

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YARA ENFEKSİYONU ETKENİ
ÇOKLU DİRENÇLİ BAKTERİLERE KARŞI
FOTODİNAMİK AJANLARIN
ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİ

Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı

Doktora Tezi

Ayşe AKBIYIK

DANIŞMANLAR

Doç. Dr. Hüseyin TAŞLI
Yrd. Doç.Dr. Nermin TOPALOĞLU AVŞAR

İZMİR
(2017)

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YARA ENFEKSİYONU ETKENİ
ÇOKLU DİRENÇLİ BAKTERİLERE KARŞI
FOTODİNAMİK AJANLARIN
ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİĞİ

Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı

Doktora Tezi

Ayşe AKBIYIK

DANIŞMANLAR

Doç. Dr. Hüseyin TAŞLI
Yrd. Doç.Dr. Nermin TOPALOĞLU AVŞAR

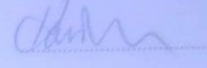
İZMİR
(2017)

DEĞERLENDİRME KURULU ÜYELERİ

(Adı Soyadı)

(İmza)

Başkan : Doç.Dr. Hüseyin TAŞLI
(Danışman)



Üye: Prof.Dr. Süleyha HİLMİOĞLU POLAT
Üye : Prof.Dr. Mine Hoşgör LİMONCU
Üye : Prof. Dr. M. Emin LİMONCU
Üye : Prof.Dr. Süheyra SÜRÜCÜOĞLU





Doktora Tezinin kabul edildiği tarih:25.12.2017

ÖNSÖZ

Tez sürecimde, özellikle yoğun deneylerde manevi desteğini esirgemeyen ve enerjimin bir kısmını bu alana aktarmama fırsat tanıyan değerli Hocam Doç. Dr. Esra AKIN KORHAN'a; sosyal hayatta ve iş hayatımda manevi desteğini esirgemeyen arkadaşım Yrd. Doç Dr. Burcu CEYLAN'a çok teşekkür ederim. Doktora eğitimimde üzerimde emeği çok olan ve hayranlık duyduğum çok değerli sayın hocalarım Prof. Dr. Şafak EMERTCAN, Prof. Dr. Mine HOŞGÖR LİMONCU, Prof. Dr. M. Emin LİMONCU, Doç. Dr. Hüseyin TAŞLI, Doç. Dr. Bayrı ERAÇ'a çok teşekkür ederim. Deneyler sırasında desteklerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Abdurrahman AYGÜL, Nur ÇOBANOĞLU ve Arş. Gör. Yamaç TEKİNTAŞ'a çok teşekkür ederim. Laboratuvarla bütünleşen ve çekinmeden yardım istediğim canım arkadaşım Emel BAKAY'a; yaz stajı sırasında, deneylerde bana eşlik eden hevesli ve başarılı ESMA YILDIZ'a ve son deneyde gece yarısına kadar süren deneye eşlik eden "bilim canavarı" Caner DİKYOL'a çok teşekkür ederim.

Tezin gerçekleştirilmesinde maddi desteği sağlayan Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Fon Saymanlığına sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Deneyde kullanılan fotosensitizanları sentezleyen sayın hocalarım Doç Dr. Vildan ALPTÜZÜN, Arş. Gör. Dr. Sülünay PARLAR'a çok teşekkür ederim.

Bu tezin gerçekleştirebilmemde büyük bir katkısı olan, "o olmasaydı biraz zor olurdu" cümlesini her defasında kullandığım, bana mesailerini harcayan ve de laboratuvarında çalıştığım sürece oraya aidiyet duygusunu hissetmemi sağlayan, yolarımızın kesişmesi noktasında şükrettiğim çok değerli danışmam hocam Yrd. Dr. Nermin TOPALOĞLU AVŞAR teşekkür ederim. Veeeeeeee son olarak, genelde şanslı olduğumu düşünmem ancak, danışmanlığının başıma gelen en iyi şeylerden birisi olduğunu gördüğüm, özellikle laboratuvar çalışmaları sırasında her imdat çağrılarımın cevap veren, her zaman çözüm odaklı olan, bilimsel açıdan baskılamaktan daha ziyade teşvik edici bir tutum sergileyen çok değerli danışman hocam Doç Dr. Hüseyin TAŞLI'ya çok teşekkür ederim.

Farmasötik Mikrobiyoloji doktora eğitimim süreci her dakikasından keyif aldığım bir tutkuydu. Tekrar teşekkür ederim.....

İzmir

Ayşe AKBIYIK

25.12.2017

ÖZET

Yara Enfeksiyonu Etkeni Çoklu Dirençli Bakterilere Karşı Fotodinamik Ajanların Antibakteriyel Etkinliği

Yaralarda kritik kolonizasyon veya enfeksiyon yaygın görülen bir problemdir. Enfeksiyon doku iyileşmesi geciktirmenin yanı sıra derin dokulara ilerleyip, osteomyelit, bakteriyemi, sepsis gibi ciddi komplikasyonların gelişmesine de neden olmaktadır. Bu araştırmada yara enfeksiyonu etkeni çoklu ilaç dirençli bakterilere karşı fotodinamik ajanların antibakteriyel etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırmada çoklu ilaç dirençli (ÇİD) metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*-MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatları kullanıldı. Araştırmada fotosensitizan olarak literatürde yer almayan sentezini gerçekleştirildiğimiz P_M, P_E, P_{PN} ve P_{PL} olarak isimlendirdiğimiz yeni katyonik porfirin türevleri (KPT); ışık kaynağı olarak bilgisayar kontrollü 655-nm dalga boyunda 41,5 mW'lık çıkış gücüne sahip diyot lazer kullanıldı. Araştırmada, ÇİD klinik izolatları üzerinde farklı KPT konsantrasyonları (3,125-650 µM) ve farklı enerji dozları (25-150 J/cm²) kombinasyonları ile gerçekleştirilen antimikrobiyal fotodinamik tedavi (antimicrobial photodynamic therapy-aPDT) deneylerinde her bir ÇİD klinik izolatında $\geq 99,9999$ değerlere varan sağkalım azalması saptandı. Çalışmada enerji dozu yükseltildikçe fotoianktivasyon etkinliğinin arttığı, en iyi etkinin 150 J/cm² enerji dozunda görüldüğü belirlendi. ÇİD klinik izolatlarına karşı en iyi antimikrobiyal etki P_{PL}'nin kullanıldığı aPDT'lerde görülürken, antimikrobiyal etkinliğinin en düşük olduğu fotosensitizan türünün P_M olduğu saptandı. Araştırmamızda minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin altındaki konsantrasyonlarda KPT türevleri ile gerçekleştirilen aPDT'lerin ÇİD yara enfeksiyon etkenlerine karşı güçlü bir antimikrobiyal etkinlik gösterme potansiyelinde olduğu sonucuna ulaşıldı. KPT türüne göre ÇİD izolatlarının duyarlılıklarındaki farklılıkların araştırılması için ileri analizlerin yapılması, maksimal düzeyde antimikrobiyal etki gösteren aPDT parametrelerinin canlı hücre üzerindeki toksisitesinin *in vivo* koşullarda araştırılması önerilmektedir.

Anahtar kelimeler: Yara enfeksiyonları; çoklu ilaç direnci; antimikrobiyal fotodinamik tedavi; katyonik porfirin türevleri

ABSTRACT

The antibacterial activity of photodynamic agents against multidrug resistant bacteria causing wound infection

Critical colonization or infection of wound are a widespread problem. In addition to delaying tissue healing, infection also progresses to deep tissues leading to the development of serious complications such as osteomyelitis, bacteremia, and sepsis. In this study, it was aimed to investigate the antibacterial activity of photodynamic agents against multidrug-resistant (MDR) bacteria which affect wound infection. MDR clinical isolates of methicillin-resistant *S.aureus* (MRSA), *P.aeruginosa*, *E. coli*, *A.baumannii* and *K.pneumoniae* were used in the study. In the research, novel cationic porphyrin derivatives (CPD) named P_M, P_E, P_{PN} and P_{PL} as photosensitizer which are synthesized by us and not included in the literature; a diode laser with a computer controlled 655-nm wavelength output power of 41.5 mW as the light source were used. In the study, aPDT experiments with combinations of the different concentrations CPD (3,125-650 μM) and different energy doses (25-150 J/cm^2) a survival reduction of up to ≥ 99.9999 values in each MDR clinical isolate was detected. In the study has been determined that the efficacy of photoinactivation parallel to the increase in energy dose increased and the best effect is seen at the energy dose of 150 J/cm^2 . The best antimicrobial effect against MDR clinical isolates was seen in the aPDTs using P_{PL}, while the lowest antimicrobial activity of the photosensitizer derivative was found to be P_M. In our study, aPDT performed with CPD derivatives at concentrations below the minimum inhibitory concentration (MIC) values have the potential to show a strong antimicrobial activity against MDR wound infection agents. It is recommended in this study, further investigation is needed to investigate the differences in the susceptibility of MDR isolates according to type of CPD, and *in vivo* conditions of the toxicity on living cells of the aPDT parameters showing maximal antimicrobial effect.

Keywords: Wound infections; multidrug resistant; antimicrobial photodynamic therapy; cationic porphyrin derivatives

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

ÖZET	I
ABSTRACT	II
ÇİZELGE DİZİNİ	V
KISALTMA ve SEMBOLLER DİZİNİ	IX
BÖLÜM I	
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	
1.1. Problemin Tanımı.....	1
1.2.Araştırmanın Amacı.....	2
1.3.Araştırmanın Önemi.....	3
1.3. Araştırmanın Sınırlılıkları.....	5
1. 5. Genel Bilgiler	
1.5.1. Yara ve Yara İyileşme Süreci.....	6
1.5.2. Yara Enfeksiyonları, Yara Enfeksiyonlarının Patogenezi ve Epidemiyolojisi.....	8
1.5.3. Yara Enfeksiyonlarının Tedavisinde Yaşanan Sorunlar.....	10
1.5.4. Antimikrobiyal Fotodinamik Tedavi.....	12
BÖLÜM II	
2. MATERYAL VE YÖNTEM	
2.1. Deneyde Kullanılan Bakteri Suşları.....	20
2.2. Deneyde Kullanılan Fotosensitizanlar.....	22
2.3. Deneyde Kullanılan Lazer Cihazı ve Optik Düzenek.....	25
2.4. Fotoinaktivasyon.....	26
BÖLÜM III	
3. BULGULAR	
3.1. Katyonik Porfirin Türevlerinin Antimikrobiyal Etkinlikleri.....	28
3.2. Fotoinaktivasyonun Klinik İzolatlar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği.....	30
3.2.1. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli MRSA Klinik İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği.....	30
3.2.2. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli <i>Escherichia coli</i> Klinik	37
	III

İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği.....	
3.2.3. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Klinik İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği.....	43
3.2.4. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli <i>Klebsiella pneumoniae</i> Klinik İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği.....	50
3.2.5. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli <i>Acinetobacter baumannii</i> Klinik İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği.....	56
3.2.6. Aynı Enerji Dozunda Farklı Fotosensitizan Konsantrasyonları İle Gerçekleştirilen Fotoinaktivasyonun Klinik İzolatlar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği.....	66
3.2.6.1. 50 J/cm ² Enerji Dozunun Kullanıldığı Fotoinaktivasyon.....	66
3.2.6.2. 100 J/cm ² Enerji Dozunun Kullanıldığı Fotoinaktivasyon.....	68
3.2.6.3. 150 J/cm ² Enerji Dozunun Kullanıldığı Fotoinaktivasyon.....	70
BÖLÜM IV	
4. TARTIŞMA	72
BÖLÜM V	
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	82
KAYNAKLAR	83
ÖZGEÇMİŞ	97

ÇİZELGELER DİZİNİ

Şekil No	Sayfa No
1. Yara iyileşme süreci.....	7
2. aPDT'nin etki mekanizması.....	13
3. Dalga boyuna göre kromofor absorpsiyonu.....	14
4. Işık dalga boyları ve doku girginliği.....	15
5. Porfirin türevlerinin açık kimyasal formülü.....	22
6. Yeni Katyonik Porfirin Türevleri'nde ışık absorpsiyonu.....	24
7. Lazer düzeneği	26
8. P _M 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (MRSA-1).....	30
9. P _M 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD MRSA-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	31
10. P _E 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (MRSA-1).....	32
11. P _E 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD MRSA-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	32
12. P _{PN} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (MRSA-1).....	33
13. P _{PN} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD MRSA-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	34
14. P _{PL} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (MRSA-1).....	34
15. P _{PL} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD MRSA-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	35
16. P _M 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>E.coli</i> -1).....	37
17. P _M 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>E.coli</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	38
18. P _E 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>E.coli</i> -1).....	38
19. P _E 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>E.coli</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	39
20. P _{PN} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>E.coli</i> -1).....	40
21. P _{PN} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>E.coli</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği	40
22. P _{PL} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>E.coli</i> -1).....	41

23. P _{PL} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>E.coli</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	42
24. P _M 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>P.aeruginosa</i> -1)	43
25. P _M 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>P.aeruginosa</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	44
26. P _E 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>P.aeruginosa</i> -1).....	44
27. P _E 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>P.aeruginosa</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	45
28. P _{PN} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>P.aeruginosa</i> -1).....	46
29. P _{PN} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>P.aeruginosa</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	46
30. P _{PL} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>P.aeruginosa</i> -1).....	47
31. P _{PL} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>P.aeruginosa</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği	48
32. P _M 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>K. pneumoniae</i> -1)...	50
33. P _M 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>K. pneumoniae</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	51
34. P _E 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>K. pneumoniae</i> -1).....	51
35. P _E 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>K. pneumoniae</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği	52
36. P _{PN} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>K. pneumoniae</i> -1)...	53
37. P _{PN} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>K. pneumoniae</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği	53
38. P _{PL} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>K. pneumoniae</i> -1)...	54
39. P _{PL} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>K. pneumoniae</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	55
40. P _M 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>A.baumannii</i> -1).....	56
41. P _M 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>A.baumannii</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	57
42. P _E 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>A.baumannii</i> -1).....	57
43. P _E 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>A.baumannii</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	58
44. P _{PN} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>A.baumannii</i> -1)	59

45. P _{PN} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>A.baumannii</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	59
46. P _{PL} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (<i>A.baumannii</i> -1).....	60
47. P _{PL} 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD <i>A.baumannii</i> -1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	61
48. 50 J/cm ² enerji dozunun kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD klinik izolatlar üzerindeki antimikrobiyal etkinliği	67
49. 100 J/cm ² enerji dozunun kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD klinik izolatlar üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	69
50. 150 J/cm ² enerji dozunun kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD klinik izolatlar üzerindeki antimikrobiyal etkinliği.....	71



Tablo No	Sayfa No
1. Yara bakteri ilişkisi.....	8
2. Kanıt düzeyleri.....	11
3. Çoklu ilaç dirençli klinik izolatların antibiyotik duyarlılıkları.....	21
4. KPT'nin standart suşlar ve klinik izolatlar üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri.....	29
5. aPDT'nin ÇİD MRSA klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği.....	36
6. aPDT'nin ÇİD <i>E.coli</i> klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği.....	43
7. aPDT'nin ÇİD <i>P.aeruginosa</i> klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği.....	49
8. aPDT'nin ÇİD <i>K. Pneumoniae</i> klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği.....	55
9. aPDT'nin ÇİD <i>A. baumannii</i> klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği.....	63

KISALTMA ve SEMBOLLER DİZİNİ

¹O₂: Tekil Oksijen

aPDT: Antimicrobial Photodynamic Therapy (Antimikrobiyal Fotodinamik Tedavi)

cfu: Colony Forming Unit (Koloni Oluşturan Birim)

CLSI: Clinical & Laboratory Standards Institute

ÇİD: Çoklu İlaç Dirençli

DMF: Dimetilformamid

DNA: Deoksi Ribo Nükleik Asit

DSÖ: Dünya Sağlık Örgütü

EGF: Epidermal growth factor

ESBL: *Extended-Spectrum Beta-Lactamase* (Genişlemiş Spektrumlu Beta-Laktamaz)

FGF: Fibroblast growth factors

H₂O₂: Hidrojen Peroksit

IGF-1: Insulin-like growth factor 1

IL-6: Interleukin 6

İTK: İnce Tabaka Kromatografisi

J: Joule

K: Kontrol

L: Lazer

LED: Light Emitting Diode (Işık Yayan Diyot)

MHB: Mueller Hinton Broth

MİK: Minimal İnhibisyon Konsantrasyonu

ml: Mililitre

MMP: Matrix Metalloproteinaz (Matris Metalloproteinaz)

MRSA: Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (Metisiline Dirençli *Staphylococcus aureus*)

MSSA: Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (Metisiline Duyarlı *Staphylococcus aureus*)

N: Azot

nm: Nanometre

O₂: Moleküler Oksijen

O₂⁻: Süperoksit

OH: Hidroksil

PBS: Phosphate-Buffered Saline (Fosfat Tampon Salin)

PDGF: Platelet-derived *growth factor*

PDI: Fotodinamik İnaktivasyon (Photodynamic İnactivation)

PDT: Photodynamic Therapy (Fotodinamik Tedavi)

PPIX: Protoporphyrin IX

PS: Fotosensitizan (Photosensitizer)

ROS: Reactive Oxygen Species (Reaktif Oksijen Türleri)

TGF- α : Transforming growth factor alpha

TGF- β : Transforming growth factor beta

TNF- α : Tumor Necrosis Factor-alpha (TNF-alpha)

TSA: Triptik Soy Agar

TSB: Triptik Soy Broth

KPT: Katyonik Porfirin Türevleri

μ g: Mikrogram

μ M: Mikromolar

μ mol: Mikromol

BÖLÜM I

1. GİRİŞ

1.1. Problemin Tanımı

Cerrahi alan enfeksiyonları, yanık yaraları, diyabetik ayak, venöz bacak ve basınç ülserleri gibi kronik yaralar olmak üzere yaralarda kritik kolonizasyon veya enfeksiyon yaygın görülen bir problem olup, yarada gelişen yüzeysel enfeksiyon doku iyileşmesini geciktirmesinin yanı sıra derin dokulara ilerleyip morbidite ve mortalite artışı ile yakın ilişkili osteomyelit, bakteriyemi, sepsis gibi ciddi komplikasyonların gelişmesine de neden olmaktadır (1–3). Enfekte yaralardaki bakteri profillerinin incelendiği çalışmalarda, güçlü bir biyofilm tabakası oluşturabilen çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Esherishia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, Koagülaz negatif stafilokoklar, *Acinetobacter baumannii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella* spp. yanı sıra peptostreptokoklar, *Bacteriodes fragilis*, *Clostridium* spp. gibi anaerobik bakterilerin izole edildiği bildirilmektedir (2,4–12).

Multidisipliner bir yaklaşımı gerektiren enfekte yaraların tedavisinde lokal yara bakımının sağlanarak yaradaki mikrobiyal kolonizasyonun azaltılması kilit noktadır (8,13,14). Günümüzde ilgili rehberler ve uzmanlar tarafından mikrobiyal yükün azaltılması veya enfeksiyonun giderilmesi amacıyla gümüş sülfadiazin, nitrofurazon, gümüş salınımlı yara örtüleri gibi antimikrobialler önerilmekle birlikte, bu antimikrobiallerin yara iyileşmesindeki etkinliği sınırlı kalmaktadır (8,15,16). Mikroorganizmaya karşı non-selektif özellikteki bu antimikrobiallerin canlı hücrelerini hedef alıp lokal ve sistemik yan etkiler geliştirebileceği; iki haftadan daha uzun süre kullanılmaları halinde yara yatağındaki epitelizasyon ve granülasyon dokusuna zarar verebileceği; gümüş bileşikler gibi bazı topikal antimikrobiallerin sınırlı doku penetrasyonu gösterip, derin dokulardaki enfeksiyonun giderilmesinde etkinliklerinin sınırlı kalabileceği bildirilmektedir (15,17,18). Enfekte yaraların yüzeyinde gelişen biyofilm tabakası immün sistemi hücrelerinin ve ürettikleri antimikrobiyal maddelerin bölgeye penetrasyonunu engellemekle birlikte, eksternal uygulanan bu antimikrobiallerin difüzyonunu da engellemesi yara tedavisinde sorun yaratan diğer bir durumdur. Ek olarak, günümüzde enfekte yara tedavisinde sorun yaşanmasının diğer bir nedeni de yaradan izole edilen *S.aureus*, *E. coli*,

P.aeruginosa, *A. baumannii*, *P. mirabilis*, *Klebsiella* spp. *P.aeruginosa* gibi bakterilerdeki çoklu ilaç direncidir (19). Nitekim, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 27 şubat 2017'de yayınladığı bildirmede, gösterdikleri çoklu ilaç direnci nedeniyle insan sağlığını tehdit eden, yeni antimikrobiyallere veya antibiyotiklere ihtiyaç duyulan bakteri listesinde, enfekte yaralardan sıklıkla izole edilen karbapenem dirençli *A. baumannii*, *P.aeruginosa*, karbapenem dirençli ve genişlemiş spektrumlu beta-laktamaz (Extended-Spectrum Beta-Lactamase-ESBL) üreten *Enterobacteriaceae* ailesi gibi bakterileri öncelikli sırada ve kritik seviyede ele alınmıştır (20).

Enfekte yaraların tedavisinde yaşanan bu problem ve bakteriyal direnç noktasında global örgütler tarafından alarm düzeyindeki bu çağrılar, araştırmacıları non-toksik özellikte, direnç geliştirme potansiyeli taşımayan, güçlü antimikrobiyal etkinlik gösterebilen alternatif tedavi seçenekleri üzerinde yoğunlaşmalarına zemin hazırlamıştır. Günümüzde yara iyileştirilmesinde trombosit kökenli büyüme faktörleri gibi büyüme faktörleri, elektriksel stimülasyon, lazer, infrarent, ultraviyole gibi fototerapi, darbeli elektromanyetik alan gibi elektromanyetik alanlar, doğrudan temasla elektriksel stimülasyon, yüksek frekanslı ultrason, negatif basınçla yara tedavisi, hiperbarik oksijen tedavisi, biyolojik yara örtüleri gibi yardımcı tedaviler önerilmekle birlikte, mevcut kanıtlar bu tedavi yaklaşımlarının rutin kullanımda önerilebilmesi için yeterli olmadığı bildirilmektedir (8). Son yıllarda, alternatif yaklaşımlardan biri olan antimikrobiyal fotodinamik tedavi (antimicrobial photodynamic therapy-aPDT) ÇİD suşlarının neden olduğu lokalize enfeksiyonların tedavisindeki potansiyeli yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (20–37).

1.2.Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada yara enfeksiyonu etkeni çoklu ilaç dirençli bakterilere karşı fotodinamik ajanların antibakteriyal etkinliğinin araştırılması amaçlanmıştır. Araştırma hedefleri;

- ÇİD klinik izolatları üzerinde toksik etki veya biostimülant etki yaratmayan ışık enerji dozu aralığının saptanması,
- ÇİD klinik izolatları üzerinde toksik etki veya biostimülant etki yaratmayan fotosensitizan konsantrasyonu aralığının saptanması (Her bir fotosensitizan için),

- ÇİD klinik izolatlarında maksimal düzeyde etki edebilecek antimikrobiyal fotodinamik tedavi parametrelerinin belirlenmesi,
- Elde edilen antimikrobiyal fotodinamik tedavi parametreleri ile yapılacak deney tekrarlarından aynı veya anlamlı düzeyde farklılık göstermeyen sonuçlara ulaşılmasıdır.

1.3. Araştırmanın Önemi

Sağlık bakım kurumlarında yaygın görülen enfekte yaraların zamanında etkin tedavisi ve bakımı enfeksiyon kaynaklı mortalite ve morbidite oranlarının azaltılması ve maliyetin düşürülmesi, işyükünün azaltılması açısından son derece önemlidir (1,2,36). Ancak, günümüzde enfekte yaraların tedavisi ve bakımında non-toksik, yara iyileşmesindeki etkinliği kanıtlanmış antiseptik veya antimikrobiyal ürünün bulunmaması enfekte yaraların bakımı ve tedavisinde aPDT uygulaması gibi alternatif yaklaşımların ortaya çıkmasına zemin hazırlamıştır (20–37).

aPDT gram pozitif ve gram negatif bakteri, maya ve mantar gibi patojen mikroorganizmaların yok edilmesinde umut vaat eden yeni bir stratejidir. İlaç dirençli suşların ortaya çıkmasına katkıda bulunmaksızın bakterileri öldürebilen aPDT'nin geleneksel antibiyotik tedavisine göre avantajlar sağlayabileceği düşünülmektedir (38). aPDT toksik olmayan boya veya fotosensitizan (Photosensitizer-PS) ve fotosensitizanı uyaran düşük yoğunlukta zararsız görülebilir ışık kombinasyonu kullanılarak, mikrobiyal hücreleri öldürme prensibine dayanan bir tedavi metodudur (39–41). aPDT, Tip I ve Tip II olmak üzere iki farklı yoldan gerçekleşen kimyasal ve fiziksel tepkimler sonucunda oluşan reaktif türler ile bakteri DNA'sı ve sitoplazma membranında hasar oluşturarak, bakteri membranındaki transport sistemlerini ve enzimlerini inaktive ederek antimikrobiyal etkinliğini gösterir (39,41–46). Bakteri içine absorpsiyonun maksimal düzeyde gerçekleştiği bir fotosensitizanın ve bu fotosensitizanı aktive eden uygun dalga boyundaki ışık kombinasyonu ile uygulanacak aPDT, bakterilerin oluşturduğu biyofilm tabakasının yapısını bozup, yüzeyde kolonize olan ÇİD suşları da dahil birçok bakteriye karşı antimikrobiyal etki gösterme potansiyeline sahiptir (47–49). Bugün, ÇİD bakterilere karşı maksimal düzeyde antimikrobiyal etki gösterebilen fotosensitizanın keşfedilme çabaları halen devam etmekle birlikte, ÇİD klinik izolatları üzerinde gerçekleştirilen

in vitro ve *in vivo* aPDT deneylerinde porfirin türevlerinin bu etkiyi yakalayabilme potansiyelinde olduğu bildirilmektedir (22,47,49–59).

Porfirinler dört pirol halkasının metilen (–HC=) köprüleri ile bir birine bağlanmasıyla oluşan makrohalkalı aromatik moleküllerdir (60). Hemoglobinin ve miyoglobinin yapısında bulunan demir-PPIX veya “hem (Fe²⁺PPIX)/hemin (Fe³⁺PPIX)” bileşiği oksijenazların, peroksitlerin ve katalazların ko-faktörü rollünün yanısıra oksijen bağlanması, nitrik oksit sentetazlar ve sitokromlarda elektronların transferi gibi önemli biyolojik süreçlere katılmaktadır (60–63). Demir-PPIX bileşiklerin kullanılması bazı gram negatif ve pozitif bakteriler için önemli bir virülans özellik olup, bu bakterilerde hem alım mekanizmaları mevcuttur. Araştırmalarda, doğal yada porfirin-selüloz-nanokristaller veya antibiyotik gibi konjugatların kullanıldığı porfirin analoglarının Fe²⁺PPXI-alım mekanizmalarını ile bakteri içerisine rahatlıkla nüfus ettiği bildirilmektedir (64–67).

Diğer fotosensitizantlarda olduğu gibi gram pozitif bakteriler üzerinde oldukça güçlü antimikrobiyal etkinlik gösterebilen nötral yapıdaki porfirinlerin gram negatif bakterilere karşı etkinliği hücre duvarı yapısı itibariyle sınırlıdır (68,69). Nötral yapıdaki porfirinlere polimiksin B nonapeptid, CaCl₂, EDTA gibi gram negatif bakterilerin dış membranında hasar oluşturacak ajanların kombine edilmesi ile gram negatif bakterilerde antimikrobiyal etkinlik elde edilebileceği bildirilmektedir. Katyonik özellik kazandırılmış porfirinlerin, ilave bir permeabilizasyon ajan bulunmadan gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvarında hasar oluşturarak, hücre içine nüfuz edebildiği vurgulanmaktadır (68–72). Katyonik yapıdaki porfirinlerin antimikrobiyal etkinliğini tip II reaksiyon mekanizması ile gösterdikleri belirtilmektedir. Işıkla uyarılmış katyonik özellikteki porfirinler enerjilerini moleküler oksijene aktarması sonucunda oluşan tekil oksijen (¹O₂) hücre duvarında ve hücre membranında bulunan fosfolipitler, peptidler ve steroller gibi yapılarla reaksiyona girerek hücre ölümüne neden olduğu, yanısıra tetra-p-tosilat tuzu (TMP) [5,10,15,20-tetrakis (1-metil-piridino) -21H, 23H-porfin] gibi katyonik porfirinlerin, iplikçik kırılması ile sonuçlanan DNA baz çiftleri arasına enterkalasyon yaparak, DNA hasarına yol açtığı bildirilmektedir (48,57,68,69,73).

Katyonik porfirin türevlerinin epitel ve fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitenin incelendiği aPDT deneylerinde, TMPyP'nin NIH 3T3 (Fare embriyonik fibroblast hücresi hattı) ile birlikte 24 saatlik inkübasyonunda hücre toksisitenin,

konsantrasyon miktarıyla ilişkili olduğu; düşük konsantrasyonlarda (0.5-1 μ mol/L) hücrelerde sitotoksik etki yaratan H₂O₂'in daha az oranda üretiminin gerçekleştiği, yüksek konsantrasyonda (100 μ mol/L) fibroblast hücrelerinin %85'nin ölümüne neden olan H₂O₂ üretimi gerçekleştiği tespit edilmiştir (74). *P. aeruginosa* suşlarında %99.999'luk azalma sağlayan porfirin klorit (TriP [4])'in [5-fenil-10,15,20-tris (N-metil-4-piridil)] insan cilt fibroblastlarında %78.9'luk azalmaya neden olabildiği bildirilmiştir (75). İnsan cilt fibroblast hücreleri üzerinde TMPyP ve TPPS [5,10,15,20-tetrakis-(4-sülfonatofenil) -21H, 23H-porfin] 'nin fotoaktivasyonu sonucunda oluşan tekil oksijen (¹O₂)'nin mikrosaniyelik ömrü olduğu, bu ömrün üretildiği hücrede difüze olmasına ancak yettiği bildirilmekte olup ve fotoaktivasyon sonucunda oluşan ¹O₂'nin yalnızca lokalize etki gösterebileceği vurgulanmaktadır (76).

Canlı hücre dokusuna zarar vermeksizin maksimal düzeyde geniş spektrumlu antimikrobiyal etkinlik gösterebilen ve enfekte yaraların iyileşme sürecindeki enflamasyon, proliferasyon, matürasyon fazlarına olumlu katkılar sağlayabilen aPDT iyileşmeyen enfekte yaraların bakımı ve tedavisinde iyi bir seçenek gibi görünmektedir. Bu araştırmada, sentezini gerçekleştirdiğimiz, literatürde yer almayan yeni katyonik porfirin türevleri ile gerçekleştirilen aPDT uygulamasının, enfekte yaraların iyileşmesine katkıda bulunması, hasta konforunu yükseltmesi, hasta yatış sürelerini kısaltması, tedavi ve bakım maliyetini düşürmesi gibi avantajlar sağlayabileceği öngörülmektedir.

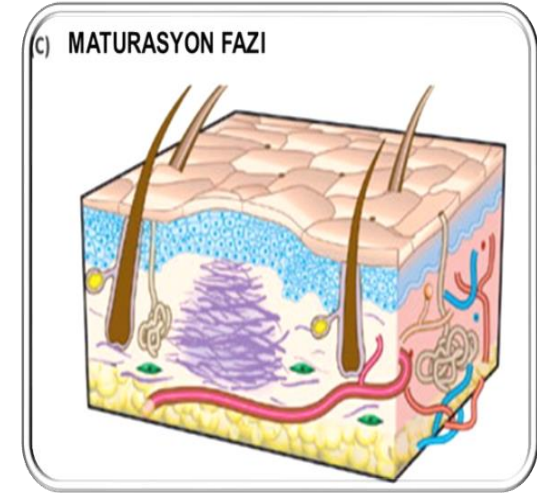
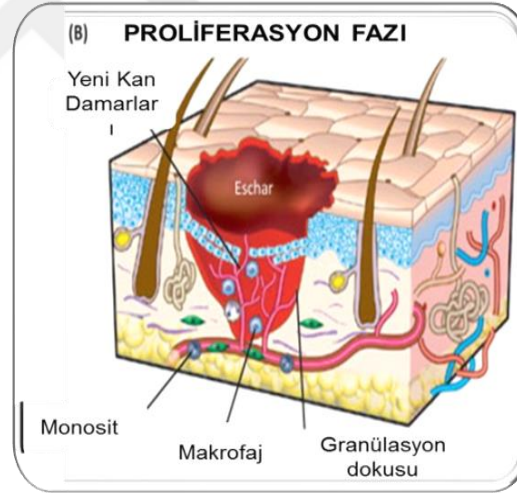
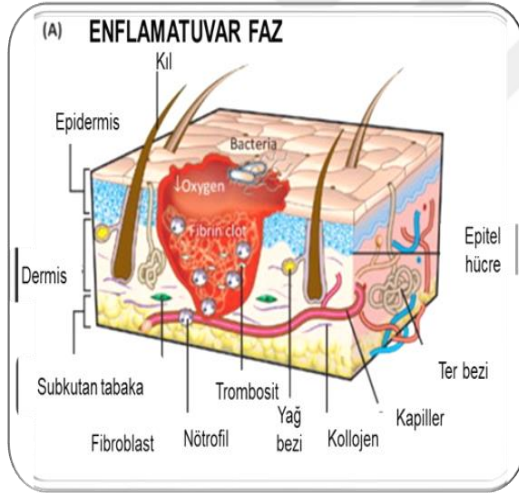
1.4. Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırmada, yeni Katyonik Porfirin Türevleri (KPT) ile gerçekleştirilen aPDT'nin antimikrobiyal etkinliğine karşı klinik izolatların duyarlılığındaki farklılıkların nedenlerinin araştırılması bütçe kısıtlılığı nedeniyle yapılamamıştır. Ek olarak, araştırmanın bir diğer sınırlılığı güçlü antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT parametrelerinin canlı hücre üzerindeki toksisitenin araştırılmasının bütçe yetersizliğinden dolayı yapılamamasıdır.

1.5. Genel Bilgiler

1.5.1. Yara ve Yara İyileşme Süreci

Akut cerrahi alan yaraları, kaza veya travma sonrasında gelişen travmatik yaralar, yanık yaraları, diyabetik ayak, venöz bacak ve basınç ülserleri gibi kronik yaralar olmak üzere geniş çeşitlik gösteren yara, doku bütünlüğünün bozulması ya da tahrip olması şeklinde tanımlanabilir (3,77). Yara iyileşmesi, kan hücreleri, epitel ve bağ dokusu hücreleri, hücre dışı matris ve çeşitli hücre medyatörlerin yer aldığı dinamik ve karmaşık bir süreçtir. Süreç genel olarak enflamasyon, granülasyon dokusunun oluşumu ve maturasyon evrelerinden oluşur (12). İlk evrede trombositler ve kan proteinleri, geçici ekstraselüler matriks işlevi gören ve kanamayı durduran fibrin tıkaçını oluşturur. Bu durum, farklı kemoatraktanların aktivasyonu ile nötrofil, monosit, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin kan pıhtısına doğru göçünü başlatır. Bu hücreler yarada bulunan bakterileri, hücre kalıntılarını, dokuya yabancı partikülleri fagositoz yolu ile temizler. Ayrıca yara bölgesine göç eden immün sistem hücreleri, çevre doku hücrelerini etkileyerek ikinci evre olan granülasyon dokusu oluşumunu başlatacak bazı büyüme faktörlerini salgırlar. Yara bölgesine çekilen fibroblastlar daha fazla hücre proliferasyonunu, büyümesini, doku oksijenizasyonunu ve beslenmesini sağlayacak yeni damarlar oluşmasını ve yeni bir ekstraselüler matriks üretimini gerçekleştirir. Bu süreçte epidermal hücrelerin proliferasyonu ve yara bölgesine göçü sonucunda reepitelizasyon oluşur. Son faz olan maturasyon veya yeniden şekillenme sürecinde dokuda kollajen oluşumundan sorumlu fibroblastların etkisi ile yarada kasılmalar meydana gelir (Şekil 1) (12,78).



- Hemostaz: Vazokontraksiyon oluşumu, trombosit tıkaçı ve fibrin tıkaçı gerçekleşir.
- Enflamasyon: Trombositlerden salınan IGF-1, TGF- α ve TGF- β , PDGF vb. Sitokinler nötrofilleri, fibroblastları, geç dönemde (yara oluşumundan sonraki 24-48 saat) makrofajları yara bölgesine çeker.
- Makrofajlar tarafından hücre proliferasyonu, matris sentezi, anjiogenzi düzenleyen TGF- β , IGF-1, EGF vb. sitokinlerin salınımı gerçekleşir.

- Kemotattik faktör PDGF sayesinde fibroblast göçü
- Kolojen sentezi
- Anjiogenez ve epitelizasyon artışı

- Sentezlenen kolojenin yeniden düzenlenmesi
- Serin proteaz ve Matris Metallo Proteazlar tarafından kolojen yıkımı
- Kolojen yapımı ve yıkımı arasında denge hakim
- Enflamatuvar hücrelerinde azalma

Şekil 1. Yara iyileşme süreci (IGF-1 Insulin-like growth factor 1; TGF- α : Transforming growth factor alpha TGF- β : Transforming growth factor beta; EGF: Epidermal growth factor; PDGF: Platelet-derived growth factor)

1.5.2. Yara Enfeksiyonları, Yara Enfeksiyonlarının Patogenezi ve Epidemiyolojisi

Yarada sağlam derinin oluşturduğu primer savunma bozulur, patojen ve fırsatçı patojenler yara yüzeyine yerleşir. Yara ve bakteri arasındaki bu etkileşim kontaminasyon, kolonizasyon, kritik kolonizasyon ve enfeksiyon olmak üzere dört seviyede gerçekleşir (Tablo 1). Konak yanıtın gelişmesine ve enflamatuvar reaksiyonların başlamasını sağlayacak düzeyde bakteri kolonizasyonu (kritik kolonizasyon olarak da adlandırılır; 10^5 cfu/gr doku) veya yara bölgesinde gelişen enfeksiyon doku iyileşme sürecini bozar ve doku toksisitesine neden olur (1,2).

Kontaminasyon	Bakterinin çoğalmadan yara bölgesinde bulunmasıdır.
Kolonizasyon	Bakterinin yara bölgesinde doku hasarı oluşturmaksızın çoğalmasıdır.
Kritik kolonizasyon	Enfeksiyonun klasik klinik semptomları oluşturmaksızın bakterinin yara içinde üreyerek yara iyileşmesini olumsuz yönden etkilemesidir.
Enfekte yara	Bakterinin doku hasarı ve kızarıklık, ısı artışı, ağrı, şişlik ve eksuda artışı gibi klinik enfeksiyon semptomlarının oluşmasıdır.

