



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

DOKTORA
TEZİ

ANTİMİKROBİYAL FOTODİNAMİK TEDAVİ
ETKİNLİĞİNİN KATETER
MODELİNDE İNCELENMESİ

MERVE ERDOĞAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MART 2024



MERVE ERDOĞAN

TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MART 2024



**ANTİMİKROBİYAL FOTODİNAMİK TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN
KATETER MODELİNDE İNCELENMESİ**

Merve ERDOĞAN

**DOKTORA TEZİ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

MART 2024

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Merve ERDOĞAN

11.03.2024

ANTİMİKROBİYAL FOTODİNAMİK TEDAVİ ETKİNLİĞİNİN KATETER MODELİNDE İNCELENMESİ

(Doktora Tezi)

Merve ERDOĞAN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mart 2024

ÖZET

Hastanede yatan hastalarda nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının önemli bir kısmı intravenöz kateter enfeksiyonları kaynaklıdır. Yüksek mortalite-morbidite oranı ve maliyeti nedeniyle kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının önlenmesine yönelik çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Çalışmamızda, *S. aureus* ve *S. epidermidis* ile bakteriyel, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* ile fungal in vitro kateter enfeksiyon modeli geliştirilmiştir. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi (aFDT), belirli bir dalga boyuna sahip görünür ışık kaynağı (LED, Light Emitting Diode), fotosensitizör madde (FS) ve oksijen bileşenlerinden meydana gelmektedir. Bu etkileşim sonucunda açığa çıkan reaktif oksijen türleri/tekil oksijen hedef mikroorganizma üzerine sitotoksik etki göstermektedir. Çalışmada biyofilm oluşumu basamağından önce veya sonra katetere belirlenen tedavi yöntemi uygulanmıştır. Kateterde profilaktik FDT ile önleyici, terapötik FDT ile tedavi edici etki araştırılmaktadır. Fotosensitizör olarak kırmızı LED için metilen mavisi ve toluidin mavisi O, yeşil LED için rose bengal ve eosin Y, mavi LED için ribofilavin ve kurkumin kullanılmıştır. Fotodinamik tedavinin in vitro kateter modelinde biyofilm üzerine etkisi; biyofilm biyokütlesinin ölçümü ve hücre canlılığı testi ile kantitatif, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile kalitatif olarak incelenmiştir. Her mikroorganizma için elde edilen veriler deney grupları ve tedavi uygulanmayan kontrol grupları karşılaştırılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada istatistiksel ve görsel farklılık anlamlı bulunduğu için fotodinamik tedavinin kateter modelinde biyofilm yapısı üzerine etkili olduğu, ancak her mikroorganizma için etkinliğin fotosensitizör ve LED kombinasyonlarına göre değişkenlik gösterdiği bulunmuştur. *Staphylococcus* için en etkili kombinasyonlar metilen mavisi ile kırmızı LED ve rose bengal ile yeşil LED iken, *Candida* için toluidin mavisi O ile kırmızı LED ve kurkumin ile mavi LED kombinasyonlarıdır. İn vitro modelleme çalışmamızın sonuçları, FDT'nin kateterle ilişkili enfeksiyonları önlemek ve tedavi etmek için potansiyel yeni bir yaklaşım olabileceğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 1039

Anahtar Kelimeler : Fotodinamik Tedavi, Biyofilm, Kateter, *Candida*, *Staphylococcus*

Sayfa Adedi : 119

Danışman : Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

İkinci Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Ayça ŞAHİN

INVESTIGATION OF ANTIMICROBIAL PHOTODYNAMIC THERAPY IN CATHETER MODEL

(Ph. D. Thesis)

Merve ERDOĞAN

GAZI UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

March 2024

ABSTRACT

A significant proportion of nosocomial bloodstream infections in hospitalised patients are caused by intravenous catheter infections. Due to the high mortality-morbidity rate and cost, studies on the prevention of catheter-related bloodstream infections have come to the forefront. In our study, bacterial catheter infection model with *S. aureus* and *S. epidermidis* and fungal in vitro catheter infection model with *C. albicans* and *C. parapsilosis* were developed. Antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) consists of a visible light source (LED, Light Emitting Diode) with a specific wavelength, photosensitiser (FS) and oxygen components. The reactive oxygen species / singlet oxygen released as a result of this interaction have a cytotoxic effect on the target microorganism. In the study, the treatment method determined before or after the biofilm formation step was applied to the catheter. Preventive effect with prophylactic PDT and therapeutic effect with therapeutic PDT are investigated. Methylene blue and toluidine blue O for red LED, rose bengal and eosin Y for green LED, ribofilavin and curcumin for blue LED were used as photosensitisers. The effect of photodynamic therapy on biofilm in the in vitro catheter model was analysed quantitatively by measuring biofilm biomass and cell viability test and qualitatively by scanning electron microscopy (SEM). The data obtained for each microorganism were evaluated by comparing the experimental groups and untreated control groups. Since the statistical and visual differences were found to be significant, it was found that photodynamic therapy was effective on the biofilm structure in the catheter model, but the effectiveness for each microorganism varied according to the photosensitiser and LED combinations. The most effective combinations for *Staphylococcus* were red LED with methylene blue and green LED with rose bengal, whereas for *Candida* the most effective combinations were red LED with toluidine blue O and blue LED with curcumin. The study results suggest that PDT may be a potential new approach to prevent and treat catheter-associated infections.

Science Code : 1039

Key Words : Photodynamic Therapy, Biofilm, Catheter, *Candida*, *Staphylococcus*

Page Number : 119

Advisor : Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR

Co-Advisor : Asst. Prof. Dr. Ayça ŞAHİN

TEŞEKKÜR

Öncelikle bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım değerli hocalarım; tez danışmanım Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Kayhan ÇAĞLAR'a, tüm lisansüstü eğitimim boyunca uzun yıllar beraber çalışma şansı bulduğum ve tez sürecimi de başından sonuna kadar önderliğinde yürüttüğüm sayın Prof. Dr. Ayşe KALKANCI'ya, Tez İzleme Komitesinde yer alan sayın Prof. Dr. Ahmet BAŞUSTAOĞLU'na çok teşekkür ederim.

Asistanı olarak çalışmaktan mutluluk duyduğum kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Ayşen BAYRAM'a ve eğitime katkıda bulunan bütün saygıdeğer hocalarıma üzerimdeki emeklerinden dolayı teşekkürlerimi sunuyorum.

Birlikte eğitim aldığım uzmanlık ve doktora öğrencilerine, birlikte çalıştığım laboratuvarlarda görev alan bütün çalışanlara, tüm arkadaşlarıma manevi destekleri için teşekkür ederim. Mesafelere rağmen uzun yıllar yanımda olduğu, sabrı ve anlayışı için Murat AKPINAR'a, sonsuz teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her koşulda beni destekleyen annem Meral ERDOĞAN'a, babam Harun ERDOĞAN'a, dedem Nevzat ARKUN'a ve şansım olduklarını düşündüğüm tüm aile bireylerime bana duydukları güven, koşulsuz sevgileri ve sonsuz desteklerinden dolayı tek tek tüm içtenliğimle teşekkür ederim.

Pandemi ve deprem dönemine denk gelen zor koşullarda büyük özveri ve sabırla bitirdiğim tezimi fiziken artık yanımda olamasa da her zaman yanımda olduğunu hissederek güç aldığım sevgili anneannem Leyla ARKUN'a ithaf ediyorum...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
RESİMLERİN LİSTESİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Biyofilm.....	3
2.1.1. Biyofilm tanımı	3
2.1.2. Biyofilm tarihçesi	4
2.1.3. Biyofilm yapısı ve bileşenleri.....	6
2.1.4. Biyofilm oluşum aşamaları.....	8
2.1.5. Biyofilmde hücreler arası iletişim	13
2.1.6. Biyofilm ve enfeksiyon ilişkisi.....	15
2.1.7. Biyofilm kontrolü ve anti-biyofilm stratejileri	19
2.2. Kateterler ve Kateter ilişkili Enfeksiyonlar	21
2.2.1. Kateter tipleri ve özellikleri.....	21
2.2.2. Kateter ilişkili enfeksiyonlar ve klinik tanımları.....	22
2.2.3. Kateter ilişkili enfeksiyonlarda risk faktörleri.....	24
2.2.4. Kateter ilişkili enfeksiyonlarda epidemiyoloji	26
2.2.5. Kateter ilişkili enfeksiyonlarda etiyoloji	28

	Sayfa
2.2.6. Kateter enfeksiyonlarında tanı.....	30
2.2.7. Kateter enfeksiyonlarında tedavi	31
2.3. Antimikrobiyal Fotodinamik Tedavi (AFDT)	33
2.3.1. Antimikrobiyal fotodinamik tedavinin tarihçesi.....	33
2.3.2. Antimikrobiyal fotodinamik tedavinin etki mekanizması	35
2.3.3. Antimikrobiyal fotodinamik tedavide fotosensitizörler.....	39
2.3.4. Antimikrobiyal fotodinamik tedavide kullanılan ışık kaynakları	42
2.3.5. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi uygulamaları	43
2.3.6. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi avantajları ve dezavantajları	44
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	47
3.1. Deneyde Kullanılan Mikroorganizmalar	47
3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Malzemeler	47
3.2.1. Deneyde kullanılan besiyerleri	47
3.2.2. Deneyde kullanılan fotosensitizörler ve özellikleri	47
3.2.3. Deneyde kullanılan diğer kimyasal maddeler	48
3.3. Deneyde kullanılan Araç ve Gereçler.....	48
3.3.1. Deneyde kullanılan ışık kaynağı ve özellikleri.....	48
3.3.2. Deneyde kullanılan diğer cihazlar ve laboratuvar malzemeleri	49
3.4. Yöntemler	50
3.4.1. Besiyerlerinin hazırlanması	50
3.4.2. Fotosensitizörlerin hazırlanması.....	51
3.4.3. Çalışma grupları ve deney tasarımı	52
3.4.4. İn vitro kateter modelinde bakteriyel ve fungal biyofilm oluşturulması..	53
3.4.5. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi uygulaması (AFDT).....	54
3.4.6. Kristal viyole testi ile biyofilm biyokütlesinin ölçümü	55
3.4.7. İstatiksel analiz	56

	Sayfa
3.4.8. Hücre canlılığı testi.....	57
3.4.9. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) örnek hazırlanması ve analizi	57
4. BULGULAR	59
4.1. Biyofilm Biyokütle Ölçümünün İstatiksel Analizinin Değerlendirilmesi	59
4.1.1. Profilaktik FDT grubuna ait biyofilm biyokütlesi bulguları	59
4.1.2. Terapötik FDT grubuna ait biyofilm biyokütlesi bulguları	63
4.2. Hücre Canlılığı Deneyinin Değerlendirilmesi	68
4.2.1. Profilaktik FDT grubuna ait bulgular	69
4.2.2. Terapötik FDT grubuna ait bulgular	70
4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları.....	71
4.3.1. Profilaktik fotodinamik tedavinin antibiyofilm etkisinin SEM ile incelenmesi.....	71
4.3.2. Terapötik fotodinamik tedavinin antibiyofilm etkisinin SEM ile incelenmesi.....	75
5. TARTIŞMA.....	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	93
KAYNAKLAR	95
EKLER.....	113
EK-1. Etik Kurul Raporu	114
ÖZGEÇMİŞ	118

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Kateter ile ilişkili enfeksiyon tanımları	24
Çizelge 4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi	59
Çizelge 4.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi .	60
Çizelge 4.3. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi.....	61
Çizelge 4.4. <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 96142 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi	62
Çizelge 4.5. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi	64
Çizelge 4.6. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümü istatistik analizi	65
Çizelge 4.7. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümü istatistik analizi.....	66
Çizelge 4.8. <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 96142 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi	67

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları	9
Şekil 2.2. Anti-biyofilm stratejileri	20
Şekil 2.3. Mikroorganizmaların intravenöz katetere giriş yolları	23
Şekil 2.4. Fotodinamik antimikrobiyal kemoterapinin temel bileşenleri	36
Şekil 2.5. Fotodinamik tedavinin etki mekanizması: jablonski diyagramı	37
Şekil 2.6. Tip I ve Tip II reaksiyon	38
Şekil 3.1. Tez çalışmasında yer alan gruplar	52
Şekil 4.1. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	60
Şekil 4.2. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	61
Şekil 4.3. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	62
Şekil 4.4. <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 96142 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	63
Şekil 4.5. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	64
Şekil 4.6. <i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC 35984 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	65
Şekil 4.7. <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	67
Şekil 4.8. <i>Candida parapsilosis</i> ATCC 96142 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları	68
Şekil 4.9. Profilaktik tedavi sonucu hücre canlılığı grafiği	69
Şekil 4.10. Terapötik tedavi sonrası hücre canlılığı grafiği	70