Özellikle yanık yaraları, diyabetik ayak, venöz bacak ve basınç ülserleri gibi kronik yaralar olmak üzere yaralarda kritik kolonizasyon veya enfeksiyon yaygın görülen bir problem olup (1,2), prevelans çalışmalarına göre kronik yara gelişen hastaların yaklaşık dörtte üçünde kritik kolonizasyon ve/veya enfeksiyon meydana geldiği bildirilmektedir (2,81). Yarada kritik kolonizasyon veya enfeksiyon gelişmesi durumunda yara iyileşme sürecinin aşamaları olan enflamasyon, proliferasyon ve maturasyon süreçlerinin normal seyri sekteye uğrar. Yara bölgesinde enflamatuvar süreci hakim olur ve proliferasyon süreci başlamaz (12,78). Bu durumda, salgıladıkları serbest radikaller, sitolitik enzim ve enflamatuvar medyatörlerle, patojen ve konak doku hücrelerinde hasar oluşumuna neden olan nötrofillerin yara yatağına sürekli akışı gerçekleşir. Yara bölgesinde toplanan lökositler, ürettikleri enflamatuvar medyatörlerle fibroblastları, epitel hücreleri etkilemekle birlikte, enflamatuvar hücreleri de etkileyerek yaranın enflamatuvar fazının devam etmesine katkıda bulunur. Ek olarak, iyileşmeyen yaralarda ağırlıklı olarak nötrofiller tarafından matris metalloproteinaz (matrix metalloproteinases-MMP) enziminin yüksek miktarlarda üretiminin gerçekleşmesi söz konusudur. MMP enzimi yara bölgesindeki ölü dokuyu temizlemekle birlikte, yüksek oranda MMP salgısının yara iyileşme

sürecini bozulmasına katkı sağladığı düşünülmektedir. Yaradaki pro-enflamatuvar maddeler ve inhibitörler arasındaki dengenin bozulması, takibinde ekstraselüler matriks oluşumunun gerilemesi, hücre göçünün azalması, fibroblast proliferasyonunda ve kollajen sentezinde düşüş gerçekleşir ve yara daha da kronikleşir (82,83). Ek olarak, özellikle kronik yaralarda olmak üzere yara bölgesinde yetersiz doku perfüzyonu, travma ya da ödem yaranın iyileşme sürecini daha da baskılar. Yetersiz perfüzyon dokularda hipoksi gelişmesi, takibinde hücre ölümü ve doku nekrozu gelişmesi ile sonuçlanır. Yara bölgesindeki bu değişimler mikroorganizmaların yara bölgesinde daha fazla üremelerine ve kolonize olmalarına zemin hazırlar (1,2,83). Yara bölgesinde kolonize olan bakterilerin ürettikleri toksik maddeler, konak bağışık yanıtta rol alan nötrofil gibi enflamatuvar hücrelerin konak dokuda daha fazla hasara yol açacak sitotoksik enzimleri, oksijen radikalleri ve enflamatuvar medyatörleri salgılamalarına neden olur. Oluşan kısır döngü, yaranın iyileşme sürecinin daha da bozulmasına ve yüzeyde bulunan enfeksiyonun derin dokulara ilerleyip, mortaliteyle yakın ilişkili osteomyelit, bakteriyemi, sepsis gibi ciddi komplikasyonların gelişmesine, ayrıca hasta bakımı harcamalarında ciddi oranlarda artışlara neden olur (12,83,84).

Enfekte yaralardaki bakteri profillerinin incelendiği çalışmalarda, güçlü bir biyofilm tabakası oluşturabilen ve çoklu ilaç direnci gösterebilen *S.aureus*, *E.faecalis*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, koagülaz negatif stafilokoklar, *A. baumannii*, *P.mirabilis*, *Klebsiella* spp. yanı sıra peptostreptokoklar, *Bacteriodes fragilis*, *Clostridium* spp. gibi anaerobik bakterilerin izole edildiği bildirilmektedir (2,4–12). Cerrahi alan enfeksiyonu şüphesi nedeniyle 129 sürüntü örneğinin incelendiği bir çalışmada en yaygın görülen etkenin *S.aureus* (%50,32) olmakla birlikte takibinde *P.aeruginosa* (%16,30), *E.coli* (%14,32), *K.pneumoniae* (%11,76) ve diğer gram negatif basillerin (%5,80), *S.pyogenes* (%1,30)'in yer aldığı saptanmıştır (85). Venöz bacak ülserleri, ayak ülserleri gibi kronik yarası olan 213 hastadan alınan 217 sürüntü örneklerinin incelediği bir çalışmada 28 bakteri türünün izole edildiği, örneklerin %27,1'inin polimikrobiyal olduğu bildirilmektedir. Bu çalışmada en yaygın izole edilen bakteri türlerinin *S.aureus* (%37), *P.aeruginosa* (%17), *P. mirabilis* (%10), *E. coli* (%6) *Corynebacterium* spp. (5%)'ni yer alması ve izolatların ÇİD olması dikkat çekmektedir (9). Selülit, cerrahi alan, nekrotizan fasiit, abse, diyabetik ayak, gibi ülserleri de kapsayan cilt ve yumuşak doku enfeksiyonlarının epidemiyolojisinin

incelendiği bir araştırmada, enfekte yaraların %15,4'ünün polimikrobiyal özellikte olduğu, enfeksiyon etkenleri arasında ilk sırayı MRSA, takibinde *Streptococcus* spp., *Proteus* spp. ve diğer *Enterobacteriaceae* üyeleri, *P.aeruginosa*'nın yer aldığı belirlenmiştir. Akers ve arkadaşları (2014) iyileşmeyen inatçı enfekte yaraların %97'sinin biyofilm oluşturan klinik izolatlarla yakından ilişkili olduğunu ve çoğu izolatın çoklu ilaç direnci paterni gösterdiğini tespit etmişlerdir (86). Benzer şekilde Gjødsebøl ve arkadaşları (2006) iyileşmeyen enfekte yaralardan çoğunlukla *S.aureus* (%93.5), *P.aeruginosa*, (%71.7), koagulaz negatif sitafilakok (%45.7), *Proteus* spp. (%41.3), anaerobik bakterilerin (%39.1) kaynaklık ettiğini, enfekte yaraların çoğunun polimikrobiyal olduğunu, enfekte yaraların tümünde dirençli bakteri türlerinin identifiye edildiğini saptamışlardır. Bakteriyal direncin yara iyileşmesini önemli ölçüde etkilediği bu çalışmada saptanan önemli sonuçlardan bir diğeridir (87).

1.5.3. Yara Enfeksiyonlarının Tedavisinde Yaşanan Sorunlar

Multidisipliner bir yaklaşımı gerektiren enfekte yaraların tedavisinde lokal yara bakımının sağlanarak yaradaki mikrobiyal kolonizasyonun azaltılması kilit noktadır (8,13,14). Günümüzde ilgili rehberler ve uzmanlar tarafından mikrobiyal yükün azaltılması veya enfeksiyonun giderilmesi amacıyla asetik asit, klorheksidin, hidrojen peroksit, iyot, potasyum permanganat, poliheksametilen biguanid, triklosan gibi antiseptikler; gümüş sülfadiazin, nitrofurazon gibi topikal antimikrobiyaller; antimikrobiyal özelliği olan gümüş salımlı, ballı ve aljinatlı yara örtüleri önerilmektedir (8,15,16). Önerilen bu antimikrobiyaller enfekte yaraların iyileştirmede başarılı sonuçlar doğursa da yara iyileşmesindeki kanıt düzeyleri henüz tanımlanmamıştır (8,15,16). Bununla birlikte antimikrobiyallerin enfekte yaraların bakımı ve tedavisinde kullanımlarını sınırlandıran bir takım sorunlar mevcuttur. Mikroorganizmaya karşı selektif özellik göstermeyen bu antimikrobiyallerin canlı hücrelerini hedef alıp lokal ve sistemik yan etkiler geliştirebileceği; iki haftadan daha uzun süre kullanılmaları halinde yara yatağındaki epitelizasyon ve granülasyon dokusuna zarar verebileceği; gümüş bileşikleri gibi bazı topikal antimikrobiyallerin sınırlı doku penetrasyonu gösterip, derin dokulardaki enfeksiyonun giderilmesinde etkinliklerinin sınırlı kalabileceği bildirilmektedir (15,17,18). Enfekte yaraların yüzeyinde gelişen biyofilm tabakası adı verilen, yüzeyde kolonize olan bakterilerin

çevresini saran ve bakterileri birbirine bağlayan mukoid ekzopolimersakkarid matrix tabakası, immün sistemi hücrelerinin ve ürettikleri antimikrobiyal maddelerin bölgeye penetrasyonunu engellemekle birlikte, eksternal uygulanan bu antimikrobialların difüzyonunu da engellemesi yara tedavisinde sorun yaratan diğer bir durumdur. Ek olarak, günümüzde enfekte yaraların tedavisinde sorun yaşanmasının diğer bir nedeni de yaradan izole edilen bakterilerin çoklu ilaç direnci göstermesi ve hatta ÇİD *S.aureus*, *E.coli*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *P. mirabilis*, *Klebsiella* spp. *P.aeruginosa* gibi bakterilerde yaşanan “mevcut tüm antibiyotiklere direnç” yani “pan-ilaç direnci (pan-drug-resistant-PDR)” dir (19). Nitekim, Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) 27 şubat 2017’de yayınladığı bildirmede, gösterdiği çoklu ilaç direnci nedeniyle insan sağlığını tehdit eden, yeni antimikrobiallere veya antibiyotiklere ihtiyaç duyulan bakteri listesinde, enfekte yaralardan sıklıkla izole edilen karbapenem dirençli *A.baumannii*, *P.aeruginosa*, karbapenem dirençli ve ESBL üreten *Enterobacteriaceae* ailesi gibi bakterileri öncelikli sırada ve kritik seviyede ele alınmıştır (20). Enfekte yaraların tedavisinde yaşanan bu problem ve bakteriyal direnç noktasında global örgütler tarafından alarm düzeyindeki bu çağrılar, araştırmacıları toksik olmayan, direnç geliştirme potansiyeli taşımayan, güçlü antimikrobiyal

etkinlik gösterebilen alternatif tedavi seçenekleri üzerinde yoğunlaşmalarına zemin hazırlamıştır. Günümüzde yara iyileştirilmesinde trombosit kökenli büyüme faktörleri gibi büyüme faktörleri (kanıt gücü=B),

Tablo 2. Kanıt düzeyleri (8)

Kanıt Gücü A	Bu öneri, kronik yarası bulunan bireylerde doğru planlanmış ve yapılmış, kılavuz önerileri istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarla tutarlı bir biçimde desteklenen klinik vaka serilerinden elde edilen bilimsel kanıtlarla doğrudan desteklenmektedir. Açık ve belirgin sonuçlu geniş ölçekli randomize çalışma(lar).
Kanıt gücü B	Bu öneri, kronik yarası bulunan bireylerde doğru planlanmış ve yapılmış, kılavuz önerileri istatistiksel olarak anlamlı sonuçlarla tutarlı bir biçimde desteklenen klinik vaka serilerinden elde edilen bilimsel kanıtlarla doğrudan desteklenmektedir.
Kanıt gücü C	Bu öneri, dolaylı (örn. sağlıklı gönüllülerde, farklı kronik yarası bulunan bireylerde, hayvan çalışmalarında) kanıtlar ve / veya uzman görüşleri tarafından desteklenmektedir.

elektriksel stimülasyon (Kanıt Gücü= C), lazer, infrarot, ultraviyole gibi fototerapi (Kanıt Gücü= C), darbeli elektromanyetik alan gibi elektromanyetik alanlar (Kanıt Gücü= C), doğrudan temasla elektriksel stimülasyonu (Kanıt Gücü= A; iyileştirmeye

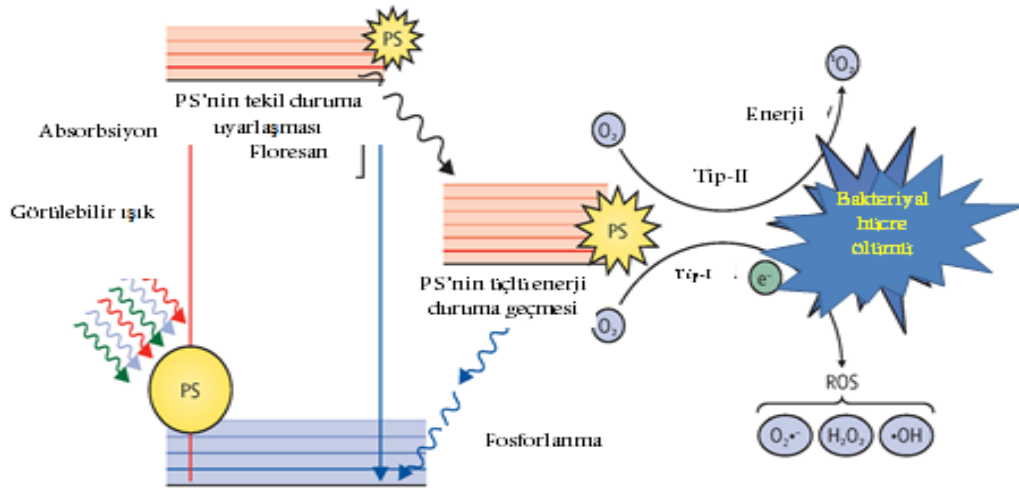
yardımcı ancak, mikrobiyal yükü azaltmaz), yüksek frekanslı ultrason (Kanıt Gücü= C), negatif basınçla yara tedavisi (Kanıt Gücü= C), hidroterapi (Kanıt Gücü= C), hiperbarik oksijen tedavisi (yeterli kanıt yok), biyolojik yara örtüleri (kanıtlar yetersiz) gibi yardımcı tedaviler önerilmekle birlikte, mevcut kanıtlar bu tedavi yaklaşımlarının rutin kullanımda önerilebilmesi için yeterli olmadığı bildirilmektedir (Tablo 2) (8). Son yıllarda, alternatif yaklaşımlardan biri olan antimikrobiyal fotodinamik tedavi (antimicrobial photodynamic therapy-aPDT) ÇİD suşlarının neden olduğu lokalize enfeksiyonların tedavisindeki potansiyeli yoğun bir şekilde araştırılmaktadır (20–37).

1.5.4. Antimikrobiyal Fotodinamik Tedavi

Fotodinamik tedavi (PDT)'nin geçmişi 1901 yıllara dayanmaktadır. aPDT, doktora öğrencisi Oscar Raab'ın mikroskopik inceleme için akridin turuncusu (acridine orange) ile boyanan *Paramecium spp.* hücrelerinde gün ışığına maruz kalan tarafta ölüm gerçekleştiği, ancak karanlık alandaki hücrelerin canlılığını koruduklarının fark etmesi ile keşfedilmiştir. 1970'li yıllarda PDT'nin kanserde kullanımı gündeme gelmiş olup, 1995'de FDA (Food and Drug Administration) tarafından porfirin türevi boyaların bazı kanser türlerinde kullanımı onaylanmıştır. PDT ülkemiz de dahil bir çok ülkede maküler dejenerasyon (sarı nokta) göz hastalıklarında yaygın olarak kullanım görmektedir. Günümüzde ise PDT'nin iyileşmeyen lokalize enfekte yaraların tedavisinde alternatif olma potansiyeli üzerinde yoğun çabalar harcanmaktadır (41). aPDT veya fotodinamik inaktivasyon (Photodynamic inactivation-PDI), gram pozitif ve gram negatif bakteri, maya ve mantar gibi patojen mikroorganizmaların yok edilmesinde umut vaat eden yeni bir stratejidir. İlaç dirençli suşların ortaya çıkmasına katkıda bulunmaksızın bakterileri öldürebilen aPDT'nin geleneksel antibiyotik tedavisine göre avantajlar sağlayabileceği düşünülmektedir (38).

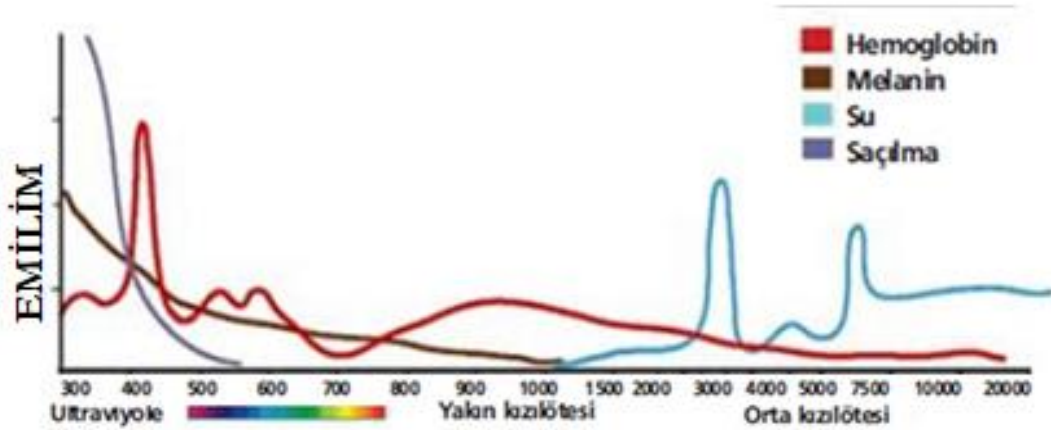
aPDT toksik olmayan boya veya fotosensitizan (Photosensitizer-PS) ve fotosensitizanı uyaran düşük yoğunlukta zararsız görülebilir ışık kombinasyonu kullanılarak, mikrobiyal hücreleri öldürme prensibine dayanan bir tedavi metodudur (41,88,89). aPDT, bakteri DNA'sı ve sitoplazma membranında hasar oluşturarak, bakteri membranındaki transport sistemlerini ve enzimlerini inaktive ederek antimikrobiyal etkinliğini gösterir. aPDT'nin mikrobisidal etki mekanizması iki tip

reaksiyonla gerçekleşir. Uygun dalga boyunda ışık maruziyeti takibinde, ışığı absorbe eden PS tekil duruma uyarılır. Tekil duruma uyarlanmış PS daha düşük enerjili ve daha uzun ömürlü üçlü enerji durumuna geçer. Uyarılmış üçlü PS iki farklı yoldan moleküler oksijen ile reaksiyona girebilir. Tip I reaksiyonda, üçlü enerji safhasındaki PS hücrelerdeki organik substrat ile reaksiyona girmesi ile güçlü reaktif özellikte serbest radikaller oluşur. Serbest radikallerin, dokudaki endojen moleküler oksijen (O_2) ile tepkimeye girmesi sonucunda hücre membranının bütünlüğüne zarar veren, geri dönüşümsüz biyolojik hasar oluşturan süperoksit (O_2^-), hidroksil radikalleri (OH^{\cdot}), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species-ROS) meydana gelir. Tip II reaksiyonunda ise üçlü enerji safhasına geçen PS, moleküler oksijenle tepkimeye girerek, enerjisini moleküler oksijene transfer eder ve tekil oksijen açığa çıkar (1O_2) (Şekil 2). Yüksek reaktif özellikteki tekil oksijen (1O_2) birçok biyolojik substrat ile etkileşime girerek, hedef bölgede oksidatif hasar oluşumunu indükler. Tekil oksijen (1O_2) fotooksidasyon işleminin primer sitotoksik ajanıdır. Yaklaşık 0.04 mikrosaniyelik ömrü olan ve 0.02 mikrometrelik alanda etki edebilen tekil oksijen (1O_2), bu özelliği itibariye aPDT'nin, uygulandığı alanın uzağındaki sağlıklı doku ve hücrelerde toksik etki yaratma ihtimalini ortadan kaldırır (41,39,90,44,43,46,42).

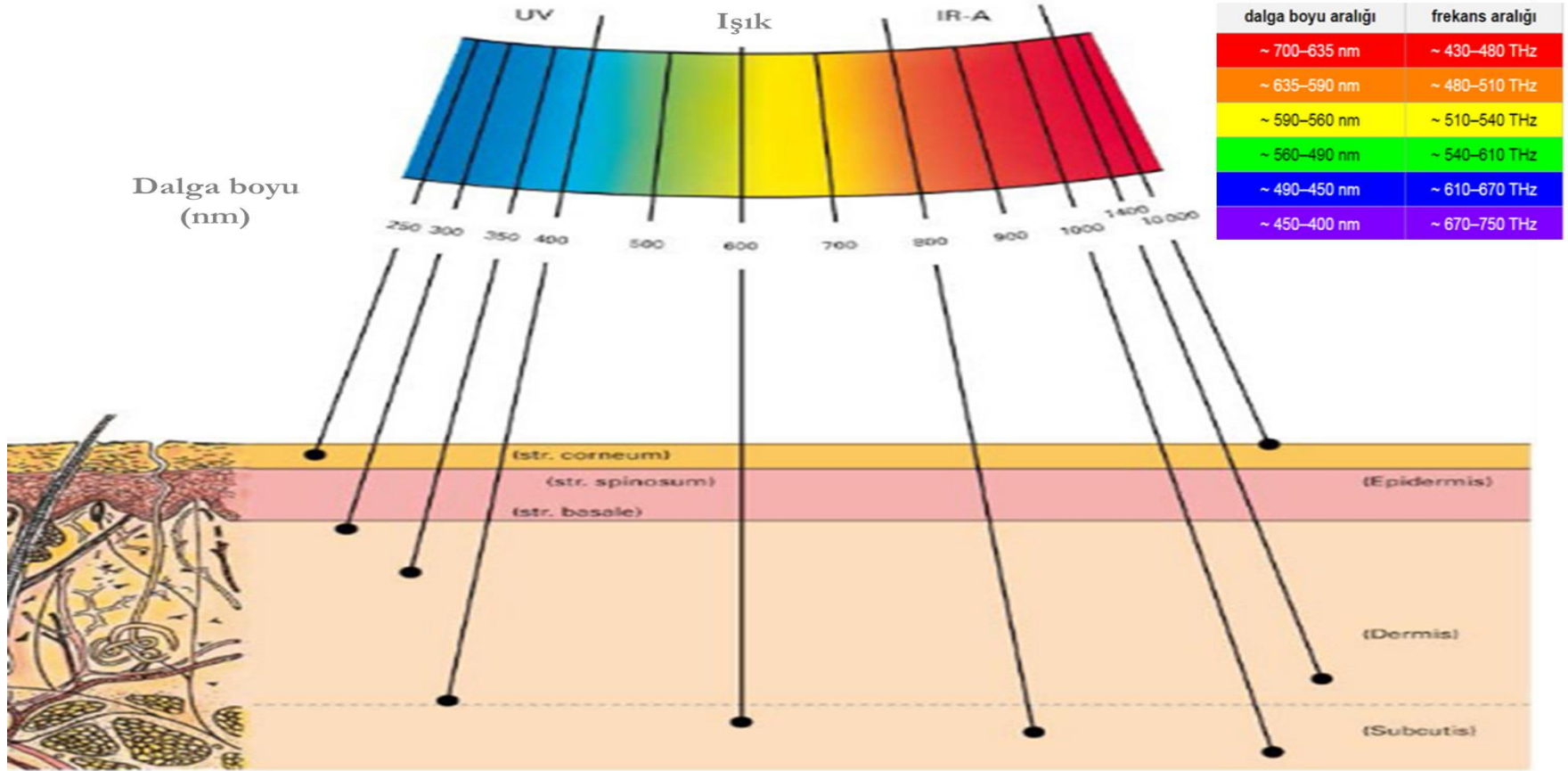


Şekil 2. aPDT'nin etki mekanizması

Bugüne kadar farklı ışık kaynakları ve PS kombinasyonları kullanılarak aPDT'nin antimikrobiyal etkinliği çeşitli mikroorganizmalar üzerinde değerlendirilmiştir. aPDT'de PS aktivasyonu sağlayabilecek uygun dalga boyunda, düşük kuvvette, zararsız, dokudaki girginliği fazla olan ışığa ihtiyaç vardır. Şuana kadar yapılan aPDT deneylerinde fotoinktivasyon amacıyla Nd:YAG, Er:YAG, tulium, helyum-neon, indiyum-galyum-alüminyum-fosfit, galyum-alüminyum-arsenit, arsenit diyot veya diyot gibi lazerler; ışık yayan diyot (Light Emitting Diode-LED), halojen lambalar, xenon lambalar gibi lazer dışı görülebilir ışık kaynakları kullanılmıştır (35,68,70,91–100,50,54,101,51,102–104). aPDT kullanılan ışığın doku penetrasyonu, dalga boyuna göre değişim göstermektedir. ~650 nm dalga boyuna sahip ışık kaynağı 3,0-3,5 mm doku giriginli sağlarken, yakın kızıl ötesi ışığın doku giriginliği ~6 mm'ye ulaşmaktadır (Şekil 4) (96,97,50,101,51,102,104,45). Ayrıca ışının dokulara geçişi, ışığın dağılımı ve ışığın absorpsiyonu olmak üzere iki mekanizma tarafından belirlenir. Işın 600 nm'nin altındaki daga boylarında dağılır ve bu dağılım oksihemoglobinin, melanin gibi endojen kromoforlar tarafından ışık absorpsiyonu gerçekleşmesine neden olurken, 900 nm dalga boyundan daha büyük olması su absorpsiyonunu arttırmakta ve doku penetrasyonu azalmaktadır (Şekil 3) (105).



Şekil 3. Dalga boyuna göre kromofor absorpsiyonu



Şekil 4. Işık dalga boyları ve doku girginliği

aPDT’de bir diğere önemli komponent de PS’dir. Araştırmacılar canlı hücrelerine toksik etki göstermeyen, sadece ışıkla aktive olabilen, belirli bir dalga boyunu soğurma kapasitesi yüksek, lokal uygulamalarda etkisini kaybetmeyen, karanlık toksisitesi düşük olan, maksimal düzeyde antimikrobiyal etkinlik gösterebilen PS bulma çabası içindedirler (90). aPDT deneylerinde toluidin mavisi, metilen mavisi, nil mavisi, fitalosiyeninler, klorin türevleri, indosiyenin yeşili, porfirin ve türevlerinin de yer aldığı birçok PS’nin etkinliği gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde test edilmiştir. Araştırmalarda gram negatif ve gram pozitif bakterinin aPDT’ye karşı duyarlılıklarının farklılıklar gösterdiği, bu farklılığın PS’nin yük durumundan ve bakteri hücre duvarı yapısından kaynaklandığı bildirilmektedir. Çalışmalarda, gram pozitif bakterilerde etkili bir antimikrobiyal etki için aPDT’de nötral ya da anyonik özellikte PS’nin kullanılması gerektiği, dış membranı itibariyle güçlü bir negatif yüke sahip olan gram negatif bakterilerde aynı etkiyi yaratmak için PS’ye katyonik özellik kazandırılması gerektiği bildirilmektedir (96,97,100,54,51,106,107,73,64,108,59,109–113). Bugün, özellikle ÇİD gram negatif ve gram pozitif bakterilere karşı antimikrobiyal etki gösterebilen PS’nin keşfedilme çabaları halen devam etmekle birlikte, *in vitro* ve *in vivo* koşullarda gerçekleştirilen aPDT deneylerinde katyonik özellik kazandırılan porfirin türevlerinin bu etkiyi yakalayabilme potansiyelinde olduğu bildirilmektedir (22,106,111,114–116,58,117–121).

Porfirinler dört pirol halkasının metilen (–HC=) köprüleri ile bir birine bağlanmasıyla oluşan makrohalkalı aromatik moleküllerdir (60). Doğadan izole edilebilen ve laboratuvarında sentezlenebilen formları mevcuttur (122,67). Doğal porfirinler ağırlıklı olarak 2- ve 4- pozisyonlarında vinil grupları, 6- ve 7- pozisyonlarında propiyonil grupları ve dört pozisyonlarında metil grupları bulunan protoporfirin IX (PPIX)’dan türemiş olup, hayvanların vücut sıvıları ve dışkıları, yumurta kabukları, kuşların tüyleri gibi doğal ortamlardan sıklıkla izole edilebilmektedir (67). Porfirin halka sistemindeki pirol halkalarının N (azot) atomlarına magnezyum (klorofil), nikel (faktör F430), kobalt (vitamin B12), bakır (turasin), demir (hem ve sirohem), manganez (Mn-PPIX) ve çinko (Zn-PPIX) içeren metal iyonlarının bağlanmasıyla metaloporfirinler oluşur. Demir-PPIX ve magnezyum-PPIX bileşikleri doğadaki en yaygın ve en önemli enzim kofaktörleri arasında yer alan metaloporfirinlerdir. Hemoglobinin ve miyoglobinin yapısında

bulunan demir-PPIX veya “hem (Fe^{2+} PPIX)/hemin (Fe^{3+} PPIX)” bileşiği oksijenazların, peroksitlerin ve katalazların ko-faktörü rollünün yanısıra oksijen bağlanması, nitrik oksit sentetazlar ve sitokromlarda elektronların transferi gibi önemli biyolojik süreçlere katılmaktadır (60,122,67,63,61,123). Demir-PPIX bileşiklerin kullanılması bazı gram negatif ve pozitif bakteriler için önemli virülans özelliğidir. *Corynebacterium diphtheriae*, *S.aureus*, *Streptococcus pneumoniae* ve *Mycobacteriae* spp. gibi gram pozitif bakteriler; *Serratia marcescens*, *Neisseriae*, *Hemophilus* spp., *Helicobacter pylori*, *Vibrio* spp., *Porphyromonas gingivalis*, *Plesiomonas shigelloides*, *Bacteroides fragilis*, *Yersinia* spp., *Legionella pneumophila*, *Shigella dysenteriae*, *E.coli*, *Rhizobium* spp., *K.pneumoniae*, *P.mirabilis*, *Pseudomonas* spp. ve *Aeromonas* spp.’de dahil gram negatif bakteriler Fe^{2+} PPIX (hem)-alım mekanizmaları ile konak vücut sıvıları ve dokularındaki serbest Fe^{2+} PPIX’u ve Fe^{2+} PPIX’in bağlı olduğu hemoglobin, miyoglobin, sitokrom proteinlerini, katalaz ve peroksidaz enzimlerini demir elde etmek için kullanırlar. Gram negatif bakterilerde hem reseptörü kompleksi, TonB ve ExbBD proteinleri; gram pozitif bakterilerde sitoplazmik zar içerisinde bulunan hem-spesifik bağlanma ve taşıma proteinleri ile bakteri içerisine alınan Fe^{2+} PPIX, Fe^{2+} PPIX oksijenaz benzeri enzimler olan HmuO ve HemO tarafından parçalanarak biliverdin (okside bilürubin) demir ve karbon monoksit ayrıştırılır (67,124,125,62,126). Bakteri içerisine alınan Fe^{2+} PPXI’un oksitlenmesi sonucunda oluşan Fe^{3+} PPXI (hemin) bakteride toksik etki yaratır. Fe^{3+} PPXI antimikrobiyal etkinliğini Fe^{2+} PPXI (hem)-peroksidaz benzeri aktivite ile (H_2O_2 varlığında) ve monooksijenaz benzeri aktivite ile (oksijen ve indirgeme maddesinin varlığını gerektirir) gösterdiği bildirilmektedir (127–129).

Araştırmalarda, doğal yada porfirin-selüloz-nanokristaller veya antibiyotik gibi konjugatların kullanıldığı porfirin analoglarının Fe^{2+} PPXI-alım mekanizmalarını ile bakteri içerisine rahatlıkla nüfus ettiği (64,67,65,66); elektronları aktarma, peroksidaz ve oksidaz reaksiyonlarını katalizleme, fotonları absorbe etme, ROS üretimi gibi bir takım biyokimyasal süreçlere bağlı olarak antimikrobiyal etkinlik gerçekleştiği tespit edilmiştir. Porfirin veya porfirin analoglarının ROS üretimi ile çeşitli hücre içi bileşenlerinde hasar oluşturma; lipid peroksidasyonu ile hücre membranında hasar oluşturma; interlokasyon veya oksidatif kırılma ile DNA’da hasar oluşturma kabiliyetinde olduğu bildirilmektedir (122,67,65,130,131). Diğer

PS'lerde olduğu gibi gram pozitif bakteriler üzerinde oldukça güçlü antimikrobiyal etkinlik gösterebilen nötral yapıdaki porfirinlerin gram negatif bakterilere karşı etkinliği hücre duvarı yapısı itibariyle sınırlıdır (68,69). Nötral yapıdaki porfirinlere polimiksin B nonapeptid, CaCl₂, EDTA gibi gram negatif bakterilerin dış membranında hasar oluşturacak ajanların kombine edilmesi ile gram negatif bakterilerde antimikrobiyal etkinlik elde edilebileceği bildirilmektedir. Katyonik özellik kazandırılmış porfirinlerin, ilave bir permeabilizasyon ajan bulunmadan gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvarında hasar oluşturarak, hücre içine nüfuz edebildiği vurgulanmaktadır (68,70,69,71,72). Katyonik yapıdaki porfirinlerin antimikrobiyal etkinliğini tip II reaksiyon mekanizması ile gösterdikleri belirtilmektedir. Işıkla uyarılmış katyonik özellikteki porfirinler enerjilerini moleküler oksijene aktarması sonucunda oluşan tekil oksijen (¹O₂) hücre duvarında ve hücre membranında bulunan fosfolipitler, peptidler ve steroller gibi yapılarla reaksiyona girerek hücre ölümüne neden olduğu, yanı sıra tetra-p-tosilat tuzu (TMP) [5,10,15,20-tetrakis (1-metil-piridino) -21H, 23H-porfin] gibi katyonik porfirinlerin, iplikçik kırılması ile sonuçlanan deoksi ribo nükleik asit (DNA) baz çiftleri arasında enterkalasyon yaparak, DNA hasarına yol açtığı bildirilmektedir (68,73,69,57,48).

Porfirin ve türevlerinin kullanıldığı aPDT deneylerinde PPIX gibi nötral porfirinler, TMPyP [5,10,15,20-Tetrakis (1-metil-4-piridinio) porfirin tetra (p-tolüensülfonat)], katyonik galaktoporfirinler, mesotetrakatyonik porfirin (T₄MPyP), katyonik antimikrobiyal peptid (KAP), magainin, buforin poly-S-lysine konjugatlarının eklenip katyonikleştirilen porfirin türevleri fotosensitizan amaçlı kullanılmıştır. Porfirin ve türevlerinin ışık absorpsiyonunun maksimal düzeyde gerçekleştiği 400 nm dalga boyunu kapsayan geniş dalga boyu aralığındaki (380-800 nm) ışık kaynağının çoğunlukla tercih edildiği bu araştırmalarda katyonikleştirilmiş porfirin türevlerinin kullanıldığı aPDT'lerin diğer fotosensitizanalara veya nötral porfirinlere göre güçlü biyofilm oluşturma yeteneğindeki dirençli gram negatif ve gram pozitif bakteriler dahil çoğu bakteriye karşı güçlü bir antimikrobiyal etkinlik gösterebileceği tespit edilmiştir (115,56,132,133). Katyonik porfirin türevlerinin epitel ve fibroblast hücreleri üzerindeki toksisitenin incelendiği aPDT deneylerinde, TMPyP'nin NIH 3T3 (Fare embriyonik fibroblast hücresi hattı) ile birlikte 24 saatlik inkübasyonunda hücre toksisitenin, konsantrasyon miktarıyla ilişkili olduğu, düşük konsantrasyonlarda (0.5-1µmol/L) hücrelerde sitotoksik etki yaratan H₂O₂'nin daha

az oranda üretiminin gerçekleştiği, yüksek konsantrasyonda (100 µmol/L) fibroblast hücrelerinin %85'nin ölümü ile sonuçlanan H₂O₂ üretimi gerçekleştiği tespit edilmiştir (74). İnsan cilt fibroblast hücreleri üzerinde TMPyP ve TPPS [5,10,15,20-tetrakis-(4-sülfonatofenil) -21H, 23H-porfin] 'nin fotoaktivasyonu sonucunda oluşan tekil oksijen (¹O₂)'nin mikrosaniyelik ömrü olduğu, bu ömrün üretildiği hücrede difüze olmasına ancak yettiği bildirilmekte olup ve fotoaktivasyon sonucunda oluşan tekil oksijenin (¹O₂) yalnızca lokalize etki gösterebileceği vurgulanmaktadır (76).

aPDT geniş spektrumlu antimikrobiyal etkinlik göstermesi, gözardı edilecek düzeyde doku toksisitesine neden olması, çoklu tedavilerde bile fotorezistans gelişiminin olmaması, kolay ulaşılabilirliği, maliyetinin düşük olması itibariyle iyileşmeyen ÇİD bakteri kaynaklı lokalize enfeksiyonların tedavisinde iyi bir seçenek gibi görünmektedir (41,104,134,53,135). Ayrıca, *in vivo* çalışmalarda aPDT geleneksel antibiyotiklerin aksine fibroblastlarda ve epitel hücrelerinde proliferasyon sağlayarak iyileşme sürecini hızlandırdığı bildirilmektedir (53,136–139). Non-invaziv bir metot olan aPDT uygulamasının, lokalize yara enfeksiyonlarının iyileşmesine katkıda bulunması, hasta konforunu yükseltmesi, hasta yatış sürelerini kısaltması, tedavi ve bakım maliyetini düşürmesi, uygulama süresi kısa ve kolay uygulanabilir özelliğinden ötürü sağlık personeli iş yükünü azaltması gibi avantajlar sağlayabileceği öngörülmektedir.

BÖLÜM II

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Deneyde Kullanılan Bakteri Suşları

Araştırmada antibiyotik direnç profili yönünden farklılık gösteren çoklu ilaç dirençli (ÇİD) metisiline dirençli *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae* klinik izolatları kullanıldı. Klinik izolatların izolasyonu ve antimikrobiyal duyarlıklarının değerlendirilmesi İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Araştırma kapsamına alınan bakteri suşlarının antibiyotik duyarlılık sonuçları Tablo 3'de gösterildiği gibidir.

Bakteri süspansiyonlarının hazırlanmasında, -80 °C'de muhafaza edilen stok kültürlerden alınan bakteri suşları triptik soy agar (TSA) besiyerine ekimi yapılarak 37 °C'de bir gecelik (16-18 saat) inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında tek koloni alınıp triptik soy broth (TSB) sıvı besiyerine ekimi yapılarak, 37 °C'de 16-18 saat boyunca inkübe edildi. Bakteri hücreleri santrifüjlendikten (4°C'de 10 dakika 3000 rpm) sonra oluşan pelet fosfat tampon salin (Phosphate-buffered saline-PBS)'de süspanse edilerek, yaklaşık 10^9 cfu/ml (600 nm: 0,6-0,8 optik yoğunluk) (22,36) olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı.

Tablo 3. Çoklu ilaç dirençli klinik izolatların antibiyotik duyarlılıkları

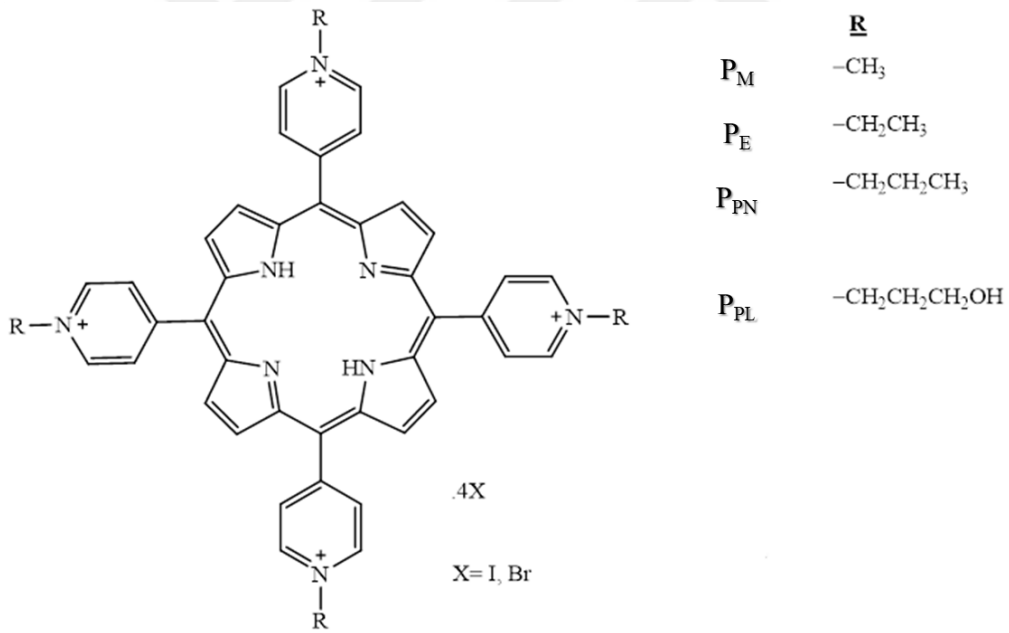
Gruplar	Antibiyotikler	Klinik İzolatlar																								
		ÇİD ¹ MRSA ²			ÇİD <i>Escherichia coli</i>		ÇİD <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				ÇİD <i>Acinetobacter baumannii</i>														ÇİD <i>Klebsiella pneumoniae</i>	
		1	2	3	1	2	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	1	2
Penisilin	Ampicilin	R	R	R	R	R																				
Sefalosporinler	Sefoksitin	R	R	R																						
	Sefuroksim				R	R																			R	R
	Seftazidim				R	R	R	R	R																R	R
	Seftriakson				R	R																			R	R
	Sefepim				R	R	R	R	R																R	R
Karbapenemler	İmipenem				I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Meropenem				R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
	Ertapenem				R	R																			R	R
Monobaktam	Aztreonam				R	R	R	R	R																R	R
β-Laktamaz İnhibitörleri	Amoksisilin Klavulanat				R	R																			R	R
	Piperacillin/Tazo bactam				R	R																				
Glikopeptidler	Vankomisin	S	S	S																						
	Teicoplanin	S	S	S																						
Aminoglikozidler	Amikasin				R	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	I	R	I	R	
	Netilmisin				R	R		R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R			
Tetrasiklinler	Tetrasiklin	R	S	S																						
Linkozamidler	Klindamisin	S	R	S																						
Sülfonamidler ve Trimetoprim	SMX ³	S	R	S	R	R					S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	R	
Kinolonlar	Ciprofloksasin	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	
Polimiksinler	Colistin				S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	

¹ Çoklu ilaç dirençli² Metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*³ Sülfametoksazol-Trimetoprim

S (Sensitive-Duyarlı); I (Intermediate resistant- Orta düzeyde duyarlı); R (Resistant-Dirençli)

2.2. Deneyde Kullanılan Fotosensitizanlar

Bu araştırmada fotosensitizan olarak, literatürde yer almayan yeni katyonik porfirin türevleri (KPT) sentezlendi. P_M, P_E, P_{PN}, P_{PL} olmak üzere dört yeni KPT'nin sentezi literatürdeki yöntemle göre Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi (140). KPT'nin sentezi şu şekilde gerçekleştirildi: 5,10,15,20-tetrakis (4-piridil) porfirin (162 mmol), çeşitli alkil halojenürler ile (2-bromoetanöl, benzil klorür, 2-feniletıl bromür, 3-fenilpropıl bromür, 64,3 mmol) susuz dimetilformamid (DMF) (20 mL) içerisinde 40 °C de manyetik karıştırıcıda ısıtılır. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat/metanol, 5:2) ile takip edilerek porfirin tamamen bitene kadar reaksiyona devam edilir ve reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım soğutulur, oluşan çökelti önce soğuk DMF ile sonra dietileter ile yıkanarak süzölür ve kurutulur. Sentezi gerçekleştirilen KPT açık kimyasal formölü şekil 5'de gösterilmiştir.



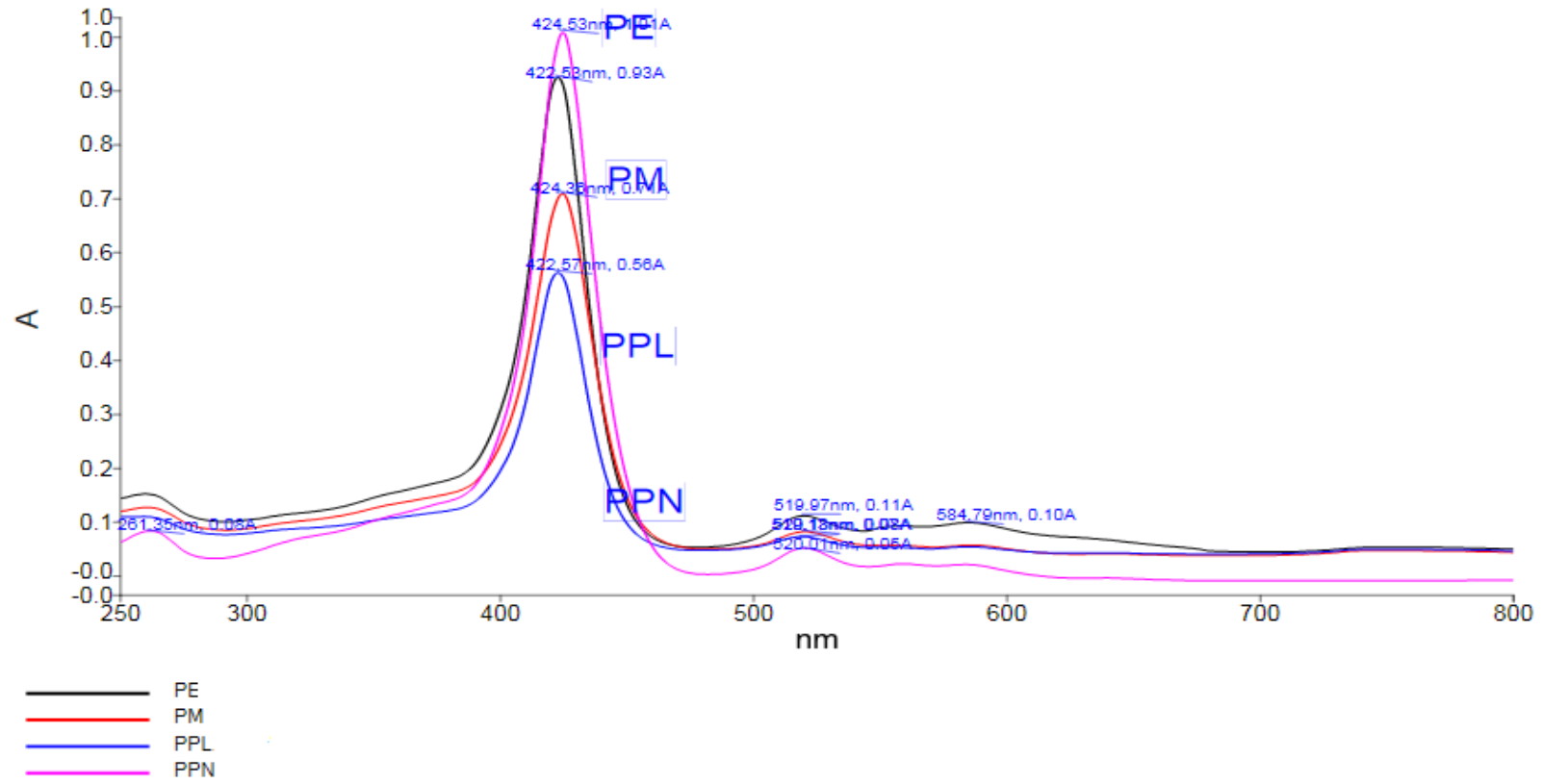
şekil 5. Porfirin türevlerinin açık kimyasal formölü

Çalışmada kullanılacak yeni KPT'nin 30 ml'lik PBS içerisinde çözünmesi sağlandı. Hazırlanan KPT çözeltileri ışık geçirmeyen alüminyum folyo ile sarılarak +4 °C sıcaklıkta muhafaza edildi. Her bir aPDT deneyi öncesinde bu çözeltilerden belirli

konsantrasyonlarda ($\mu\text{M}/\text{ml}$) taze stok solüsyonlar hazırlandı. PBS ile hazırlanan stok solüsyonlar deney sürecinde karanlık alanda muhafaza edildi.

Araştırmada yeni KPT türevlerinin ışık PS ansorbsiyonlarının değerlendirilmesi İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları-Spektroskopi Laboratuvarında değerlendirilmiş olup, absorbsiyon aralığı Şekil 6'da gösterilmiştir. Yeni KPT, 250-800 nm arasında değişim gösteren geniş bir dalga boyunu absorbe yeteneklerine sahip olup, maksimal ışık absorbsiyonu her birinde 422 ± 3 nm'dir.



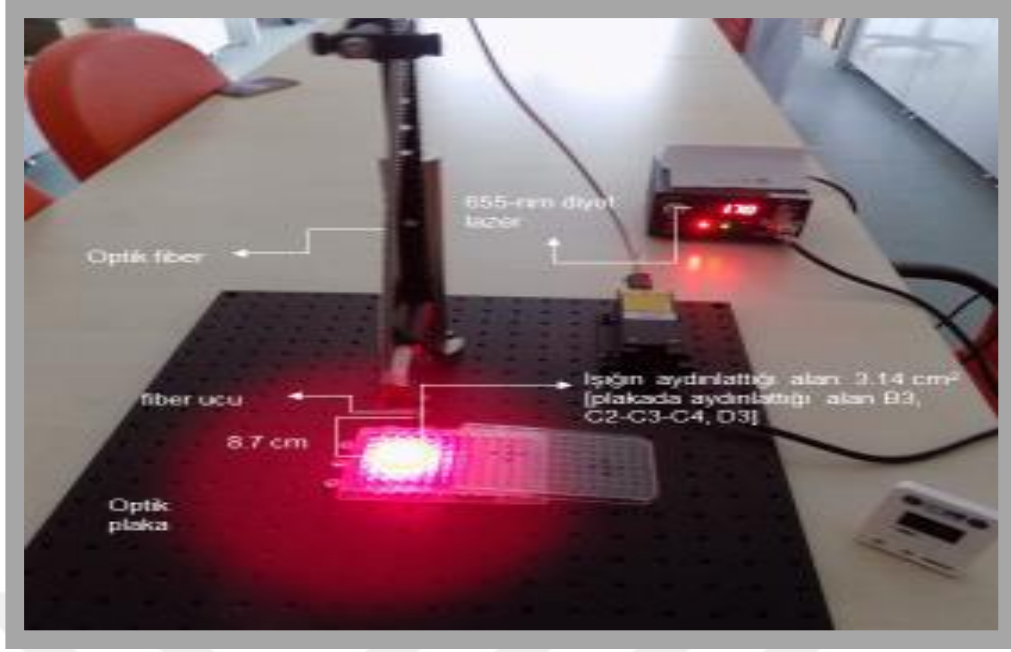


Şekil 6. Yeni Katyonik Porphirin Türevleri'nde ışık absorpsiyonu

Araştırmada, Ege Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda mikrodilüsyon metodu kullanılarak yeni KPT'nin her bir bakteri türünden tek bir ÇİD klinik izolatu üzerinde ve *S. aureus* ATCC 29213, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 standart suşları üzerindeki minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK) CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) kurallarına göre değerlendirildi. TSB içerikli bakteri süspansiyonundan 1 ml alınıp santrifüjlendikten (4 °C'de 10 dakika 3000 rpm) sonra oluşan pelet PBS'de süspense edildi. Final konsantrasyonu yaklaşık 5×10^5 cfu/ml (600 nm: 0,5) olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı. 50 µl mueller hinton broth (MHB) besiyeri, 96 kuyucuklu plakların her bir kuyucuğuna transfer edildi. 50 µl PS/antibiyotik plakların başlangıç kuyucuklarına koyularak seri dilüsyonu yapıldı [Siprofloksasinin, (64 µg/ml stok solüsyon) 16 µg/ml başlangıç konsantrasyonundan, final konsantrasyonu 0,016 µg/ml olacak şekilde iki katlık seri dilüsyonu yapıldı. Fotosensitizanlar başlangıç konsantrasyonu 5.000 µg/ml (20.000 µg/ml stok solüsyon)'den final konsantrasyonları 2,441 µg/ml olacak şekilde iki katlık seri dilüsyonları yapıldı]. Plakların her bir kuyucuğuna 50 µl bakteri süspansiyonu eklenip, plaklar 37 C °C'de 16-18 saatlik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında, bakterilerin büyümesini engelleyen en düşük bileşik konsantrasyonları hesaplanarak KPT'lerin MİK değerleri tespit edildi. Deneyler üçlü kopyalar halinde üç kere tekrar edildi.

2.3. Deneyde Kullanılan Lazer Cihazı ve Optik Düzenek

Çalışmada ışık kaynağı olarak yeni KPT'de ışık absorbsiyonunun gerçekleşebileceği (şekil 6) bilgisayar kontrollü 655-nm diyot lazer kullanıldı (PSU III.LED; Changchen New Industries optoelectronics Tech Ltd.). Optik düzenekte fiber optik, tabla üzerinde plakaya dik olarak yerleştirilmiştir. Optik plaka ile fiber ucu arasındaki mesafe 8,7 cm'dir. Işık bu mesafeden uygulandığında optik plaka üzerinde 3,14 cm²'lik bir alanı ve 96 kuyucuklu plaka üzerinde ise B3, C2-C3-C4, D3 numaralı kuyucukların aydınlatılmasını sağlamaktadır. Optik fiberlerden çıkan ışığın çıkış gücü 41.5 milliwatt (mW)'tır. İstenilen antibakteriyal etkiyi elde etmek için 41.5 mW'lık çıkış gücü belirli sürelerle bakteriler üzerinde uygulanarak optimum lazer enerji dozu belirlendi (şekil 7).



Şekil 7. Lazer düzeneği (PSU III. LED; Changchen New Industries optoelectronics Tech Ltd.)

Enerji dozu hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı.

$$\text{Işınlama süresi} \quad \left(\frac{\text{J (Joule)}}{\text{cm}^2} \right) \quad \frac{\text{Güç}}{\text{Alan}} \times \text{süre} \quad \left(\frac{\text{W (Watt)}}{\text{cm}^2} \times \text{s} \right)$$

2.4. Fotoinaktivasyon

Fotoinaktivasyon deneyleri İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Biyomedikal Optik ve Lazer Uygulamaları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Fotoinaktivasyon deneylerinde öncelikle her bir türden en dirençli klinik izolat seçilip, bu izolat üzerinde güçlü fotoinaktivasyon etkisi yaratan aPDT parametrelerinden [...joule/cm² + ...µM/ml]] oluşan kombinasyonlar belirlendi. Kombinasyonların oluşturulmasında öncelikle düşük bir enerji dozu ve düşük bir fotosensitizan konsantrasyonundan başlandı. Sonrasında enerji dozu sabit tutulup fotosensitizan konsantrasyonu kademeli olarak arttırıldı. Güçlü bir fotoinaktivasyon etkisinin görüldüğü andan itibaren enerji dozu kademeli bir şekilde arttırılıp, fotosensitizan konsantrasyonu kademeli bir şekilde düşürüldü. Deneylerde enerji dozu maksimum seviye olan 150 joule/cm²'ye kadar çıkartıldı. fotosensitizan konsantrasyonu ise fotoinaktivasyon etkisinin kaybolduğu seviyelere kadar

düşürüldü. Kullanılan klinik izolat üzerinde güçlü fotoianktivasyon etkisini yaratan kombinasyonlardan herhangi biri seçildi ve seçilen bu kombinasyonun türün diğer klinik izolatları üzerinde de benzer ya da aynı fotoianktivasyon etkinliğini sağlayıp sağlamadığı test edildi.

Deneyler, ortam ışığının fotoianktivasyon sonucunu etkilememesi için karanlık alanda gerçekleştirildi. aPDT deneyleri genel hatları ile şu şekilde gerçekleştirildi: Her bir aPDT deneyinde çalışma grupları yalnızca lazerin uygulandığı “lazer [L] grubu”, yalnızca fotosensitizanın uygulandığı “fotosensitizan [PS] grubu” her ikisinin birlikte uygulandığı “antimikrobiyal fotodinamik tedavi [aPDT] grubu” ve PBS dışında herhangi bir uygulamanın yapılmadığı “kontrol grubu [K]” olmak üzere dört gruba ayrıştırıldı. [PS], [aPDT], [L] ve [K] grubu olarak belirlenen 96 kuyucuklu plaklarının her birinin belirli kuyucuklarına bakteri süspansiyonundan 50 µl transfer edildi. [PS] ve [aPDT] grubu plaklarının bakteri bulunan kuyucuklarına spesifik konsantrasyonlarda 50 µl’lik stok süspansiyonlardan fotosensitizan eklendi. [L] ve [K] grubu plaklarının bakteri bulunan kuyucuklarına ise 50 µl PBS eklendi. Her dört grup 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. [L] ve [aPDT] grubu plakaları lazer ışığına maruz bırakıldı. Işık uygulaması sonrasında tüm gruplardaki bakteri süspansiyonları, seri dilüsyon metodu ile PBS’de seyreltildi. Seyreltilerden 100 µl allikot alınıp TSA üzerine ekilip ve 37 °C’de karanlık alanda bir gecelik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında cfu/ml’de bakteri sağkalımı hesaplandı. Her bir deney 3’lü kopyalar halinde üç kere tekrarlandı (50,111,137,141). cfu/ml’deki bakteriyel sağkalım aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$\left(N = \frac{C \times n_1 \times n_2}{V} \right)$$

- N = 1 ml’deki mikroorganizma sayısı (cfu/ml)
- C = Petri kutusundaki koloni sayısı
- V = Petri kutusuna aktarılan miktar (ml)
- n₁ = Başlangıç dilüsyon katsayısı
- n₂ = Sayımı yapılan petrinin dilüsyon katsayısı

Deneylerde tüm gruplardaki sağkalımdaki azalma aşağıda gösterildiği gibi 10 tabanında logaritmik (log₁₀) olarak hesaplandı.

Sağkalım (cfu/ml)=Kontrol grubundaki bakteri sayısı-Uygulama gruplarındaki bakteri sayısı

- [aPDT] grubu=[K]_N-[aPDT]_N
- [PS]=[K]_N -[PS]_N
- [L]=[K]_N -[L]_N

BÖLÜM III

3. BULGULAR

3.1. Katyonik Porfirin Türevlerinin Antimikrobiyal Etkinlikleri

Araştırmada, yeni KPT'nin ÇİD klinik izolatları ve standart suşlar üzerindeki MİK sonuçları Tablo 4'de gösterilmiştir. KPT'nin tek başına ÇİD klinik izolatları ve standart suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliğinin siprofloksasin ile kıyaslandığında çok düşük olduğu görüldü. KPT'nin ÇİD *E.coli* üzerindeki MİK değerlerinin 625-5000 µg/ml (850,40-5847,61 µM/ml) arasında değişim gösterdiği, PE'nin antimikrobiyal etkinliğinin diğer KPT'lere göre daha yüksek olduğu saptandı. Yeni KPT'lerin diğer klinik izolatlar üzerindeki MİK değerleri sırasıyla ÇİD MRSA-1'de 2500 µg/ml (2923,81-3682,75 µM/ml), ÇİD *P.aeruginosa*-1'de 1250->5000 µg/ml (1580,16->7365,51 µM/ml), ÇİD *K.pneumoniae*-1'de 2500->5000 µg/ml (2923,81-7365,51 µM/ml), ÇİD *A. baumannii*-1'de 1250-5000 µg/ml (1461,90-6803,18 µM/ml) arasında değişim gösterdi. Ek olarak standart suşların MİK değerlerinin ÇİD klinik izolatlarının MİK değerlerine kıyasla belirgin ölçüde düşük olduğu görüldü.

Tablo 4. KPT'nin standart suşlar ve klinik izolatlar üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri

		Standart Suşlar ve Klinik İzolatlar							
KPT ²		<i>E. coli</i> ATTC 25922 0,004-0,015 ⁵	ÇİD ¹ <i>E.coli</i> -1	<i>S.aureus</i> ATTC 29213 0,12-0,5 ⁵	ÇİD MRSA ³ -1	<i>P. aeruginosa</i> ATTC 27853 0,25-1,0 ⁵	ÇİD <i>P.aeruginosa</i> -1	ÇİD <i>K.pneumoniae</i> -1	ÇİD <i>A. baumannii</i> -1
P _M	µg/ ml	312,5	1250	2500	2500	1250	>5000	5000	2500
	µM/ ml	460,34	1841,38	3682,75	3682,75	1841,38	>7365,51	7365,51	3682,75
P _E	µg/ ml	312,5	625	625	2500	1250	5000	5000	5000
	µM/ ml	425,20	850,40	850,40	3401,60	1700,80	6803,18	6803,18	6803,18
P _{PN}	µg/ ml	78,13	1250	2500	2500	1250	1250	>5000	2500
	µM/ ml	98,77	1580,16	3160,32	3160,32	1580,16	1580,16	6320,64	3160,32
P _{PL}	µg/ ml	1250	5000	2500	2500	2500	5000	2500	1250
	µM/ ml	1461,90	5847,61	2923,81	2923,81	2923,81	5847,61	2923,81	1461,90
CİP ⁴	µg/ ml	0,016 >	2	0,125	>16	0,25	>16	>16	>16

¹ Çoklu ilaç dirençli

² Katyonik porfirin türevleri

³ Metisiline dirençli *S.aureus*

⁴ Siprofloksasin

⁵ Standart bakteriler için siprofloksasinin kabul edilebilir kalite kontrol MİK sınır değerleri

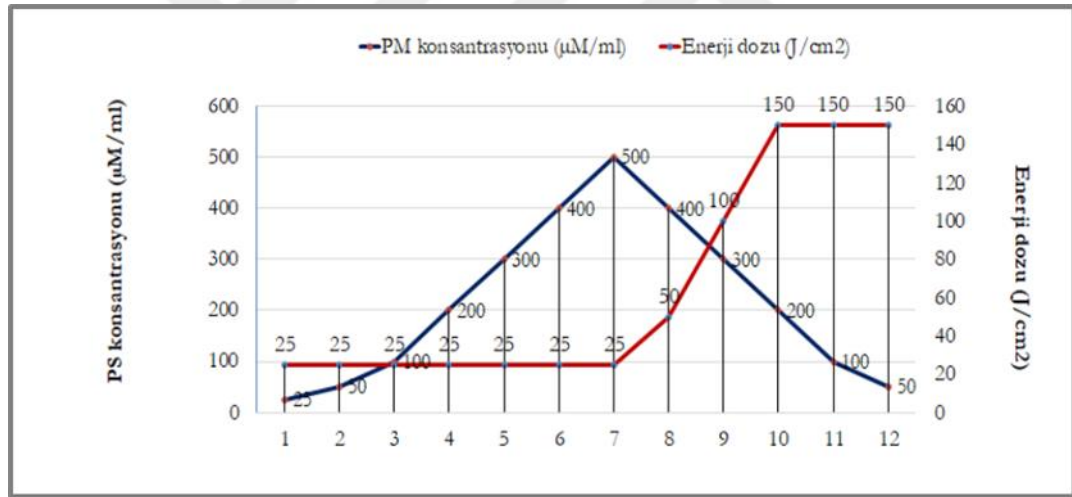
**Siprofloksasin 16 µg/ ml başlangıç

** Katyonik porfirin türevleri 5.000 µg/ ml başlangıç

3.2. Fotoinaktivasyonun Klinik İzolatlar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği

3.2.1. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli MRSA Klinik İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği

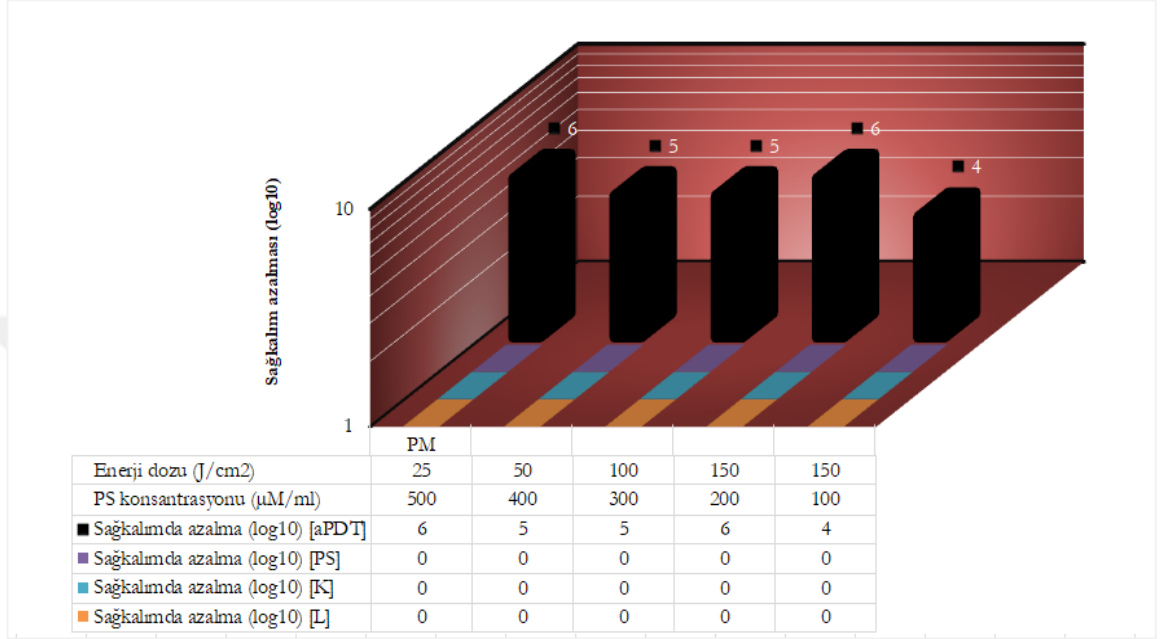
P_M 'nin kullanıldığı aPDT deneylerinde 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve 25-500 µM/ml aralığında değişen fotosensitizan konsantrasyonları kombine edildi. Şekil 8'de görüldüğü gibi toplamda 12 kombinasyonun kullanıldığı aPDT deneylerinde MRSA-1 üzerinde güçlü bir antimikrobiyal etkinliğin görüldüğü noktadan itibaren enerji dozu yükseltildi, fotosensitizan konsantrasyonu düşürüldü. Deneylerde [500 µM+ 25 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 7. aPDT deneyinde güçlü bir fotoinaktivasyon etkisi görülmeye başladı. [50 µM+ 150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 12. deneyde ise fotoinaktivasyon etkinliği belirgin ölçüde azaldı (Şekil 8).



Şekil 8. P_M 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (MRSA-1)

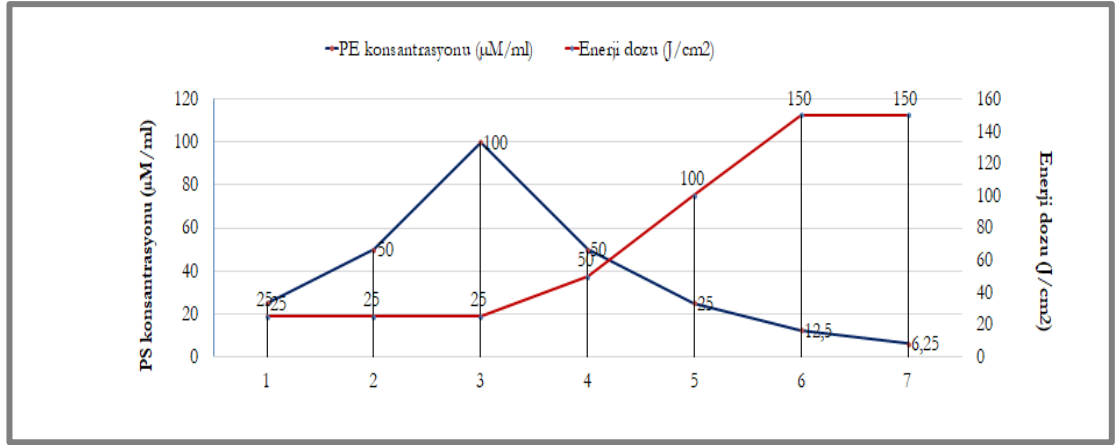
[500 µM/ml + 25 J/cm²] kombinasyonları ile gerçekleştirilen aPDT deneylerinde bakteriyel sağkalımındaki azalma 400 µM/ml'de 5 log₁₀, 25-400 µM/ml P_M konsantrasyonu aralığında ise 2-4 log₁₀ aralığında değişim gösterdi. Deneylerde [500 µM/ml+25 J/cm²] aPDT kombinasyonunda 6 log₁₀, [400 µM/ml+50 J/cm²] ve [300 µM/ml+100 J/cm²] kombinasyonlarının her birinde 5 log₁₀'luk ÇİD MRSA-1 sağkalımında azalmalar saptandı. Enerji dozunun 150 J/cm²'ye çıkarıldığı aPDT deneylerinde bakteriyel sağkalımındaki azalmalar sırasıyla 200 µM/ml'de >6 log₁₀,

100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ 'de 4 \log_{10} 'dur. Aynı enerji dozunda fotosensitizan konsantrasyonu 50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ değerine indirildiği aPDT deneylerinde ÇİD MRSA-1 klinik izolatu üzerinde önemli ölçüde antimikrobiyal etkinlik görülmedi (Şekil 9). ÇİD MRSA-1 izolatında antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] ve [PS] gruplarında bakteriyel sağkalımında anlamlı düşüşler görülmedi.



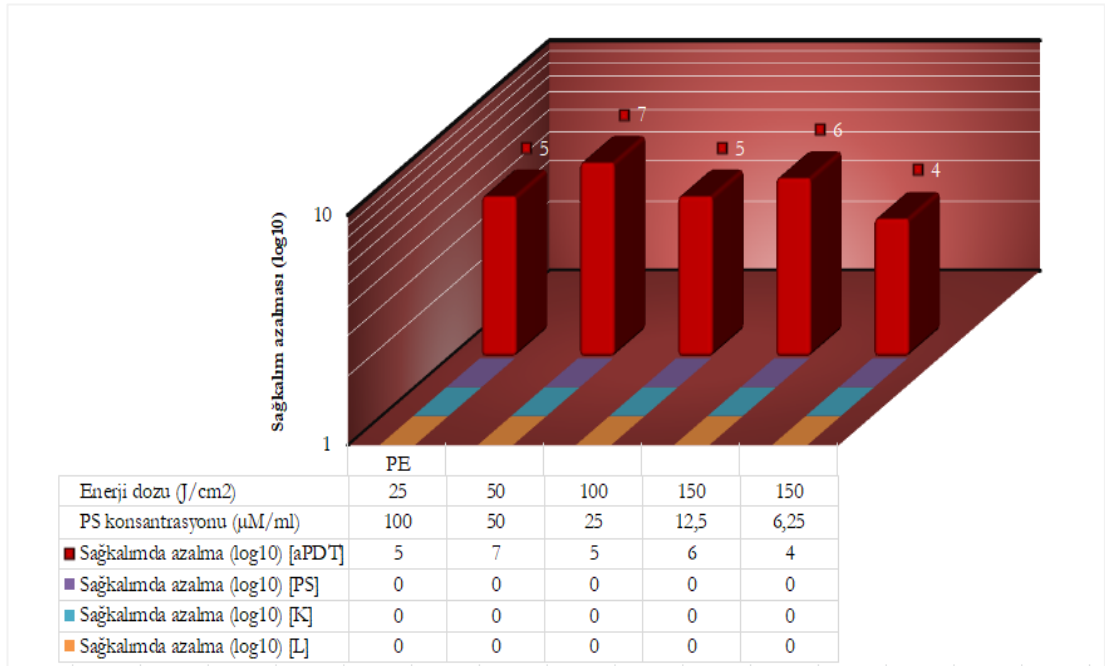
Şekil 9. P_M 'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD MRSA-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

Fotosensitizan amaçlı P_E 'nin kullanıldığı aPDT deneylerinde 25-150 J/cm^2 aralığında değişen enerji dozları ve 6,25-100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ aralığında değişen P_E konsantrasyonları kombine edildi. Deneylerde [100 μM +25 J/cm^2] kombinasyonunun kullanıldığı 3. deneyde güçlü bir fotoinaktivasyon etki görülmeye başladı. 150 J/cm^2 'de fotosensitizan konsantrasyonu 6,25 μM 'le düşürüldüğünde MRSA-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinlik önemli ölçüde azaldı (Şekil 10).



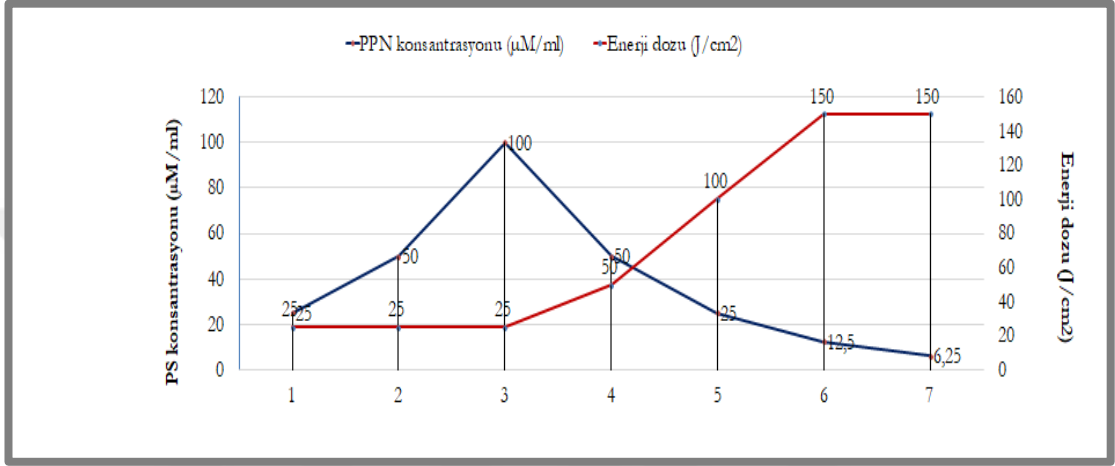
Şekil 10. PE'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (MRSA-1)

aPDT deneylerinde $[50\mu\text{M/ml} + 25 \text{ J/cm}^2]$ PE kombinasyonlarında antimikrobiyal etkinliğin düşük olduğu görüldü. $50 \mu\text{M/ml}$ 'de $3 \log_{10}$ 'luk sağkalım azalması görülürken $75 \mu\text{M/ml}$ 'de $4 \log_{10}$ 'luk azalma gerçekleşti. $[100 \mu\text{M/ml} + 25 \text{ J/cm}^2]$, $[50 \mu\text{M/ml} + 50 \text{ J/cm}^2]$, $[25\mu\text{M/ml} + 100 \text{ J/cm}^2]$, $[12,5 \mu\text{M/ml} + 150 \text{ J/cm}^2]$ ve $[6,25 \mu\text{M/ml} + 150 \text{ J/cm}^2]$ aPDT kombinasyonlarında ÇİD MRSA-1 klinik izolatu sağkalımındaki düşüşler sırasıyla $5 \log_{10}$, $>7 \log_{10}$, $5 \log_{10}$, $6 \log_{10}$ ve $4 \log_{10}$ 'dur. Antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] ve [PS] gruplarındaki bakteriyel sağkalımında anlamlı düşüşler görülmedi (Şekil 11).



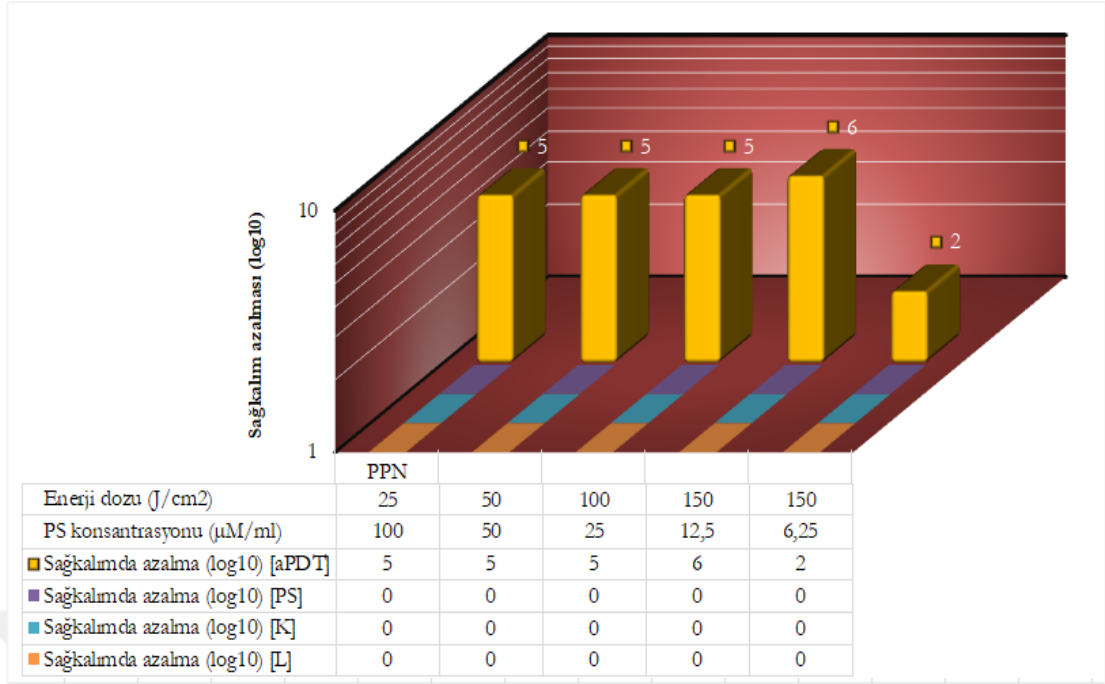
Şekil 11. PE'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD MRSA-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

P_{PN} ile gerçekleştirilen aPDT deneylerinde Şekil 12’de görüldüğü gibi 25-150 J/cm^2 aralığında değişen enerji dozları ve 6,25-100 $\mu M/ml$ aralığında değişen fotosensitizan konsantrasyonları kombine edilip, güçlü antimikrobiyal etkinlik görüldüğü kombinasyon olan [$100 \mu M + 25 J/cm^2$]’de itibaren enerji dozu yükselttilip, P_{PN} konsantrasyonu düşürüldü. 2 \log_{10} ’luk azalmanın görüldüğü [$6,25 \mu M + 150 J/cm^2$] kombinasyonunun kullanıldığı 7.deneyden sonra parametre belirlenmesi sonlandırıldı.



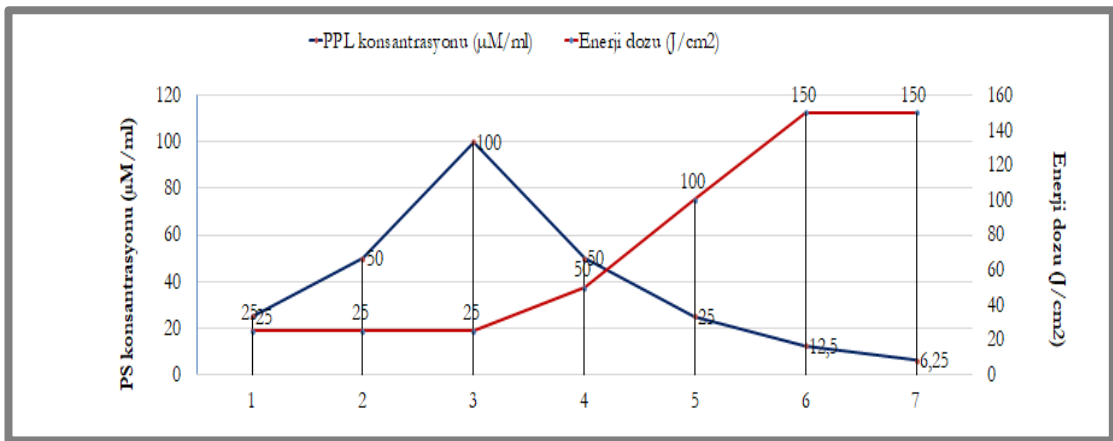
Şekil 12. P_{PN} ’nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (MRSA-1)

25 J/cm^2 enerji dozu ve 75 $\mu M/ml$ P_{PN} kombinasyonunda ÇİD MRSA-1’de 3 \log_{10} ’luk bir azalma görülürken, aynı enerji dozunda P_{PN} konsantrasyonunun 75 $\mu M/ml$ ’nin altına düşürüldüğü aPDT deneylerinde bakteriyal sağkalımında önemli ölçüde düşüşler görülmedi. P_{PN} ’nin kullanıldığı aPDT deneylerinin sonuçları antimikrobiyal etkinlik açısından P_E ’de elde edilen sonuçlara benzerlik göstermiş olup [$100 \mu M/ml + 25 J/cm^2$], [$50 \mu M/ml + 50 J/cm^2$] ve [$25 \mu M/ml + 100 J/cm^2$] kombinasyonlarının her birinde 5 \log_{10} ’luk düşüşler gerçekleşti. 150 J/cm^2 enerji dozunun kullanıldığı aPDT deneylerinde 12,5 $\mu M/ml$ P_{PN} konsantrasyonunda 6 \log_{10} ’un üzerinde azalma saptanırken, P_{PN} konsantrasyonu 6,25 $\mu M/ml$ ’ye düşürüldüğünde sağkalımdaki azalma 2 \log_{10} ile sınırlı kaldı. Deneylerde antimikrobiyal etkinlik gösteren parametrelerin herhangi birinde [L] ve [P] gruplarında bakteriyal sağkalımında anlamlı düşüşler görülmedi (Şekil 13).