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 3.1. Çalışmada kullanılan LED ışık kaynağı	48
Resim 3.2. Çalışmada kullanılan fotosensitizörlerin stok solüsyonları	51
Resim 3.3. Santral venöz kateter ve steril kateter segmentleri	53
Resim 3.4. Farklı renklerde LED ile FDT uygulaması	54
Resim 3.5. Kristal viyole testi optik dansite okuma plakları	56
Resim 3.6. Püskürtmeli Au-Pd kaplama cihazı	58
Resim 3.7. Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	58
Resim 4.1. Kateter yüzeyinde <i>Staphylococcus aureus</i> biyofilmi SEM analizi, kontrol (üstte) ile MB+L profilaktik FDT (altta) görüntüleri	72
Resim 4.2. Kateter yüzeyinde <i>Staphylococcus epidermidis</i> biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile RB+L profilaktik FDT (sağda) görüntüleri.....	73
Resim 4.3. Kateter yüzeyinde <i>Candida albicans</i> biyofilmi SEM analizi, kontrol (üstte) ile CUR+L profilaktik FDT (altta) görüntüleri	74
Resim 4.4. Kateter yüzeyinde <i>Candida parapsilosis</i> biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile TBO+L profilaktik FDT (sağda) görüntüleri	75
Resim 4.5. Kateter yüzeyinde <i>Staphylococcus aureus</i> biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile MB+L terapötik FDT (sağda) görüntüleri	76
Resim 4.6. Kateter yüzeyinde <i>Staphylococcus epidermidis</i> biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile RB+L terapötik FDT (sağda) görüntüleri	77
Resim 4.7. Kateter yüzeyinde <i>Candida albicans</i> biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile CUR+L terapötik FDT (sağda) görüntüleri	78
Resim 4.8. Kateter yüzeyinde <i>Candida parapsilosis</i> biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile TBO+L terapötik FDT (sağda) görüntüleri	79

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
μl	mikrolitre
μM	mikromolar
cm	santimetre
nm	nanometre
dk	dakika
g	gram
J	Joule
mg	miligram
ml	mililitre
rpm	rounds per minute
sn	saniye

Kısaltmalar	Açıklama
aFDT	Antimikrobiyal Fotodinamik Tedavi
AKT	Antimikrobiyal Kilit Tedavi
CUR	Kurkumin
DMSO	Dimetil Sülfoksit
EOY	Eozin Y
EPS	Ekstraselüler Polimerik Madde
FDT	Fotodinamik Tedavi
FS	Fotosensitizör
KİE	Kateter İlişkili Enfeksiyon

Kısaltmalar	Açıklama
KİKDE	Kateter İlişkili Kan Dolaşımı Enfeksiyonu
KNS	Koagülaz Negatif Stafilokok
KV	Kristal Viyole
LED	Işık Yayan Diyot
MB	Metilen Mavisi
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
QS	Quarum Sensing
RB	Rose bengal
RBF	Ribofilavin
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
SDB	Sabouraud Dekstroz Broth
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SVK	Santral Venöz Kateter
TBO	Toluidin Mavisi O
TSA	Triptik Soy Agar
TSB	Triptik Soy Broth

1. GİRİŞ

Kateterler yaşam desteği ve tedavi anlamında büyük öneme sahip araçlardır. Nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarının önemli bir kısmı kateter kullanımı kaynaklıdır. Yüksek morbidite-mortalite oranı, hastanede yatış süresinde artış ve ek maliyet sebebiyle kateter ilişkili enfeksiyonların önlenmesine yönelik çalışmalar ön plana çıkmaktadır. Başta cilt flora mikroorganizmaları olmak üzere, çeşitli bakteriler ve mantarlar kateter enfeksiyonunun etiyolojisinde yer almaktadır. Çalışmada *Staphylococcus aureus* ve *Staphylococcus epidermidis* referans kökenleri ile bakteriyel, *Candida albicans* ve *Candida parapsilosis* referans kökenleri ile fungal in vitro kateter enfeksiyon modeli oluşturulmuştur.

Kateter enfeksiyonları geleneksel olarak antimikrobiyal ilaçlarla tedavi edilmektedir. Antimikrobiyal ajanların etkisi, gelişen ilaç direnci ve biyofilm ile ilişkili virülansla birlikte büyük ölçüde zayıflamaktadır. Biyofilm ilişkili enfeksiyonların tedavisinde antimikrobiyal kilit tedavi (AKT), kullanılan referans bir yöntemdir. Ancak, antimikrobiyal ilaçların biyofilm içerisine geçirgenliği sınırlıdır. Ayrıca, antimikrobiyallerin çeşitli yan etkileri mevcuttur. Bu sebeplerden ötürü kateter enfeksiyonuna karşı alternatif yeni tedavi yöntemleri araştırılmaktadır.

Fotodinamik tedavi (FDT), uzun süredir tıpta çeşitli alanlarda kullanılan ve etkinliği bilinen bir uygulamadır. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi (aFDT), son yıllarda bakteriyel ve fungal enfeksiyonların tedavisi için geleneksel antimikrobiyal tedavi yöntemine yardımcı yeni bir yaklaşım olarak ortaya çıkmaktadır. Fotodinamik etkinin ortaya çıkması için belirli bir dalga boyuna sahip görünür ışık kaynağı (Light Emitting Diode, LED), fotosensitizör ajan (FS) ve oksijen bileşenlerinin bir araya gelmesi gerekmektedir. Işığın fotosensitizör madde tarafından soğurulması ile birlikte, fotosensitizör uyarılmış hale geçer ve bunun sonucunda açığa çıkan reaktif oksijen türleri/tekil oksijen hedef mikroorganizma ölümünü tetikleyerek sitotoksik etki göstermektedir.

Fotosensitizör seçimi, Güzel Tunççan ve arkadaşlarının bakteriyel ve fungal planktonik hücreler ile plakta biyofilm üzerine antimikrobiyal fotodinamik tedavi etkinliği çalışmasında kullanılan fotosensitizörler baz alınarak belirlenmiştir [1]. Kateter yüzeyinde biyofilmi inaktive etme yetenekleri açısından etkin ışığa duyarlılaştırıcı ajanın kapsamlı bir şekilde

belirlenmesi amacıyla fotosensitizör grubu genişletilmiştir. Bu çalışmada fotosensitizör olarak metilen mavisi (MB), toluidin mavisi O (TBO), rose bengal (RB), eozin Y (EOY), riboflavin (RBF) ve kurkumin (CUR) seçilmiştir. Bu fotosensitizörler, FDT'deki etkinliklerini belirleyen farklı kimyasal yapılara ve özelliklere sahiptir.

Fotodinamik tedavide, ışığa duyarlılaştırıcıyı aktive etmek ve tedavi etkinliği için farklı ışık kaynakları kullanılmaktadır. Klinik FDT' de kullanılan ana ışık kaynağı türleri lazerler, ışık yayan diyotlar (LED) ve halojen lambalardır. LED lambaların kullanımı kolaydır ve uygun maliyetlidir. LED lambalar lazerlere kıyasla geniş bir alana ışık yayar, ancak yoğunluğu düşük ışık yayarak daha az ısı üretir. Bu durum oldukça önemlidir çünkü aşırı ısı FDT sırasında çevredeki dokulara zarar verebilir. LED lambaların azaltılmış ısı üretimi, aşırı ısınma riski olmadan daha uzun tedavi süreleri sağlamaktadır. Tüm bunlar, LED'leri fotodinamik tedavi için popüler bir seçim haline getirmektedir [2]. Bu sebeplerden dolayı çalışmada ışık kaynağı olarak fotosensitizörlere uygun dalga boyunda LED 'ler seçilmiştir.

Bu çalışmada, in vitro kateter enfeksiyon modeli oluşturularak bakteriyel ve fungal biyofilm üzerine çeşitli fotosensitizörlerin ve LED (light emitting diode) ışık kaynaklarının önleyici (profilaktik) ve tedavi edici (terapötik) antimikrobiyal fotodinamik etkinliği araştırılmıştır. Antimikrobiyal fotodinamik etki biyofilm biyokütlesinin ölçümü ve hücre canlılığı testi ile kantitatif olarak, taramalı elektron mikroskobu (Scanning electron microscopy, SEM) ile görsel olarak incelenmiştir.

Çalışmada, antimikrobiyal fotodinamik tedavi ile kateterde biyofilm oluşumunu engelleyen ve oluşan biyofilmi azaltan veya yok eden bir uygulama geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Aynı zamanda hedeflenen, in vitro antimikrobiyal fotodinamik tedavi modelinin literatüre detaylı katkı sunması ve gelecekteki in vivo çalışmalara zemin hazırlamasıdır.

Mevcut tıbbi uygulamalar içinde biyofilm ilişkili kateter enfeksiyonuna yönelik antimikrobiyal fotodinamik tedavi uygulaması yoktur. Literatürde önerilen, fotosensitizörü ve ışık kaynağı kesinleşmiş bir anti-biyofilm fotodinamik tedavi protokolü bulunmamaktadır. Bu çalışma antimikrobiyal fotodinamik tedavinin kateterde anti-biyofilm etkinliğinin belirlenmesi, hastanelerde kateter enfeksiyonunun önlenmesi ve kateterin çıkarılmasına gerek duyulmayan alternatif veya destekleyici bir tedavi yöntemi geliştirilmesi açısından önem taşımaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyofilm

2.1.1. Biyofilm tanımı

Mikrobiyoloji tarihinin önemli bir bölümünde mikroorganizmaların gelişim fizyolojisi planktonik olarak tanımlanmıştır. Ancak doğal ortamlarında yapılan doğrudan gözlemler, mikroorganizmaların planktonik halden ziyade bir yüzeye tutunan biyofilm içine gömülü mikrobiyal topluluklardan oluştuğunu göstermektedir [3,4,5]. Bu teori üzerine yapılan çalışmalarda elde edilen veriler, mikroorganizmaların %99,9'unun yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturarak ürediğini doğrulamaktadır [6,7]. Mikroorganizmalar toprak, su boruları, kalıcı tıbbi cihazlar gibi cansız yüzeylerde veya dış minesi, kalp kapakları, akciğer gibi canlı yüzeylerde biyofilm oluşturabilmektedir [8].

Biyofilm yapısı, mikroorganizmaların polisakkarit, ekstraselüler DNA ve proteinlerden oluşan matriks içerisinde yaşayıp çoğaldıkları bir mikro ekosistemdir [9]. Biyofilm; belirli bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunan mikroorganizma toplulukları ve bu mikroorganizma topluluklarının oluşturduğu polimer yapıdaki materyallerden meydana gelmektedir [10]. Belirli bir yüzey alan üzerinde tabaka halinde bulunan bu yapı; çevreden absorbe edilen çeşitli organik veya inorganik maddelerden, mikroorganizmalardan ve mikroorganizmaların sentezlediği hücre dışı polisakkaritlerden oluşmaktadır.

Elder ve arkadaşlarının biyofilm tanımı “mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığı ile oluşturdukları yapısal birlik” iken Carpentier ve Cerf, “mikroorganizmaların gömülü olarak bulunduğu yüzeye yapışmış organik polimer matriks” tanımını yapmışlardır [11,12].

Costerton ve arkadaşları ise biyofilm yapısını, “mikroorganizma tarafından üretilen ve mikroorganizmanın canlı ve cansız yüzeylere yapışmasını sağlayan glikokaliks” olarak tanımlamışlardır [13].

Donlan, “geri dönüşümsüz şekilde bir substrata, ara yüzeye veya birbirine tutunan, ekstraselüler polimerik maddelerden oluşan matriks içerisine gömülü, gen transkripsiyonuna

ve büyüme hızına bağlı olarak planktonik hücrelerden farklı fenotip gösteren, mikrobiyal hücrelerden meydana gelen hareketsiz topluluk” şeklinde güncel biyofilm tanımını yapmıştır [14].