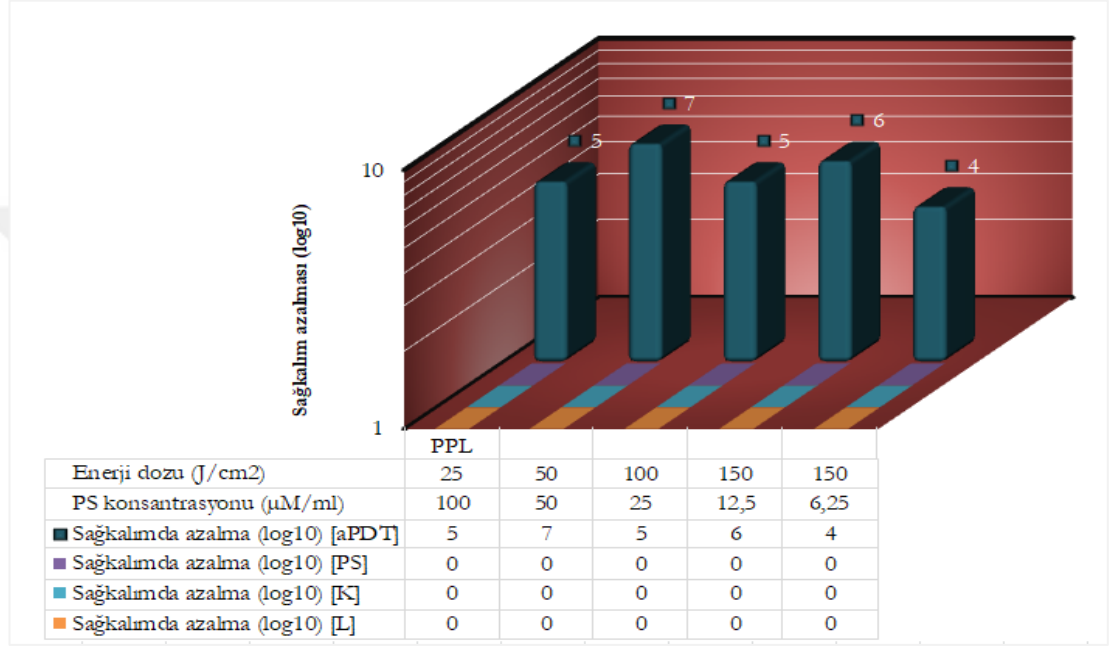
Şekil 13. P_{PN}'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD MRSA-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

aPDT deneylerinde Şekil 14'de görüldüğü gibi 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve 6,25-100 µM/ml aralığında değişen P_{PL} konsantrasyonları kombine edildi. Güçlü bir antimikrobiyal etkinlik 3 deneyde kullanılan kombinasyonda yani [100 µM+25 J/cm²]'de başladı; [6,25 µM+150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 7. deneyde antimikrobiyal etkinlik belirgin ölçüde düşüş gösterdi.



Şekil 14. P_{PL}'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (MRSA-1)

Deneysel [100 µM/ml+25 J/cm²], [50 µM/ml+50 J/cm²], [25µM/ml+100 J/cm²], [12,5 µM/ml+150 J/cm²] ve [6,25 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonları ile gerçekleştirilen aPDT'lerde ÇİD MRSA-1 sağkalımındaki azalmalar sırasıyla 5 log₁₀, 7 log₁₀, 5 log₁₀, >6 log₁₀ ve 4 log₁₀'dur. Antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyel sağkalımında anlamlı azalmalar görülmedi (Şekil 15).



Şekil 15. PPL'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD MRSA-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

ÇİD MRSA-1 üzerinde önemli ölçüde antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT parametreleri ve bu parametrelerin diğer ÇİD MRSA klinik izolatları üzerindeki antimikrobiyal etkinliği Tablo 5'de gösterilmiştir. P_M ile gerçekleştirilen aPDT deneylerinde MRSA-1 izolatında 6 log₁₀'luk azalma sağlayan [500 µM/ml+25 J/cm²] kombinasyonu MRSA-2'de 4 log₁₀'luk, MRSA-3'de 5 log₁₀'luk azalma sağladı. P_E'nin kullanıldığı deneylerde MRSA-1 sağkalımında 5 log₁₀'luk azalma sağlayan [100 µM/ml+25 J/cm²] kombinasyonu MRSA-3 izolatında 5 log₁₀, MRSA-2'de ise 5 log₁₀'un üzerinde azalma sağladı. MRSA-1'de 5 log₁₀'luk azalmalar sağlayan [100 µM/ml P_{PN}+25 J/cm²] ve [100 µM/ml P_{PL}+25 J/cm²] kombinasyonlarının herbiri diğer iki MRSA klinik izolatında 5 log₁₀'un üzerinde azalmalar sağladı.

Tablo 5. aPDT'nin ÇİD¹ MRSA klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği

aPDT ¹ parametreleri	Canlı hücre sayısı (cfu/ml)											
	ÇİD MRSA-1				ÇİD MRSA-2				ÇİD MRSA-3			
	[aPDT] ³	[PS] ⁴	[L] ⁵	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]
P _M [500 µM/ml+25 J/cm ²]	1x10 ³	2x10 ⁹	5x10 ⁹	3x10 ⁹	5x10 ⁵	3x10 ⁹	5x10 ⁹	5x10 ⁹	4x10 ⁴	6x10 ⁹	5x10 ⁹	4x10 ⁹
P _E [100µM/ml+25 J/cm ²]	2x10 ⁴	1x10 ⁹	5x10 ⁹	5x10 ⁹	ÜY ⁶	3x10 ⁹	5x10 ⁹	5x10 ⁹	4x10 ⁴	6x10 ⁹	5x10 ⁹	4x10 ⁹
P _{PN} [100 µM/ml+25 J/cm ²]	1x10 ⁴	1x10 ⁹	5x10 ⁹	4x10 ⁹	ÜY	3x10 ⁹	5x10 ⁹	5x10 ⁹	ÜY	6x10 ⁹	5x10 ⁹	4x10 ⁹
P _{PL} [100 µM/ml+25 J/cm ²]	1x10 ⁴	2x10 ⁹	5x10 ⁹	4x10 ⁹	ÜY	3x10 ⁹	5x10 ⁹	5x10 ⁹	ÜY	4x10 ⁹	5x10 ⁹	4x10 ⁹

¹ Çoklu ilaç direçli;

² Antimikrobiyal fotodinamik tedavi;

³ Antimikrobiyal fotodinamik tedavi grubu;

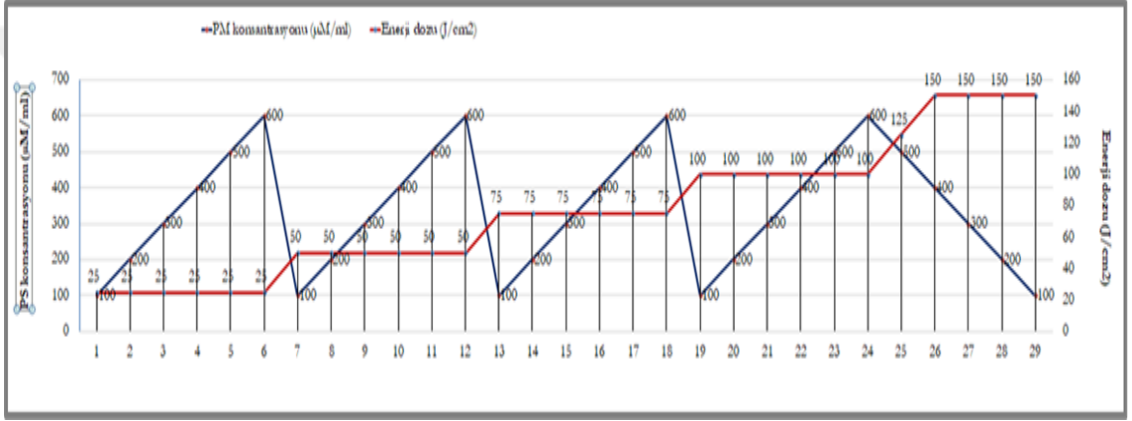
⁴ Fotosensitizan grubu

⁵ Kontrol grubu

⁶ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmedi, bakteriyel sağkalımındaki azalma >5 log₁₀ üzerindedir)

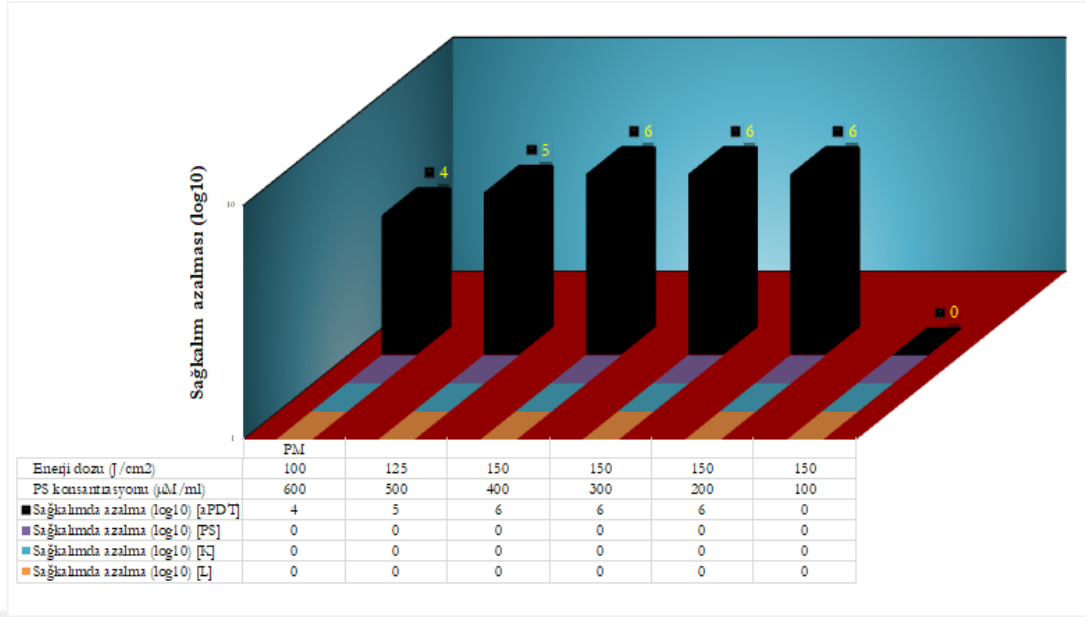
3.2.2. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli *Escherichia coli* Klinik İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği

Fotosensitizan olarak P_M 'nin kullanıldığı deneylerde 25-150 J/cm^2 aralığında değişen enerji dozları ve 100-600 $\mu M/ml$ aralığında değişen P_M konsantrasyonları kombine edilerek aPDT parametrelerinin ÇİD *E.coli*-1 klinik izolatı üzerindeki antimikrobiyal etkinlik incelendi. Güçlü bir fotoinaktivasyon etkinlik 24. deneyde kullanılan parametrelerde yani [600 $\mu M/ml$ +100 J/cm^2] kombinasyonunda görülmeye başladı. 150 J/cm^2 enerji dozunun ve 100 $\mu M/ml$ fotosensitizan konsantrasyonunun kombine edildiği 30. deneyde fotoinaktivasyon etkinlik belirgin ölçüde azaldı (Şekil 16).



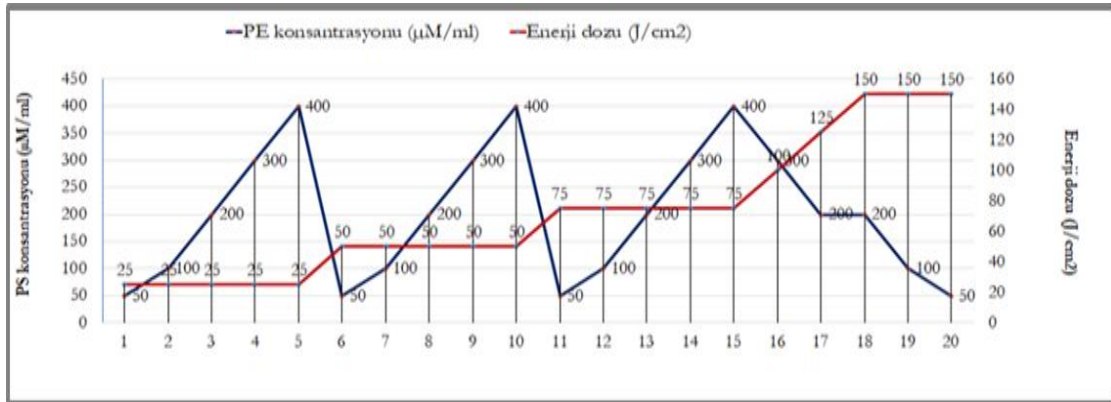
Şekil 16. P_M 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*E.coli*-1)

Araştırmada [$\leq 75 J/cm^2 + \leq 600 \mu M/ml$] kombinasyonları ile gerçekleştirilen aPDT deneylerinde ÇİD *E.coli*-1 sağkalımında önemli ölçüde bir düşüş görülmeydi. [600 $\mu M/ml$ +100 J/cm^2], [500 $\mu M/ml$ +125 J/cm^2], [400 $\mu M/ml$ +150 J/cm^2], [300+150 J/cm^2] ve [200 $\mu M/ml$ +150 J/cm^2] kombinasyonları ÇİD *E.coli*-1 sağkalımında sırasıyla 4 \log_{10} , 5 \log_{10} , >6 \log_{10} , >6 \log_{10} ve >6 \log_{10} 'luk azalmalar sağladı. 150 J/cm^2 enerji dozunda, P_M konsantrasyonu 100 $\mu M/ml$ seviyelerine indirildiğinde aPDT'nin antimikrobiyal etkinliği belirgin ölçüde düştü. Antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] ve [PS] gruplarındaki bakteriyel sağkalımında anlamlı düşüşler görülmeydi (Şekil 17).



Şekil 17. P_M'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *E.coli-1* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

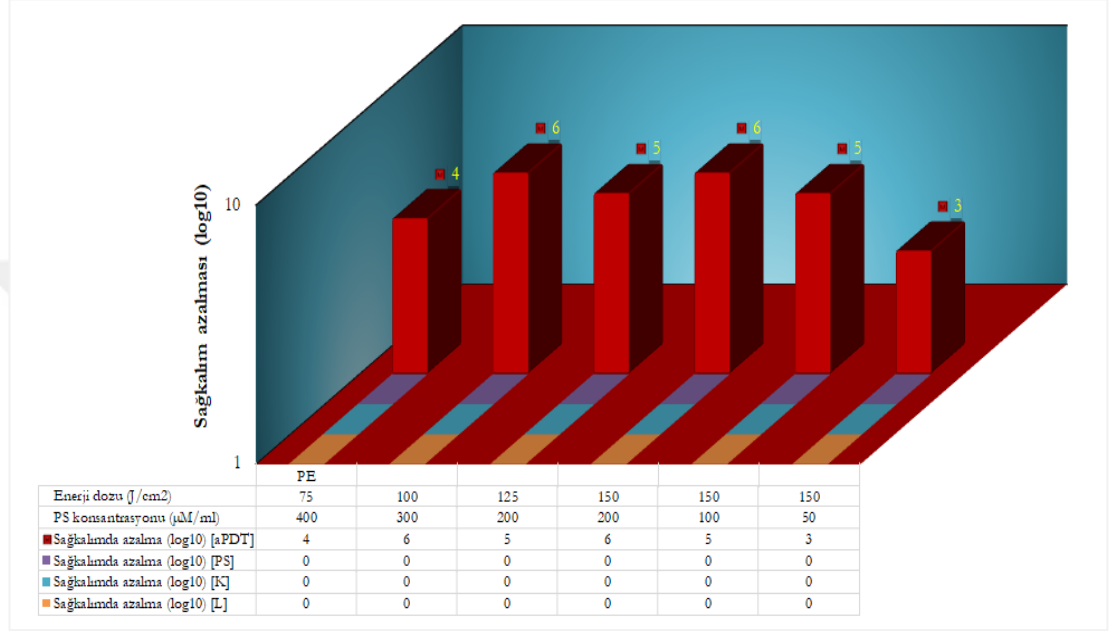
P_E'nin kullanıldığı aPDT deneylerinde Şekil 18'de görüldüğü gibi 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve 50-400 µM/ml aralığında değişen P_E konsantrasyonları kombine edildi. [400 µM/ml+75 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 15.deneyde güçlü fotoianktivasyon etkinlik başlayıp, [50 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 20. deneyde fotoianktivasyon etkinlik belirgin ölçüde azalmıştır.



Şekil 18. P_E'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*E.coli-1*)

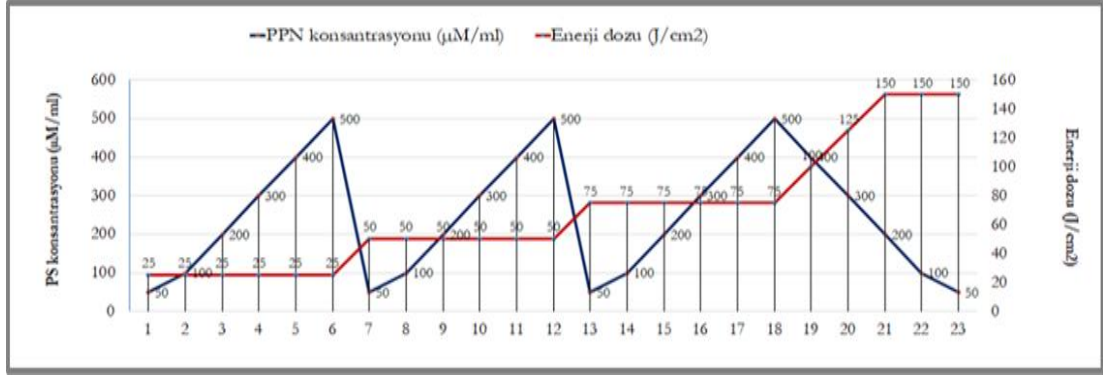
Deneylerde, [≤ 400 µM/ml+ ≤ 75 J/cm²] kombinasyonlarının ÇİD *E.coli-1* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin düşük olduğu görüldü. [400 µM/ml+75 J/cm²], [300

$\mu\text{M/ml}+100 \text{ J/cm}^2$], $[200 \mu\text{M/ml}+125 \text{ J/cm}^2]$, $[200 \mu\text{M/ml}+150 \text{ J/cm}^2]$, $[100 \mu\text{M/ml}+150 \text{ J/cm}^2]$ ve $[50 \mu\text{M/ml}+150 \text{ J/cm}^2]$ aPDT kombinasyonlarında *ÇİD E.coli-1* sağkalımındaki azalmalar sırasıyla $4 \log_{10}$, $>6 \log_{10}$, $5 \log_{10}$, $>6 \log_{10}$, $5 \log_{10}$ ve $3 \log_{10}$ 'dur. Deneysel antimikrobiyal etkinlik gösteren fotosensitizan ve enerji dozu kombinasyonlarının herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyel sağkalımında anlamlı azalmalar görülmedi (Şekil 19).



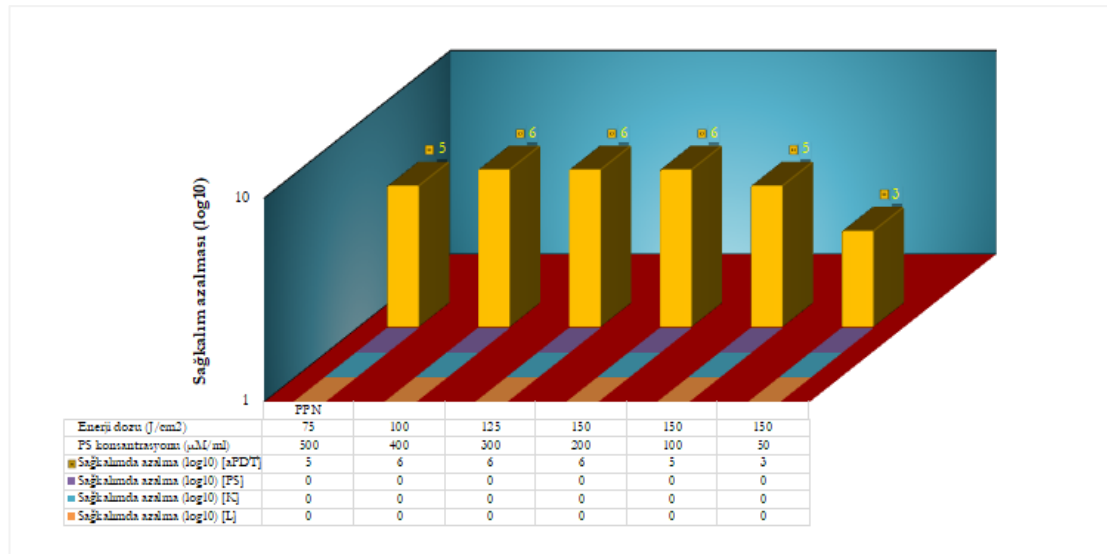
Şekil 19. PE'nin kullanıldığı aPDT'lerin *ÇİD E.coli-1* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

P_{PN}'nin fotosensitizan olarak kullanıldığı aPDT deneylerinde 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları, 50-500 μM/ml aralığında değişen P_{PN} konsantrasyonları kombine edildi. *ÇİD E.coli-1* klinik izolatu üzerinde güçlü fotoinaktivasyon etki 400 μM/ml fotosensitizan konsantrasyonu ve 75 J/cm² enerji dozunun kombine edildiği 17.deneyde gerçekleşti. $[50 \mu\text{M/ml}+150 \text{ J/cm}^2]$ kombinasyonunun kullanıldığı 23.deneyde aPDT'nin fotoinaktivasyon etkinliği belirgin ölçüde azaldı (Şekil 20).



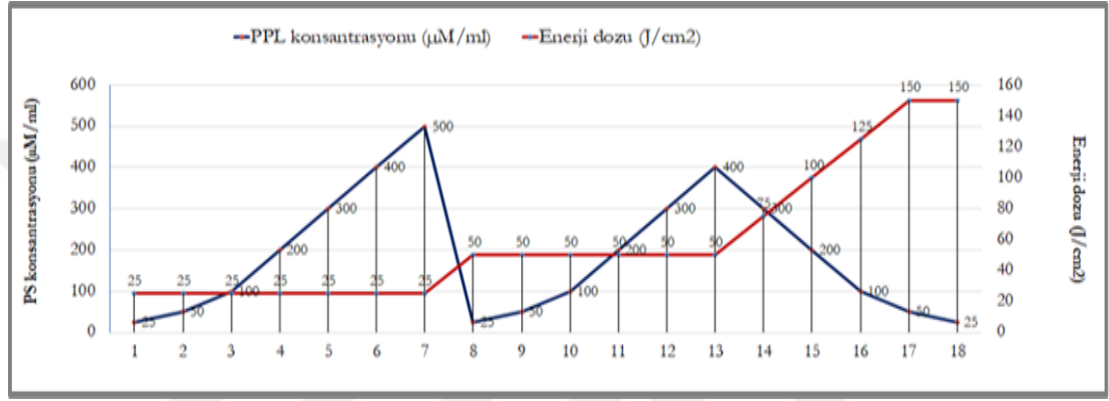
Şekil 20. P_{PN}'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*E.coli-1*)

25-50 J/cm²+ ≤500 µM/ml P_{PN}'nin kombine edildiği aPDT deneylerinde sağkalımda önemli düşüşler görülmedi. Benzer şekilde 75 J/cm² enerji dozu ile gerçekleştirilen aPDT deneylerinde 300 µM/ml ve altındaki P_{PN} konsantrasyonlarında *E.coli-1* sağkalımında önemli ölçüde azalma görülmedi, ancak aynı enerji dozunda 300 µM/ml P_{PN} konsantrasyonu 3 log₁₀, 400 ve 500 µM/ml P_{PN} konsantrasyonlarının her biri 5 log₁₀'luk azalmalar sağladı. [400 µM/ml+100 J/cm²], [300 µM/ml+125 J/cm²] ve [200 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonlarının her biri 6 log₁₀'un üzerinde azalmalar sağladı. 100 µM/ml P_{PN} konsantrasyonu ve 150 J/cm² enerji dozunun çalışıldığı deneylerde bakteriyel sağkalımındaki azalma 5 log'dur. Aynı enerji dozunda 50 µM/ml P_{PN} 3 log₁₀'luk bir azalma sağladı. *E.coli-1*'de fotoinaktivasyon etkinliği olan aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyel sağkalımında anlamlı azalmalar görülmedi (Şekil 21).



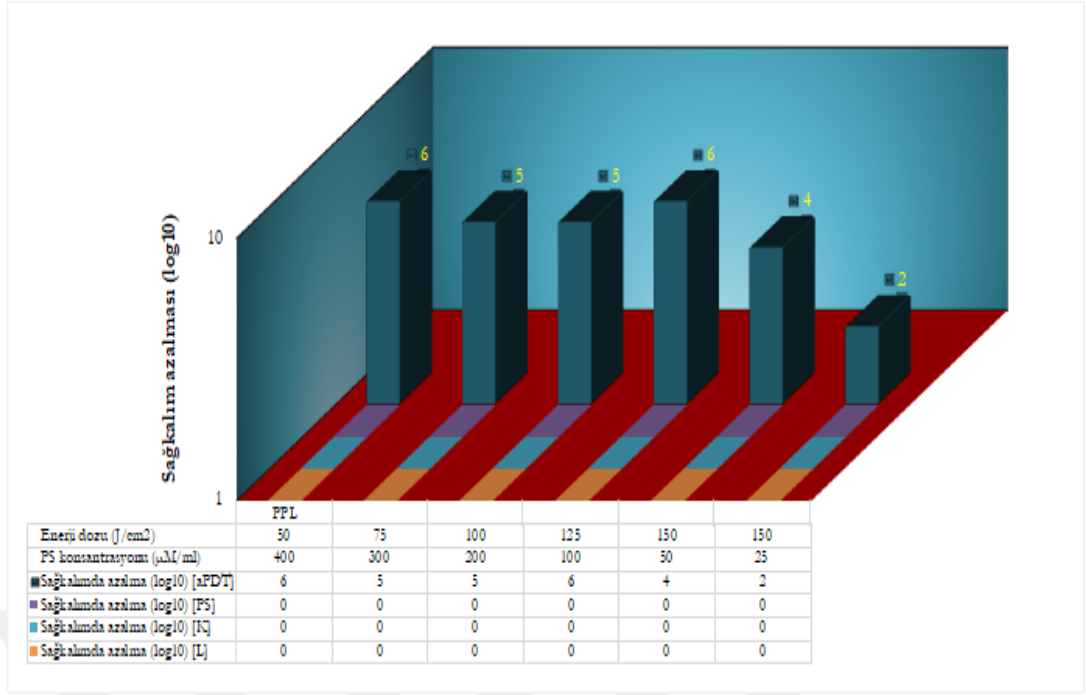
Şekil 21. P_{PN}'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *E.coli*-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

P_{PL}'nin fotosensitizan amaçlı kullanıldığı deneylerde Şekil 22'de görüldüğü gibi 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve 25-400 µM/ml aralığında değişen P_{PL} konsantrasyonları kombine edildi. Güçlü bir antimikrobiyal etkinlik 12. deneyde kullanılan [300 µM/ml+50 J/cm²] aPDT kombinasyonunda başladı. [25 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 18.deneyde fotoinaktivasyon etkilik belirgin ölçüde azaldı.



Şekil 22. P_{PL}'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*E.coli*-1)

25 J/cm²+≤400 µM P_{PL} kombinasyonlarının parametre olarak kullanıldığı deneylerde aPDT'nin antimikrobiyal etkinliği düşük veya yoktu. 100, 200 ve 300 µM/ml konsantrasyonlarının 50 J/cm² enerji dozunda çalışıldığı aPDT'lerde bakteriyal sağkalımında 3-5 log₁₀ arasında değişen azalmalar gerçekleşti. [400 µM/ml+50 J/cm²] kombinasyonu ÇİD *E.coli* 1'de 6 log₁₀'un üzerinde bir azalma sağladı. [300 µM/ml+75 J/cm²] ve [200 µM/ml+100 J/cm²] kombinasyonlarının her birinde bakteriyal sağkalımında 5 log₁₀'luk düşüşler görülürken, [100 µM/ml+125 J/cm²] kombinasyonundaki düşüş 6 log₁₀'dur. 150 J/cm² enerji dozu ile gerçekleştirilen aPDT deneylerinde bakteriyal sağkalımındaki düşüş 50 µM/ml'de 4 log₁₀, 25 µM/ml'de 2 log₁₀'dur. Fotoinaktivasyonun görüldüğü parametrelerde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyal sağkalımında anlamlı düşüşler görülmedi (Şekil 23).



Şekil 23. P_{PL}'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *E.coli-1* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

ÇİD *E.coli-1* üzerinde güçlü fotoinaktivasyon gösteren aPDT parametrelerinin ÇİD *E.coli-2* üzerindeki antimikrobiyal etkisi şu şekildedir: 200 µM/ml P_M ve 150 J/cm² enerji dozu kombinasyonu ÇİD *E.coli-1* sağkalımında >6 log₁₀'luk azalma sağlarken, *E.coli-2*'de 3 log₁₀'luk bir azalma sağladı. *E.coli-1* sağkalımında 6 log₁₀'un azalma [100 µM/ml P_{PL}+125 J/cm²] kombinasyonu; 6 log₁₀'un üzerinde azalmalar sağlayan [200 µM/ml P_E+150 J/cm²], [200 µM/ml P_{PN}+ 150 J/cm²] kombinasyonları ÇİD *E.coli-2* klinik izolatında da aynı etkiyi gösterdi (Tablo 6).

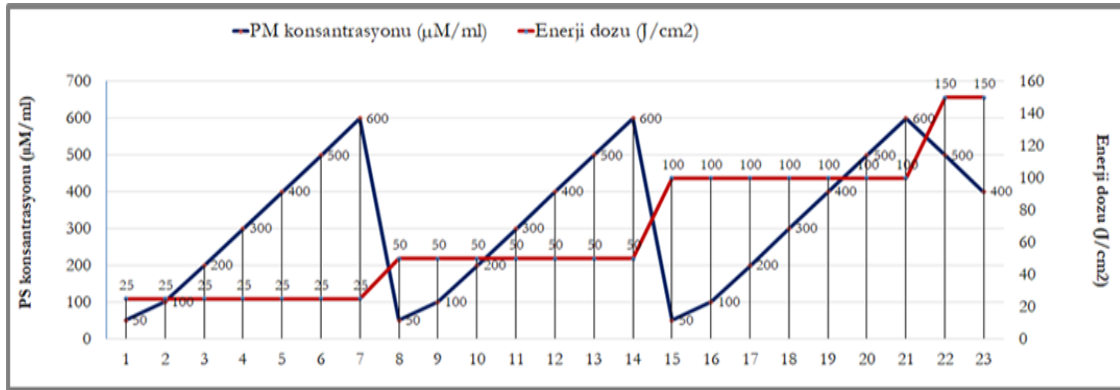
Tablo 6. aPDT'nin ÇİD¹ *E.coli* klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği

	Canlı hücre sayısı (cfu/ml)							
	ÇİD <i>E.coli-1</i>				ÇİD <i>E.coli-2</i>			
	[aPDT] ³	[PS] ⁴	[L] ⁵	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]
P _M [200 µM/ml+150 J/cm ²]	1x10 ³	7x10 ⁹	3x10 ⁹	4x10 ⁹	4x10	7x10 ⁹	3x10 ⁹	4x10 ⁹
P _E [200µM/ml+150 J/cm ²]	ÜY ⁶	4x10 ⁹	7x10 ⁹	7x10 ⁹	ÜY	4x10 ⁹	3x10 ⁹	3x10 ⁹
P _{PN} [200 µM/ml+150 J/cm ²]	ÜY	4x10 ⁹	7x10 ⁹	4x10 ⁹	ÜY	4x10 ⁹	3x10 ⁹	4x10 ⁹
P _{PL} [100 µM/ml+125 J/cm ²]	3x10 ³	3x10 ⁹	3x10 ⁹	4x10 ⁹	6x10 ³	3x10 ⁹	7x10 ⁹	4x10 ⁹

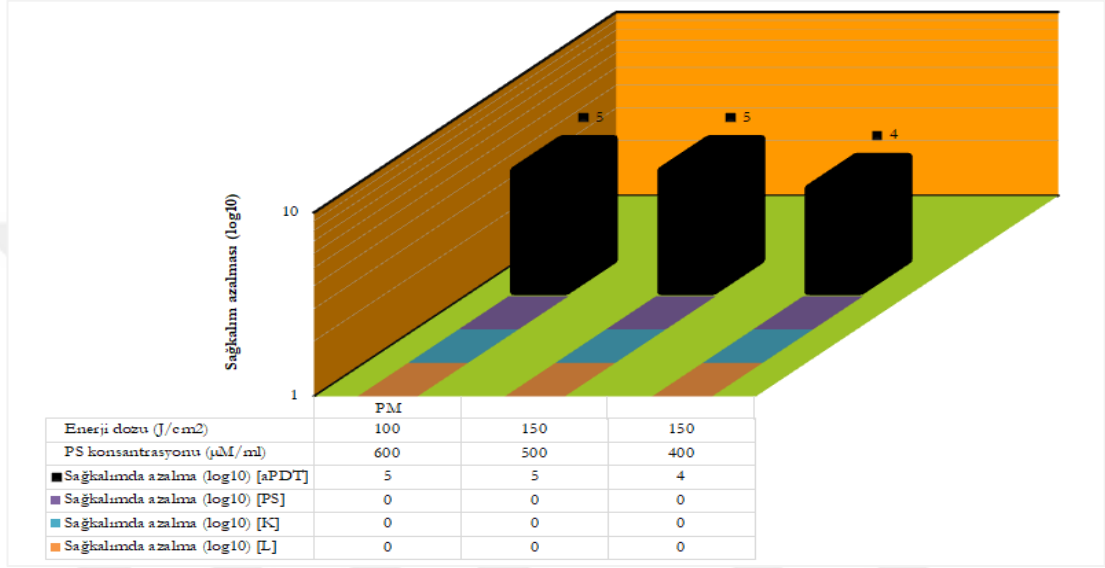
¹ Çoklu ilaç direci;
² Antimikrobiyal fotodinamik tedavi;
³ Antimikrobiyal fotodinamik tedavi grubu;
⁴ Fotosensitizan grubu
⁵ Kontrol grubu
⁶ Üreme görülmedi (10⁻¹lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyel sağkalımındaki azalma >6 log üzerindedir)

3.2.3. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli *Pseudomonas aeruginosa* Klinik İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği

25-150 J/cm² enerji dozu ve 600 µM/ml ≥ P_M konsantrasyonu kombinasyonlarının kullanıldığı (Şekil 24) deneylerde 25-50 J/cm² ve ≤600 µM/ml P_M kombinasyonlarında aPDT'nin ÇİD *P.aeruginosa-1* klinik izolatına karşı fotoinaktivasyon etkinliği düşük seviyelerdeydi. Güçlü fotoinaktivasyon etkinlik 21.deneyde kullanılan [600 µM/ml+100 J/cm²] kombinasyonunda görüldü. [400 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 23. deneyde ise fotoinaktivasyon etkinlik azalmaya başladı.

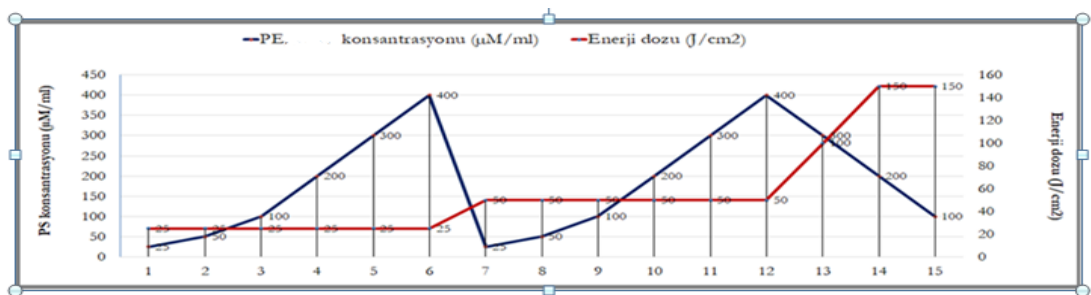
**Şekil 24.** P_M'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*P.aeruginosa-1*)

100 J/cm² enerji dozlarının kullanıldığı aPDT deneylerinde 500 µM/ml ve altındaki konsantrasyon değerlerinde antimikrobiyal etkinlik düşük iken, aynı enerji dozunda 600 µM/ml’de >5 log₁₀’luk bir düşüş görüldü. Enerji dozu 150 J/cm² yükseltildiğinde 500 µM/ml’de 5 log₁₀, 400 µM/ml’de 4 log₁₀’luk düşüşler gerçekleşti. Etkili fotoinaktivasyonun görüldüğü parametrelerin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında sağkalım azalması görülmedi (Şekil 25).



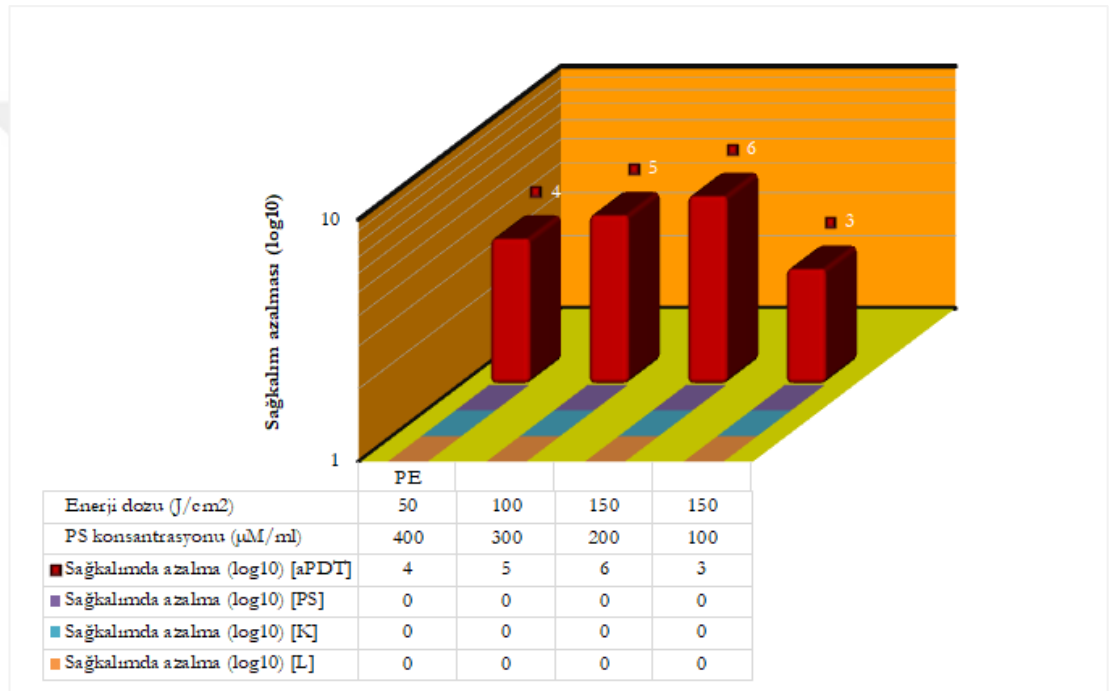
Şekil 25. PM’nin kullanıldığı aPDT’lerin ÇİD *P.aeruginosa-1* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

Fotosensitizan olarak PE’nin kullanıldığı aPDT deneylerinde 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ile 25-400 µM/ml aralığında değişen fotosensitizan konsantrasyonları kombine edildi. 12. aPDT deneyinde kullanılan kombinasyonda güçlü antimikrobiyal etkinlik görülmeye başladı. aPDT’nin fotoinaktivasyon etkinliğinin belirgin ölçüde azaldığı kombinasyon 15.deneyde kullanılan parametrelerdir (100µM/ml+150 J/cm²) etkinliği (Şekil 26).



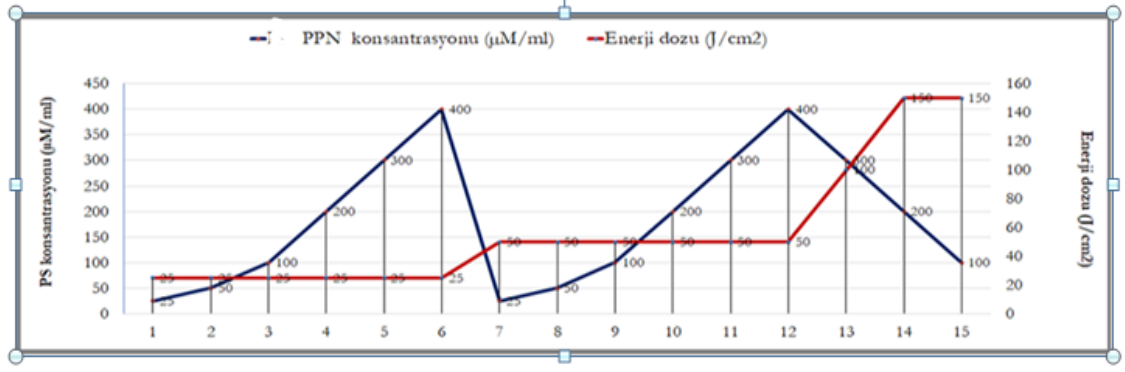
Şekil 26. PE’nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*P.aeruginosa-1*)

25 J/cm² enerji dozunda 400 µM/ml, 50 J/cm² enerji dozunda 200 µM/ml ve 300 µM/ml P_E kombinasyonlarında antimikrobiyal etkinlik düşük olup, bakteriyel sağkalımındaki azalma 3 log₁₀ ve altındadır. 50 J/cm² enerji dozunda P_E konsantrasyonu 400 µM/ml seviyesine yükseltildiğinde sağkalımdaki azalma da 4 log₁₀'a yükseldi. [300 µM/ml+100 J/cm²], [200 µM/ml+150 J/cm²] ve [100 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonlarında ÇİD *P.aeruginosa*-1 sağkalımındaki azalma sırasıyla 5 log₁₀, >6 log₁₀ ve 3 log₁₀'dur. Fotoinaktivasyon sağlayan aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyel sağkalımında anlamlı azalmalar görülmedi (Şekil 27).



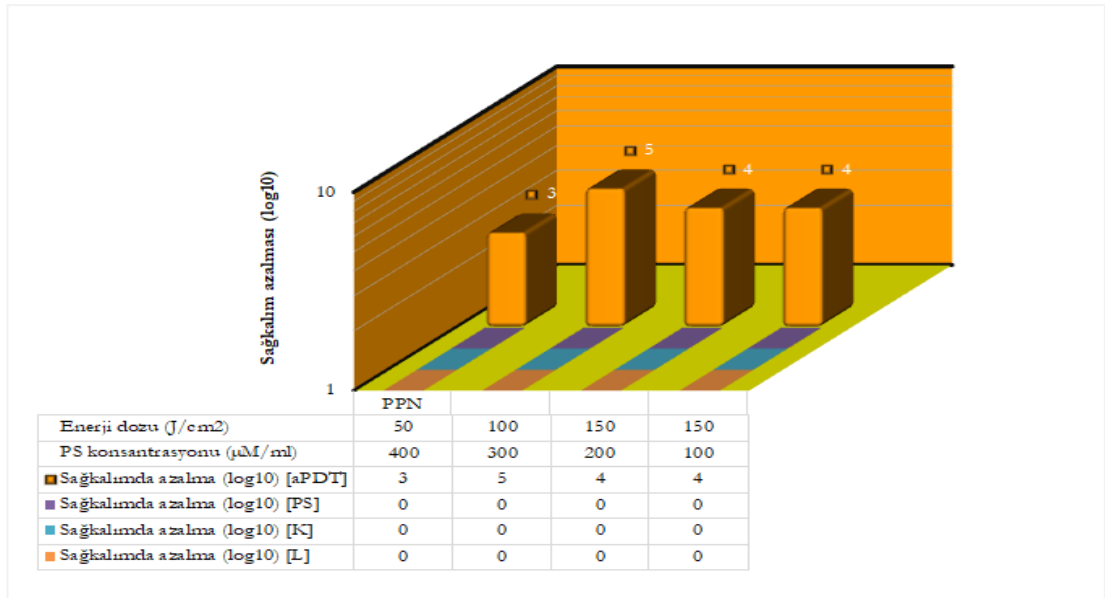
Şekil 27. P_E'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *P.aeruginosa*-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

Şekil 28'de P_{PN} kullanıldığı aPDT deneylerinde ÇİD *P.aeruginosa*-1 izolatu üzerinde güçlü fotoinaktivasyon etki [300 µM/ml+100 J/cm²] kombinasyonunda yani 12.deneyde görülmeye başladı. 150 J/cm² enerji dozunda fotosensitizan konsantrasyonu 100 µM/ml'e düşürüldüğünde fotoinaktivasyon etkinliğinin de düştüğü görüldü.



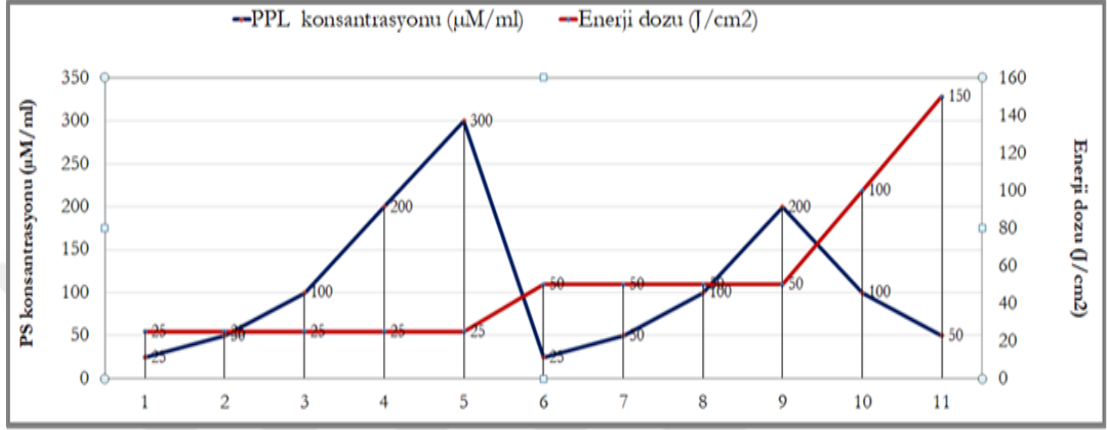
Şekil 28. PPN'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*P.aeruginosa-1*)

Deneylerde [400 µM/ml+25 J/cm²] ve [200 µM/ml+50 J/cm²], [300 µM/ml+50 J/cm²], [400 µM/ml+50 J/cm²] kombinasyonlarının her birinin antimikrobiyal etkinliği düşük olduğu ve bakteriyel sağkalımındaki azalmanın 3 log₁₀ ve altında olduğu tespit edildi. ÇİD *P.aeruginosa-1* güçlü bir antimikrobiyal etki [300 µM/ml+100 J/cm²] kombinasyonunda gerçekleşmiş olup, bu deneyde 5 log₁₀ düzeyinde sağkalım azalması görüldü. 150 J/cm² enerji dozunun kullanıldığı aPDT deneylerinde 200 µM/ml ve 100 µM/ml PPN konsantrasyonlarının her birinde 4 log₁₀'luk azalmalar saptandı. Antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında sağkalımda anlamlı azalmalar görülmedi (Şekil 29).



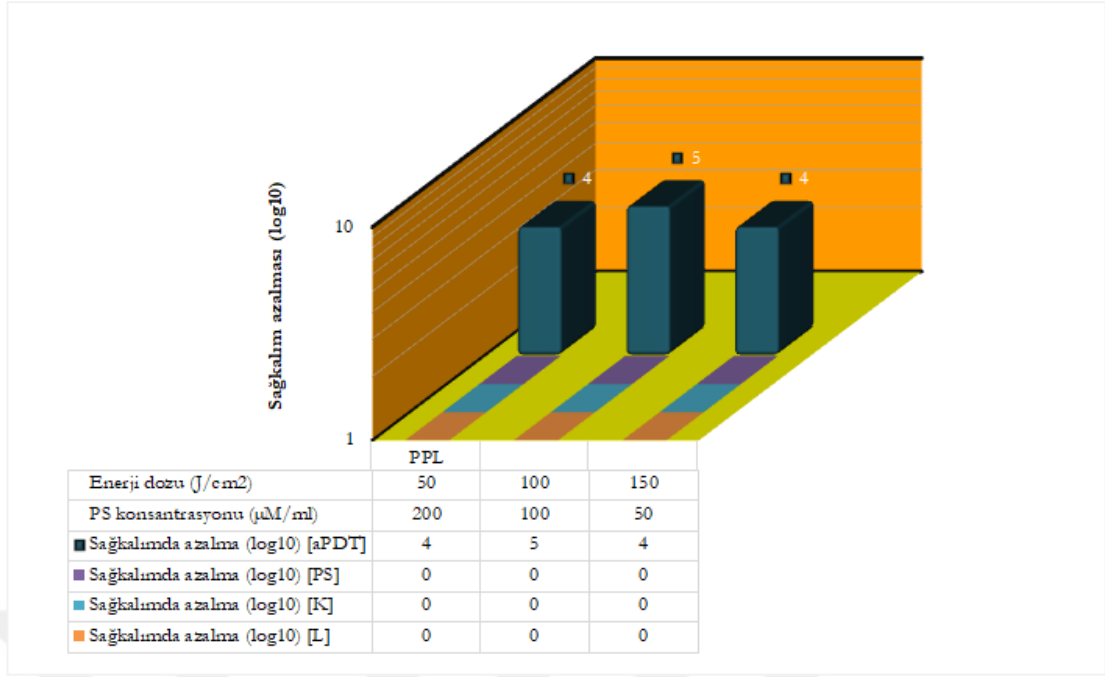
Şekil 29. PPN'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *P.aeruginosa-1* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

P_{PL} 'nin fotosensitizan amaçlı kullanıldığı aPDT deneylerinde 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve 25-300 µM/ml aralığında değişen fotosensitizan konsantrasyonları kombine edildi. [200 µM/ml+100 J/cm²] kombinasyonunda güçlü bir antimikrobiyal etkinlik görülmeye başladı. [50 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 11. deneyde ise fotoinaktivasyon etkinliğinde azalma başgösterdi (Şekil 30).



Şekil 30. P_{PL} 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*P.aeruginosa-1*)

25 J/cm² enerji dozunda 300 µM/ml \geq konsantrasyon değerlerinde P_{PL} kombinasyonları ile gerçekleştirilen aPDT ÇİD *P.aeruginosa-1*'e karşı sınırlı antimikrobiyal etkinlik gösterdi. Deneylerde [100 µM/ml+50J/cm²] ve [200 µM/ml+50J/cm²] kombinasyonlarında aPDT ÇİD *P.aeruginosa-1* klinik izolatında sırasıyla 3 ve 4 log₁₀'luk düşüşler sağladı. [100 µM/ml+100 J/cm²] kombinasyonunda bakteriyal sağkalımındaki azalma 5 log₁₀ iken, [50 µM/ml+150 J/cm²]’de azalma 4 log₁₀’dur. Fotoinaktivasyon gerçekleşen aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyal sağkalımında anlamlı azalmalar görülmedi (Şekil 31).



Şekil 31. P_{PL}'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *P.aeruginosa-1* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

ÇİD *P.aeruginosa-1* klinik izolatına karşı etkili fotoinaktivasyon gösteren aPDT parametreleri ve bu parametrelerin diğer ÇİD *P.aeruginosa* izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği Tablo 7'de gösterildiği gibidir. ÇİD *P.aeruginosa-1* sağkalımında $>5 \log_{10}$ 'luk azalma sağlayan [600 μM/ml P_M+100 J/cm²] kombinasyonu, ÇİD *P.aeruginosa-2* sağkalımında 6 log₁₀, ÇİD *P.aeruginosa-3* sağkalımında 4 log₁₀, ÇİD *P.aeruginosa-4* sakalımında ise $>5 \log_{10}$ 'luk düşüşler sağladı. ÇİD *P.aeruginosa-1* sağkalımında 5 log₁₀'luk düşüş sağlayan [300 μM/ml P_E+100 J/cm²] kombinasyonu ÇİD *P.aeruginosa-2* ve *P.aeruginosa-4*'ün herbirinin sağkalımında $>7 \log_{10}$ 'luk bir düşüş sağlarken, ÇİD *P.aeruginosa-3*'deki sağkalım azalması 5 log₁₀'dur. ÇİD *P.aeruginosa-1* üzerinde 5 log₁₀'luk azalma sağlayan [300 μM/ml P_{PN}+100 J/cm²] kombinasyonu *P.aeruginosa-4* dışındaki klinik izolatlarda aynı etkiyi gösterirken, *P.aeruginosa-4*'ün sağkalımında 6 log₁₀'luk bir düşüş sağladı. ÇİD *P.aeruginosa-1* sağkalımında 5 log₁₀'luk azalma sağlayan [100 μM/ml P_{PL}+100 J/cm²] kombinasyonu, ÇİD *P.aeruginosa-4*'de aynı etkiyi gösterirken, diğer klinik izolatlarda 4 log₁₀'luk bir azalma sağladı.

Tablo 7. aPDT'nin ÇİD¹ *P.aeruginosa* klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği

aPDT ¹ parametreleri	Canlı hücre sayısı (cfu/ml)															
	ÇİD <i>P.aeruginosa</i> -1				ÇİD <i>P.aeruginosa</i> -2				ÇİD <i>P.aeruginosa</i> -3				ÇİD <i>P.aeruginosa</i> -4			
	[aPDT] ³	[PS] ⁴	[L] ⁵	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]
P _M [600 µM/ml+100 J/cm ²]	ÜY ⁶	5x10 ⁹	3x10 ⁹	1x10 ⁹	1x10 ³	3x10 ⁹	2x10 ⁹	3x10 ⁹	2x10 ⁵	5x10 ⁹	4x10 ⁹	2x10 ⁹	ÜY ⁶	9x10 ⁹	1x10 ⁹	5x10 ⁹
P _E [300µM/ml+100 J/cm ²]	2x10 ⁴	6x10 ⁹	6x10 ⁹	4x10 ⁹	ÜY ⁷	2x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁹	4x10 ⁴	3x10 ⁹	4x10 ⁹	8x10 ⁹	ÜY ⁷	2x10 ⁹	1x10 ⁹	1x10 ⁹
P _{PN} [300 µM/ml+100 J/cm ²]	2x10 ⁴	7x10 ⁹	6x10 ⁹	4x10 ⁹	6x10 ⁴	8x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁹	3x10 ⁴	4x10 ⁹	5x10 ⁹	8x10 ⁹	3x10 ³	2x10 ⁹	1x10 ⁹	1x10 ⁹
P _{PL} [100 µM/ml+100 J/cm ²]	8x10 ⁴	4x10 ⁹	6x10 ⁹	4x10 ⁹	2x10 ⁵	5x10 ⁹	5x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁵	4x10 ⁹	4x10 ⁹	8x10 ⁹	5x10 ⁴	2x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹

¹ Çoklu ilaç direci;

²Antimikrobiyal fotodinamik tedavi;

³Antimikrobiyal fotodinamik tedavi grubu;

⁴ Fotosensitizan grubu

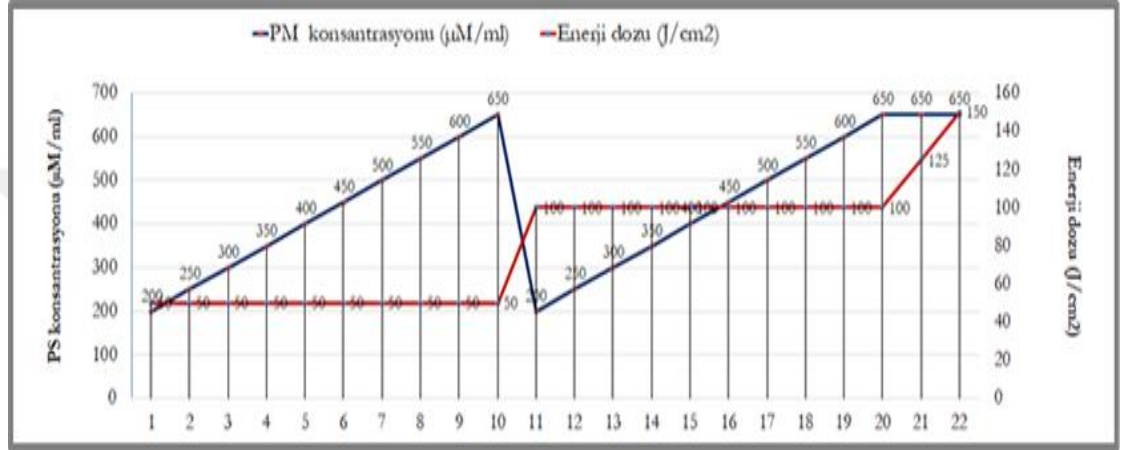
⁵ Kontrol grubu

⁶Üreme görülmedi (10⁻¹lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyal sağkalımındaki azalma >5 log₁₀ üzerindedir)

⁷Üreme görülmedi (10⁻¹lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyal sağkalımındaki azalma >7 log₁₀ üzerindedir)

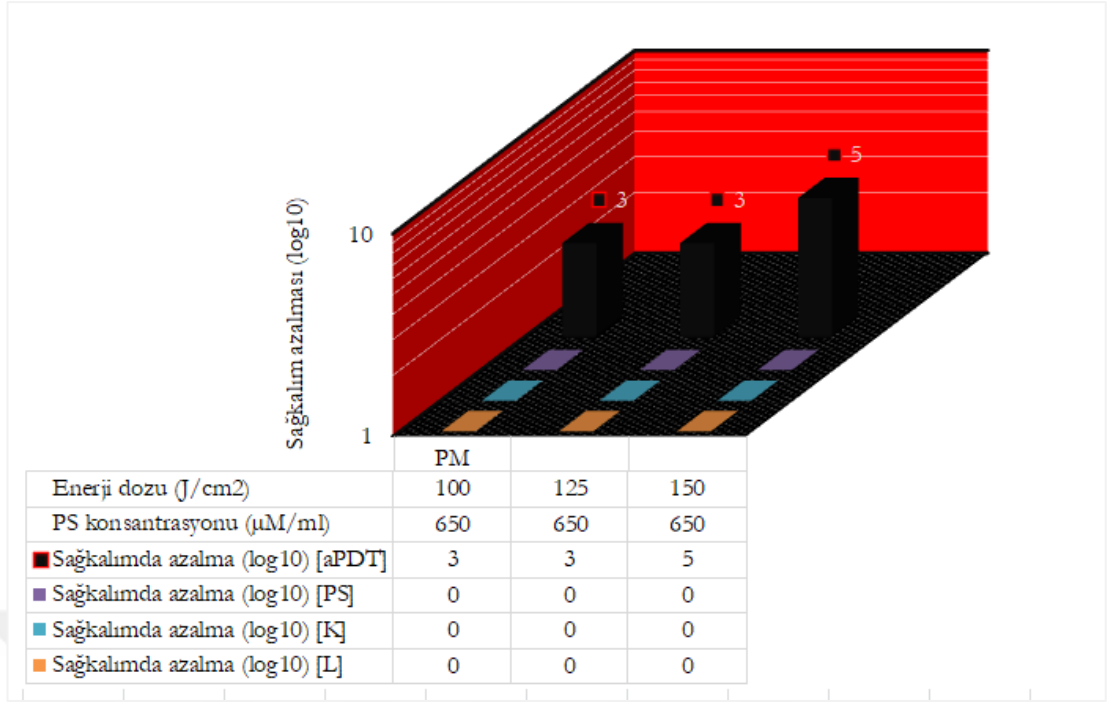
3.2.4. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli *Klebsiella pneumoniae* Klinik İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği

P_M 'nin fotosensitizan olarak kullanıldığı aPDT deneylerinde 50 J/cm^2 , 100 J/cm^2 , 125 J/cm^2 ve 150 J/cm^2 enerji dozlarının herbirinde Şekil 32'de görüldüğü gibi P_M konsantrasyonları kademeli bir şekilde arttırılarak aPDT'nin ÇİD *K.pneumoniae*-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği incelendi. Güçlü bir antimikrobiyal etkinlik 22. deneyde kullanılan [$650 \mu\text{M/ml}+150\text{J/cm}^2$] kombinasyonunda gerçekleşti.



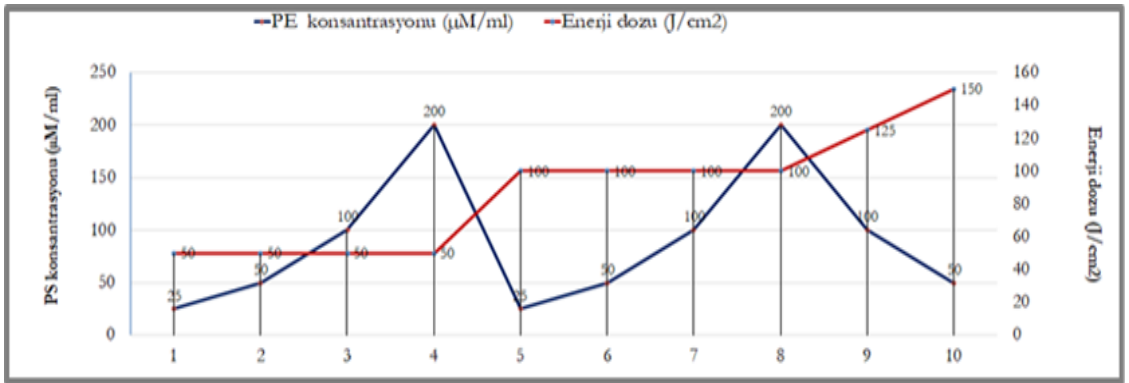
Şekil 32. P_M 'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*K. pneumoniae*-1)

50 J/cm^2 haricindeki enerji dozlarında ÇİD *K.pneumoniae*-1'e karşı antimikrobiyal etkinin görülmeye başladığı P_M konsantrasyonu $650 \mu\text{M/ml}$ 'dir. $650 \mu\text{M/ml}$ P_M konsantrasyonunda, herbir enerji dozunda bakteriyal sağkalımındaki azalma 100 J/cm^2 'de $3 \log_{10}$, 125 J/cm^2 'de $3 \log_{10}$, 150 J/cm^2 'de $5 \log_{10}$ 'dur. Fotoinaktivasyon etkisinin görüldüğü aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında sağkalım azalması görülmedi (Şekil 33).



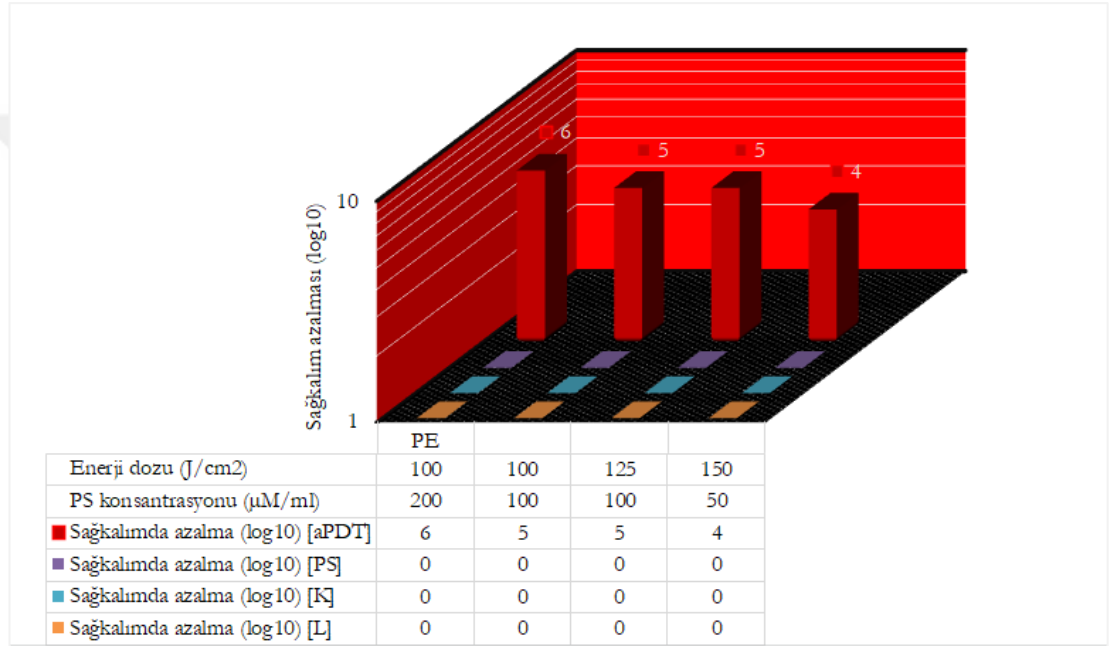
Şekil 33. P_M'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *K. pneumoniae*-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

P_E ile yapılan aPDT deneylerinde Şekil 34'de görüldüğü gibi 50-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve 25- 200 µM/ml aralığında değişen fotosensitizan konsantrasyonları kombine edilerek aPDT'nin fotoinaktivasyon etkinliği değerlendirildi. Güçlü bir fotoinaktivasyon etkinlik 100 J/cm² enerji dozu ve 200 µM/ml fotosensitizan konsantrasyonu parametrelerinin kombine edildiği 8. deneyde gerçekleşti. Fotoinaktivasyon etkinliği azaldığı kombinasyon ise [50 µM/ml+150J/cm²]'dur.



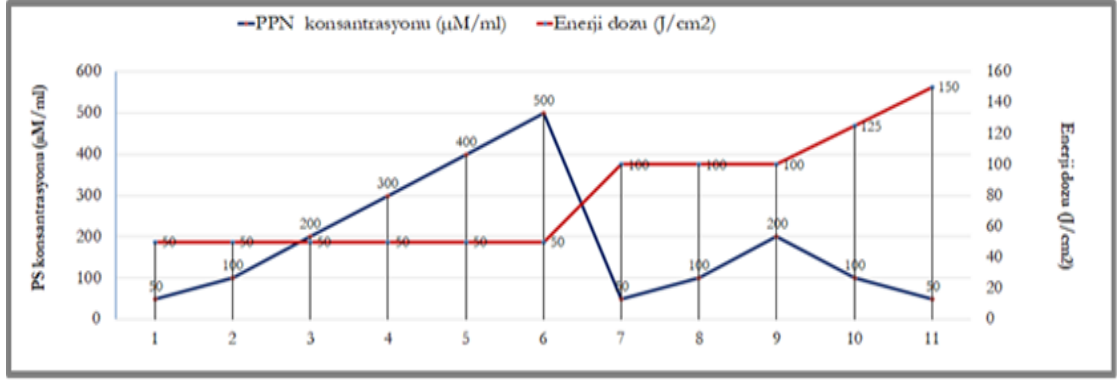
Şekil 34. P_E'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*K. pneumoniae*-1)

50 J/cm² enerji dozunda ≤200 µM/ml P_E konsantrasyonları ile gerçekleştirilen aPDT parametreleri ÇİD *K.pneumoniae*-1'e karşı antimikrobiyal etkinlik göstermedi. 100 J/cm² enerji dozunda 200 µM/ml ve 100 µM/ml P_E konsantrasyonlarının her birinde bakteriyel sağkalımındaki azalma 6 log₁₀ ve 5 log₁₀'dur. Deneylerde [100 µM/ml+125 J/cm²] ve [50µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonları ÇİD *K.pneumoniae*-1 sağkalımında sırasıyla 5 log₁₀ ve 4 log₁₀'luk azalmalar sağladı. Antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyel sağkalımında anlamlı azalmalar görülmedi (Şekil 35).



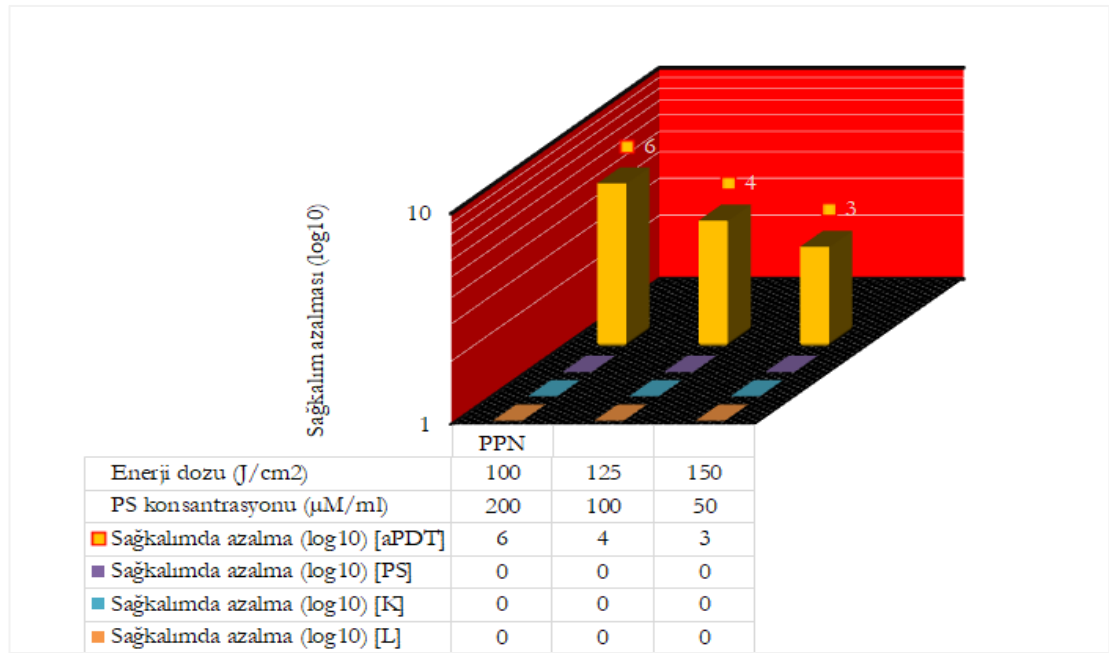
Şekil 35. P_E'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *K. pneumoniae*-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

P_{PN}'nin fotosensitizan olarak kullanıldığı deneylerde 50-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve 50-500 µM/ml aralığında değişen P_{PN} konsantrasyonları kombine edildi. Güçlü fotoinaktivasyon etkinlik [100 µM/ml+100 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 7.deneyde gerçekleşti. [50 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 11.deneyde antimikrobiyal etkinlik belirgin ölçüde düşüş gösterdi (Şekil 36).



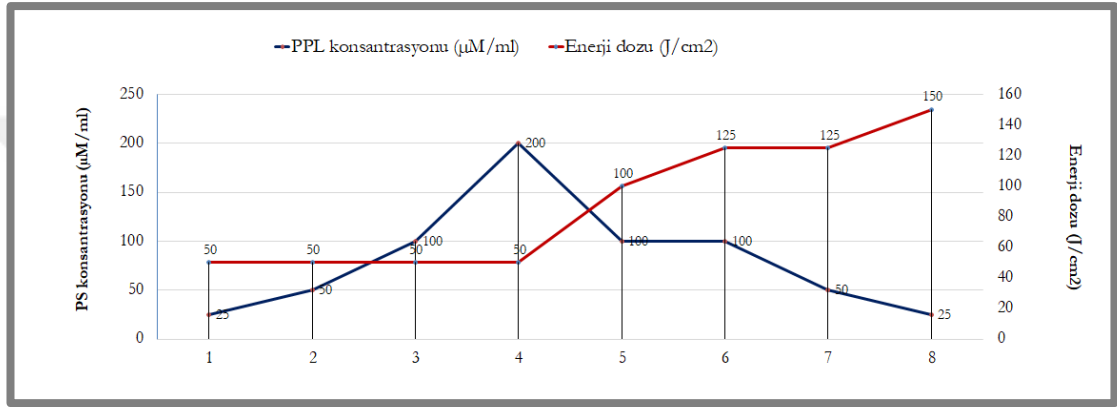
Şekil 36. P_{PN}'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*K. pneumoniae*-1)

Deneylerde, 50 J/cm² enerji dozu ve ≤500 µM/ml P_{PN} kombinasyonları ile gerçekleştirilen aPDT'lerin fotoinaktivasyon etkinliği yoktu. Şekil 37'de bazı kombinasyonların fotoinaktivasyon sonucu verilmekle birlikte, 100 J/cm² enerji dozunda 200 µM/ml, 300 µM/ml, 400 µM/ml ve 500 µM/ml P_{PN} konsantrasyonlarının çalışıldığı deneylerde ÇİD *K.pneumoniae*-1 klinik izolatında >6 log₁₀'luk azalmalar görüldü. [100µM/ml+125 J/cm²] ve [200µM/ml+125 J/cm²] parametrelerinde sırasıyla 4 log₁₀ ve 5log₁₀'luk düşüşler görülürken, [50µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonundaki düşüş 3 log₁₀ düzeyde sınırlı kaldı. Antimikrobiyal etkinliği olan aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında sağkalım azalması görülmedi.



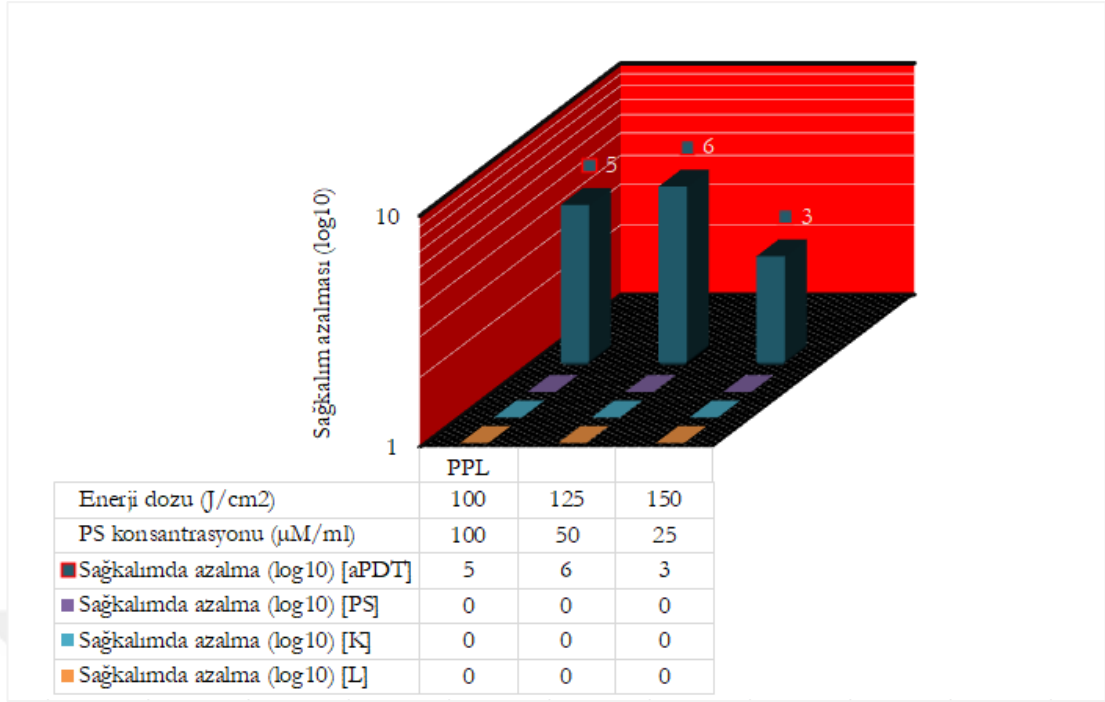
Şekil 37. P_{PN}'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *K. pneumoniae*-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

P_{PL} ile gerçekleştirilen aPDT deneylerinde Şekil 38’de görüldüğü gibi 50-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve 25-200 µM/ml aralığında değişim gösteren P_{PL} konsantrasyonları kombine edilerek aPDT’nin fotoinaktivasyon etkinliği değerlendirildi. Güçlü fotoianktivasyon etkinlik [100 µM/ml+50 J/cm²] kombinasyonun kullanıldığı 3.deneyde başladı. [200 µM/ml+50 J/cm²] kombinasyonun kullanıldığı 4.deneyden de aynı sonuç görüldü. 150 J/cm² enerji dozu 25 µM/ml fotosensitizan konsantrasyonunun kombine edildiği 8. deneyde fotoianktivasyon etkinlik belirgin ölçüde azaldı.



Şekil 38. P_{PL}’nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*K. pneumoniae*-1)

Şekil 39’da bazı kombinasyonların fotoinaktivasyon etkinliği gösterilmekle birlikte, [100µM/ml+50 J/cm²] ve [200µM/ml+50 J/cm²] kombinasyonlarının herbirinde sağkalım azalması 5 log₁₀’dur. [100µM/ml+100 J/cm²], [100µM/ml+125J/cm²] ve [50 µM/ml+125 J/cm²] kombinasyonların kullanıldığı aPDT deneylerinde sağkalım azalması sırasıyla 5 log₁₀, >6 log₁₀ ve 5 log₁₀’dur. [25µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonu ÇİD *K.pneumoniae*-1 klinik izolatında 3 log₁₀’luk bir azalma sağladı. Fotoinaktivasyon gerçekleşen aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyal sağkalımında anlamlı azalmalar görülmedi.



Şekil 39. P_{PL}'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *K. pneumoniae-1* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

ÇİD *K.pneumoniae-1* klinik izolatına karşı güçlü antimikrobiyal etki gösteren aPDT parametreleri ve bu parametrelerin diğer ÇİD *K.pneumoniae-2* klinik izolatına karşı antimikrobiyal etkinliği Tablo 8'de gösterildiği gibidir.

	Canlı hücre sayısı (cfu/ml)							
	ÇİD <i>K. pneumoniae-1</i>				ÇİD <i>K. pneumoniae-2</i>			
	[aPDT] ³	[PS] ⁴	[L] ⁵	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]
P _M [650 µM/ml+150 J/cm ²]	2x10 ⁴	4x10 ⁹	3x10 ⁹	3x10 ⁹	ÜY ⁶	7x10 ⁹	3x10 ⁹	4x10 ⁹
P _E [200µM/ml+125 J/cm ²]	2x10 ⁴	4x10 ⁹	3x10 ⁹	7x10 ⁹	2x10 ⁵	4x10 ⁹	3x10 ⁹	3x10 ⁹
P _{PN} [200 µM/ml+125J/cm ²]	2x10 ⁴	3x10 ⁹	3x10 ⁹	4x10 ⁹	6x10 ³	4x10 ⁹	3x10 ⁹	4x10 ⁹
P _{PL} [100 µM/ml+125 J/cm ²]	8x10 ³	7x10 ⁹	3x10 ⁹	4x10 ⁹	2x10 ³	3x10 ⁹	7x10 ⁹	4x10 ⁹

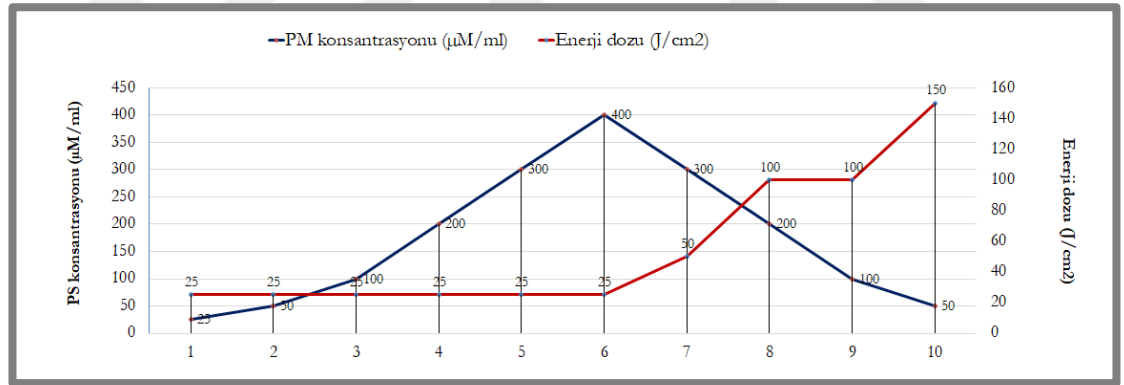
¹ Çoklu ilaç direci;
² Antimikrobiyal fotodinamik tedavi;
³ Antimikrobiyal fotodinamik tedavi grubu;
⁴ Fotosensitizan grubu
⁵ Kontrol grubu
⁶ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyal sağkalımındaki azalma >6 log üzerindedir)

ÇİD *K.pneumoniae-1* sağkalımında 5 log₁₀'luk azalma sağlayan [650 µM/ml P_M+150 J/cm²] kombinasyonu, ÇİD *K.pneumoniae-2* sağkalımında >6 log₁₀ azalma

sağladı. [200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ P_E+125 J/cm²] kombinasyonu *K.pneumoniae*-1'de 5 log₁₀'luk, *K.pneumoniae*-2'de 4 log₁₀'luk düşüş sağladı. [200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ P_{PN}+125 J/cm²] kombinasyonu *K.pneumoniae*-1 sağkalımında 5 log₁₀'luk düşüş sağlarken, *K.pneumoniae*-2'deki düşüş 6 log₁₀'dur. [100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ P_{PL}+125 J/cm²] aPDT kombinasyonunda her iki izolatta aynı etki görülmüş olup, bakteriyel sağkalımındaki azalma 6 log₁₀'dur (Tablo 7).