Elektron mikroskoplarının kullanıma girmesi ile yapılan detaylı çalışmalar, biyofilmelerin yapısal detaylarının ve oluşum basamaklarının ayrıntılı olarak incelenebilmesine olanak sağlamıştır. Bu sayede biyofilm kavramı daha net anlaşılmıştır [15].

2.1.2. Biyofilm tarihçesi

Fosil kayıtlarından edinilen bilgilere göre biyofilme ait kalıntılar 3,3–3,5 milyar yıl öncesine dayanmaktadır [16,17]. 17. yüzyıla kadar mikroorganizmalar planktonik olarak tanımlanmıştır. Mikroorganizmaların bir yüzey üzerinde tutunarak yaşayabildikleri şeklindeki mikrobiyolojik fenomen ilk kez Antonie Van Leeuwenhoek tarafından bildirilmiştir. Leeuwenhoek’ un, dişi üzerindeki plaktan aldığı sürüntüyü kendi yapmış olduğu basit mikroskopla inceleyerek mikrobiyal kümelerin varlığını gözlemlediği ve farkında olmadan biyofilm yapısını ilk kez görüntülediği bilinmektedir. [18-20].

Mikroorganizmaların canlı ve cansız yüzeylere tutunup büyüdüğünün gözlemlenmesine rağmen biyofilm teorisi yirminci yüzyıla kadar yayılmamıştır. Biyofilm oluşumuyla ilgili ilk önemli verilere suda yaşayan bakteriler incelenerek ulaşılmıştır. Deniz mikrobiyolojisinde yapışan mikroorganizmaları serbest dolaşan mikroorganizmalardan ayırt etmek amacıyla mikroorganizmaların yüzeye yapışmasını ve bu alanda çoğalarak topluluk oluşturmalarını ifade eden film terimi 1933-1935 yıllarında kullanılmıştır [21,22].

Henrici, 1933 yılında tatlı sulardaki biyokirliliği incelediği çalışmasında suda yaşayan bakterilerin büyük bir kısmının serbest yüzen mikroorganizmalar olmadığını bildirmiştir [22]. ZoBell ve Allen, 1935 yılında suda yaşayan bakterilerin genellikle katı yüzeylere tutunarak çoğaldığını belirtmişlerdir. Çalışmalarında deniz suyuna batırdıkları cam slaytların üzerinde üreyen mikroorganizmaları incelemişler ve ilk olarak cama geçici olarak bağlandıklarını, daha sonra yüzeye yapışarak mikrokoloniler oluşturdıklarında yıkansalar dahi yüzeyden ayrılmadıklarını gözlemlemişlerdir [21,23]. Heukelekian ve Heller, 1940 yılında yaptıkları çalışmada deniz mikroorganizmaları için şişe etkisini incelemiş ve mikroorganizmaların öncelikle yüzeye tutunduklarını, tutunma sonrası biyolojik

reaksiyonlarının büyük ölçüde hızlandığını belirtmiştir [23,24]. 1943’ de Zobell tarafından yapılan başka bir çalışmada tutunma sonrası yüzeydeki bakteri miktarının başlangıçtaki miktardan daha fazla olduğu gösterilmiştir [25]. 1973 yılında Characklis, endüstriyel su sistemlerindeki mikroorganizma topluluklarının yüzeye yapıştıklarında dezenfektanlara karşı dirençli olduklarını ortaya koymuştur [20]. 1976’ da Marshall, çok ince ekstrasellüler polimer fibrillerin bakteri yüzeyine sabitlendiğini belirtmiştir [19].

Tıp alanındaki biyofilm çalışmaları daha ileri tarihlerde gerçekleşmiştir. Ekolojik ortamda bulunan biyofilmler üzerine yapılan çalışmalar halk sağlığı ile ilişkili bulunmuştur [19]. 1977 yılında kronik kistik fibrozisi olan hastalardan alınan balgam örneklerinde *Pseudomonas aeruginosa* toplulukları gözlemlenmiş ve tıp literatüründe slaymla çevrili bakteri agregasyonu ile kronik enfeksiyon arasındaki ilişki ilk defa rapor edilmiştir [26]. Slaym kralı olarak bilinen J. William Costerton da tıp alanında biyofilm ve biyofilm enfeksiyonları ile ilgili yapılan çalışmalara öncülük etmiştir [27]. Costerton ve çalışma arkadaşları 1978’ de yeterli besin içeren su ekosistemlerinde bakterilerin biyotik veya abiyotik yüzeylere tutunarak büyüdüklerini bildirmişlerdir. 1981 yılında yüzeye tutunan hücre popülasyonlarını tanımlamak için ilk defa “biyofilm” terimi kullanılmıştır [19,20,28]. Yapılan çalışmalarda, mikroorganizma topluluklarının bulundukları ekolojik ortamdan yararlandıkları tespit edilmiştir. Koşulların elverişli olduğu ekosistemlerde, mikroorganizmaların büyük kısmının biyofilm tabakasını oluşturan matriks içerisinde üreyerek yaşamlarını sürdürdüğü görülmüştür. Ayrıca, biyofilm oluşturan mikroorganizma ile planktonik mikroorganizmalar arasında farklılıklar gözlemlenmiştir [19,20]. 1985 yılındaki çalışmasında Costerton, planktonik bakterilerle kıyaslandığında biyofilm içerisindeki bakterilerin antibiyotiğe daha dirençli olduklarını göstermiştir [29].

Biyofilmin ışık mikroskobundan daha yüksek çözünürlüğe sahip olan elektron mikroskobuyla incelenmesiyle birlikte biyofilm yapısına ait bilgiler de artmıştır. 1969 yılında Jones ve arkadaşları atık su tesisindeki filtrelerin yüzeyine yapışan hücre topluluklarını elektron mikroskobu ile incelemişler ve biyofilmde yapışmayı sağlayan hücreleri çevreleyen matriksin polisakkarit yapıda olduğunu açıklamışlardır [30]. Costerton ve arkadaşları ise 1999 yılında biyofilm yapısını, mikroorganizmaların ürettiği herhangi bir cisime yapışma özelliği olan “Glikokaliks” olarak isimlendirilen polimerik matriks şeklinde tanımlamışlardır [20].

2.1.3. Biyofilm yapısı ve bileşenleri

Biyofilm yapısını biyolojik olarak mikroorganizmalarda çoğalma hızı, ekzopolisakkarit sentezi, hücreler arası sinyalizasyon ve gen transkripsiyonu gibi faktörler; fizyolojik olarak ise biyofilmin oluştuğu çevre koşulları etkilemektedir [20,31].

Biyofilm yapısının bileşenleri yüzey, mikroorganizma ve ekstraselüler polimerik madde (ekzopolisakkarit, EPS) ile diğer elemanlardır [20].

Yüzey:

Biyofilm yapısı; kataterler, kontakt lensler, protez kalp kapakçıkları, protez kalp pilleri, rahim içi araçları, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi vücutta hem biyotik hem de abiyotik yüzeylerde oluşabilmektedir [32]. Mikroorganizmaların bir yüzeye bağlanma düzeyi; ortam sıcaklığı ve pH'ı, mikroorganizma türü ve sayısı, hücre duvar yapısı, hücre hareketliliği, ortamdaki besin içeriği ve miktarı, iyon konsantrasyonu ve mikroorganizmanın adsorbe olduğu yüzey özellikleri gibi birçok etkene bağlı olarak değişebilmektedir [33].

Yüzey özellikleri mikrobiyal adsorbsiyonda önemli bir rol oynamaktadır. Tutunmayı etkileyen yüzeyel özellikler arasında elektriksel yük, mikrotopografya, hidrofobisite ve pürüzlülük yer almaktadır [34].

Biyofilm oluşumunda yüzeyde bulunan proteinler mikroorganizmaların bağlanmasını etkilemektedir [35]. Biyofilm ilişkili proteinler (Biofilm Associated Protein, BAP), mikroorganizmaların yüzeyde kolonize olmasını ve sürekliliğini sağlamaktadır [36]. Biyofilm yapısı yüzeye ait dış faktörlerden de etkilenmektedir. Konak ve çevre kaynaklı yapılar da biyofilm içeriğine katılmaktadır. Eritrosit, fibrin, enzim gibi yapıların katılımı biyofilmin bileşimine ve fiziksel özelliklerine etki edebilmektedir [13].

Mikroorganizma

Biyofilm oluşturma özelliği olan mikroorganizmalar ile biyofilm oluşumuyla ilişkili olmayan serbest mikroorganizmalar arasında büyük farklılıklar mevcuttur [8].

Biyofilm oluşturan mikroorganizmaların büyüme hızı, çeşitli antimikrobiyal ajanlara karşı gösterdiği direnç ve konak bağışıklığından kaçabilme avantajı ciddi sağlık problemlerine neden olmaktadır.

Biyofilm oluşumu sürecinde mikroorganizmaların bir yüzeye tutunmaları farklı türdeki mikroorganizmaların aynı alanda bulunma olasılığını arttırmaktadır. Biyofilmler aynı mikroorganizmalardan oluşabileceği gibi farklı mikroorganizmalar da bir araya gelerek biyofilm oluşturabilmektedir. Biyofilm içerisinde heterojen bir yapı meydana gelmektedir. Bu durum mikroorganizmalar arası gen alışverişine olanak sağlamakta ve genetik olarak dirençli suşlar gelişmektedir. Mikroorganizmaların belirli bir yüzey üzerinde tutunmaları ayrıca konak bağışıklığından korunmalarını da sağlamaktadır [37].

Ekstraselüler Polimerik Madde (Ekzopolisakkarit, EPS)

Biyofilm yapısı, mikroorganizmaların da içerisinde gömülü biçimde yer aldığı ekstraselüler polimerik madde içeren çamur veya balçık benzeri matriks şeklindedir [3]. Biyofilmin kompleks yapısı, ortamdaki organik ve inorganik moleküllerin ekstraselüler yapıda toplanmasıyla meydana gelmektedir. Biyofilm %73-98 oranında su içermektedir [20]. Biyofilmlerin katı kütlesi temelde mikrobiyal hücrelerden ve ekstraselüler matriksten oluşmaktadır. Biyofilmlerin karbon içeriğini %75–90 oranında ekstraselüler matriks oluşturmaktadır ve temel ekstraselüler komponent polisakkaritlerdir [14,38]. Matriks içerisindeki diğer bileşenler ise proteinler, lipitler, fosfolipitler, nükleik asit ve iyonlardır [39]. Matriks yoğunluğu ve içerikteki oranlar mikroorganizmaların türüne, fizyolojik özelliklerine gelişme ortamına ve fiziksel özelliklerine göre değişkenlik göstermektedir [20,40].

Gram negatif bakterilerin nötral veya anyonik özellikte, Gram pozitif bakterilerin ise katyonik özellikte biyofilm matriksi oluşturduğu bilinmektedir [41,42]. Farklı mikroorganizmaların oluşturduğu biyofilmlerin kimyasal içerikleri ve yapısal özellikleri farklı olmakla birlikte, temel özellikleri ortaktır [14,43].

Biyofilm yapısı mikroskobik olarak incelendiğinde aralarından su kanallarının geçtiği çok tabakalı heterojen bir yapı şeklinde görülmektedir. Matriks yarı akışkan özelliğe sahiptir ve

içerisinde yer alan mikroorganizmalar ise genellikle sabittir. Bu kanallar, matriks içerisinde yaşayan mikrobiyal hücrelere besin ve oksijen taşınmasını sağlamaktadır [40,44].

Yüzeye tutunan mikroorganizmalar çoğalarak önce mikrokolonileri oluşturur, mikrokoloniler de zamanla büyüyüp, genişleyerek biyofilm tabakasını oluşturmaktadır. EPS sentezi, hücrelerin yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunması için gereklidir [45,46]. Bir yüzey üzerindeki mikrobiyal hücreleri çevreleyerek içerisine alan ekstraselüler polimerik madde varlığı, biyofilm oluşumunun ayırt edici bir göstergesidir. EPS, mikroorganizmaların etrafında uzun, ince şeritler halinde kompleks bir ağ oluşturmakta ve biyofilme yapısal destek sağlamaktadır [14,20,41].

Biyofilm hücreleri tarafından sentezlenen bu ekzopolisakkaritlerin planktonik hücreler tarafından sentezlenen ekzopolisakkaritlerden içerik olarak farklı olduğu ve biyofilm oluşumuna özgü bir matriks polimeri sentezledikleri bildirilmiştir [14,47].