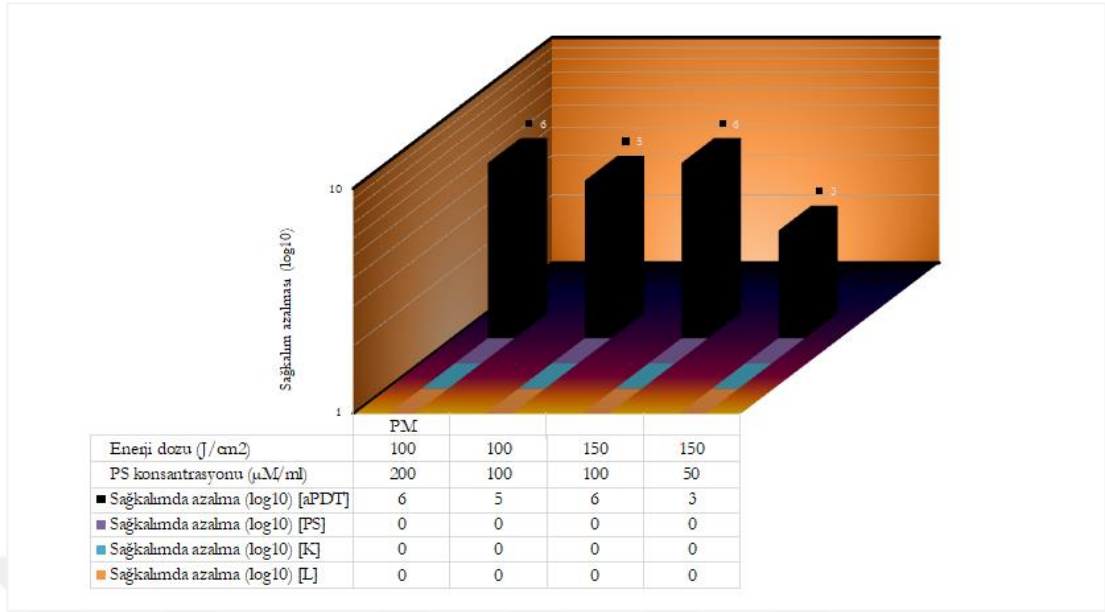
3.2.5. Fotoinaktivasyonun Çoklu İlaç Dirençli *Acinetobacter baumannii* Klinik İzolatları Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği

Şekil 40'da görüldüğü gibi 25-400 $\mu\text{M}/\text{ml}$ aralığında değişen P_M konsantrasyonları ve 50-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ile kombine edilerek aPDT'nin fotoinaktivasyon etkisi değerlendirildi. Güçlü fotoinaktivasyon etkinlik 5 deneydeki kombinasyonla başladı. [50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ +150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 9. deneyde fotoinaktivasyonun etkinliği önemli ölçüde düştü.



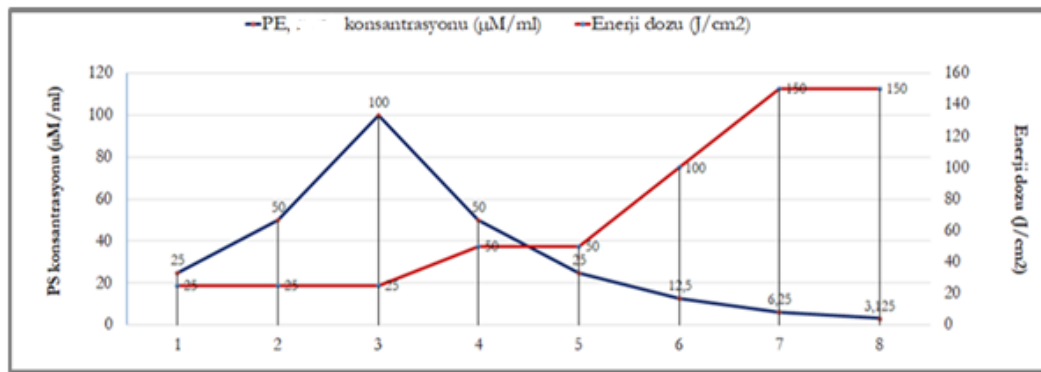
Şekil 40. P_M'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*A.baumannii*-1)

aPDT deneylerinde [400 $\mu\text{M}/\text{ml}$ +25 J/cm²] ve [300 $\mu\text{M}/\text{ml}$ +50 J/cm²] parametrelerinin herbiri ÇİD *A.baumannii*-1 klinik izolatında 4 log₁₀'luk azalma sağladı. [200 $\mu\text{M}/\text{ml}$ +100 J/cm²], [100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ +100 J/cm²], [100 $\mu\text{M}/\text{ml}$ +150 J/cm²] ve [50 $\mu\text{M}/\text{ml}$ +150 J/cm²] kombinasyonları ile gerçekleştirilen aPDT deneyleri ÇİD *A.baumannii*-1 sağkalımında >6 log₁₀, 5 log₁₀, >6 log₁₀ ve 3 log₁₀'luk düşüşler sağladı. Fotoinaktivasyon gösteren aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında sağkalım azalması görülmedi (Şekil 41).



Şekil 41. P_M'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *A.baumannii-1* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

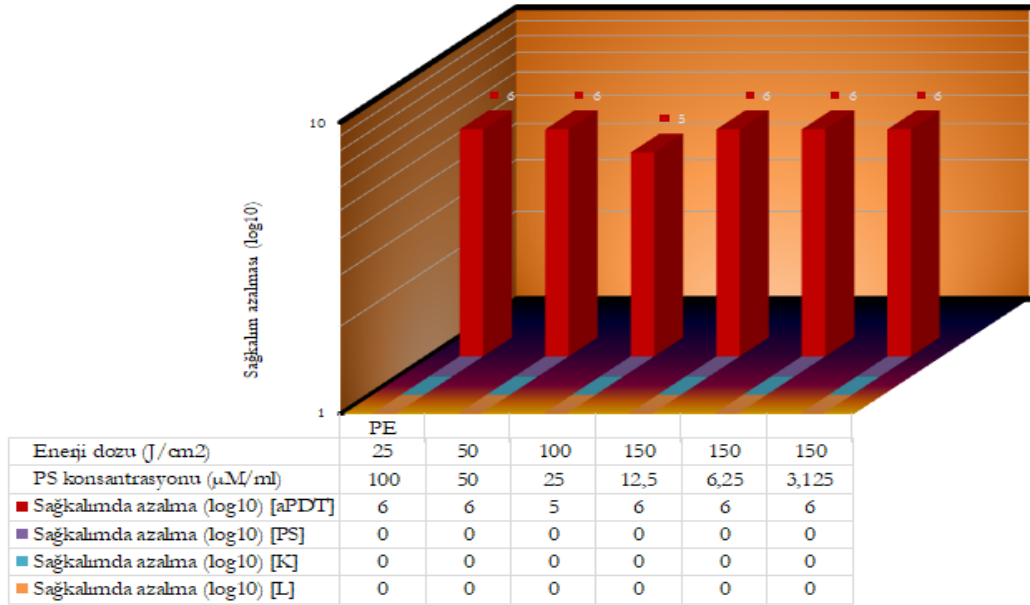
Fotosensitizan olarak P_E'nin kullanıldığı aPDT deneylerinde şekil 42'de görüldüğü gibi 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ile 3,125-100 µM/ml aralığında değişen konsantrasyonlar kombine edildi. Güçlü antimikrobiyal etkinlik 3.deneyde kullanılan [100 µM/ml+25 J/cm²] kombinasyonunda görülmeye başladı.



Şekil 42. P_E'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*A.baumannii-1*)

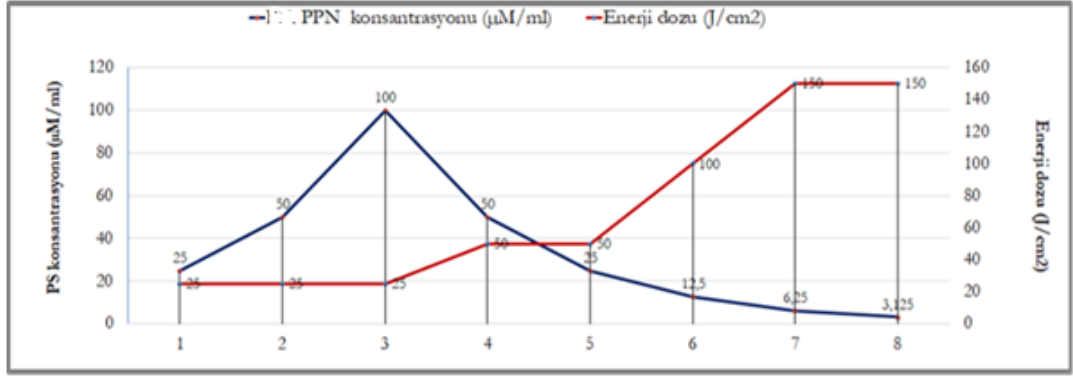
Deneylerde enerji dozunun yükseltilmesi ve fotosensitizan konsantrasyonunun düşürülmesi prensibi doğrultusunda belirlenen aPDT parametrelerinin ÇİD

A.baumannii-1 klinik izolatına karşı fotoinaktivasyon etkinliği Şekil 43’de gösterildiği gibidir. 25 J/cm² enerji dozunun kullanıldığı deneylerde bakteriyel sağkalımındaki azalmanın önemli ölçüde olduğu konsantrasyon 50 µM/ml olup, azalma 4 log₁₀’dur. Aynı enerji dozunda 100 µM/ml P_E konsantrasyonunda 6 log₁₀’un üzerinde bir azalma meydana geldi. [50 µM/ml+50 J/cm²] ve [25 µM/ml+100 J/cm²] kombinasyonlarının her birinde sağkalım azalması sırasıyla >6 log₁₀ ve 5 log₁₀’dur. [12,50 µM/ml+150 J/cm²], [6,25 µM/ml+150 J/cm²] ve [3,125 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonlarının herbiri ÇİD *A.baumannii*-1’de 6 log₁₀’luk bir azalmalar sağladı. Fotoinaktivasyonun görüldüğü aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında sağkalım azalması görülmedi.



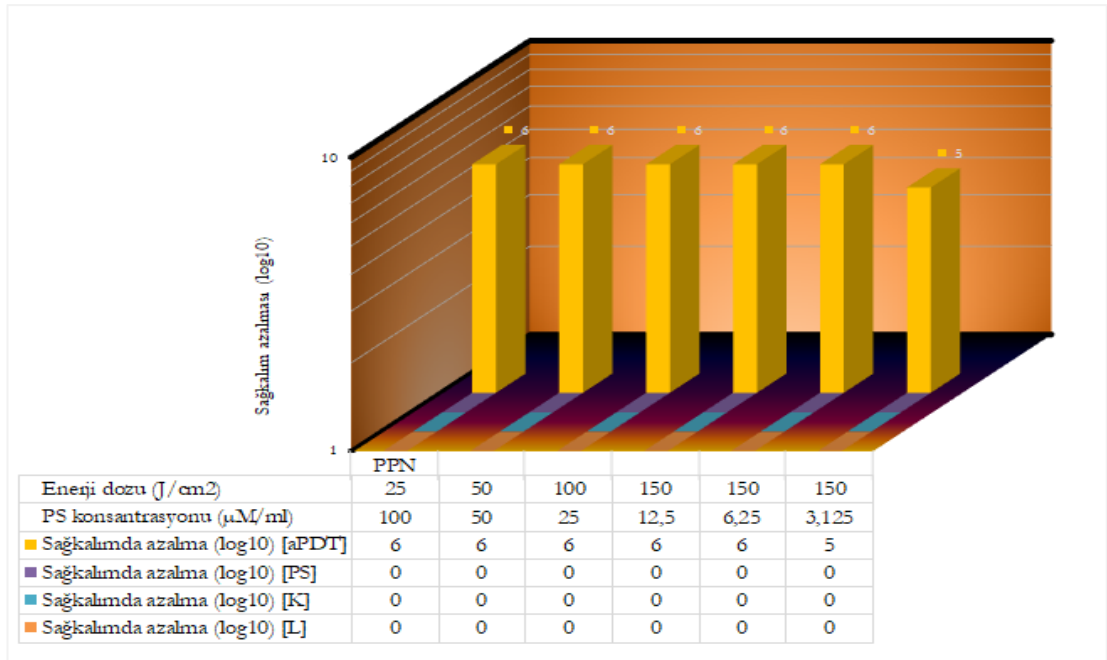
Şekil 43. P_E’nin kullanıldığı aPDT’lerin ÇİD *A.baumannii*-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

P_{PN}’nin kullanıldığı aPDT deneylerinde fotosensitizan konsantrasyonu 100 µM/ml’den 3,125 µM/ml’ye kadar düşürülerek, enerji dozu 25 J/cm²’den 150 J/cm²’e kademeli olarak yükseltilerek aPDT’nin klinik izolat üzerindeki antimikrobiyal etkinliği değerlendirildi. Deneylerde, [100µM/ml +25 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 3.deneyde güçlü antimikrobiyal etkinlik başladı (Şekil 44).



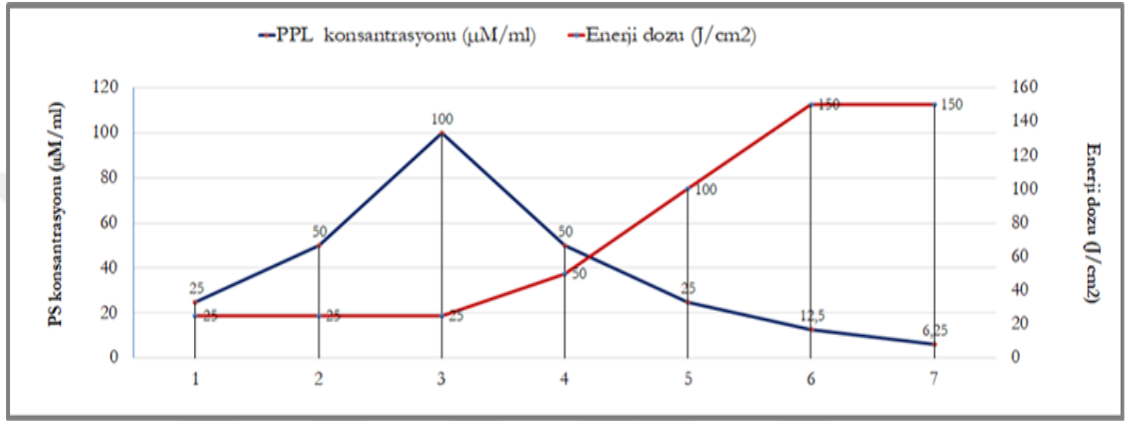
Şekil 44. P_{PN}'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*A.baumannii*-1)

Deneylerde etkili fotoinaktivasyonun başladığı noktadan itibaren P_{PN} konsantrasyonunun düşürülmesi ve bunun tersine enerji dozunun artırılması ile oluşan kombinasyonların antimikrobiyal etkinliği Şekil 45'de gösterildiği gibidir. Deneylerde, [100 µM/ml+25 J/cm²], [50 µM/ml +50 J/cm²], [25 µM/ml+100 J/cm²], [12,50 µM/ml+150 J/cm²], [6,25 µM/ml+150 J/cm²] ve [3,125 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonları ÇİD *A.baumannii*-1 sağkalımında sırasıyla 6 log₁₀, >6 log₁₀, 6 log₁₀, >6 log₁₀, >6 log₁₀ ve 5 log₁₀'luk düşüşler sağladı. Antimikrobiyal etkinliğin görüldüğü aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyel sağkalımında anlamlı azalmalar görülmedi.



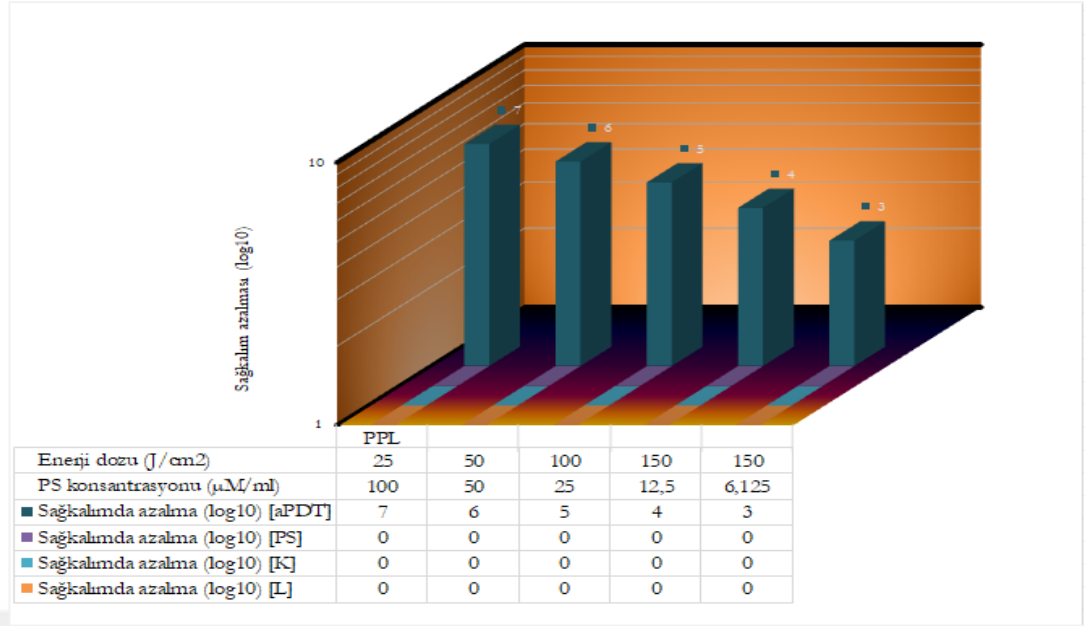
Şekil 45. P_{PN}'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *A.baumannii*-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

Fotosensitizan olarak P_{PL}'nin kullanıldığı deneylerde 25-150 J/cm² enerji dozları ve 6,25-100 µM/ml fotosensitizan konsantrasyonları kombine edilerek antimikrobiyal etkinlik araştırıldı. Deneylerde, [100µM/ml+25 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 3.deneyde güçlü antimikrobiyal etkinlik başladı, [6,25 µM/ml+150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 7. deneyde fotoinaktivasyon etkinlik belirgin düzeyde azaldı (Şekil 46).



Şekil 46. P_{PL}'nin kullanıldığı deneylerde aPDT parametreleri (*A.baumannii-1*)

Deneylerde [100 µM/ml+25 J/cm²], [50 µM/ml+50 J/cm²], [25 µM/ml+100 J/cm²], [12,5 µM/ml+150 J/cm²] ve [6,25 µM/ml+150 J/cm²] aPDT parametreleri ÇİD *A.baumannii-1* sağkalımında sırasıyla >7 log₁₀, >6 log₁₀, 5 log₁₀ ve 4 log₁₀'luk azalmalar sağladı. 150 J/cm² enerji dozunda fotosensitizan konsantrasyonu 3,125 µM/ml değerine düşürüldüğünde aPDT'nin antimikrobiyal etkinliği de azalmış olup, sağkalımdaki azalma 3 log₁₀ ile sınırlı kaldı. Fotoinaktivasyon sağlayan aPDT parametrelerinin herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında sağkalım azalması görülmedi (Şekil 47).



Şekil 47. P_{PL}'nin kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD *A.baumannii*-1 üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

ÇİD *A.baumannii*-1 klinik izolatına karşı güçlü antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT kombinasyonları ve bu kombinasyonların diğer ÇİD *A.baumannii* klinik izolatları üzerindeki antimikrobiyal etkinliği Tablo 7'de görüldüğü gibidir. P_M'nin kullanıldığı deneylerde ÇİD *A.baumannii*-1 sağkalımında 5 log₁₀'luk düşüş sağlayan [100 μM/ml+100 J/cm²] kombinasyonu *A.baumannii*-12 izolatında 3 log₁₀; *A.baumannii*-3, *A.baumannii*-4, *A.baumannii*-11, *A.baumannii*-13 ve *A.baumannii*-14 klinik izolatlarının her birinde 5 log₁₀; *A.baumannii*-2, *A.baumannii*-7, *A.baumannii*-8, *A.baumannii*-9 ve *A.baumannii*-10 klinik izolatlarında 6 log₁₀; *A.baumannii*-5 ve *A.baumannii*-6 izolatlarında >7 log₁₀'luk azalma sağladı. P_E'nin fotosensitizan olarak kullanıldığı deneylerde ÇİD *A.baumannii*-1 sağkalımında >6 log₁₀'luk düşüş sağlayan [50 μM/ml+50 J/cm²] kombinasyonu *A.baumannii*-8, *A.baumannii*-10, *A.baumannii*-11 ve *A.baumannii*-14 klinik izolatlarında 5 log₁₀; *A.baumannii*-2, *A.baumannii*-3, *A.baumannii*-5, *A.baumannii*-7, *A.baumannii*-9, *A.baumannii*-12 ve *A.baumannii*-13 klinik izolatlarında 6 log₁₀; *A.baumannii*-4 ve *A.baumannii*-6 izolatlarında >7 log₁₀'luk düşüşler sağladı. P_N'nin kullanıldığı deneylerde ÇİD *A.baumannii*-1 sağkalımında >6 log₁₀'luk düşüş sağlayan [50 μM/ml+50 J/cm²] kombinasyonu *A.baumannii*-2, *A.baumannii*-8, *A.baumannii*-11, *A.baumannii*-13 ve *A.baumannii*-14 izolatlarında 5 log₁₀'luk; *A.baumannii*-4, *A.baumannii*-6,

A.baumannii-9, *A.baumannii*-10 ve *A.baumannii*-12 klinik izolatlarında 6 log₁₀; *A.baumannii*-3, *A.baumannii*-5 ve *A.baumannii*-7 izolatlarında >7 log₁₀ azalma sağladı. PPL'nin kullanıldığı aPDT deneylerinde ÇİD *A.baumannii*-1 sağkalımında >6 log₁₀'un üzerinde azalma sağlayan [50 µM/ml+50 J/cm²] kombinasyonu *A.baumannii*-2, *A.baumannii*-5, *A.baumannii*-8, *A.baumannii*-10, *A.baumannii*-11 ve *A.baumannii*-14 klinik izolatlarında 5 log₁₀'luk; *A.baumannii*-3, *A.baumannii*-4, *A.baumannii*-9, *A.baumannii*-12 ve *A.baumannii*-13 klinik izolatlarda 6 log₁₀; *A.baumannii*-6 ve *A.baumannii*-7 izolatlarında ise >7 log₁₀'luk azalma sağladı.



Tablo 8. aPDT'nin ÇİD¹ *A. baumannii* klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği

aPDT ¹ parametreleri	Canlı hücre sayısı (cfu/ml)															
	ÇİD <i>A.baumannii</i> -1				ÇİD <i>A.baumannii</i> -2				ÇİD <i>A.baumannii</i> -3				ÇİD <i>A.baumannii</i> -4			
	[aPDT] ³	[PS] ⁴	[L] ⁵	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]
P _M [100 µM/ml+100 J/cm ²]	4x10 ⁴	5x10 ⁹	3x10 ⁹	6x10 ⁹	3x10 ³	3x10 ⁹	2x10 ⁹	1x10 ⁹	9x10 ⁴	5x10 ⁹	4x10 ⁹	3x10 ⁹	9x10 ⁴	9x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹
P _E [50µM/ml+50 J/cm ²]	ÜY ⁶	6x10 ⁹	6x10 ⁹	3x10 ⁹	2x10 ³	2x10 ⁹	1x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ³	3x10 ⁹	4x10 ⁹	3x10 ⁹	ÜY ⁶	2x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹
P _{PN} [50 µM/ml+50 J/cm ²]	ÜY ⁶	7x10 ⁹	6x10 ⁹	3x10 ⁹	2x10 ⁴	8x10 ⁹	2x10 ⁹	1x10 ⁹	ÜY ⁶	4x10 ⁹	5x10 ⁹	3x10 ⁹	1x10 ³	2x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹
P _{PL} [50 µM/ml+50 J/cm ²]	ÜY ⁶	4x10 ⁹	6x10 ⁹	3x10 ⁹	3x10 ⁴	5x10 ⁹	5x10 ⁹	1x10 ⁹	9x10 ³	4x10 ⁹	4x10 ⁹	3x10 ⁹	5x10 ⁴	2x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹

¹ Çoklu ilaç direci;

²Antimikrobiyal fotodinamik tedavi;

³Antimikrobiyal fotodinamik tedavi grubu;

⁴ Fotosensitizan grubu

⁵ Kontrol grubu

⁶ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyal sağkalımındaki azalma >7 log₁₀ üzerindedir)

⁷ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyal sağkalımındaki azalma >6 log₁₀ üzerindedir)

Tablo 7'nin devamı. aPDT'nin ÇİD¹ *A. baumannii* klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği

aPDT ¹ parametreleri	Canlı hücre sayısı (cfu/ml)															
	ÇİD <i>A.baumannii</i> -5				ÇİD <i>A.baumannii</i> -6				ÇİD <i>A.baumannii</i> -7				ÇİD <i>A.baumannii</i> -8			
	[aPDT] ³	[PS] ⁴	[L] ⁵	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]
P _M [100 µM/ml+100 J/cm ²]	ÜY ⁶	5x10 ⁹	3x10 ⁹	2x10 ⁹	ÜY ⁶	3x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ³	5x10 ⁹	4x10 ⁹	2x10 ⁹	1x10 ³	9x10 ⁹	1x10 ⁹	3x10 ⁹
P _E [50µM/ml+50 J/cm ²]	1x10 ³	6x10 ⁹	6x10 ⁹	2x10 ⁹	ÜY ⁶	2x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁹	5x10 ³	3x10 ⁹	4x10 ⁹	2x10 ⁹	5x10 ⁴	2x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹
P _{PN} [50 µM/ml+50 J/cm ²]	2x10 ²	7x10 ⁹	6x10 ⁹	2x10 ⁹	8x10 ³	8x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁹	ÜY ⁶	4x10 ⁹	5x10 ⁹	2x10 ⁹	5x10 ⁴	2x10 ⁹	1x10 ⁹	7x10 ⁹
P _{PL} [50 µM/ml+50 J/cm ²]	2x10 ³	4x10 ⁹	6x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ³	5x10 ⁹	5x10 ⁹	2x10 ⁹	ÜY ⁶	4x10 ⁹	4x10 ⁹	2x10 ⁹	6x10 ⁴	2x10 ⁹	1x10 ⁹	7x10 ⁹

¹ Çoklu ilaç direci;

²Antimikrobiyal fotodinamik tedavi;

³Antimikrobiyal fotodinamik tedavi grubu;

⁴ Fotosensitizan grubu

⁵ Kontrol grubu

⁶ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyel sağkalımındaki azalma >7 log₁₀ üzerindedir)

⁷ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyel sağkalımındaki azalma >6 log₁₀ üzerindedir)

Tablo 7'nin devamı. aPDT'nin ÇİD¹ *A. baumannii* klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği

aPDT ¹ parametreleri	Canlı hücre sayısı (cfu/ml)															
	ÇİD <i>A.baumannii-9</i>				ÇİD <i>A.baumannii-10</i>				ÇİD <i>A.baumannii-11</i>				ÇİD <i>A.baumannii-12</i>			
	[aPDT] ³	[PS] ⁴	[L] ⁵	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]
P _M [100 µM/ml+100 J/cm ²]	4x10 ³	5x10 ⁹	3x10 ⁹	2x10 ⁹	1x10 ³	3x10 ⁹	2x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁴	5x10 ⁹	4x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁶	9x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹
P _E [50µM/ml+50 J/cm ²]	3x10 ³	6x10 ⁹	6x10 ⁹	2x10 ⁹	3x10 ⁴	2x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁴	3x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁹	8x10 ³	2x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹
P _{PN} [50 µM/ml+50 J/cm ²]	3x10 ³	7x10 ⁹	6x10 ⁹	2x10 ⁹	1x10 ³	8x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁹	4x10 ⁴	4x10 ⁹	5x10 ⁹	2x10 ⁹	8x10 ³	2x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹
P _{PL} [50 µM/ml+50 J/cm ²]	2x10 ³	4x10 ⁹	6x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁴	5x10 ⁹	5x10 ⁹	2x10 ⁹	3x10 ⁴	4x10 ⁹	4x10 ⁹	2x10 ⁹	6x10 ³	2x10 ⁹	1x10 ⁹	2x10 ⁹

¹ Çoklu ilaç direci;

²Antimikrobiyal fotodinamik tedavi;

³Antimikrobiyal fotodinamik tedavi grubu;

⁴ Fotosensitizan grubu

⁵ Kontrol grubu

⁶ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyal sağkalımındaki azalma >7 log₁₀ üzerindedir)

⁷ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyal sağkalımındaki azalma >6 log₁₀ üzerindedir)

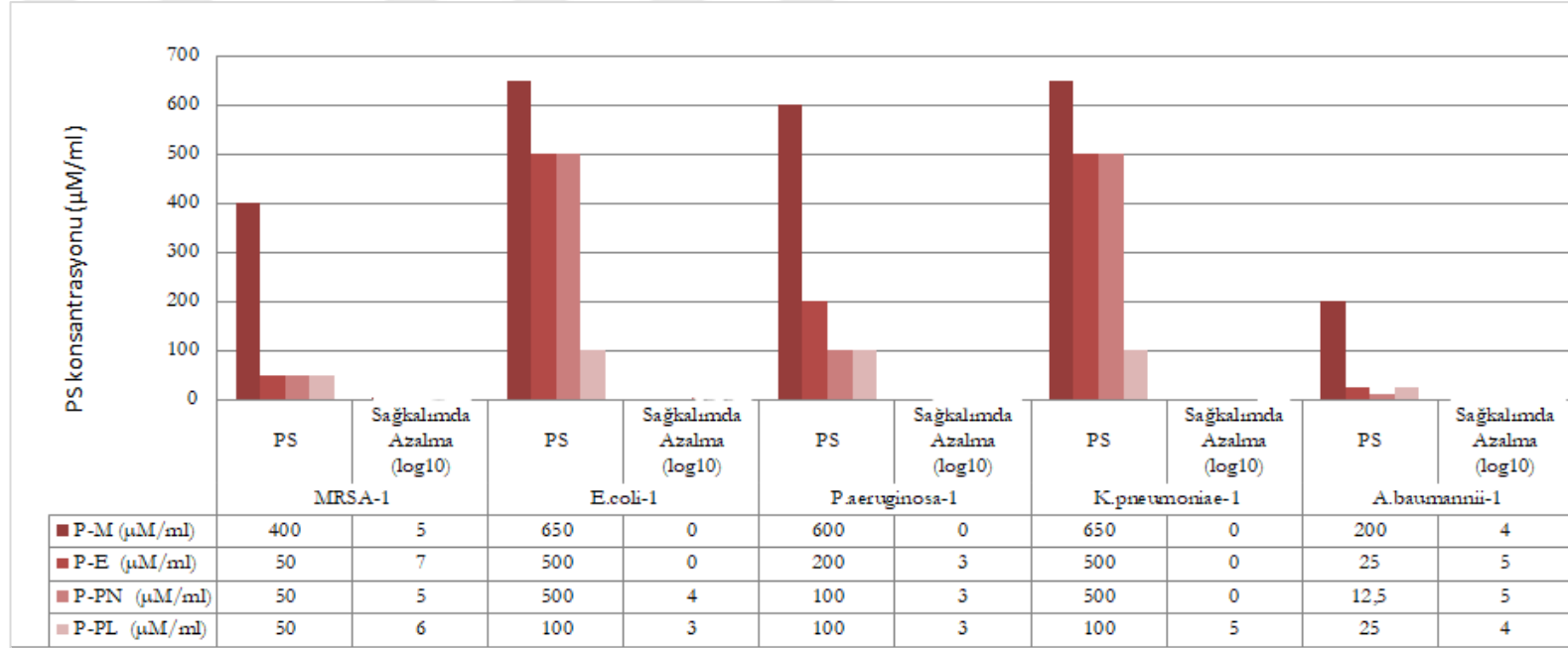
Tablo 7'nin devamı. aPDT'nin ÇİD ¹ <i>A. baumannii</i> klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği								
	Canlı hücre sayısı (cfu/ml)							
	ÇİD <i>A.baumannii-13</i>				ÇİD <i>A.baumannii-14</i>			
	[aPDT] ³	[PS] ⁴	[L] ⁵	[K]	[aPDT]	[PS]	[L]	[K]
P _M [100 µM/ml+100 J/cm ²]	2x10 ⁴	5x10 ⁹	3x10 ⁹	2x10 ⁹	6x10 ⁴	3x10 ⁹	2x10 ⁹	8x10 ⁹
P _E [50µM/ml+50 J/cm ²]	4x10 ³	6x10 ⁹	6x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁴	2x10 ⁹	2x10 ⁹	6x10 ⁹
P _{PN} [50 µM/ml+50 J/cm ²]	2x10 ⁴	7x10 ⁹	6x10 ⁹	2x10 ⁹	2x10 ⁴	8x10 ⁹	2x10 ⁹	6x10 ⁹
P _{PL} [50 µM/ml+50 J/cm ²]	3x10 ³	4x10 ⁹	6x10 ⁹	2x10 ⁹	5x10 ⁴	5x10 ⁹	5x10 ⁹	6x10 ⁹

¹ Çoklu ilaç direci;
²Antimikrobiyal fotodinamik tedavi;
³Antimikrobiyal fotodinamik tedavi grubu;
⁴ Fotosensitizan grubu
⁵ Kontrol grubu
⁶ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyal sağkalımındaki azalma >7 log üzerindedir)
⁷ Üreme görülmedi (10⁻¹'lik dilüsyonda üreme görülmeyip, bakteriyal sağkalımındaki azalma >6 log üzerindedir)

3.2.6. Aynı Enerji Dozunda Farklı Fotosensitizan Konsantrasyonları İle Gerçekleştirilen Fotoinaktivasyonun Klinik İzolatlar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği

3.2.6.1. 50 J/cm² Enerji Dozunun Kullanıldığı Fotoinaktivasyon

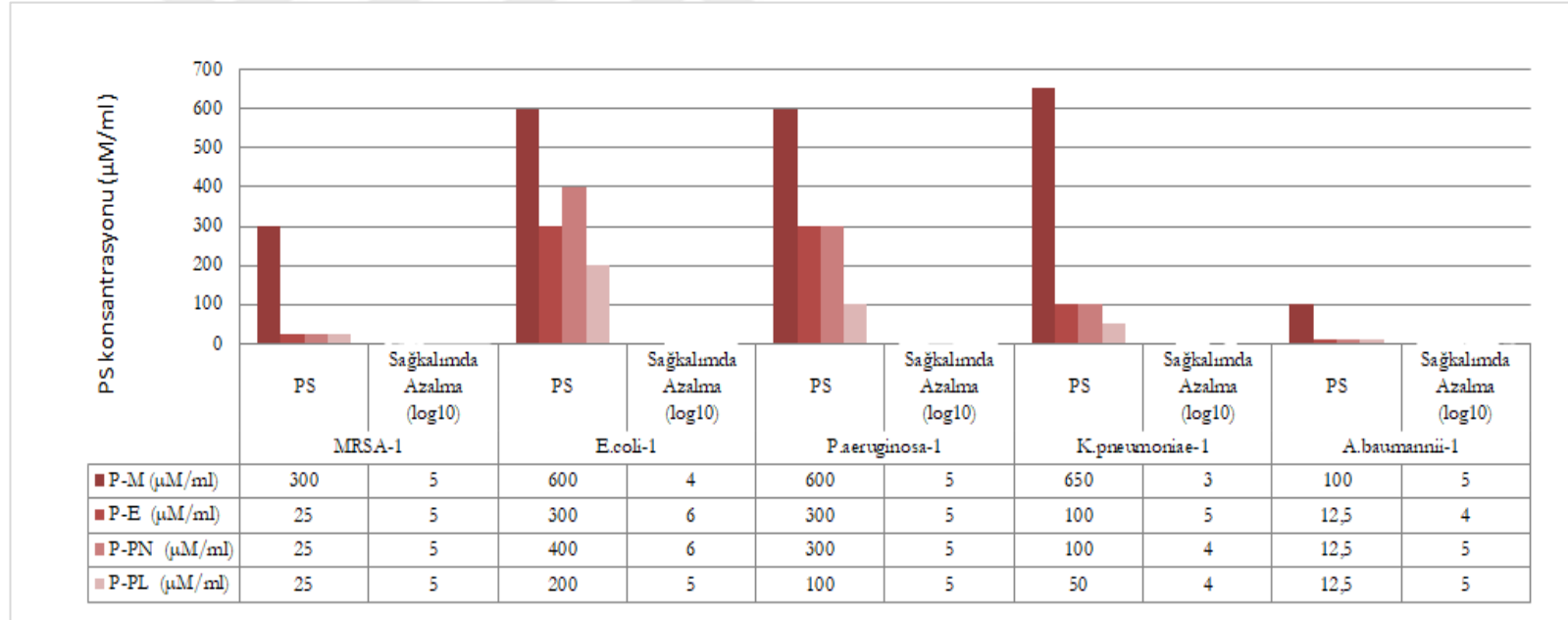
50 J/cm² enerji dozunun kullanıldığı deneylerde ÇİD klinik izolatlarında ≥ 3 log₁₀ azalma sağlayan her bir KPT'nin konsantrasyonu Şekil 48'de gösterildiği gibidir. 400 µM/ml P_M MRSA-1 sağkalımında 5 log₁₀, 200 µM/ml P_M *A.baumannii-1*'de 4 log₁₀'luk azalmalar sağlarken, 600 veya 650 µM/ml P_M *E.coli-1*, *P.aeruginosa-1*, *K.pneumoniae-1* izolatlarına karşı etkisiz kaldı. P_E'nin kullanıldığı deneylerde 50 µM/ml MRSA-1 sağkalımında 7 log₁₀, 200 µM/ml *P.aeruginosa-1*'de 3 log₁₀ ve 25 µM/ml *A.baumannii-1*'de 5 log₁₀'luk düşüşler sağlarken, 500 µM/ml P_E *K.pneumoniae-1* ve *E.coli-1* izolatlarına karşı etkisiz kaldı. P_{PN}'nin kullanıldığı deneylerde 50 µM/ml MRSA-1 sağkalımında 5 log₁₀, 500 µM/ml *E.coli-1*'de 4 log₁₀, 100 µM/ml *P.aeruginosa-1*'de 3 log₁₀ ve 12,50 µM/ml *A.baumannii-1*'de 5 log₁₀'luk azalmalar sağlarken, 500 µM/ml P_{PN} *K.pneumoniae-1*'e karşı etkisiz kaldı. P_{PL} 50 µM/ml'de MRSA-1 sağkalımında 6 log₁₀, 100 µM/ml'de *E.coli-1* ve *P.aeruginosa-1* izolatlarının her birinde 3 log₁₀, 100 µM/ml'de *K.pneumoniae-1*'de 5 log₁₀ ve 25 µM/ml'de *A.baumannii-1*'de 4 log₁₀'luk düşüşler sağladı.