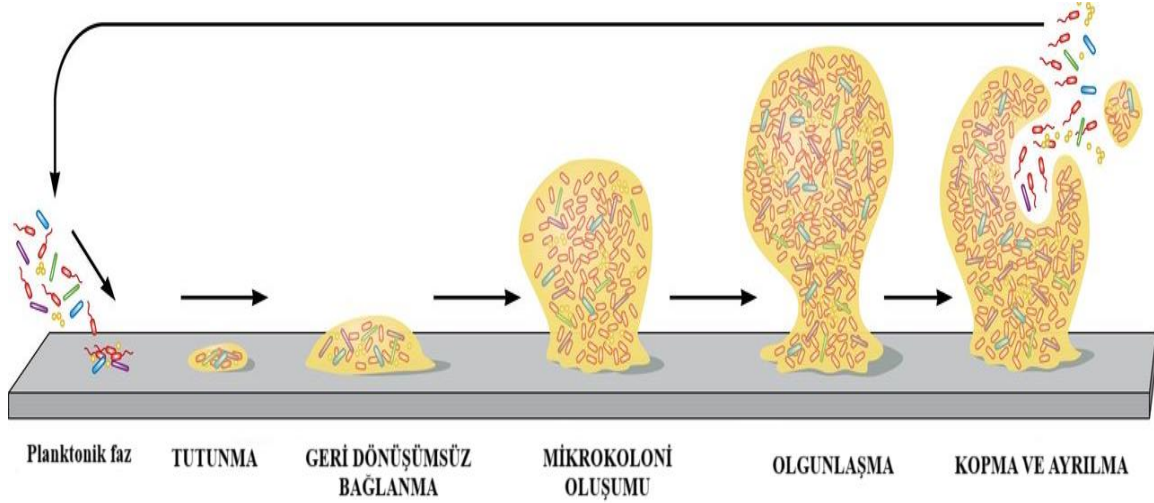
Ekstraselüler polimerik madde, çevresel şartlara karşı savunmada büyük önem taşımaktadır. Mikroorganizmalar, antimikrobiyal ajanların zararlı etkilerinden ve fagositozdan EPS sayesinde korunmaktadır [20]. Ayrıca, biyofilmlerin ilaç direnci gelişimlerinde de etkin rol oynamaktadır. EPS tahribatı, mevcut biyofilmin yapısal varlığının bozulmasına yol açmakta ve antimikrobiyal ajanlara karşı olan duyarlılığın büyük ölçüde artmasına neden olmaktadır [31].

Diğer Elemanlar

Biyofilmlerin yapısında; yüzey, mikroorganizma ve EPS ana bileşenleri dışında; çeşitli mikrobiyal enzimler, mikrobiyal metabolitler ile magnezyum, kalsiyum, demir gibi çeşitli inorganik iyonlar da yer almaktadır [48].

2.1.4. Biyofilm oluşum aşamaları

Biyofilm oluşumu bir döngü içerisinde devam eden çok aşamalı dinamik bir süreçtir. Temel olarak beş aşamadan oluşmaktadır:



Şekil 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları [47]

- 1) Geri dönüşümlü bağlanma (Tutunma)
- 2) Geri dönüşümsüz bağlanma (Yapışma)
- 3) Mikrokoloni oluşumu (Toplanma)
- 4) Olgunlaşma
- 5) Kopma ve ayrılma (Şekil 2.1.) [49,50].

Geri dönüşümlü bağlanma:

Biyofilm oluşum sürecinin ilk basamağı olan tutunma, planktonik haldeki mikrobiyal hücrelerin biyotik veya abiyotik bir yüzeye pili, fimbria, flagella gibi hücre uzantılarının yardımıyla van der Waals kuvvetleri gibi zayıf etkileşimlerle geri dönüşümlü olarak bağlanmasıdır. Mikroorganizmanın bir yüzeye tutunabilmesi için, mikroorganizma ile yüzey arasında yakın bir mesafe ($<1\text{nm}$) olması ve yüzey ile temas kurduğunda mikroorganizmada farkındalık oluşması gerekmektedir [51].

Tutunmanın gerçekleşmesiyle birlikte biyofilm fenotipinin açığa çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlamaktadır. Mikroorganizma, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Bu sistem mikroorganizma bir yüzey ile temas ettiğinde aldığı çevresel uyarıları fenotipik değişikliklere çevirebilmektedir [51,52].

Biyofilm oluşumu için farklılaşma işleminin başlaması, “Quorum Sensing (QS)” haberleşme sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. QS mekanizması ile mikroorganizma

çevresindeki popülasyon yoğunluğunu belirlemektedir. Yüzeye tutunan her hücre, varlığını bildiren bir molekül salgılayarak ortama mesaj göndermektedir. Yüzeye tutunan hücre sayısı arttıkça sinyal yoğunluğu da artmaktadır. Sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artış ile biyofilm oluşumuna yönelik süreç başlamaktadır. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar interselüler, düşük molekül ağırlığına sahip haberciler aracılığıyla iletişim sağlamaktadır [50,51].

Tutunmayı etkilen faktörler; mikrobiyal gelişme ortamı, gelişim fazı, pH, sıcaklık, temas zamanı, organik madde varlığı, hücre dışı polimerik madde üretimi, hücreler arası iletişim, yüzey tipi ve özellikleridir [53,54].

Geri dönüşümsüz bağlanma

İkinci basamak ise mikroorganizmaların yüzeye yapışma veya kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir. Yapışma, mikroorganizmada bulunan ligandların yüzeydeki ligandlara spesifik olarak geri dönüşümsüz bağlanmasıyla gerçekleşir [55].

Bu aşamada mikroorganizmalar, biyofilm yapısının ana bileşeni olan ekzopolisakkarit, ekstraselüler DNA (eDNA), protein ve lipitlerden oluşan ekstraselüler polimerik madde (EPS) sentezlemektedir. EPS ve yüzey proteinleri, mikroorganizma ile yüzey arasında güçlü etkileşimler ile bağlanmayı desteklemektedir. Geri dönüşümlü tutunmadan geri dönüşümsüz bağlanmaya geçiş aşamasında hücre içi ikincil haberci sistemleri rol oynamaktadır [56,57].

Mikrokoloni oluşumu

Üçüncü aşama geri dönüşümsüz olarak bağlanan yapıların gelişim sürecini kapsamaktadır. Yüzeye yapışan hücrelerin bölünerek çoğalması, planktonik mikroorganizmaların çevreden biyofilm tabakasına katılması ve hücre dışı polimerik maddelerin salgılanmasıyla mikrokoloni oluşumu gerçekleşmektedir [20,57].

Mikroorganizma yüzeye tutunduktan sonra, gelişme şartları uygunsa kolonizasyon başlar. Matris, tutunma ve bir takım çevresel uyarana yanıt olarak sentezlenmektedir. Mikrokolonilerin oluşumunda ve varlığını devam ettirebilmesinde matris sentezi kritik öneme sahiptir. Mikrokoloniler %10-25 oranında mikroorganizmalardan, %75-90 oranında

EPS matriksinden oluşmaktadır. Biyofilmin ana bileşeni olan EPS, mikroorganizmaların yüzeye ve birbirlerine tutunmalarını sağlamaktadır. Ayrıca, biyofilmin üç boyutlu yapısının devamlılığı, olumsuz çevre koşullarından korunma ve quorum sensing (QS) sinyal moleküllerinin, hücre dışı enzimlerin, metabolik ürünlerin iletimi gibi fonksiyonlarıyla da mikroekosistem oluşumuna katkı sağlamaktadır [20,56].

Tutunma ve mikrokoloni oluşumunda görev alan genetik faktörler mikroorganizmaya göre farklılık göstermektedir [58].

Doğal ortamda mikroorganizmalar ile yapılan çalışmalarda toplanma aşamasında, hücreler arası iletişim ve çevrede varlığını sürdüren planktonik hücrelerin de rol oynadığı gösterilmiştir [53].

Olgunlaşma

Dördüncü aşamada büyüyen mikrokolonilerin kompleks, mantar şeklinde yapılar veya kulelere dönüşmesi ile olgunlaşma evresi gerçekleşmektedir [17,50,59]. Birbirinden farklı yükseklikte kuleler oluşturan mikrokoloniler arasında etkin bir şekilde iletimi sağlamak amacıyla ilkel bir dolaşım sistemi görevi yapan su kanalları bulunmaktadır [59,60]. Biyofilm yapısındaki su kanalları vasıtasıyla su, oksijen, besin maddeleri ve metabolik atık ürünler taşınmaktadır. Çevresel faktörler; ekstraselüler matriks regülasyonunu, buna bağlı olarak da biyofilm yapısının kalınlık, dansite gibi morfolojik özelliklerini etkilemektedir [56].

Biyofilm yapısının büyüme potansiyeli yeterli besin, oksijen ve karbon kaynaklarının varlığı, besin maddelerinin ve oksijenin perfüzyonu, toksik metabolik yan ürünlerin uzaklaştırılması, ortamın sıcaklığı, pH'ı ve osmolaritesi gibi çeşitli faktörlere bağlıdır [14].

Olgun biyofilmlerin tek tabakalı veya EPS ile paketlenmiş mikrokoloniler halinde olabileceği bilinmektedir [53]. Olgunlaşmada yeterli çoğunluğu algılama ve buna bağlı genetik ifade önemli bir rol oynamaktadır [61].

Kopma ve ayrılma

Biyofilm yaşam döngüsünün son aşaması ise kopma ve ayrılma evresidir. Bu aşamada tek bir mikroorganizma veya mikroorganizma kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama dağılmaktadır. Bu durum, dış faktörlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak da gerçekleşebilmektedir [52,57,62].

Mikroorganizmaların biyofilm gelişimi, gerekli yaşam koşullarının varlığıyla doğrudan bağlantılıdır. Çevresel faktörlerin uygunluğuna göre biyofilm gelişimi sorunsuz devam etmektedir. Ancak uygun koşullar sağlanmazsa biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar tutundukları yüzeyden ayrılarak serbest yaşamlarına geri dönmektedir. Mikroorganizmalar olgun biyofilm evresinde kendilerine oksijen kullanımı ve antimikrobiyal direnç açısından avantaj sağlayan tabakalı yerleşim şekli sergilemektedir. Olgunlaşma aşamasındaki biyofilm, varlığını sürdürmekte zorlandığı elverişsiz koşullara maruz kaldığında tutunduğu iç yüzeye en yakın katmandaki mikroorganizmalar durağanlaşır veya ölür, matriks bileşenlerinin sentezi azalır, matriks enzimatik olarak parçalanır. Dış yüzeye yakın olan katmandaki mikroorganizmalar ise biyofilm tabakasından kopar ve planktonik forma geçer. Biyofilmden kopan hücreler farklı bir yüzeyde kolonize olup yeni biyofilm tabakası oluşturabilmektedir [14,63]. Tabakalı biyofilm yapısının iç yüzeye en yakın hücreler diğerlerine kıyasla daha stabil konumda bulunmaktadır [62].

Ayrılma aşamasında, hücre motilitesinde ve ekstraselüler polimerik maddenin bozulmasında rol alan genlerde up-regülasyon, tutunma ve ekstraselüler polimerik maddenin üretiminde rol alan genlerde down-regülasyon gerçekleşmektedir. Hücre içi ikinci haberci bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (c-di-GMP) gen regülasyonunda etkin bir rol oynamaktadır [9]. Hücre içinde c-di-GMP seviyesindeki değişim, mikroorganizmanın planktonik veya biyofilm halinde yaşamasında anahtar rol oynamaktadır. İkinci haberci c-di-GMP miktarı arttığında planktonik yaşam baskılanırken biyofilm oluşumu aktive olmaktadır [64].

Planktonik mikroorganizma salınımını içeren bu evre, biyofilmin yeni bir yüzeye yayılmasını ve kolonize olmasını sağlamaktadır [65].

2.1.5. Biyofilmde hücreler arası iletişim

Quorum Sensing (QS, Çoğunluğu Algılama)

Mikrobiyal iletişimin önemli bir mekanizması, popülasyon yoğunluğuna bağlı uyarıcı yanıt sistemidir. “Quorum Sensing (QS)” olarak bilinen bu fenomen, otoindükleyiciler veya quorum sensing molekülleri (QSM) olarak adlandırılan hormon benzeri moleküller aracılığıyla gerçekleşmektedir. Quorum sensing molekülleri merkezi metabolizmada ana rolü olmayan ancak çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olan sinyal molekülleridir. Bu moleküllerin konsantrasyonu popülasyonla doğru orantılı olarak artmaktadır ve konsantrasyon kritik bir eşiğe ulaştığında, QS ile ilgili hedef genlerin ifadenmesine veya baskılanmasına yol açan düzenleyici bir yanıt oluşmaktadır [66-68].

QS iletişimi ilk kez 1970'lerde Nealson ve arkadaşları tarafından denizde yaşayan *Vibrio* türlerinde biyoluminesans üzerine yaptıkları çalışmalar sırasında gözlemlenmiştir [66,69,70].

Serbest yaşayan mikroorganizmalar belirli bir eşik yoğunluğuna ulaştıklarında QS mekanizması, küçük sinyal moleküllerinin salgılanması vasıtasıyla hücreler arası iletişimi sağlamaktadır. Bu sinyaller mikrobiyal hücreler üzerinde genetik ve fizyolojik çeşitli etkilere yol açmaktadır [71]. QS mekanizması hücresel fonksiyonlar, adezyon, besin alımı, hücreler arasında genetik materyal transferi, hareketlilik, sekonder metabolitlerin sentezi, virülans faktörlerinin salgılanması ve biyofilm oluşumu gibi çeşitli davranışları modüle etmektedir [66,72].

Biyofilm oluşumunda çeşitli genetik belirleyiciler rol oynamaktadır. Biyofilm oluşumu esnasında gen ifadesini düzenleyici mekanizmalardan biri de hücreler arası sinyalizasyondur [73,74]. Biyofilm oluşumu ve quorum sensing (QS) birbiri ile yakından ilişkili süreçlerdir. Biyofilm oluşumu, kendi ürettiği hücre dışı matrikste gömülü olarak yaşayan mikroorganizma popülasyonlarını içeren kooperatif grup davranışıdır. QS, popülasyondaki planktonik hücre yoğunluğuna yanıt olarak gen ekspresyonunu senkronize eden hücre iletişim mekanizmasıdır ve biyofilm yaşam tarzına geçişi koordine edebilmektedir [75]. Biyofilmin büyüme aşamasında ekzopolisakkarit yapı mikroorganizmaların yakın halde

bulunmasına yardımcı olmaktadır, bu durum hücrel davranıştaki değişiklikler için kimyasal sinyalleri daha etkili şekilde algılamalarını sağlamaktadır [70,76]. Biyofilm içerisindeki patojen mikroorganizmalar antimikrobiyal direnç mekanizması geliştirmek ve virülansı arttırmak amacıyla QS sisteminden faydalanmaktadır [71,72]. Patojenik mikroorganizmalarda virülans faktörlerinin ekspresyonu, enfeksiyon oluşturma ve immün yanıttan kaçma şansı sağlayarak önemli bir hayatta kalma avantajı oluşturmaktadır. Bazı QS molekülleri, konak hücreleri için toksik olmaları veya konak bağışıklığını modüle edebilmeleri sebebiyle tek başına virülans faktörü olarak kabul edilmektedir [66].

Üç ana tip QS sistemi bulunmaktadır:

- (1) Gram negatif bakterilerde açıl homoserin lakton (AHL) QS sistemi
- (2) Gram pozitif bakterilerde otoindükleyici peptit (AIP) QS sistemi
- (3) Hem Gram negatif hem Gram pozitif bakterilerde görülen otoindükleyici-2 (AI-2) QS sistemidir [72].

Otomatik indükleyici mikroorganizmanın türüne göre değişiklik göstermektedir. Gram-negatif bakteri hücre membranını geçebilen ve alıcı hücrelerdeki düzenleyici proteinlere bağlanan N-açıl-L-homoserin laktonları (AHL) birbirleriyle iletişim kurmak amacıyla kullanılmaktadır. Artan AHL konsantrasyonu ile bakteriyel büyümenin anlamlı bir korelasyon gösterdiği bilinmektedir. Gram-negatif bakterilerde LuxI/LuxR tipi çekirdek algılama mekanizması görülmektedir [70,77].

Gram-pozitif organizmalarda ise sistem daha karmaşıktır. Gram-pozitif bakteriler, tür içi iletişimde sinyal molekülü olarak oligopeptidleri kullanarak biyofilm oluşturmaktadır. Gram pozitif bakteriler otoindüktörün aktif taşınımını gerektiren iki bileşenli bir sinyal iletim sistemine sahiptir. Membrana bağlı histidin kinaz reseptörüne ihtiyaç duyan peptit bazlı algılama mekanizmalarını kullanılmaktadır [68,71].

LuxS tarafından kodlanan otoindükleyici-2 (AI-2) 'nin kullanıldığı QS sistemi hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilerde iletişimi sağlamaktadır. *Vibrio harveyi*'de keşfedilen AI-2 otoindükleyici QS yolağı türler arası sinyalleri algılayıp tercüme etmektedir [70,71,77].

QS ile hücreler arası iletişim bakterilerle sınırlı değildir, mantarlarda ve son zamanlarda virüslerde de tanımlanmıştır [69]. Ökaryotik mikrobiyal QS sistemleri daha yakın zamanda keşfedilmiştir. *Candida albicans* ve *Saccharomyces cerevisiae* gibi mantar türlerinde farnesol başta olmak üzere tirozol, feniletanol ve triptofol gibi çeşitli ökaryotik QS molekülleri tanımlanmıştır [67,74]. QS sinyalleri zarları geçerek sadece aynı türün üyeleri tarafından değil, diğer türler tarafından da algılanmaktadır. Mikroorganizmaların çevrelerine tepki verirken dış ortamı algılayabildiği uzun süredir bilinmesine rağmen birçok türün diğer türlerin varlığını da algılayabildiği yakın zamanda öğrenilmiştir [68,70]. QS çalışmaları ile iletişim kurma yeteneğinin hem tür içinde hem de türler arasında etkileşim ve hayatta kalma açısından kritik öneme sahip olduğu bilinmektedir [78].

2.1.6. Biyofilm ve enfeksiyon ilişkisi

Yüzyıllar boyunca insanlar, planktonik patojenlerin neden olduğu akut enfeksiyonlara maruz kalmıştır. Günümüzde bu enfeksiyonlar, aşılar ve antimikrobiyal ilaçlar ile mücadele edilmesi sonucu bir dereceye kadar kontrol altına alınmıştır. Ancak, biyofilm oluşturan mikroorganizmalar gelişmiş ülkelerde çok sayıda enfeksiyonun ana sebebidir [79,80].

Ulusal Sağlık Enstitüsü'nün (National Institutes of Health, NIH) istatistiklerine göre, biyofilmler insanda gelişen bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık olarak %65'inden, tüm kronik enfeksiyonların ise %80'inden sorumludur [72]. Hastalık Kontrol Merkezi (Center for Disease Control, CDC) tarafından 2007'de yaklaşık 1,7 milyon hastane kaynaklı enfeksiyonun bakteriyel biyofilm kaynaklı olduğu ve sadece Amerika Birleşik Devletleri'nde 11 milyar dolar ekonomik kayba yol açtığı bildirilmiştir [81,82]. Biyofilm kaynaklı enfeksiyonlar, yıllık yarım milyondan fazla ölümden ve yaklaşık 94 milyar dolar tedavi maliyetinden sorumludur [82,83].

Biyofilm ilişkili enfeksiyonlar büyük bir halk sağlığı problemidir. Endokardit, osteomyelit, sinüzit, idrar yolu enfeksiyonları, kronik prostatit, periodontitis, kistik fibrozis dahil olmak üzere kronik akciğer enfeksiyonu, kronik enflamatuvar bir hastalık olan Crohn hastalığı, orta kulak enfeksiyonları, kronik yanık enfeksiyonu, diyabetik ayak ve özellikle kalıcı tıbbi cihazlarla ilişkili çeşitli nozokomiyal enfeksiyonlar biyofilm kaynaklıdır [68,72,84-86].

Biyofilm kaynaklı hastalıklar; tıbbi cihaz ilişkili biyofilm enfeksiyonu, tıbbi cihaz ilişkili olmayan kronik biyofilm enfeksiyonu ve biyofilm kaynaklı tıbbi cihaz işlev bozukluğu olmak üzere temelde üç gruba ayrılmaktadır [80,87].

Tıbbi Cihaz İlişkili Biyofilm Enfeksiyonu

İmplant tıbbi cihazların kullanımı modern tıbbın ayrılmaz bir parçası haline gelmiştir. Yabancı cisim implantları faydalarının yanı sıra enfeksiyöz komplikasyonlara sebebiyet vermektedir [88]. Kalp pilleri ve protez kalp kapakçıkları, vasküler prosesler, elektrikli diyalizörler, protez eklemler, alloplastik ortopedik cihazlar, intravenöz kateterler, kalıcı üriner kateterler, üretral stentler, endotrakeal tüpler, beyin omurilik sıvısı şantları, periton diyaliz kateterleri, safra yolları stentleri, meme implantları, ses protezleri, intrauterin cihazlar, abdominal drenler, nefrostomi tüpleri, doku dolgu maddeleri ve kontak lensler hastalar için vazgeçilmez olduğu kanıtlanmış implant tıbbi cihazlardır [80,85,86]. Bununla birlikte, aynı cihazlar biyofilm ilişkili enfeksiyon riskini de beraberinde getirmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl 45 milyondan fazla implant tıbbi cihaz kullanılmaktadır. Nozokomiyal kaynaklı enfeksiyonlar en az %50 oranında tıbbi cihazlarla ilişkilidir [89]. Suda, havada, toprakta veya insan florasında bulunan mikroorganizmalarla ilişkilendirilen bu enfeksiyonlar yaşam kalitesini olumsuz etkilemekte ve ölümcül olabilmektedir [80].

Yabancı cisim ilişkili enfeksiyonların %2'si eklem protezleri ve meme implantları, %4'ü mekanik kalp kapakçıkları, kalp pilleri ve defibrilatörler, %10'u ventriküler şantlar ve %40'ı ventriküler destek cihazları ile ilişkilidir. Buna ek olarak, hastane kaynaklı kan dolaşımı enfeksiyonlarının çoğu intravasküler cihazlarla ilişkilidir [72,80].

Bir tıbbi cihaz insan vücuduna yerleştirildiğinde, hayati organların normal işlevlerini kurtarma amacını yerine getirirken konakçı hücrelerin ve mikroorganizmaların ulaşmak için yarıştığı bir bölge haline gelmektedir [90]. İmplant edilen tıbbi cihazların mikrobiyal kolonizasyonu hızlı bir şekilde gerçekleşmektedir ve konakçı tarafından üretilen trombositler, plazma ve doku proteinleri gibi yapısal maddeler ile kolonizasyon artmaktadır [91]. Normal flora veya çevresel flora ile kolonize olan yabancı cisim vücudun içerisindeki steril anatomik kısım ile temas halindedir ve mikroorganizmanın karmaşık metamorfozu

biyofilm oluşumuyla sonuçlanmaktadır. Enfeksiyonların mikrobiyal kaynağı konak mikrobiyotası ya da ekzojen kaynaklarda bulunan mikroorganizmalardır [80,87].

Yabancı cisimle ilişkili enfeksiyonlarda yaygın olarak izole edilen mikroorganizmalar arasında *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis* ve *Candida* türleri bulunmaktadır [80,92]. Stafilokoklar biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlarda en sık izole edilen bakterilerdir ve son yıllarda nozokomiyal enfeksiyonlar açısından en önemli patojen haline gelmiştir. Stafilokokların tıbbi cihazla ilişkili enfeksiyonların en yaygın etkeni olmasının sebebi; biyofilm oluşturma ve ekzotoksin üretme kabiliyetidir. İmplantasyon sırasında cihazı kontamine eden bakteriler çoğunlukla hastanın cilt florasından gelmektedir [80]. Mantarlar da vücutta çeşitli anatomik bölgelerde biyofilm oluşturma kapasitesine sahiptir [93]. Tıbbi cihazların yaygınlığı, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, yaşlanma süreci ve immün sistemi baskılanmış hasta demografisi biyofilmlerle ilişkili mantar enfeksiyonlarının ortaya çıkmasına toplu olarak katkıda bulunmuştur [94]. Tıbbi cihaz ilişkili enfeksiyonların yaklaşık olarak %20'sinde etken mikroorganizmalar *Candida* türleridir [89]. İnsanda mukozal yüzeylerde kommensal olarak yaşayan ve bağışıklığı baskılanmış hastalarda fırsatçı patojen olan *Candida albicans*, klinik olarak biyofilm üretimi açısından en önemli türdür [95]. *Candida* ve *Aspergillus* türlerinin etken olduğu enfeksiyonlar, implant cihaz ilişkili enfeksiyonların %8'inden sorumludur ve hayatta kalma oranını %50'ye kadar düşürmektedir [96]. Fungal biyofilm yapısı antifungal tedaviye karşı oldukça dirençlidir. Bu enfeksiyonların etkili şekilde tedavi edilememesi, yüksek morbidite ve mortalite oranlarına yol açmaktadır [97].