Şekil 48. 50 J/cm² enerji dozunun kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD klinik izolatlar üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

3.2.6.2. 100 J/cm² Enerji Dozunun Kullanıldığı Fotoinaktivasyon

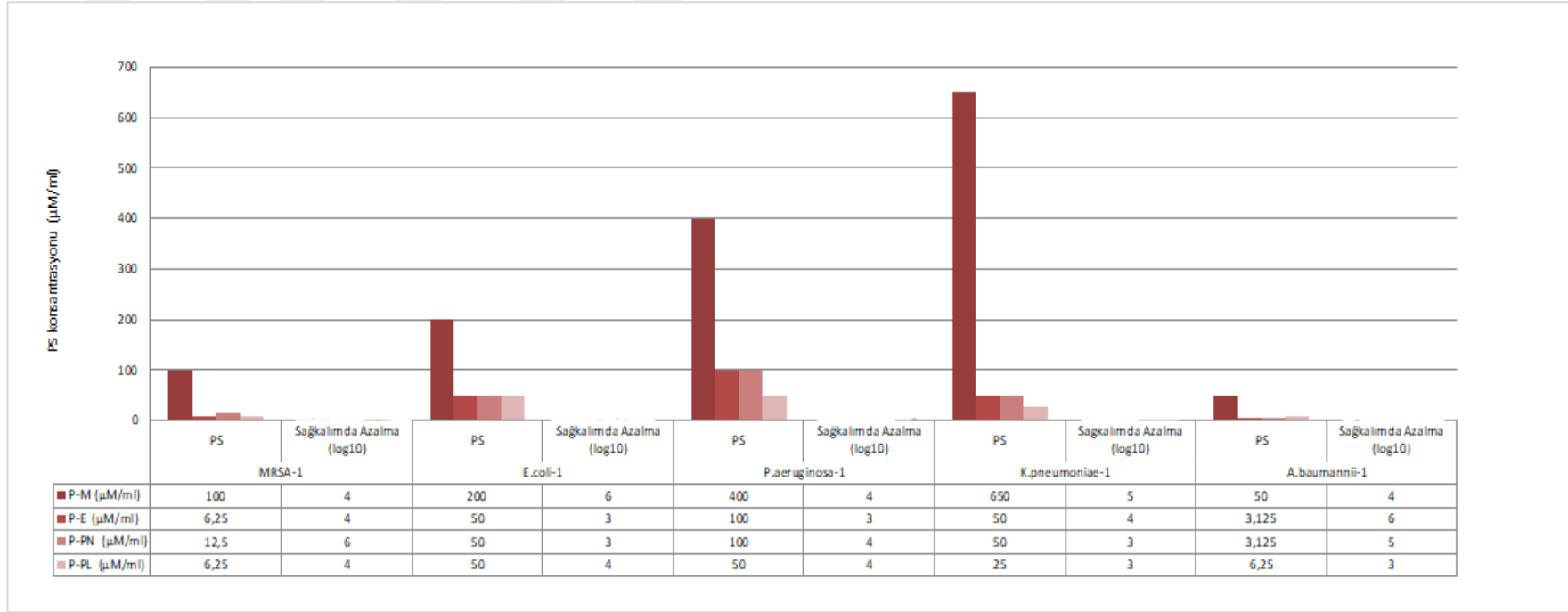
100 J/cm² enerji dozunda ÇİD klinik izolatlarında $\geq 4 \log_{10}$ azalma sağlayan her bir KPT'nin konsantrasyonu Şekil 49'da gösterildiği gibidir. 300 µM/ml P_M MRSA-1 sağkalımında 5 log₁₀, 600 µM/ml P_M *E.coli*-1 ve *P.aeruginosa*-1 sağkalımında sırasıyla 4 log₁₀ ve >5 log₁₀, 650 µM/ml P_M *K.pneumoniae*-1'de 3 log₁₀, 100 µM/ml P_M *A.baumannii*-1'de 5 log₁₀'luk azalmalar sağladı. 25 µM/ml P_E konsantrasyonu MRSA-1 sağkalımında 5 log₁₀, 300 µM/ml P_E *E.coli*-1 ve *P.aeruginosa*-1 sağkalımında sırasıyla >6 log₁₀ ve 5 log₁₀, 100 µM/ml P_E *K.pneumoniae*-1'de 5 log₁₀ ve 12,50 µM/ml P_E *A.baumannii*-1'de 4 log₁₀'luk düşüşler sağladı. 25 µM/ml P_{PN} MRSA-1 sağkalımında 5 log₁₀, 400 µM/ml P_{PN} *E.coli*-1'de >6 log₁₀, 300 µM/ml P_{PN} *P.aeruginosa*-1'de 5 log₁₀, 100 µM/ml P_{PN} *K.pneumoniae*-1'de 4 log₁₀'luk ve 12,50 µM/ml P_{PN} *A.baumannii*-1'de 5 log₁₀'luk azalmalar gerçekleştirdi. 25 µM/ml P_{PL} MRSA-1 sağkalımında 5 log₁₀, 200 µM/ml P_{PL} *E.coli*-1'de 5 log₁₀, 100 µM/ml P_{PL} *P.aeruginosa*-1'de 5 log₁₀, 50 µM/ml P_{PL} *K.pneumoniae*-1'de 4 log₁₀ ve 12,5 µM/ml P_{PL} *A.baumannii*-1'de 5 log₁₀'luk düşüşler sağladı.



Şekil 49. 100 J/cm² enerji dozunun kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD klinik izolatlar üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

3.2.6.3. 150 J/cm² Enerji Dozunun Kullanıldığı Fotoinaktivasyon

150 J/cm² enerji dozunda ÇİD klinik izolatlarında $\geq 3 \log_{10}$ azalma sağlayan her bir KPT konsantrasyonu Şekil 50'de gösterildi. 100 µM/ml P_M konsantrasyonu MRSA-1 sağkalımında 4 log₁₀, 200 µM/ml P_M *E.coli*-1'de >6 log₁₀, 400 µM/ml P_M *P.aeruginosa*-1'de 4 log₁₀, 650 µM/ml P_M *K.pneumoniae*-1'de 5 log₁₀, 50 µM/ml P_M *A.baumannii*-1'de 4 log₁₀'luk azalmalar sağladı. 6,25 µM/ml P_E konsantrasyonu MRSA-1 sağkalımında 4 log₁₀, 50 µM/ml P_E *E.coli*-1 ve 100 µM/ml P_E *P.aeruginosa*-1'in her birinde 3 log₁₀, 50 µM/ml P_E *K.pneumoniae*-1'de 4 log₁₀ ve 3,125 µM/ml P_E *A.baumannii*-1'de 6 log₁₀'luk azalmalar sağladı. 12,50 µM/ml P_{PN} MRSA-1 sağkalımında >6 log₁₀, 50 µM/ml P_{PN} *E.coli*-1'de 3 log₁₀, 100 µM/ml P_{PN} *P.aeruginosa*-1'de 4 log₁₀, 50 µM/ml P_{PN} *K.pneumoniae*-1'de 3 log₁₀ ve 3,125 µM/ml P_{PN} *A.baumannii*-1'de 5 log₁₀'luk azalmalar sağladı. 6,25 µM/ml P_{PL} MRSA-1 sağkalımında 4 log₁₀, 50 µM/ml P_{PL} *E.coli*-1 ve *P.aeruginosa*-1'in her birinde 4 log₁₀, 25 µM/ml P_{PL} *K.pneumoniae*-1'de 3 log₁₀ ve 6,25 µM/ml P_{PL} *A.baumannii*-1'de 3 log₁₀'luk düşüşler gerçekleştirdi.



Şekil 50. 150 J/cm² enerji dozunun kullanıldığı aPDT'lerin ÇİD klinik izolatlar üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

BÖLÜM IV

4. TARTIŞMA

aPDT’de kullanılacak fotosensitizanın canlı hücrelerine toksik etki göstermeyen, sadece ışıkla aktive olabilen, belirli bir dalga boyunu soğurma kapasitesi yüksek, lokal uygulamalarda etkisini kaybetmeyen, karanlık toksisitesi düşük olan ve geniş spektrumda maksimal düzeyde antimikrobiyal etkinlik gösterebilmesi kilit öneme sahiptir (90). Araştırmalarda gram negatif ve gram pozitif bakterin aPDT’ye karşı duyarlılıklarının farklılıklar gösterdiği, bu farklılığın PS’nin yük durumundan ve bakteri hücre duvarı yapısından kaynaklandığı bildirilmektedir. Çalışmalarda, gram pozitif bakterilerde nötral, anyonik veya katyonik özellikte PS etkili olurken, dış membranı itibariyle güçlü bir negatif yüke sahip olan gram negatif bakterilerde ise PS’ye katyonik özellik kazandırılması gerektiği bildirilmektedir (96,97,100,54,51,106,107,73,64,108–113,142). Araştırmalarda, katyonik özellik kazandırılmış porfirin analoglarının Fe²⁺PPXI-alım mekanizmalarını ile bakteri içerisine rahatlıkla nüfus ettiği bildirilmektedir (64,67,65,66). Çalışmamızda aPDT’nin gram negatif ve gram pozitif bakterilerde etkili fotoinaktivasyon gösterme yeteneğinde olan ve literatürde yer almayan yeni KPT’nin sentezi gerçekleştirildi. Sentezlenen yeni KPT’nin MİK değerleri baz alındığında, gerek *E.coli*, *S.aureus* ve *P.aeruginosa* standart suşları gerekse de ÇİD *E.coli*, *S.aureus*, *P.aeruginosa*, *K.pneumoniae* ve *A.baumannii* klinik izolatları üzerindeki tek başlarına olan antimikrobiyal etkinlikleri gözardı edilecek düzeydedir. Bu bulgu, fotosensitizanın tek başına toksik etki göstermemesi özelliğiyle de uyumlu bir sonuçtur.

Çalışmamızda ışık kaynağı olarak, KPT’yi duyarlaştıran bilgisayar kontrollü 655-nm dalga boyundaki diyot lazer kullanıldı. Porfirin türevleri ile yapılan bir çok çalışmada ışık kaynağı olarak porfirin absorpsiyonunun maksimal düzeyde gerçekleştiği 400 nm dalga boyunu kapsayan dalga boyu aralığına sahip ışık kaynakları kullanılmıştır (115,56,132,133). Benzer şekilde sentezlediğimiz yeni KPT’lerin maksimal absorpsiyonu 422±3 nm dalga boyunda gerçekleşti. Çalışmamızda 655-nm dalga boyundaki diyot lazerin tercih edilmesinin nedeni, 400 nm dalga boyundaki ışığın oksihemoglobin tarafından absorpsiyonunun maksimal düzeyde gerçekleşmesi sonucu hemoglobinin yapısında bulunan endojen porfirin türevi olan hem (PPXI+Fe²⁺) molekülünün duyarlaşması noktasında tehlike yaratabileceği, ek olarak kullandığımız kırmızı ışığın mavi ışığa göre doku

penetrasyonunun fazla oluşudur (132). Wang ve arkadaşlarının çalışmasında (2017) elde edilen sonuç, endojen porfirinlerin mavi ışıkta rahatlıkla aktive olabileceğini gösteren iyi bir örnektir. ÇİD *A.baumannii* ile enfekte fare modelinde aPDT'nin etkinliğine bakılmıştır. Bu çalışmada eksternal PS'ye ihtiyaç duyulmaksızın bakterilerdeki endojen PPIX'nin mavi ışıkla ($\lambda=415$ nm) maksimal düzeyde aktive olabildiğini ve oluşan ROS ile ÇİD *A.baumannii* karşı güçlü bir fotoinaktivasyon sağladığı tespit edilmiştir. Ancak bu araştırmada canlı hücredeki endojen porfirinin aktivasyonu ve aktivasyonu sonucu canlı hücresi üzerindeki toksisitesinin ne olduğu ile ilgili bilgi verilmemiştir (143).

Çalışmamızda, yeni KPT'nin kullanıldığı aPDT'nin 5 farklı ÇİD klinik izolatları üzerindeki etkinliği değerlendirildi. aPDT'nin ÇİD MRSA klinik izolatları üzerindeki fotoinaktivasyon etkinliğinin incelenmesi amacıyla 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve P_M'de 25-500 µM/ml, P_E, P_{PN} ve P_{PL}'nin her birinde 6,25-100 µM/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda fotosensitizan kombinasyonları kullanıldı. Deneylede kullanılan fotosensitizanın türüne göre MRSA-1 sağkalımındaki azalma farklılık göstermekle birlikte P_M'nin kullanıldığı aPDT'lerde 4-5 log₁₀, P_E'de 4->7log₁₀, P_{PN}'de 2->6 log₁₀ ve P_{PL}'de 4->7 log₁₀ aralığında değişim gösteren düşüşler görüldü. Deneylede düşük fotosensitizan konsantrasyonu ile güçlü bir antibakteriyal etkinlik elde edilebilmesi hedeflenerek fotoinaktivasyon aktivitesinin başladığı parametreden itibaren enerji dozu yükseltip, fotosensitizan konsantrasyonu düşürüldü. Bu çerçevede her bir fotosensitizan türünde MRSA-1 klinik izolatına karşı antimikrobiyal etkinin maksimum seviyelerde olduğu kombinasyonlar [200 µM/ml P_M+150 J/cm²], [12,50 µM/ml P_E+150 J/cm²], [12,50 µM/ml P_{PN}+150 J/cm²], [12,50 µM/ml P_{PL}+150 J/cm²] olup, bu kombinasyonlarda %99,9999 ve üzerinde sağkalım azalması gerçekleşti. MRSA-1 üzerinde güçlü antimikrobiyal etkinlik gösteren parametrelerin diğer iki MRSA klinik izolatlarına karşı antimikrobiyal etkinliği P_{PE}, P_{PN} ve P_{PL}'nin kullanıldığı aPDT'lerde aynı veya daha fazla iken, P_{PM}'de %0,01 oranında azaldığı görüldü. Grinholc ve arkadaşları (2014) fotosensitizan amaçlı nötrol yapıdaki PPIX ve ışık kaynağı olarak 620-780 nm dalga boyundaki ışık kaynağını kullandıkları aPDT'nin MRSA ve metisiline duyarlı *S.aureus* (MSSA) klinik izolatları üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini incelemişlerdir. Çalışmada, 25 µM PPIX+50 J/cm² kombinasyonları MRSA sağkalımında 0,01-4,51 log₁₀ aralığında değişen azalmalar sağlarken, MSSA'de

azalmanın 0,01-4,82 log₁₀ arasında değişim gösterdiği, MRSA izolatlarının MSSA izolatlarına kıyasla fotoinaktivasyona daha az duyarlı olduğu sonucuna ulaşılmıştır (144). Banfi ve arkadaşları (2006) Grinholc ve arkadaşlarının (2014) tersine nötral porfirin türevlerinin katyonik porfirin türevlerine göre *S.aureus* suşları üzerinde daha az etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir (70). Benzer şekilde 25 µM PPIX+50 J/cm² kombinasyonu ile yapılan aPDT deneylerinde MSSA sağkalımında 2–4.51 log₁₀ aralığında düşüş görülürken, MRSA sağkalımında azalmanın 0–0.99 log₁₀ ile sınırlı kaldığı saptanmıştır (145). Tomé ve arkadaşları (2004) nötral yapıdaki porfirinlerin *S.aureus*'un dirençsiz formuna etkili olduğunu, ancak MRSA üzerinde etkinliğinin azaldığı, katyonik yapıdaki porfirinlerle uygulanan aPDT'nin MRSA'da güçlü bir antimikrobiyal etkinlik yarattığını tespit etmişlerdir (146). aPDT'de etkili bir fotoinaktivasyon için PS'nin bakteri tarafından maksimal düzeyde absorpsiyonu kritik önem taşıdığı çalışmalarla belirlenmiştir. Porfirin–mannose–hPG (hyperbranched polyglycerol) konjugatlarının PS olarak kullanıldığı bir araştırmada, 652 nm dalga boyunda ışık kaynağı ile 100 J/cm² enerji dozu ve 100 µM PS kombinasyonunun fotoinaktivasyon etkinliği incelenmiştir. Bu araştırmada mannoz birimi fazla olan PS kombinasyonları ile gerçekleştirilen aPDT'lerin *S.aureus* suşlarında eradikasyon sağladığı tespit edilmiştir (147). Benzer şekilde katyonik porfirin-polymyxin B konjugatı'nın kullanıldığı bir araştırmada PS'nin bakteri hücresi içerisine alınımının nötral porfirinlere oranla daha fazla olduğu, dolayısı ile aPDT'nin etkinliğinin daha da arttığı vurgulanmıştır (148). Masiera ve arkadaşları (2017)'nin çalışmasında porfirin izomeri olan Porphycene türevleri PS kaynağı olarak kullanılmış olup, 2,7,12,17-tetrakis(β-methoxyethyl)'nin kullanıldığı aPDT'lerin *S.aureus* üzerinde önemli ölçüde fotoinaktivasyon gösterdiği, 2,7,12,17-tetra-t-butylpor-phycene türevinin ise bakteri absorpsiyonunun yetersizliğinden kaynaklı fotoinaktivasyonun yetersiz olduğu sonucuna ulaşılmıştır (149). Almeida ve arkadaşları (2014) 40 W/cm² gücünde ışık kaynağı ve 0,5 µM konsantrasyonunda mesokatyonik porfirin olan Tetra-Py+-Me'ni kullandıkları aPDT deneylerinde aPDT'nin ÇİD MRSA'ya karşı antimikrobiyal etkinliğin ışık maruziyet süresine göre değişim gösterdiği, 30 dakikada 4 log₁₀, 60 dakikada 5 log₁₀'luk sağkalımda azalma gerçekleşmiştir (106). Çalışmamızda benzer şekilde ışık maruziyet süresi arttırılan aPDT'lerde düşük PS konsantrasyonlarında bile güçlü bir antimikrobiyal etkinlik elde edildi. Bununla birlikte, katyonik yapıdaki porfirinlerin kullanıldığı aPDT'lerin

S.aureus üzerindeki etkinliğin bakteriyal direnç varlığına göre değişim gösterdiği bildirilmesine rağmen (145,150) çalışmamızda P_M dışındaki fotosensitizanlarla gerçekleştirilen aPDT parametreleri farklı direnç paternine sahip MRSA suşları üzerinde benzer antimikrobiyal etkinlik gösterdi. aPDT'ye karşı bakteriyal direncin, direnç genlerinin varlığı ile ilişkili olduğu teorisi olsa da (SCC_{mec}, *spa* ve main clonal complexes), bu teori henüz açıklığa kavuşturulamamıştır (145). Bartolomeu ve arkadaşları (2016) Tetra-Py+-Me'yi PS olarak kullandıkları araştırmada aPDT'nin tekrarlı uygulamalarında bile fotorezistan suşların gelişmediği, dirençli veya virülansı yüksek olan MRSA suşlarında fotoinaktivasyonun etkin bir şekilde gerçekleştiği, aPDT'nin bakteri virülansının azalmasında katkı sağladığı sonucuna ulaşmışlardır (151).

ÇİD *E.coli* klinik izolatları üzerindeki fotoinaktivasyon değerlendirilmesinde 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve P_M'de 100-600 µM/ml, P_E'de 50-400 µM/ml, P_{PN}'de 50-500 µM/ml ve P_{PL}'de 50-500 µM/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda PS kombine edildi. Deneylede kullanılan fotosensitizanın türüne ve konsantrasyon miktarına göre farklılık göstermekle birlikte ÇİD *E.coli* sağkalımındaki azalma 2->6 log₁₀ arasında değişim gösterdi. Minimal düzeyde fotosensitizan ile güçlü bir antimikrobiyal etkinlik elde edilmesini hedeflediğimiz fotoinaktivasyon deneylerinde 5->6 log₁₀ aralığında sağkalım azalmasını sağlayan optimal kombinasyonlar [200 µM/ml P_M+150 J/cm²], [100 µM/ml P_E +150 J/cm²], [100 µM/ml P_{PN}+150 J/cm²] ve [100 µM/ml P_{PL}+125 J/cm²] şeklindedir. ÇİD *E.coli*-1 üzerinde güçlü antimikrobiyal etkinlik gösteren parametrelerin diğer klinik izolata karşı antimikrobiyal etkinliği P_{PE}, P_{PN} ve P_{PL}'nin kullanıldığı aPDT'lerde aynı iken, P_{PM}'de %0,1 oranında azaldığı görüldü. Dosselli ve arkadaşları (2014)'nin katyonik antimikrobiyal peptid (KAP), magainin ve buforin konjugatlarının eklendiği porfirin türevleri ve 390–460 nm dalga boyundaki mavi ışık kaynağını kullandıkları aPDT deneylerinde 5 µM+13.5 J/cm²'de kombinasyonunda *E.coli* sağkalımında 7 log₁₀'luk bir azalma saptanmakla birlikte, aynı enerji dozunda 3-5 µM konsantrasyonlardaki fotosensitizanın fibroblast hücrelerinde güçlü bir fotoinaktivasyon gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Tomé ve arkadaşları (2004) 1-5 µM konsantrasyonunda katyonik yapıda porfirin ve poly-S-lysine konjuge porfirin ve 50 mW/cm² güçteki ışık kaynağı ile 30 dakikalık fotoinaktivasyonun, *E.coli* sağkalımında 4-5 log₁₀'luk azalma sağladığını, fotoinaktivasyonun poly-S-lysine konjuge porfirinlerinde daha

belirgin olduğunu, bu etkinin poly-S-lysine zinciri ile bakteri dış membranı arasındaki kuvvetli etkileşim sonucu membran geçirgenliğindeki artıştan kaynaklandığını bildirmişlerdir (146). Banfi ve arkadaşlarının çalışmasında (2006) fotosensitizan olarak 7,33 μM konsantrasyonunda katyonik porfirin türevlerinin kullanıldığı aPDT deneylerinde 74 mW/cm^2 enerji gücünde 60 dakikalık ışık maruziyetinin *E.coli* sağkalımında 6-7 \log_{10} 'luk azalma sağladığını belirlenmiştir (56). 5,0 μM katyonik yapıda Tri-Py+-Me-PF ve 64.8 J/cm^2 kombinasyonlarının kullanıldığı aPDT deneylerinde *E.coli* sağkalımında 5 \log_{10} 'luk azalma gerçekleşmiştir (152). Maisch ve arkadaşları (2012) 100 $\mu\text{mol}/\text{L}$ TMPyP +40 J/cm^2 kombinasyonu ile gerçekleştirilen aPDT'nin *E.coli* sağkalımında 5 \log_{10} 'luk azalma sağladığını tespit etmişlerdir (99). Liu ve arkadaşlarının (2012) lipopolisakkarit nötrojize peptid konjuge edilen protoporfirin ampisilin dirençli *E.coli* suşu üzerindeki fotoinaktivasyon etkinliğinin incelendiği çalışmada 0,5-1 μM konsantrasyonlarda PPIX+peptid konjugatları ve 30 J/cm^2 enerji dozu kombinasyonlarının PS konsantrasyonuna bağlı olarak bakteriyel sağkalımında $>2,0 \log_{10}$ ve $>3,0 \log_{10}$ 'luk azalmalar sağladığı belirlenmiştir (133). Bu çalışmada PPIX+peptid konjugatlarının ampisilin dirençli *E.coli* üzerindeki MİK değerleri 4-32 μM aralığında değişim gösterdiği dikkat çekmektedir (133). Benzer şekilde Zn bazlı porfirin konjugatlarının [ZnTnHex-2(3)-PyP ve ZnTnOct-2(3)-PyP] kullanıldığı bir araştırmada düşük enerji dozu (9,9 J/cm^2) ve PS konsantrasyonu (1,0 μM) kombinasyonunun *E.coli*'de güçlü bir fotoinaktivasyon sağladığı (sağkalım azalması: 6 \log_{10}) tespit edilmiştir (153). Çalışmamızda ÇİD *E.coli* izolatlarının sağkalımında $>5 \log_{10}$ 'luk azalma sağlayan parametreler diğer çalışmalara kıyasla daha yüksektir. Farklı katyonik metalloporfirin türevlerinin (Cu^{2+} , Fe^{2+} , Pd^{2+} , Zn^{2+}) kullanıldığı bir araştırmada Pd (T4)'nin bakteri tarafından absorpsiyonunun belirgin ölçüde fazla olduğu, düşük konsantrasyonlarda ve enerji dozunda (405 nm-2.5 J/cm^2) *E.coli*'ye karşı güçlü bir antimikrobiyal etki elde edildiği belirlenmiştir (154). Çalışmamızda kullandığımız fotosensitizanların MİK değerlerine bakıldığında maksimal düzeyde fotoinaktivasyonun görüldüğü ($>5 \log_{10}$) konsantrasyonun en düşük MİK değerine sahip olan P_E 'nin MİK değerine kıyasla 8.504 kat daha azdır. Bununla birlikte çalışmamızda ÇİD *E.coli*'de güçlü antimikrobiyal etkinin ancak 100 J/cm^2 üzerinde enerji dozlarında görülmesi kullandığımız ışık kaynağının 655 nm dalga boyunda olmasından kaynaklandığı varsayılmaktadır. Nitekim, Nitzan ve

Ashkenazi (2001) bu varsayımı doğrulayan sonuçlara ulaşmışlardır. Nitzan ve Ashkenazi (2001) fotosensitizan olarak TMPyP'ni kullandıkları deneylerde 29,4 µmol/L konsantrasyonun farklı dalga boylarında ÇİD *E.coli* üzerindeki fotoinaktivasyonu incelenmiştir. Bu araştırmada etkili fotoinaktivasyon için aynı konsantrasyonda mavi ışıkta (400–450 nm) 2 J/cm², yeşil ışıkta (480–550 nm) 15 J/cm², kırmızı ışıkta (600–700 nm) 24 J/cm² enerji dozlarına ihtiyaç olduğu saptanmıştır (132). Çalışmamızda ışınlama öncesinde fotosensitizan ve bakteri inkübasyonu süresi diğer çalışmalara kıyasla daha az olup, 15 dakika ile sınırlandırıldı. Çoğu çalışmada inkübasyon süresi 20-30 dakika aralığında değişim göstermiştir (56,133). Bu farklılık inkübasyon süresinin fotoinaktivasyonu etkileyip etkilemeyeceği sorusu ile karşı karşıya gelinmesine neden olmaktadır. Ancak, bazı çalışmalarda porfirin türevleri ile bakteri inkübasyonu için 5 dakikalık süresinin yeterli olacağı 5 dakikanın üzerinde olmasının fotosensitizanın hücrel bağlanmayı etkilemeyeceğini bildirilmektedir (155,156). Banfi ve arkadaşları (2006a) 30, 60 ve 90 dakikalık inkübasyonun, ÇİD *E.coli*'nin fotoinaktivasyonu arasında farklılık olmadığını saptamışlardır (70).

ÇİD *P.aeruginosa* klinik izolatları üzerindeki fotoinaktivasyon değerlendirilmesinde 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve P_M'de 50-600 µM/ml, P_E ve P_{PN}'de 25-400 µM/ml, P_{PL}'de 25-300 µM/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda PS'ler kombine edildi. Deneylerde kullanılan fotosensitizanın türüne ve konsantrasyon miktarına göre farklılık göstermekle birlikte göre ÇİD *P.aeruginosa* sağkalımındaki azalma 3->6 log₁₀ arasında değişim gösterdi. Minimal düzeyde fotosensitizan ile güçlü bir fotoinaktivasyon etkinliğinin yaratılmasını hedeflediğimiz aPDT deneylerinde [500 µM/ml P_M+150 J/cm²] 5 log₁₀, [200 µM/ml P_E+150 J/cm²] >6 log₁₀, [300 µM/ml P_{PN}+100 J/cm²] ve [100 µM/ml P_{PL}+100 J/cm²] kombinasyonlarının her biri 5 log₁₀ sağkalım azalması sağladı. Banfi ve arkadaşları (2006) 380–780 nm dalga boyunda ışık kaynağını kullandıkları aPDT deneylerinde 8 µM/ml konsantrasyonunda katyonik porfirin türevi ve 266 J/cm² enerji dozu kombinasyonunun *P. aeruginosa* sağkalımında 7 log₁₀'luk bir düşüş sağladığını tespit etmişlerdir (56). 225 µM/ml katyonik özellikteki TMP ve 240 J/cm² (λ=400 nm) enerji dozu kombinasyonunun uygulandığı aPDT'nin *P. aeruginosa* sağkalımında 4,1 log₁₀ azalma sağladığı ve *P. aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilm tabakasında hasar oluşturup, biyofilm içindeki bakterilere karşı güçlü bir antimikrobiyal etkinlik

gösterdiği saptanmıştır (57). Gomes ve arkadaşları (2012) 400–800 nm dalga boyu aralığında 150 mW/ cm² güçteki ışık kaynağını kullandıkları aPDT deneyinde 5,0 µmol/L konsantrasyonda sentezledikleri katyonik galaktoporfirinlerin UV'ye dirençli *P.aeruginosa* sağkalımında 5,3-6,0 log₁₀ aralığında değişen düşüşler sağladığını saptamışlardır (92). Sabbahi ve arkadaşları (2013) tarafından 90 J/cm² enerji dozu (λ =400 nm) ve 20 µM/ml konsantrasyonunda meso tetrakatyonik porfirin (T₄MPyP) ile gerçekleştirilen aPDT, *P.aeruginosa* sağkalımında 3,5 log₁₀'luk azalma sağlamıştır (49). 380-700 nm dalga boyu 40 W/cm² güçteki ışık kaynağı ile 180 dakikalık ışık maruziyetinin uygulandığı aPDT deneyinde 5 µM/ml Tetra-Py+Me konsantrasyonunun ÇİD *P.aeruginosa* sağkalımında 6 log₁₀'luk düşüş sağladığı tespit edilmiştir (106). Fila ve arkadaşları (2016) 525 nm dalga boyunda ışık kaynağı ile gerçekleştirdikleri aPDT deneyinde [75 µM TMPyP+150 Jcm²] kombinasyonunu yabancı tipte *P. aeruginosa* sağkalımında *in vitro* koşullarda 6 log azalma, *in vivo* koşullarda 3 log'luk bir azalma sağlamıştır (157). Çalışmamızda kullandığımız etkili fotoinaktivasyon sağlayan aPDT parametrelerinin diğer çalışmalara kıyasla daha yüksek olduğunu görmekteyiz. Bu durumun, aksini ispatlayamadığımız taktirde kullandığımız 655 nm dalga boyundaki ışık kaynağından kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz. Ek olarak ÇİD *P.aeruginosa*'ya karşı güçlü antimikrobiyal etkinlik sağlayan parametrelerdeki yüksekliğin fotosensitizan bakteri inkübasyon süresi ile ilişkili olması sözkonusu olabilir. Banfi ve arkadaşları (2006) 30, 60 ve 90 dakikalık inkübasyon sürelerinin fotoinaktivasyona olan etkisini inceledikleri çalışmada *E.coli* ve *S.aureus* suşlarında inkübasyon süresi fotoinaktivasyonu etkilemez iken, *P.aeruginosa* için en etkili letal etkinin görüldüğü inkübasyon süresinin 60 dakika olduğunu belirlemişlerdir (56). Çalışmamızda ÇİD *P.aeruginosa*'da güçlü antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT parametrelerinin diğer klinik izolatlarda kullanılan aPDT parametrelerine kıyasla daha yüksek oluşu bu varsayımı doğrular gibi görünmektedir. ÇİD *P.aeruginosa*-1 üzerinde güçlü antimikrobiyal etkinlik gösteren parametrelerin diğer klinik izolatlara karşı antimikrobiyal etkinliği benzer olduğu, fotoinaktivasyonun bakteriyal direnç durumuna göre önemli ölçüde değişmediği görüldü.

Çalışmamızda, 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve P_M'de 200-650 µM/ml, P_E'de 50-200 µM/ml, P_{PN}'de 200-400 µM/ml, P_{PL}'de 25-200 µM/ml aralığında değişen konsantrasyonlarda fotosensitizan kombinasyonlarının ÇİD

K.pneumoniae klinik izolatları üzerindeki fotoinaktivasyon etkinliği değerlendirildi. Minimal düzeyde fotosensitizan ile güçlü bir antimikrobiyal etkinlik elde edilmesini hedeflediğimiz fotoinaktivasyon deneylerinde optimal parametreler [650 µM/ml P_M+150 J/cm²], [50 µM/ml P_E +150 J/cm²], [200 µM/ml P_{PN}+125 J/cm²] ve [50 µM/ml P_{PL}+125 J/cm²] şeklinde belirlendi ve bu parametrelerdeki sağkalım azalmaları sırasıyla 5 log₁₀, 6 log₁₀, 5 log ve 6 log₁₀'dur. ÇİD *K.pneumoniae*-1 üzerinde güçlü antimikrobiyal etki sağlayan aPDT parametreleri diğer ÇİD *K.pneumoniae* izolatında bezer etki gösterdi. Liu ve arkadaşlarının (2012) aPDT'nin ampisilin dirençli *K.pneumoniae* üzerindeki fotoinaktivasyon etkisini inceledikleri çalışmada 30 J/cm² enerji dozunda 0,5 ve 1 µM PPIX+peptid konjugatı konsantrasyonlarının sağkalımda sırasıyla >2,0 log₁₀ ve >3,0 log₁₀'luk azalmalar sağladığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada PPIX+peptid konjugatlarının ampisilin dirençli *E.coli* üzerindeki MİK değerlerinin 8-32 µM aralığında olduğu; ışık kaynağı olarak PPIX+konjugatlarının ışık absorpsiyonunun pik yaptığı mavi ışık kaynağını kullanmaları dikkat çekmektedir (133). Çalışmamızda güçlü fotoinaktivasyon etkinlik için (>5 log₁₀), diğer çalışmalara kıyasla daha yüksek aPDT parametrelerinin kullanılması zorunluğunda kalındı. Bu durumun sentezlediğimiz KPT'nin MİK değerlerinin Liu ve arkadaşlarının (2012) çalışmasında kullandıkları katyonik porfirin türevlerinin (133) MİK değerlerinin çok üzerinde olmasından, kullandığımız ışık kaynağının dalga boyunda kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

ÇİD *A.baumannii* klinik izolatlarının üzerinde aPDT'nin fotoinaktivasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve P_M'de 50-400 µM/ml, P_E, P_{PN}'nin her birinde 3,125-100 µM/m, P_{PL}'de 6,25-100 µM/ml aralığında değişen konsantrasyonlar kombine edildi. Deneylerde kullanılan fotosensitizanın türüne ve konsantrasyon miktarına göre farklılık göstermekle birlikte ÇİD *A.baumannii* sağkalımındaki düşüş >6 log₁₀ değerlerine ulaştı. Minimal düzeyde fotosensitizan ile güçlü bir antimikrobiyal etkinlik elde edilmesini hedeflediğimiz aPDT deneylerinde 5->6 log₁₀ aralığında sağkalım azalmasını sağlayan optimal kombinasyonlar [100 µM/ml P_M+150 J/cm²], [3,125 µM/ml P_E +150 J/cm²], [3,125 µM/ml P_{PN}+150 J/cm²] ve [12,50 µM/ml P_{PL}+150 J/cm²] şeklindedir. ÇİD *A.baumannii* üzerinde güçlü antimikrobiyal etkinlik gösteren parametrelerin diğer klinik izolatlara karşı da benzer etkiler yarattı. Nitzan ve Ashkenazi (2001)'nin çalışmasında 29,4 µmol/L TMPyP konsantrasyonunda ÇİD *A.baumannii* suşlarına

eradikasyonu için gerekli enerji dozlarının mavi ışıpta (400–450 nm) 2 J/cm², yeşil ışıpta (480–550 nm) 15 J/cm², kırmızı ışıpta (600–700 nm) 24 J/cm² şeklinde olduğu, en iyi etkinin mavi ışıpta görülebileceği, ancak dalga boyu arttırıldıkça enerji dozu artışı ile de benzer fotoinaktivasyonun sağlanabileceği bildirilmiştir (132). 40 W/cm² gücünde ışık kaynağının ve 0,5 µM konsantrasyonunda Tetra-Py+-Me'nin kullanıldığı aPDT deneylerinde ÇİD *A.baumannii*'ye karşı antimikrobiyal etkinliğin ışık maruziyet süresine göre değişim gösterdiği 270. dakikada sağkalımdaki azalmanın 6 log₁₀ olduğu saptanmıştır (106). Yuan ve arkadaşlarının *in vivo* koşullarda gerçekleştirdikleri deneyde aminoasit porfirin konjugatı [5, 10, 15, 20-trakis(4-((s)-2, 6-diaminohexanamido)-phenyl)]'nı ve 650 nm dalga boyuna sahip ışık kaynağı kullanılmış olup, çalışmada düşük konsantrasyonlarda PS (3,9 µM) ve enerji dozu (6 J/cm²) kombinasyonlarının ÇİD *A.baumannii*'de güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer yandan bu çalışmada canlı hücre toksisitenin de belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Bu araştırmada daha düşük konsantrasyonlarda PS ile gerçekleştirilen aPDT'nin aksine doku iyileşmesini hızlandırdığı ve FGF, IL-6, TNF-α sitokinlerinin ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (158). Çalışmamızda P_M dışındaki KPT'lerde diğer izolatlarla kıyasla çok düşük konsantrasyonlarda (3,125 µM/ml) yüksek antimikrobiyal etkinlik elde edildi. Diğer izolatlarda olduğu gibi düşük konsantrasyonda güçlü antimikrobiyal etkinliği ancak yüksek dozda enerji kullanarak gerçekleştirebildik. Bu durumun kullandığımız dalga boyundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim Nitzan ve Ashkenazi (2001)'nin çalışması bu varsayımı doğrular niteliktedir (132). İlginçtir ki, antibiyotik direnç yönünden diğer izolatlarla kıyasla daha dirençli olan ÇİD *A.baumannii* izolatlarında güçlü fotoinaktivasyon sağlayan parametreler diğer izolatlarla göre daha düşüktü. Bu şaşırtıcı bulgunun açıklanması için fotosensitizan absorpsiyonu, ROS ve ¹O₂ oluşum miktarlarının ölçümü gibi daha ileri analizlerin yapılmasına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızda sentezlediğimiz KPT ile gerçekleştirilen aPDT'nin klinik izolatlar üzerindeki etkinliği fotosensitizan türüne göre değişim gösterdi. Aynı enerji dozunun kullanıldığı aPDT deneylerinde güçlü bir antimikrobiyal etki için diğer fotosensitizanlara kıyasla P_M konsantrasyon değerlerinin yüksek oluşu dikkat çekmektedir. Çalışmamızda tüm klinik izolatlarda en düşük konsantrasyonlarda güçlü antimikrobiyal etkinlik gösteren KPT türü P_{PL}'dir. ÇİD klinik izolatlarının

P_M 'nin kullanıldığı aPDT'lere karşı duyarlılığı farklılık göstermiş olup duyarlılıkları en fazlada aza doğru $A.baumannii > MRSA > P.aeruginosa \geq E.coli > K.pneumoniae$ şeklindedir. ÇİD klinik izolatlarının P_E 'ye karşı duyarlılıkları $A.baumannii > MRSA > K.pneumoniae \geq E.coli > P.aeruginosa$; P_{PN} 'ye karşı duyarlılıkları $A.baumannii > MRSA > P.aeruginosa \geq E.coli > K.pneumoniae$; P_{PL} 'ye karşı duyarlılıkları $A.baumannii \geq MRSA > K.pneumoniae > P.aeruginosa \geq E.coli$ şeklindedir. KPT'nin her bir ÇİD klinik izolatu türü üzerindeki antimikrobiyal etkinliği en fazlada en aza doğru MRSA'de $P_{PL}=P_E > P_{PN} > P_M$; $E.coli$ 'de $P_{PL} > P_E \geq P_{PN} > P_M$; $P.aeruginosa$ 'da $P_{PL} \geq P_{PN} \geq P_E > P_M$; $K.pneumoniae$ 'de $P_{PL} > P_E > P_{PN} > P_M$ şeklinde sıralanırken $A.baumannii$ 'de en iyi etki P_{PN} 'de görülmüş olup sıralama $P_{PN} > P_E > P_{PL} > P_M$ şeklindedir. Genel çerçevede ÇİD klinik izolatlarına karşı fotoinaktivasyonda en etkili KPT türevi P_{PL} iken, en az etkili olanın P_M olduğu söylenebilir. MRSA-1 dışında antibiyotik duyarlılık yönünde benzer nitelikler taşıyan ÇİD klinik izolatlarının yeni KPT'ne karşı duyarlılıklarındaki farklılıkların nedeninin anlaşılması için KPT'lerin bakteriler tarafından absorpsiyon düzeylerinin değerlendirilmesi, farklı inkübasyon sürelerinde fotoinaktivasyonun değerlendirilmesi, fotoinaktivasyon sonucunda oluşan ROS ve 1O_2 oluşum miktarlarının ölçümü gibi daha ileri analizlerin yapılmasını gerektirmektedir.