Enfeksiyonun vücutta bulunduğu bölgeye, kullanılan tıbbi cihaz türüne ve hastada cihazın bulunma süresine bağlı olarak biyofilmler birden daha fazla mikroorganizma türünden oluşabilmektedir [80,81]. Polimikrobiyal enfeksiyonlar olarak bilinen bu tür enfeksiyonlar, biyofilm kalıcılığını ve direncini arttırmaktadır. Bu sebeple, biyofilm enfeksiyonlarının tedavi maliyeti önemli ölçüde artmaktadır [86].

Tıbbi Cihaz İlişkili Olmayan Kronik Biyofilm Hastalığı

Bu biyofilm enfeksiyonları yabancı cisimlerle ilişkili değildir. Biyofilm oluşumu hasta vücudundaki dokular, kaslar, epitel hücreleri, mukozal yüzeyler ve böbrek taşı gibi metabolik oluşumlarda görülmektedir. İmplant cihazlarla ilişkili olmayan biyofilm hastalığı; kistik fibrozisi olan hastalarda kronik solunum yolu enfeksiyonları, kronik obstrüktif akciğer hastalıkları, tüberküloz, kronik yara enfeksiyonları, kronik otitis media, kronik sinüzit, endokardit, osteomyelit, diş çürükleri, periodontitis, safra yolu enfeksiyonları ve prostatit gibi enfeksiyonları içermektedir [80,87].

Biyofilm Kaynaklı Tıbbi Cihaz İşlev Bozukluğu

Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar biyomalzemelerin bozulmasına neden olarak klinik cihaz arızasına yol açabilmektedir. Biyofilm ilişkili cihaz işlev bozukluğu, vücudun bağışıklık sisteminin bir tıbbi cihazın implantasyonuna tepkisini ifade etmektedir. Makrofajların ve yabancı cisim dev hücrelerinin görev aldığı bu yanıtı yabancı cisim reaksiyonu denir. Vücuda tıbbi cihaz yerleştirildiğinde, bağışıklık sistemi implant bölgesine makrofajları göndererek tepki göstermektedir. Makrofajlar, yabancı cisimin çıkarılmasına yardımcı olan dev hücreler oluşturmak için birbirine kaynaşmaktadır. Yabancı cisim reaksiyonu; monositlerin/makrofajların yapışması, yabancı cisim dev hücreleri oluşturmak için makrofajların füzyonunun yanı sıra protein adsorpsiyonu, makrofajlar/yabancı cisim dev hücreleri ile enflamatuvar/yara iyileştirici hücreler arasındaki etkileşim gibi çeşitli yanıtları içermektedir [80].

Tıbbi cihaz işlev bozukluğu; hafif ağrı, hafif yumuşak doku kontraktürü veya fonksiyonel bozukluk gibi hafif klinik semptomlar ile enfeksiyon/enflamatuvar belirtisi olmadan görülebilmektedir. Biyofilm kaynaklı cihaz arızasının klinik belirtileri yıkıcı da olabilmektedir. Biyofilm kaynaklı tıbbi cihaz işlev bozukluğu; protez eklem arızası, meme implantı kapsül kontraktürü, intravasküler kateter disfonksiyonu, biliyer tüp obstrüksiyonu, idrar stentlerinde kristalize kabuklanmalar, beyin omurilik sıvısı şantı işlev bozukluğu ve kalp pili elektrotlarında fiziksel ve kimyasal bozunmaya sebep olmaktadır. Vücudun yabancı cisime tepki verme şekli, cihazda kullanılan malzemenin özelliklerine bağlıdır. Bu immün yanıt tıbbi cihazın hastada takılı kaldığı süre boyunca devam edebilmektedir [80].

2.1.7. Biyofilm kontrolü ve anti-biyofilm stratejileri

Biyofilm ile ilişkili enfeksiyonlar sağlık, gıda, tarım ve sanayi alanlarının ortak endişe sebebidir. Biyofilmin dağılması ve yayılması, eDNA yoluyla yüksek genetik değişim, antimikrobiyal ajanlara karşı azalan duyarlılık, konakçı bağışıklık sistemine karşı doğal direnç ve Gram negatif bakteriler söz konusu olduğunda gelişmiş endotoksin oluşturma yeteneği gibi özellikler biyofilm enfeksiyonlarının engellenmesini zorlaştırmaktadır [77].

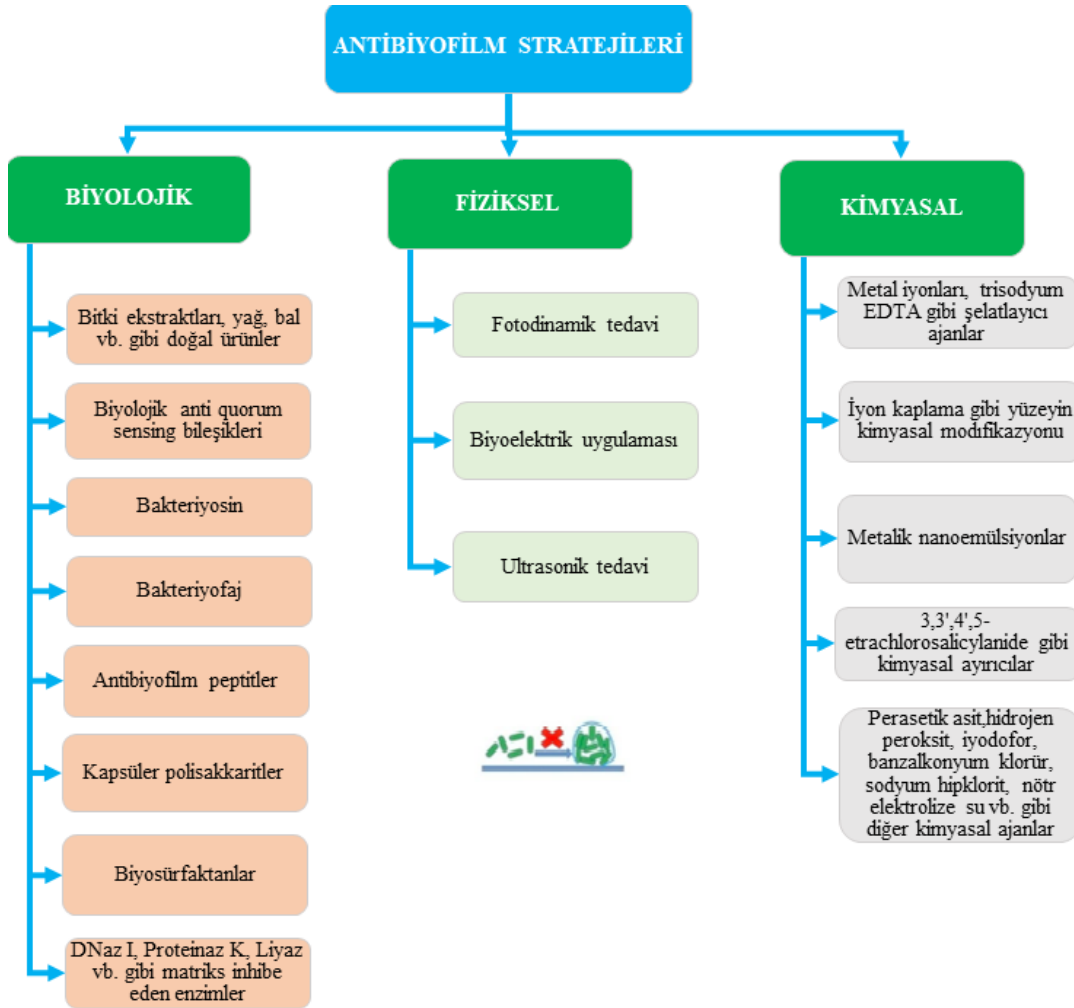
Biyofilmle ilişkili enfeksiyonlarda morbidite ve mortalite riskini azaltmak için temelde dört ana strateji kullanılmaktadır:

- (1) Cihazı yerleştirme esnasında bulaşı önleme amaçlı steril önlemler alınmakta ve aseptik bir teknik kullanılmaktadır.
- (2) Mikroorganizmaların ilk bağlanmasını engellemek için implant cihazdan antimikrobiyal ajan salan cihazlar kullanılmaktadır.
- (3) Biyofilmi ortadan kaldırmak amacıyla antimikrobiyal ilaçlar verilmektedir.
- (4) Hastaya fiziksel ve psikolojik yük getirmesine rağmen enfekte cihazın kaldırılması tedavi stratejisi olarak kesin çözüm olmaya devam etmektedir [80,98].

Biyofilm kontrolü; biyofilm oluşumunu önlemeyi veya yerleşik biyofilmin yok edilmesini amaçlamaktadır. Antimikrobiyal ilaçlar ile biyofilm ilişkili enfeksiyonları tedavi etmenin oldukça zor olduğu bilinmektedir. Biyofilm kontrolü için alternatif ve tamamlayıcı stratejilerin geliştirilmesi ihtiyacı doğmuştur. Bu sebeple, biyofilm ile ilişkili problemlere potansiyel bir çözüm arayışı devam etmektedir [70,99]. Zorlu çevre koşullarına karşı hayatta kalmak ve antimikrobiyallere karşı direnç geliştirmek için benzersiz bir yapı oluşturan biyofilmleri kontrol altına almak amacıyla farklı yöntemler araştırılmaktadır. Bunlar biyolojik, kimyasal ve fiziksel yöntemler olmak üzere üç ana başlıkta toplanmaktadır (Şekil 2.2.) [99].

Antibiyofilm kompleksleri, biyofilm yapımını engelleyen bileşiklerdir. Bu bileşikler, üç boyutlu biyofilm yapısının farklı kısımlarını hasara uğratarak biyofilm oluşumunu veya yayılmasını önlemektedir. Bitkisel bileşikler, bakteriyofajlar, antibiyofilm enzimleri, yüzey kaplama ajanları, quorum sensing inhibitörleri ve nanopartiküller antibiyofilm kompleksleri

olarak tanımlanmıştır [87]. Quorum sensing inhibitörleri (Quorum Quenching, QQ) mikrobiyal hücre iletişimine müdahale ederek biyofilm oluşumunu engelleyen ajanlardır. Quorum sensing reseptörlerine rekabetçi bağlanma, QS sinyallerinin inhibisyonu, QS sinyallerinin enzimatik bozunumu ve QS genlerinin kontrolü biyofilm kontrolü amacıyla uygulanmaktadır. Ultrasonik parçalama ile mekanik parçalama, asidik elektrolize su kullanımı, enzim aracılı bozulma, antimikrobiyal peptitler, ilaç kombinasyonları, bakteriyofajlar ve nanopartiküllerler QS inhibisyonunda görev almaktadır [70]. Son zamanlarda, nanoteknolojik yaklaşımlar tanı ve tedavide sıklıkla kullanılmaya başlanmıştır. Bu amaçla antimikrobiyal ve antibiyofilm özelliklere sahip nanopartiküllerin mikrobiyal biyofilmlere karşı kullanımı da biyofilm kontrolü açısından giderek önem kazanmaktadır [100].



Şekil 2.2. Anti-biyofilm stratejileri [99]

Biyofilme karşı geliştirilen yeni yöntemler arasında hücre dışı matriksi hedefleyen uygulamalar, anti-persister stratejiler, metal iyonları ve şelatörler, antikorların kullanımı, geleneksel ajanların aktivitesinin arttırılması, yeni biyomalzemelerin kullanımı, akıllı implantlar ve antimikrobiyal fotodinamik tedavi yer almaktadır [99].

Biyofilm konusunda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir ancak hala verimli, çevre dostu ve uygun maliyetli yeni antibiyofilm stratejilerine, standartlaştırılmış protokollerin geliştirilmesine ve ilgili mekanizmaların daha kapsamlı şekilde anlaşılmasına ihtiyaç duyulmaktadır [99].

2.2. Kateterler ve Kateter İlişkili Enfeksiyonlar

2.2.1. Kateter tipleri ve özellikleri

Alman cerrah Werner Forssmann 1929'da hasta üzerinde santral venöz kateterizasyon için ilk uygulamayı gerçekleştirmiştir, bu gelişme ile insan sağlığı damar yolu açılması, izlem ve tedavide yeni bir döneme girmiştir. Cournand ve Rishards, kardiyak kateterizasyon tekniğini geliştirmiştir. Forssmann, Cournand ve Rishards 1956 yılında Nobel Tıp Ödülünü kazanmıştır [101,102]. Bu tarihten itibaren intravenöz kateterler birçok farklı amaçla yaygın olarak kullanılmaktadır. Kateterlerin kullanım amaçları ilaçların ve intravenöz sıvıların infüzyonu, kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, total parenteral beslenme (TPN), yoğun bakım ünitelerinde santral venöz basınç ve oksijen ölçümü ile hemodinamik izleme olarak sıralanmaktadır [103].

Kateterler için en sık kullanılan yapım malzemeleri polietilen, polivinil klorid (PVC), poliüretan, silikon veya teflondur [104,105]. Kateterler boylarına göre kısa, orta, uzun; uygulama süresine göre kısa süreli veya uzun süreli; uygulama yerine göre periferik veya santral olarak alt gruplara ayrılmaktadır. Farklı tıbbi girişimler için periferik venöz kateter (PVK), periferik arteriyel kateter, pulmoner arteriyel kateter, santral venöz kateter (SVK), periferik yollu santral kateter, umbilikal kateter, basınç-monitör sistemi ve total implant kateter olmak üzere çeşitli kateterler kullanılmaktadır [106,107]. Santral venöz kateterler (SVK) hastada kullanım süresine göre tünelsiz-geçici ve tünelli-kalıcı; lümen sayısına göre tek lümenli, çift lümenli ve çok lümenli; implant yerine göre juguler, subklavyen, brakial

ve femoral; kullanım amacına göre ise basit damar yolu, hemodiyaliz, total parenteral beslenme ve kemoterapi kateteri olarak sınıflandırılmaktadır [108,109].

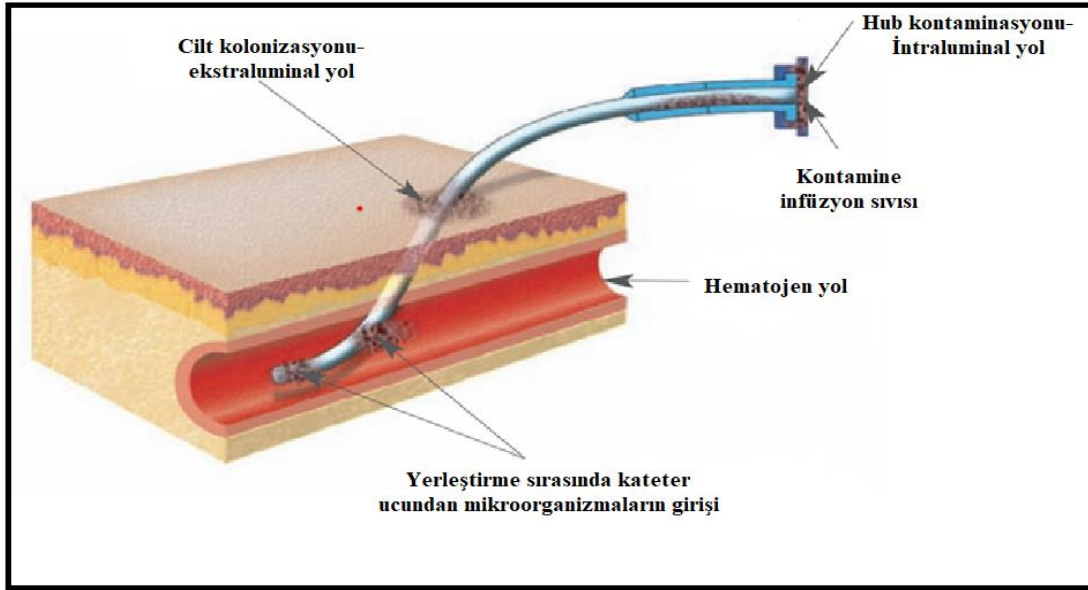
Enfeksiyon riski; kateterin tipi, boyutu, yapım malzemesi ve kullanım süresi gibi birçok etkene göre değişiklik göstermektedir. En sık kullanılan kateter tipi tünelsiz santral venöz kateterdir ve kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarının büyük bir kısmından sorumludur [106,110].

2.2.2. Kateter ilişkili enfeksiyonlar ve klinik tanımları

Modern sağlık hizmetlerinde intravenöz kateter kullanımı son yıllarda giderek artmaktadır. Bu invaziv araçlar, yüzeye yapışan mikroorganizmalar nedeniyle kateter ilişkili enfeksiyonlara yol açmaktadır [111]. Bu enfeksiyonlar, özellikle kritik durumda olan veya bağışıklığı baskılanmış hastalarda ciddi şekilde yaşamı tehdit etmektedir [112]. Kateter ilişkili enfeksiyonlar maliyet, morbidite ve mortalite artışı ile beraber uzun süreli hastanede yatışa da sebep olmaktadır [111].

Kateterle ilişkili enfeksiyonlar, mikroorganizmaların kateter vasıtasıyla beş ana mekanizma ile vücuda girişi sonucu ortaya çıkmaktadır. Bu mekanizmalar:

1. Zayıf aseptik teknik sebebiyle yerleştirme sırasında kateterin kontaminasyonu,
2. Cilt florasında yer alan mikroorganizmaların kateterin dış yüzeyinden göçü,
3. Kateterin hub kısmının endojen veya ekzojen kontaminasyonu,
4. Kontamine infüzyon,
5. Farklı bir enfeksiyon odağından hematogen yolla yayılımıdır (Şekil 2.3.) [113-115].



Şekil 2.3. Mikroorganizmaların intravenöz katetere giriş yolları [116].

Enfeksiyon kaynağından bağımsız olarak, mikroorganizmalar kateterin intraluminal (iç) veya ektraluminal (dış) yüzeyinde çoğalabilmektedir [112]. Cilt florasından katetere giriş, KİE vakalarının çoğunluğundan sorumlu olduğu için bu beş mekanizma arasında en önemli enfeksiyon kaynağıdır. Kısa süreli kateterler için, cilt kontaminasyonu en olası patogenez mekanizması iken uzun süreli kateterler için hub kontaminasyonu daha sık görülmektedir. KİE vakalarının yaklaşık %65'i cilt florasından kaynaklanırken, %30'u kontamine hub, %5'i ise diğer yollarla bulaştan kaynaklanmaktadır [113,115].

Kateterler, lokal ve sistemik enfeksiyon riskini de beraberinde getirmektedir. İntravenöz kateter kullanımı sebebiyle gelişen enfeksiyonlar basit kolonizasyondan ağır sepsise kadar değişen bir klinik tablo oluşturmaktadır [109,117]. Kateter ilişkili enfeksiyonlar arasında kolonizasyon, filebit, çıkış yeri enfeksiyonu, cep (port) enfeksiyonu, tünel enfeksiyonu, septik trombofilebit, infüzyon sıvısına ilişkili bakteriyemi/fungemi, kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu ve klinik sepsis sayılmaktadır (Çizelge 2.1.) [106].

Çizelge 2.1. Kateter ile ilişkili enfeksiyon tanımları [112,114,115].

Enfeksiyon adı	Enfeksiyon tanımı
Kateter Kolonizasyonu	Klinik bulgu olmaksızın kateter ucu, subkutan kateter segmenti veya kateter birleşme yerinden alınan kültürlerde anlamlı üreme varlığı
Filebit	Periferik vende inflamasyon ve kateter çıkış yerinde endüryasyon, eritem, hassasiyet gelişmesi durumu
Çıkış yeri enfeksiyonu	Kateter çıkış yerinde pürülan materyal varlığı olmadan, ciltte 2 cm'den küçük endüryasyon, eritem, hassasiyet gelişmesi durumu
Tünel enfeksiyonu	Tünel kateterin giriş yerinden 2 cm'den büyük bir bölgede endüryasyon, eritem ve hassasiyet gelişmesi durumu
Cep (port) enfeksiyonu	Kateterin subkutan cebinde ciltte spontan rüptür, drenaj ve nekroz olmasından bağımsız olarak pürülan eksuda varlığı
Septik trombofilebit	Mikroorganizmaların varlığına bağlı olarak ven duvarının inflamasyonu
İnfüzyon sıvısı ilişkili bakteriyemi/fungemi	İnfüzattan ve perkütan yolla alınan kan kültüründen aynı bakteri veya mantarın izolasyonu ve başka bir enfeksiyon odağının bulunmaması durumu
Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu	Kateter varlığında kan dolaşımı enfeksiyonunun klinik semptomları olan bir hastada enfeksiyona neden olan başka bir odağın bulunmaması, kateter segmentinden ve kan kültüründen aynı mikroorganizmanın izolasyonu
Klinik sepsis	Başka bir sebebi olmayan yüksek ateş, hipotansiyon veya oligüriden birinin bulunması, kanda hiçbir patojenin saptanmaması, başka bölgede enfeksiyon odağının bulunmaması durumu diğer bir ifadeyle laboratuvar bulgusu olmadan sepsis atakları görülmesi durumu

2.2.3. Kateter ilişkili enfeksiyonlarda risk faktörleri

Kateter ilişkili enfeksiyonların insidansı birçok faktöre göre değişkenlik göstermektedir. KİE için risk faktörleri hasta ile ilgili, kateter ile ilgili ve hastane/sağlık personeli ile ilgili risk faktörleri olmak üzere kategorize edilmektedir:

Hasta ile ilgili risk faktörleri

- Yaş (<1 veya > 60)
- Prematürite (erken gestasyonel yaş)
- Nötropeni
- Granülositopeni
- İmmünsüpresif tedavi

- Total parenteral n trisy n (TPN)
- Cilt bütünlüğünün bozulması
- Cilt florasındaki değişiklikler
- Altta yatan hastalıklar
- Farklı enfeksiyon odağı varlığı
- Hub ve giriş yerinde yoğun mikrobiyal kolonizasyon
- Kateterizasyon  ncesi hastanede yatış süresi

Kateter ile ilgili risk faktörleri

- Kateterin yapı materyali
- Kateterin kompozisyonu (esneklik, rijidite)
- Kateterin boyutu (uzun>kısa)
- Kateterin lokalizasyonu (santral > periferik; femoral > juguler > subklavian; alt ekstremit  >  st ekstremit )
- Kateterin lümen sayısı ( ok lümenli > az lümenli),
- Kateteri yerleştirme tipi (cut-down > perkütan; perkütan santral venöz > implante santral venöz yerleşim)
- Kateterin takılı kalma süresi

Hastane ve sağlık personeli ile ilişkili risk faktörleri

- Kateter yönetim stratejisi
- Hastane büyüklüğü
- Hastanın yattığı servis
- Mevcut sağlık personeli sayısı
- Sağlık personelinin eğitimi ve tecrübesi
- Sağlık personelinin el hijyeni
- Sağlık personelinde *S. aureus* nazal kolonizasyonu
- Uygulanan kateter bakımı ve pansuman uygulama şekli
(Yarı geçirgen transparan örtü > steril gazlı bez)
- Sağlık personeli tarafından kateterin takılma koşulları (acil şartlar > elektif şartlar)
- Sağlık personeli tarafından kateterin sık manipülasyonu [105,113,118,119].