BÖLÜM V

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamızda çoklu ilaç dirençli gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu antimikrobiyal etki gösterebilecek fotoinaktivasyon için literatürde yer almayan yeni KPT'lerin sentezi gerçekleştirildi. Araştırmada yapılan MİK değerlendirme testi ile yeni KPT'nin tek başına antimikrobiyal özelliklerinin göz ardı edilecek düzeyde olduğu belirlendi. Farklı enerji yoğunlukları ve farklı KPT konsantrasyonlarının kullanıldığı aPDT deneylerinde her bir ÇİD klinik izolatlarında $\geq 99,9999$ değerlere varan sağkalım azalması saptandı. Antimikrobiyal etkinlik gösteren aPDT kombinasyonlarının hiç birinde lazer veya fotosensitizan gruplarında bakteriyel sağkalımda azalmalar görülmedi. Çalışmada enerji dozu yükseltildikçe fotoinaktivasyonun etkinliğinin de arttığı, en iyi etkinin 150 J/cm^2 enerji dozunda görüldüğü belirlendi. ÇİD klinik izolatlarına karşı en iyi antimikrobiyal etki P_{PL} 'nin kullanıldığı aPDT'lerde görülürken, antimikrobiyal etkinliğinin en düşük olduğu PS türünün P_M olduğu saptandı. Yeni KPT'lerle gerçekleştirilen aPDT'lerde bakteriyel duyarlılıklar ÇİD klinik izolatu türüne göre değişim göstermiş olup, ÇİD *A.baumannii* ve MRSA klinik izolatlarının duyarlılığı diğer izolatlara göre daha fazladır. ÇİD *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *E.coli* klinik izolatlarının fotoinaktivasyona olan duyarlılıkları enerji dozlarına göre değişim gösterdi. 100 J/cm^2 enerji dozunda fotoinaktivasyona karşı en dirençli olan ÇİD *E.coli* iken, 150 J/cm^2 'de ÇİD *P.aeruginosa*'dır.

Araştırmamızda yeni KPT türevleri ile gerçekleştirilen aPDT'lerin ÇİD yara enfeksiyon etkenlerine karşı güçlü bir antimikrobiyal etkinlik gösterme potansiyeline sahip olduğu görüldü. KPT türüne karşı ÇİD izolatlarının duyarlılıklarındaki farklılıkların araştırılması için ileri analizlerin yapılması, maksimal düzeyde antimikrobiyal etki gösteren aPDT parametrelerinin, canlı hücre üzerinde toksisitesilerinin *in vivo* koşullarda araştırılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Perry D, Borchert K, Burke S, Chick K, Johnson K, Kraft W, Patel B TS. Pressure Ulcer Prevention and Treatment Protocol. Updated January 2012. 2012; Available from: www.icsi.org
2. Braga IA, Pirett CCNS, Ribas RM, Filho PPG, Filho AD. Bacterial colonization of pressure ulcers: Assessment of risk for bloodstream infection and impact on patient outcomes. *J Hosp Infect* [Internet]. 2013;83(4):314–20.
3. Aftab S, Tarik M, Siddique A, Yusuf A. Clinical and Microbiological Aspect of Wound Infection: A Review Update. *Bangladesh J Infect Dis* [Internet]. 2014;11(33):32–7.
4. Kirketerp-Møller K, Jensen P, Fazli M, Madsen KG, Pedersen J, Moser C, et al. Distribution, organization, and ecology of bacteria in chronic wounds. *J Clin Microbiol*. 2008;46(8):2717–22.
5. Dündar D, Keçeli Özcan S, Atmaca E. Evde Bakım Hizmeti Verilen Hastaların Bası Yaralarındaki Yüzeysel Kolonizasyonun Mikrobiyolojik İncelenmesi. *Kocatepe Tıp Derg*. 2012;13:27–32.
6. Bowler PG, Duerden BI, Armstrong DG. Wound microbiology and associated approaches to wound management. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):244–69.
7. Dana AN, Bauman WA. Bacteriology of pressure ulcers in individuals with spinal cord injury: What we know and what we should know. *J Spinal Cord Med* [Internet]. 2015;38(2):147–60.
8. National Pressure Ulcer Advisory Panel EPUAP and PPPIA. Prevention and Treatment of Pressure Ulcers: Quick Reference Guide [Internet]. 2014. 84 p.
9. Bessa LJ, Fazii P, Di Giulio M, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern: Some remarks about wound infection. *Int Wound J*. 2015;12(1):47–52.
10. Dündar D, Keçeli Özcan S, Atmaca E. Evde Bakım Hizmeti Verilen Hastaların Bası Yaralarındaki Yüzeysel Kolonizasyonun Mikrobiyolojik İncelenmesi. *Kocatepe Tıp Derg*. 2012;13:27–32.
11. Heym B, Rimareix F, Lortat-Jacob A, Nicolas-Chanoine M-H. Bacteriological investigation of infected pressure ulcers in spinal cord-injured patients and impact on antibiotic therapy. *Spinal Cord*. 2004;42(4):230–4.
12. Serra R, Grande R, Butrico L, Rossi A, Settimio U, Caroleo B, et al. Chronic wound infections : The role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* Chronic wound infections : the role of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2015;13(5):605–13.
13. Livesley NJ, Chow AW. Infected pressure ulcers in elderly individuals. *Clin*

Infect Dis [Internet]. 2002;35(11):1390–6.

14. Macgregor L, Calne S, Day K, Jones J, Pugh A, Walker J. Principles of Best Practice A World Union of Wound Healing Societies ' Initiative Wound infection in clinical practice An international consensus. London MEP Ltd [Internet]. 2008
15. Norman G, Dumville JC, Moore ZE, Tanner J, Christie J, Goto S. Antibiotics and antiseptics for pressure ulcers. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016;2016(4).
16. Mohd Nasir N, Lee BK, Yap SS, Thong KL, Yap SL. Cold plasma inactivation of chronic wound bacteria. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2016;1–10.
17. Daeschlein G, Von Woedtke T, Kindel E, Brandenburg R, Weltmann KD, Jünger M. Antibacterial activity of an atmospheric pressure plasma jet against relevant wound pathogens in vitro on a simulated wound environment. *Plasma Process Polym*. 2010;7(3–4):224–30.
18. Mirasoğlu B. Yarada Gümüş Kullanımı. In: Baktıroğlu S, Aktaş Ş, editors. *Kronik Yaralarda Güncel Yaklaşımlar*. İstanbul: KYK yayınları, I.Baskı; 2013. p. 96–105.
19. Chan BK, Siström M, Wertz JE, Kortright KE, Narayan D, Turner PE. Phage selection restores antibiotic sensitivity in MDR *Pseudomonas aeruginosa*. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(May):26717.
20. WHO. WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. <http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>. 2017;27.02.
21. de Almeida Silva K, Calomino M, Deutsch G, de Castilho S, de Paula G, Esper L, et al. Molecular characterization of multidrug-resistant (MDR) *Pseudomonas aeruginosa* isolated in a burn center. *Burns*. 2016;43(2017):137–43.
22. Tegos GP, Masago K, Aziz F, Higginbotham A, Stermitz FR, Hamblin MR. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps potentiate antimicrobial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(9):3202–9.
23. Jabalameli F, Mirsalehian A, Khoramian B, Aligholi M, Khoramrooz SS, Asadollahi P, et al. Evaluation of biofilm production and characterization of genes encoding type III secretion system among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns* [Internet]. 2012;38(8):1192–7.
24. Emami A. b, Bazargani A., Mohammadi AA., Zardosht M., Jafari SMS. Detection of blaPER-1 & blaOxa10 among imipenem resistant isolates of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients hospitalized in Shiraz Burn Hospital. *Iran J Microbiol* [Internet]. 2015;7(1):7–11.

25. Farshadzadeh Z, Khosravi AD, Alavi SM, Parhizgari N, Hoveizavi H. Spread of extended-spectrum β -lactamase genes of blaOXA-10, blaPER-1 and blaCTX-M in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients. *Burns* [Internet]. 2014;40(8):6–11.
26. Neyestanaki DK, Mirsalehian A, Rezagholizadeh F, Jabalameli F, Taherikalani M, Emaneini M. Determination of extended spectrum beta-lactamases, metallo-beta-lactamases and AmpC-beta-lactamases among carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Burns* [Internet]. 2014;40(8):1556–61.
27. Mirsalehian A, Kalantar-Neyestanaki D, Nourijelyani K, Asadollahi K, Taherikalani M, Emaneini M, et al. Detection of AmpC- β -lactamases producing isolates among carbapenem resistant *P. aeruginosa* isolated from burn patient. *Iran J Microbiol*. 2014;6(5):306–10.
28. Bijari A, Azimi L, Fallah F, Ardebili A, Lari E, Lari A. Involvement of the Multidrug Efflux Pumps in Betalactams Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates Collected from Burn Patients in Iran. *Infect Disord Drug Targets*. 2016;16(3):172–177.
29. Khosravi AD, Hoveizavi H, Mohammadian A, Farahani A, Jenabi A. Genotyping of multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn and wound infections by ERIC-PCR. *Acta cirúrgica Bras / Soc Bras para Desenvolvv Pesqui em Cir* [Internet]. 2016;31(3):206–11.
30. Nedeljković N, Todorović B, Kocić B, Cirić V, Milojković M, Waisi H. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes and resistance to antibiotics from wound swabs. *Vojn Pregl*. 2015;72(11):996–1003.
31. Joseph NM, Devi S, Shashikala P, Kanungo R. Changing trend in the antibiotic resistance pattern of *Pseudomonas Aeruginosa* isolated from wound swabs of out-patients and in-patients of a tertiary care hospital. *J Clin Diagnostic Res*. 2013;7(10):2170–2.
32. Vaez H, Faghri J, Isfahani B, Moghim S, Yadegari S, Fazeli H, et al. Efflux pump regulatory genes mutations in multidrug resistance *Pseudomonas aeruginosa* isolated from wound infections in Isfahan hospitals. *Adv Biomed Res*. 2014;28(3):117.
33. Manyahi J, Matee MI, Majigo M, Moyo S, Mshana SE, Lyamuya EF. Predominance of multi-drug resistant bacterial pathogens causing surgical site infections in Muhimbili national hospital, Tanzania. *BMC Res Notes* [Internet]. 2014;7(1):500–7.
34. Karimi H, Pour P, Ghanaatpisheh F. Frequency of *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in burn wound infections and their resistance to antibiotics. *Burns*. 2002;28(2002):340–8.
35. Bilici T, Tabakoğlu H, Topaloğlu N, Kalaycioğlu H, Kurt A, Sennaroglu A, et

- al. Modulated and continuous-wave operations of low-power thulium (Tm:YAP) laser in tissue welding. *J Biomed Opt.* 2010;15(3):abstract.
36. Yu Y, Tan M, Chen H, Wu Z, Xu L, Li J, et al. Non-thermal plasma suppresses bacterial colonization on skin wound and promotes wound healing in mice. *J Huazhong Univ Sci Technol - Med Sci.* 2011;31(3):390–4.
 37. Brehmer F, Haenssle HA, Daeschlein G, Ahmed R, Pfeiffer S, G??rlitz A, et al. Alleviation of chronic venous leg ulcers with a hand-held dielectric barrier discharge plasma generator (PlasmaDerm?? VU-2010): Results of a monocentric, two-armed, open, prospective, randomized and controlled trial (NCT01415622). *J Eur Acad Dermatology Venereol.* 2015;29(1):148–55.
 38. Sperandio F, Huang Y, Hamblin M. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2013;8(2):108–20.
 39. Dai T, Huang Y-Y, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections--state of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2009 Jan [cited 2016 May 1];6(3–4):170–88.
 40. Dai T, Kharkwal GB, Tanaka M, Huang Y-Y, Bil de Arce VJ, Hamblin MR. Animal models of external traumatic wound infections. *Virulence* [Internet]. 2011;2(4):296–315.
 41. Vera DMA, Haynes MH, Ball AR, Dai T, Astrakas C, Kelso MJ, et al. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. *Photochem Photobiol.* 2012;88(3):499–511.
 42. Sharman WM, Allen CM, Lier JE Van. Photodynamic therapeutics : basic principles and clinical applications. *Ther Focus.* 1999;4(11):507–17.
 43. Nowis D, Makowski M, Stokłosa T, Legat M, Issat T, Gołab J. Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochimica Pol.* 2005;52(2):339–52.
 44. Lukšienė Ž. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Med.* 2003;(12):1137–50.
 45. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy : a new antimicrobial approach to infectious disease ? 2004;
 46. Rajesh S, Koshi E, Philip K, Mohan A. Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. *J Indian Soc Periodontol* [Internet]. 2011;15(4):323–7.
 47. Almeida J, Tomé JPC, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro J a S, Cunha Â, et al. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2014;13(4):626–33.

48. Banfi S, Caruso E, Buccafurni L, Battini V, Zazzaron S, Barbieri P, et al. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2006;85(1):28–38.
49. Sabbahi S, Ben Ayed L, Boudabbous A. Cationic, anionic and neutral dyes: effects of photosensitizing properties and experimental conditions on the photodynamic inactivation of pathogenic bacteria. *J Water Health [Internet].* 2013;11(4):590–9.
50. Park JH, Moon YH, Bang IS, Kim YC, Kim SA, Ahn SG, et al. Antimicrobial effect of photodynamic therapy using a highly pure chlorin e6. *Lasers Med Sci.* 2010;25(5):705–10.
51. Tegos GP, Hamblin MR. Phenothiazinium Antimicrobial Photosensitizers Are Substrates of Bacterial Multidrug Resistance Pumps. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(1):196–203.
52. Tegos GP, Anbe M, Yang C, Demidova TN, Satti M, Mroz P. Protease - Stable Polycationic Photosensitizer Conjugates between Polyethyleneimine and Chlorin (e6) for Broad - Spectrum Antimicrobial Photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1402–10.
53. Hamblin MR, Touqir Zahra, Christopher H. Contag, McManus AT, Hasan T. Optical Monitoring and Treatment of Potentially Lethal Wound Infections In Vivo. *J Infect Dis.* 2003;187(January 2002):1717–25.
54. Rosa LP, da Silva FC, Nader SA, Meira GA, Viana MS. In vitro effectiveness of antimicrobial photodynamic therapy (APDT) using a 660 nm laser and malachite green dye in *Staphylococcus aureus* biofilms arranged on compact and cancellous bone specimens. *Lasers Med Sci.* 2014;29(6):1959–65.
55. Topaloğlu N. Antibacterial photodynamic therapy with indocyanine green and near-infrared light. Submitt to Inst Biomed Eng Partial fulfillment Requir degree Dr Philos Boğaziçi Univ. 2014;
56. Banfi S, Caruso E, Buccafurni L, Battini V, Zazzaron S, Barbieri P, et al. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2006;85(1):28–38.
57. Collins TL, Markus EA, Hassett DJ, Robinson JB. The Effect of a Cationic Porphyrin on *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Curr Microbiol [Internet].* 2010;61(5):411–6.
58. Biel M, Sievert C, Usacheva M, Teichert M, Wedell E, Loebel N, et al. Reduction of Endotracheal Tube Biofilms Using Antimicrobial Photodynamic Therapy. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):586–90.
59. Pereira De Lima Carvalho D, Guerra Pinto J, Di Paula Costa Sorge C,

- Rodrigues Benedito FR, Khouri S, Ferreira Strixino J. Study of photodynamic therapy in the control of isolated microorganisms from infected wounds - An in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2014;29(1):113–20.
60. Barona-Castaño JC, Carmona-Vargas CC, Brocksom TJ, De Oliveira KT, Graça M, Neves PMS, et al. Porphyrins as catalysts in scalable organic reactions. *Molecules.* 2016;21(3).
 61. Fleischer EB. The Structure of Porphyrins and Metalloporphyrins. *Acc Chem Res [Internet].* 1970;3(3):105–12.
 62. Stojiljkovic I, Hantke K. Hemin uptake system of *Yersinia enterocolitica*: similarities with other TonB-dependent systems in gram-negative bacteria. *EMBO J.* 1992;11(12):4359–67.
 63. Jelić D, Tatić I, Trzun M, Hrvačić B, Brajša K, Verbanac D, et al. Porphyrins as new endogenous anti-inflammatory agents. *Eur J Pharmacol.* 2012;691(1–3):251–60.
 64. Felgenträger A, Maisch T, Dobler D, Späth A. Hydrogen bond acceptors and additional cationic charges in methylene blue derivatives: Photophysics and antimicrobial efficiency. *Biomed Res Int.* 2013;2013.
 65. Umar MN, Rashid UR, Sayed MGUL, Karim N. Synthesis And Evaluation Of Analgesic , Anti-Inflammatory And Anti-Bacterial Activity Of Synthetic Porphyrin Derivatives. *Rev Roum Chim.* 2015;60(9):861–6.
 66. Carpenter BL, Feese E, Sadeghifar H, Argyropoulos DS, Ghiladi RA. Porphyrin-cellulose nanocrystals: A photobactericidal material that exhibits broad spectrum antimicrobial activity. *Photochem Photobiol.* 2012;88(3):527–36.
 67. Igor Stojiljkovic BDE& VKD. Antimicrobial properties of porphyrins. *Exp Opin Invest Drugs.* 2001;10(2):309–20.
 68. Ashkenazi H, Nitzan Y, Gál D. Photodynamic effects of antioxidant substituted porphyrin photosensitizers on gram-positive and -negative bacterial. *Photochem Photobiol.* 2003;77(2):186–91.
 69. Carvalho CMB, Gomes ATPC, Fernandes SCD, Prata ACB, Almeida MA, Cunha MA, et al. Photoinactivation of bacteria in wastewater by porphyrins: Bacterial ??-galactosidase activity and leucine-uptake as methods to monitor the process. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2007;88(2–3):112–8.
 70. Banfi S, Caruso E, Buccafurni L, Battini V, Zazzaron S, Barbieri P, et al. Antibacterial activity of tetraaryl-porphyrin photosensitizers: An in vitro study on Gram negative and Gram positive bacteria. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2006;85(1):28–38.
 71. Hanakova A, Bogdanova K, Tomankova K, Pizova K, Malohlava J, Binder S,

- et al. The application of antimicrobial photodynamic therapy on *S. aureus* and *E. coli* using porphyrin photosensitizers bound to cyclodextrin. *Microbiol Res* [Internet]. 2014;169(2–3):163–70.
72. Liu F, Soh Yan Ni A, Lim Y, Mohanram H, Bhattacharjya S, Xing B. Lipopolysaccharide neutralizing peptide-porphyrin conjugates for effective photoinactivation and intracellular imaging of gram-negative bacteria strains. *Bioconjug Chem* [Internet]. 2012;23(8):1639–47.
 73. Dosselli R, Ruiz-González R, Moret F, Agnolon V, Compagnin C, Mognato M, et al. Synthesis, Spectroscopic, and Photophysical Characterization and Photosensitizing Activity toward Prokaryotic and Eukaryotic Cells of Porphyrin-Magainin and -Boforin Conjugates. *J Med Chem* [Internet]. 2014;57(4):1403–15.
 74. Hanakova A, Bogdanova K, Tomankova K, Binder S, Bajgar R, Langova K, et al. Study of photodynamic effects on NIH 3T3 cell line and bacteria. *Biomed Pap*. 2014;158(2):201–7.
 75. Lambrechts SAG, Demidova TN, Aalders MCG, Hasan T, Hamblin MR. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2005 Jul 28 [cited 2016 May 1];4(7):503–9.
 76. Jimenez-Banzo A, Sagrista ML, Mora M, Nonell S. Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2008;44(11):1926–34.
 77. Bessa LJ, Fazii P, Giulio M Di, Cellini L. Bacterial isolates from infected wounds and their antibiotic susceptibility pattern : some remarks about wound infection. *Int Wound J*. 2013;47–52.
 78. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med*. 1999;341:738–46.
 79. Bjarnsholt T. Chronic Wound Colonization, Infection, and Biofilms Klaus. *J Med Microbiol* [Internet]. 2011;1–9.
 80. Howell-Jones RS, Wilson MJ, Hill KE, Howard AJ, Price PE, Thomas DW. A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *J Antimicrob Chemother*. 2005;55(2):143–9.
 81. Chopra T, Marchaim D, Awali RA, Levine M, Sathyaprakash S, Chalana IK, et al. Risk factors and acute in-hospital costs for infected pressure ulcers among gunshot-spinal cord injury victims in southeastern Michigan. *Am J Infect Control* [Internet]. 2016;44(3):315–9.
 82. Stojadinovic A, Carlson JW, Schultz GS, Davis TA, Elster EA. Topical advances in wound care. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2008;111(2 SUPPL.):S70–80.

83. Sibbald RG, Orsted HL, Schultz GS, Coutts P, Keast D. The Preparing the Wound Bed Concept. *Ostomy Wound Manag.* 2003;49(11):24–51.
84. Livesley NJ, Chow AW. Infected pressure ulcers in elderly individuals. *Clin Infect Dis [Internet]*. 2002;35(11):1390–6.
85. Hanifah YA. Post-operative surgical wound infection. *Med J Malaysia.* 1990;45(4):293–7.
86. Akers KS, Mende K, Cheatle KA, Zera WC, Yu X, Beckius ML, et al. Biofilms and persistent wound infections in United States military trauma patients: a case-control analysis. *BMC Infect Dis [Internet]*. 2014;14:190.
87. Gjødsbøl K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jørgensen B, Klein BM, Kroghfelt KA. Multiple bacteria I species reside in chronic wounds: a longitudinal study. 2006;3(3):225–31.
88. Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections-State of the art. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2009;6(3–4):170–88.
89. Kharkwal GB, Sharma SK, Huang Y, Dai T. Photodynamic Therapy for Infections: Clinical Applications Gitika. *Lasers Surg Med.* 2011;43(7):755–67.
90. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: A new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci [Internet]*. 2004;3(5):436–50.
91. Embleton M, Nair S, Heywood W, Menon D, Cookson B, Wilson M. Development of a novel targeting system for lethal photo sensitization of antibiotic-resistant strains of *Staphylococcus aureus*. 2005;49(9):3690–6.
92. Gomes MC, Silva S, Faustino M a. F, Neves MGPMS, Almeida A, Cavaleiro J a. S, et al. Cationic galactoporphyrin photosensitisers against UV-B resistant bacteria: oxidation of lipids and proteins by $1O_2$. *Photochem Photobiol Sci.* 2012;262–71.
93. Hamblin MR, Touqir Zahra, Christopher H. Contag, McManus AT, Hasan T. Optical Monitoring and Treatment of Potentially Lethal Wound Infections In Vivo. *J Infect Dis.* 2003;187(January 2002):1717–25.
94. Hashimoto MCE, Prates RA, Kato IT, Núñez SC, Courrol LC, Ribeiro MS. Antimicrobial photodynamic therapy on drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-induced infection. An in vivo study. *Photochem Photobiol.* 2012;88(3):590–5.
95. Huang L, Dai T, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic inactivation and photodynamic therapy for infections. *Methods Mol Biol [Internet]*. 2010 Jan [cited 2016 May 1];635:155–73.

96. Kashef N, Borghei YS, Djavid GE. Photodynamic effect of hypericin on the microorganisms and primary human fibroblasts. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2013;10(2):150–5.
97. Kashef N, Ravaei Sharif Abadi G, Djavid GE. Phototoxicity of phenothiazinium dyes against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and multi-drug resistant *Escherichia coli*. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2012;9(1):11–5.
98. Kömerik N, Wilson M, Poole S. The effect of photodynamic action on two virulence factors of gram-negative bacteria. *Photochem Photobiol*. 2000;72(5):676–80.
99. Maisch T, Spannberger F, Regensburger J, Felgenträger A, Bäuml W. Fast and effective: Intense pulse light photodynamic inactivation of bacteria. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2012;39(7):1013–21.
100. Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJG. Evaluation of Nd: YAG and Er: YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J*. 2012;45(5):482–91.
101. Street C, Pedigo L, Gibbs A, Loebel N. Antimicrobial photodynamic therapy for the decolonization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the anterior nares. In: *Photodynamic Therapy: Back to the Future*. 2009. p. 73803B.
102. Tubby S, Wilson M, Wright JA, Zhang P, Nair SP. *Staphylococcus aureus* small colony variants are susceptible to light activated antimicrobial agents. *BMC Microbiol* [Internet]. 2013;13(1):201.
103. Xiao J-M, Feng L, Zhou L-S, Gao H-Z, Zhang Y-L, Yang K-W. Novel fluorescent cephalosporins: synthesis, antimicrobial activity and photodynamic inactivation of antibiotic resistant bacteria. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2013;59(2013):150–9.
104. Zolfaghari PS, Packer S, Singer M, Nair SP, Bennett J, Street C, et al. In vivo killing of *Staphylococcus aureus* using a light-activated antimicrobial agent. *BMC Microbiol*. 2009;9:27.
105. Cansever BZ, Soylu MB. Fotodinamik tedavi sonuçlarımız. TC Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Göz Hast Anabilim Dalı Fotodinamik, Tıpta Uzm Tezi, Adana. 2008;
106. Almeida J, Tomé JPC, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro J a S, Cunha Â, et al. Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2014;13(4):626–33.
107. Demidova TN, Hamblin MR. Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell

Density on Microbial Photoinactivation Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(6):2329–35.

108. Huang L, St. Denis TG, Xuan Y, Huang YY, Tanaka M, Zadlo A, et al. Paradoxical potentiation of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation by sodium azide: Role of ambient oxygen and azide radicals. *Free Radic Biol Med [Internet]*. 2012;53(11):2062–71.
109. St Denis TG, Vecchio D, Zadlo A, Rineh A, Sadasivam M, Avci P, et al. Thiocyanate potentiates antimicrobial photodynamic therapy: In situ generation of the sulfur trioxide radical anion by singlet oxygen. *Free Radic Biol Med [Internet]*. 2013;65:800–10.
110. Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA, Neves MGPMS, Tomé JPC, Tomé AC, et al. Antimicrobial photodynamic therapy: Study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. *Mar Drugs.* 2010;8(1):91–105.
111. Topaloglu N, Gulsoy M, Yuksel S. Antimicrobial Photodynamic Therapy of Resistant Bacterial Strains by Indocyanine Green and 809-nm Diode Laser. *Photomed Laser Surg [Internet]*. 2013;31(4):155–62.
112. Vecchio D, Bhayana B, Huang L, Carrasco E, Evans CL, Hamblin MR. Structure-function relationships of Nile blue (EtNBS) derivatives as antimicrobial photosensitizers. *Eur J Med Chem [Internet]*. 2014;75:479–91.
113. Núñez SC, Garcez AS, Kato IT, Yoshimura TM, Gomes L, Baptista MS, et al. Effects of ionic strength on the antimicrobial photodynamic efficiency of methylene blue. *Photochem Photobiol Sci [Internet]*. 2014;13(3):595–602.
114. Huang X, Chen G, Pan J, Chen X, Huang N, Wang X, et al. Effective PDT/PTT dual-modal phototherapeutic killing of pathogenic bacteria by using ruthenium nanoparticles. *J Mater Chem B [Internet]*. 2016;4(37):6258–70.
115. Fila G, Kawiak A, Grinholc MS. Blue light treatment of *Pseudomonas aeruginosa*: Strong bactericidal activity, synergism with antibiotics and inactivation of virulence factors. *Virulence [Internet]*. 2016;0(0):1–21.
116. Hashimoto MCE, Prates RA, Kato IT, Núñez SC, Courrol LC, Ribeiro MS. Antimicrobial Photodynamic Therapy on Drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*-induced Infection. An In Vivo Study. *Photochem Photobiol.* 2012;88(3):590–5.
117. Tseng SP, Teng LJ, Chen CT, Lo TH, Hung WC, Chen HJ, et al. Toluidine blue O photodynamic inactivation on multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *Lasers Surg Med.* 2009;41(5):391–7.
118. Wu M-F, Deichelbohrer M, Tschernig T, Laschke MW, Szentmáry N, Hüttenberger D, et al. Chlorin e6 mediated photodynamic inactivation for

- multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* keratitis in mice in vivo. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(March):44537.
119. Biel MA, Pedigo L, Gibbs A, Loebel N. Photodynamic therapy of antibiotic-resistant biofilms in a maxillary sinus model. *Int Forum Allergy Rhinol*. 2013;3(6):468–73.
 120. Darabpour E, Kashef N, Mashayekhan S. Chitosan nanoparticles enhance the efficiency of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic inactivation of bacterial biofilms: An in vitro study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2016;14:211–7.
 121. El Din SN, El-Tayeb TA, Abou-Aisha K, El-Azizi M. In vitro and in vivo antimicrobial activity of combined therapy of silver nanoparticles and visible blue light against *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Nanomedicine*. 2016;11:1749–58.
 122. Lippert R, Shubina TE, Vojnovic S, Pavic A, Veselinovic J, Nikodinovic-Runic J, et al. Redox behavior and biological properties of ferrocene bearing porphyrins. *J Inorg Biochem*. 2017;171:76–89.
 123. Huang X, Nakanishi K, Berova N. Porphyrins and metalloporphyrins: Versatile circular dichroic reporter groups for structural studies. *Chirality*. 2000;12(4):237–55.
 124. Zhu W, Hunt DJ, Richardson AR, Stojiljkovic I. Use of Heme Compounds as Iron Sources by Pathogenic *Neisseriae* Requires the Product of the *hemO* Gene Downloaded from <http://jb.asm.org/> on January 29 , 2017 by Tamil Nadu Veterinary & Animal Science University. 2000;182(2):439–47.
 125. Zhu W, Wilks A, Stojiljkovic I. Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the *hemO* gene of *Neisseriae* is a heme oxygenase. *J Bacteriol* [Internet]. 2000;182(23):6783–90.
 126. Stojiljkovic I, Hantke K. Transport of Hemin Across the Cytoplasmic Membrane Through a Hemin-Specific Periplasmic Binding-Protein-Dependent Transport-System in *Yersinia-Enterocolitica*. *Mol Microbiol*. 1994;13(4):719–32.
 127. Balla J, Balla G, Jeney V, Kakuk G, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferriporphyrins and endothelium: a 2-edged sword-promotion of oxidation and induction of cytoprotectants. *Blood*. 2000;95(11):3442–50.
 128. Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic Biol Med*. 1997;22(6):1075–99.
 129. Lin H, Everse J. The cytotoxic activity of hematoxeme: evidence for two different mechanisms. *Anal Biochem* [Internet]. 1987;161(2):323–31. dopt=Citation&list_uids=3578798

130. Tovmasyan A, Weitner T, Sheng H, Lu M, Rajic Z, Warner DS, et al. Differential coordination demands in Fe versus Mn water-soluble cationic metalloporphyrins translate into remarkably different aqueous redox chemistry and biology. *Inorg Chem*. 2013;52(10):5677–91.
131. Banerjee I, Mondal D, Martin J, Kane RS. Photoactivated Antimicrobial Activity of Carbon Nanotube–Porphyrin Conjugates. *Langmuir* [Internet]. 2010;26(22):17369–74.
132. Nitzan Y, Ashkenazi H. Photoinactivation of *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* B by a cationic hydrophilic porphyrin at various light wavelengths. *Curr Microbiol*. 2001;42(6):408–14.
133. Liu F, Soh A, Ni Y, Lim Y, Mohanram H, Bhattacharjya S, et al. Lipopolysaccharide Neutralizing Peptide – Porphyrin Conjugates for Effective Photoinactivation and Intracellular Imaging of Gram-Negative Bacteria Strains. *Bioconjug Chem*. 2012;23:1639–47.
134. Hamblin MR, Donnell DAO, Murthy N, Contag CH, Hamblin MR, Donnell DAO, et al. Rapid Control of Wound Infections by Targeted Photodynamic Therapy Monitored by In Vivo Bioluminescence Imaging Rapid Control of Wound Infections by Targeted Photodynamic Therapy Monitored by In Vivo Bioluminescence Imaging ¶. *Photochem Photobiol*. 2002;75(1):51–7.
135. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppellotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med*. 2006;38(5):468–81.
136. Topaloglu N, Güney M, Yuksel S, Gulsoy M. Antibacterial photodynamic therapy with 808-nm laser and indocyanine green on abrasion wound models. *J Biomed Opt*. 2015;20(2):abstract.
137. Vecchio D, Dai T, Huang L, Fantetti L, Roncucci G, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy with RLP068 kills methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and improves wound healing in a mouse model of infected skin abrasion PDT with RLP068/CI in infected mouse skin abrasion. *J Biophotonics*. 2013;6(9):733–42.
138. Sahu K, Sharma M, Gupta PK. Modulation of inflammatory response of wounds by antimicrobial photodynamic therapy. *Laser Ther*. 2015;24(3):201–8.
139. Brown S. Clinical antimicrobial photodynamic therapy: phase II studies in chronic wounds. *J Natl Compr Canc Netw* [Internet]. 2012;10 Suppl 2(October):S80-3.
140. Gomes M, Woranovicz-Barreira, SM Faustino M, Fernandes R, Neves M, Tomé A, Gomes N, et al. Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins. *Photochem Photobiol Sci*. 2011;10(11):1735–43.

141. Miyabe M, Junqueira JC, da Costa ACBP, Jorge AOC, Ribeiro MS, Feist IS. Effect of photodynamic therapy on clinical isolates of *Staphylococcus* spp. *Braz Oral Res.* 2011;25(3):230–4.
142. Brown R, Minnon J, Schneider S, Vaughn J. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in ambulances in southern Maine. *Prehosp Emerg Care* [Internet]. 2010 Jan [cited 2016 Mar 3];14(2):176–81.
143. Wang Y, Harrington OD, Wang Y, Murray CK, Hamblin MR, Dai T. In Vivo Investigation of Antimicrobial Blue Light Therapy for Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* Burn Infections Using Bioluminescence Imaging. *J Vis Exp.* 2017;(122):1–6.
144. Grinholc M, Rapacka-Zdonczyk A, Rybak B, Szabados F, Bielawski KP. Multiresistant Strains Are as Susceptible to Photodynamic Inactivation as Their Naïve Counterparts: Protoporphyrin IX-Mediated Photoinactivation Reveals Differences Between Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Strai. *Photomed Laser Surg* [Internet]. 2014;32(3):121–9.
145. Rapacka-Zdonczyk A, Larsen a. R, Empel J, Patel A, Grinholc M. Association between susceptibility to photodynamic oxidation and the genetic background of *Staphylococcus aureus*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014;33(4):577–86.
146. Tomé JPC, Neves MGPMS, Tomé AC, Cavaleiro JAS, Soncin M, Magaraggia M, et al. Synthesis and antibacterial activity of new poly-S-lysine-porphyrin conjugates. *J Med Chem.* 2004;47(26):6649–52.
147. Staegemann MH, Gitter B, Dervede J, Kuehne C, Haag R, Wiehe A. Mannose-Functionalized Hyperbranched Polyglycerol Loaded with Zinc Porphyrin: Investigation of the Multivalency Effect in Antibacterial Photodynamic Therapy. *Chem - A Eur J.* 2017;23(16):3918–30.
148. Le Guern F, Sol V, Ouk C, Arnoux P, Frochot C, Ouk T-S. Enhanced Photobactericidal and Targeting Properties of a Cationic Porphyrin following the Attachment of Polymyxin B. *Bioconj Chem* [Internet]. 2017;acs.bioconjchem.7b00516.
149. Masiera N, Bojarska A, Gawryszewska I, Sadowy E, Hryniewicz W, Waluk J. Antimicrobial photodynamic therapy by means of porphycene photosensitizers. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2017;174(July):84–9.
150. Kossakowska M, Nakonieczna J, Kawiak A, Kurlenda J, Bielawski KP, Grinholc M. Discovering the mechanisms of strain-dependent response of *Staphylococcus aureus* to photoinactivation: oxidative stress toleration, endogenous porphyrin level and strain's virulence. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2013;10(4):348–55.

151. Bartolomeu M, Rocha S, Cunha Â, Neves MGPMS, Faustino MAF, Almeida A. Effect of Photodynamic Therapy on the Virulence Factors of *Staphylococcus aureus*. *Front Microbiol* [Internet]. 2016;7(March):1–11.
152. Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA, Neves MGPMS, Tomé JPC, Tomé AC, et al. Antimicrobial Photodynamic Therapy: Study of Bacterial Recovery Viability and Potential Development of Resistance after Treatment. *Mar Drugs* [Internet]. 2010;8(1):91–105.
153. Alenezi K, Tovmasyan A, Batinic-Haberle I, Benov LT. Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn Ther* [Internet]. 2017;17:154–9.
154. Skwor TA, Klemm S, Zhang H, Schardt B, Blaszczyk S, Bork MA. Photodynamic inactivation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*: A metalloporphyrin comparison. *J Photochem Photobiol B Biol* [Internet]. 2016;165:51–7.
155. Caminos D a, Spesia MB, Durantini EN. Photodynamic inactivation of *Escherichia coli* by novel meso-substituted porphyrins by 4-(3-N,N,N-trimethylammoniumpropoxy)phenyl and 4-(trifluoromethyl)phenyl groups. *Photochem Photobiol Sci* [Internet]. 2006;5(1):56–65.
156. Lazzeri D, Rovera M, Pascual L, Durantini E. Photodynamic studies and photoinactivation of *Escherichia coli* using meso-substituted cationic porphyrin derivatives with asymmetric charge distribution. *Photochem Photobiol*. 2004;80(2):286–93.
157. Fila G, Kasimova K, Arenas Y, Nakonieczna J, Grinholc M, Bielawski KP, et al. Murine Model Imitating Chronic Wound Infections for Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Efficacy. *Front Microbiol* [Internet]. 2016;7(August):1–11.
158. Yuan Y, Liu Z-Q, Jin H, Sun S, Liu T-J, Wang X, et al. Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I: In vitro and in vivo studies. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176529.

ÖZGEÇMİŞ

Araştırma Görevlisi Ayşe AKBIYIK 1981 Artvin Hopa/ARTVİN’de doğdu. 1995-1999 tarihleri arasında Hopa Sağlık Meslek Lisesinde okudu. 2008 yılında Ege Üniversitesi Ödemiş Sağlık Yüksekokulu Hemşirelik Bölümü’nden mezun oldu. 2011 yılında Ege Üniversitesi Hemşirelik Yüksekokulu İç Hastalıkları Hemşireliği Anabilim Dalı’nda Enfeksiyon Kontrol Hemşireliği Yüksek Lisans programını tamamladı. 2011 yılında Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalında Doktora programına başladı. 2013 yılında Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı (ÖYP) kapsamında İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Esasları Anabilim Dalı’na Araştırma Görevlisi olarak atandı. Aynı yıl Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Hemşirelik Esasları Anabilim Dalı’nda Doktora programına başladı. 2014 yılında ÖYP bünyesinde Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Esasları Anabilim Dalı’na Araştırma görevlisi olarak görevlendirildi. Ekim 2016 itibariyle İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Hemşirelik Esasları Anabilim Dalı’nda Araştırma görevlisi olarak görev yapmaya devam etmektedir.