Periferik venöz kateterler, damar yolu için en sık kullanılan tıbbi cihazlardır. Periferik venöz kateterlerle ilişkili enfeksiyon insidansı genellikle düşük olmakla birlikte, bu tip kateterlerin kullanım sıklığı nedeniyle ciddi enfeksiyöz komplikasyonlar önemli ölçüde yıllık morbiditeye neden olmaktadır [110]. SVK'lar özellikle yoğun bakım ünitelerindeki hastalarda KİKDE'ye neden olmaktadır. SVK'larda kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (KİKDE) riski periferik venöz kateterlere göre 64 kat daha fazladır [115,119]. Kateterler için risk yerleştirildiği anatomik bölgeye göre değişmektedir. Kateter yerleşimi için kasık girişi en yüksek risk, boyun girişi orta risk, göğüs veya üst ekstremité girişi düşük risk içermektedir. Kateter erişim sıklığındaki artışlar, yerleştirme ve bakım esnasında aseptik teknik uygulanmaması kontaminasyon riskini arttırmaktadır [102].

Santral venöz kateterin süresi de enfeksiyon gelişimi açısından bir risk faktörüdür. Kısa dönem kullanılan tünelsiz SVK'lar en sık kullanılan santral venöz kateterlerdir ve çoğu kateter ilişkili enfeksiyonun kaynağını oluşturmaktadır. Cerrahi olarak implante edilen uzun süreli SVK'larda risk, perkütan SVK'lara göre dörtte bir oranındadır ancak bu kateterler periferik kateterlerden daha yüksek risk oranına sahiptir. Periferik olarak yerleştirilen santral kateterler (PICC) ve pulmoner arter kateterleri yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) SVK'lara benzer bir enfeksiyon riskine sahiptir. Orta hat kateterleri daha düşük enfeksiyon oranları ile ilişkilidir. Total implante cihazlar da SVK'lara kıyasla daha düşük enfeksiyon oranları ile ilişkilidir [110].

Kateterlerin yapım malzemesi de enfeksiyöz komplikasyonla yakından ilişkilidir. Mikroorganizmaların yapışma olasılığının daha yüksek olması ve biyofilm oluşumuna yatkın olmaları sebebiyle polietilen ve polivinil kloritten yapılan kateterlerin enfeksiyon riski poliüretan, silikon ve teflon kateterlere oranla daha yüksektir [104,105]. Ayrıca, kateterin içerdği lümen sayısı arttıkça enfeksiyon riski de artmaktadır [102].

2.2.4. Kateter ilişkili enfeksiyonlarda epidemiyoloji

Nozokomiyal enfeksiyonlar, hastanede yatan hastalarda önde gelen morbidite ve mortalite nedenidir. Bu enfeksiyonlar hastanede yatan hastaların %5-15'ini etkilemektedir ve yoğun bakım ünitelerine (YBÜ) başvuranların %25-50'sinde komplikasyonlara yol açmaktadır. Dünyada en yaygın nozokomiyal enfeksiyonlar idrar yolu, alt solunum yolu, cerrahi yara ve kan dolaşımı enfeksiyonlarıdır [114,115].

Kan dolaşımı enfeksiyonları nozokomiyal enfeksiyonlar içerisinde oldukça yaygındır [115]. Kateterler, nozokomiyal kan dolaşımı enfeksiyonlarında en önemli risk faktörüdür. Hastanede yatan hastaların yaklaşık %50-%60'ına intravenöz kateter uygulaması yapılmaktadır [109]. Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 150 milyon kateter kullanılmaktadır [102]. Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri'nin (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) Ulusal Hastane Enfeksiyon Sürveyans (The National Nosocomial Infection Surveillance, NNIS) sistemi 1970 yılından beri ABD' de yaklaşık 300 hastanede nozokomiyal enfeksiyonlar hakkında veri toplamaktadır [110]. NNIS sistemi, yoğun bakım ünitelerinde kan dolaşımı enfeksiyonlarının büyük bir kısmının intravasküler cihaz kullanımı ile ilişkili olduğunu bildirmiştir. İntravasküler cihaz ilişkili enfeksiyonlar, nozokomiyal enfeksiyonların %10-20'sini oluştururken, ABD 'de yılda 200.000-400.000 aralığında kan dolaşımı enfeksiyonu meydana gelmektedir [114,115,120]. Avrupa yoğun bakım enfeksiyonu prevalans (European Prevalence of Infection in Intensive Care, EPIC) çalışmasında, Avrupa'daki kan dolaşımı enfeksiyonlarının 10.038 yoğun bakım ünitesinde (YBÜ) yatan 1417 hastada tüm hastane enfeksiyonlarının %12'sini oluşturduğu gösterilmiştir [106,114,120].

Özellikle santral venöz kateter (SVK) kullanımı, kolonizasyon ve ardından enfeksiyon riskini de beraberinde getirmektedir. Kısa süreli tünelsiz SVK'lar en sık kullanılan ve enfeksiyon açısından en yüksek riske sahip kateterlerdir. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) yoğun bakım ünitelerinde (YBÜ) hastalar için her yıl santral venöz katetere maruz kalınan toplam gün sayısı 15 milyon olarak kaydedilmiştir [110,120].

KİKDE insidansı ülkeden ülkeye, hatta hastaneden hastaneye değişmektedir. Johns Hopkins Üniversitesinde yapılan meta-analitik çalışma kan dolaşımı enfeksiyonlarının nozokomiyal enfeksiyonların üçüncü önde gelen nedeni olduğunu göstermektedir [119]. Fransa'da Ulusal de Veille Sanitaire enstitüsü (INVS) tarafından ülke çapında yürütülen bir çalışmada kan dolaşımı enfeksiyonlarının hastane kaynaklı enfeksiyonlar arasında dördüncü sırada yer aldığı ve bunların %33'ünün santral venöz kateter (SVK) ilişkili olduğu bildirilmiştir [111,117]. Santral venöz kateter 8 günü aşan bir süre takılı kaldığında, hastaların dörtte birinin kateter kolonizasyonuna maruz kaldığı ve bu hastalarda yaklaşık olarak %5 oranında kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (KİKDE) geliştiği bilinmektedir [115,122]. Amerika Birleşik Devletleri'nde yoğun bakım ünitelerinde her yıl yaklaşık 80 000 SVK ile

ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu görülmektedir [111,117]. Hastanedeki tüm birimler değerlendirildiğinde, yılda yaklaşık olarak 250.000 SVK ile ilişkili enfeksiyon vakası meydana gelmektedir [110,111,119]. KİKDE'lerin %60'ına hastanın cilt florasında yer alan mikroorganizmalar sebep olmaktadır [119]. Amerika Birleşik Devletleri'nde *Candida*'nın etken olduğu SVK ile ilişkili enfeksiyonlar, kan dolaşımı enfeksiyonlarının yaklaşık %8'inden sorumludur ve %10-40 arasında değişen ölüm oranına sahiptir [112].

Kateter kullanımının artması sonucu enfeksiyon riskinin de artması, kateterleri sağlık hizmetinin pahalı bir komplikasyonu haline getirmiştir [102]. Kateter ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları (KİKDE) hematojen yayılım, septik tromboflebit, endokardit, sepsis ve septik şoka neden olmaktadır [119]. Kateter ilişkili enfeksiyonların hastanede kalış süresini en az 6,5 gün kadar uzattığı ve mortaliteyi arttırdığı bildirilmiştir [123]. Kateter ilişkili enfeksiyonların sebep olduğu tahmini ölüm oranı %12-25 aralığındadır [110,124]. Tüm bunların yanı sıra KİKDE'lerin ekonomik etkisi de büyük önem taşımaktadır. Hasta başına tahmini maliyet aralığı 34.508-56.000 dolardır. Bu durum, Amerika Birleşik Devletleri'nde yılda 670 milyon-2,68 milyar dolar maliyete sebep olmaktadır [102,110]. Sağlık hizmetiyle ilişkili enfeksiyonlar maliyet, hastanede kalış süresi ve antimikrobiyal tedavilerde artışa yol açmaktadır [125].

2.2.5. Kateter ilişkili enfeksiyonlarda etiyoloji

Kateter ilişkili enfeksiyonlara cilt florasında yer alan mikroorganizmalar çoğunlukta olmak üzere çeşitli bakteriler ve mantarlar sebep olmaktadır. En sık rastlanan etken mikroorganizmalar koagülaz negatif stafilokoklar (KNS), *Staphylococcus aureus*, enterokoklar ve *Candida* türleridir [102,114].

Kateter ilişkili enfeksiyonlarda %50-75 oranında ilk sırada yer alan etken stafilokoklardır. Bu oran *Staphylococcus epidermidis* için %35-50 iken, *Staphylococcus aureus* için %15-25'tir [109,126]. Normal cilt florasında baskın olarak bulunması, adezinleri aracılığıyla kateter yüzeyine güçlü bir şekilde yapışması ve biyofilm oluşturma kabiliyeti sebebiyle koagülaz negatif stafilokoklar (KNS) özellikle de *S. epidermidis* kateter enfeksiyonlarında en sık saptanan mikroorganizmalardır [105,109]. *S. aureus*'un etken olduğu kateter enfeksiyonlarının büyük bir kısmı cilt florasından köken almaktadır veya burun taşıyıcılığı ile ilişkilidir [105]. *S. aureus*, genellikle hemodiyaliz kateterleri ile ilişkili enfeksiyonlarda

etken olarak görülmektedir [102]. *Enterococcus* spp., *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp. ve *Micrococcus* spp. etken olabilen diğer gram pozitif bakterilerdir [127].

Bütün kateter tiplerinde en çok rastlanan etken koagülaz negatif stafilokoklar olmasına rağmen femoral kateter ilişkili enfeksiyonlarda etken olarak en çok Gram negatif basiller ve enterokoklara rastlanmaktadır [102,128]. Gram negatif bakteriler etiyolojik olarak diğer mikroorganizmalara oranla daha az sıklıkta kateter enfeksiyonlarıyla ilişkilidir. Bunlar arasında Enterobacteriaceae üyeleri (*Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. *Enterobacter* spp.) ve *Pseudomonas aeruginosa* başta olmak üzere non-fermentatif Gram negatif bakteriler yer almaktadır. Gram negatif bakteriler KİE etkeni olarak kanser hastalarında ve yoğun bakım ünitelerinde daha yüksek oranda görülmektedir [102,135].

Kateter enfeksiyonlarında *Candida* türleri (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) ve diğer mantarlar da (*Fusarium* spp., *Rhodotorula* spp., *Trichosporon* spp., *Malassezia furfur*) etken olabilmektedir. *Candida* türleri en yaygın insan fungal patojenleri arasında yer almaktadır. *Candida* enfeksiyonları, hastane enfeksiyonları arasında dördüncü sırada yer almaktadır, ancak morbidite ve mortalite oranı diğer etkenlere göre oldukça yüksektir [105]. Kateter ilişkili enfeksiyonlarda en sık görülen fungal etken *Candida albicans*' tır. *Candida* kaynaklı kateter enfeksiyonları sıklıkla total parenteral beslenme (TPN) ile ilişkilendirilmiştir TPN, içeriğindeki glukoz oranı nedeniyle başta *C. parapsilosis* olmak üzere *Candida* türlerinin üremesini kolaylaştırmaktadır. *Candida parapsilosis* kan kültürlerinden izole edilen en yaygın ikinci *Candida* türüdür [102,129,130]. *Candida* ile ilişkili Amerika Birleşik Devletleri'nde kan dolaşımı enfeksiyonlarının yıllık insidans oranı 100.000'de 9,5-14,4 arasında, Avrupa'da ise ülkeye bağlı olarak bu oran 100.000'de 1,4-5,7 arasında değişmektedir [67]. Amerika Birleşik Devletleri'nde *Candida*'nın etken olduğu SVK ile ilişkili enfeksiyonlar, kan dolaşımı enfeksiyonları %10-%40 aralığında değişen mortaliteye sahiptir [115]. Son yıllarda tarım, veterinerlik ve tıp alanında antifungallerin yaygın kullanımı nedeniyle dirençli mantar enfeksiyonları giderek artmaktadır. Küresel ısınma ve antropojenik etkileri *Candida auris*, azole dirençli *Aspergillus* spp. ve *Lomentospora prolificans* gibi potansiyel olarak çok dirençli mantarların ortaya çıkmasına neden olmuştur [67].

Kateter enfeksiyonlarında özellikle immünsupresif veya uzun süre geniş spektrumlu antimikrobiyal tedavi alan hastalarda nadir rastlanan diğer mikroorganizmalar da etken olabilmektedir [128]. Etken mikroorganizmalar katetere, hastaya ve hastaneye ait faktörlere göre farklılık göstermektedir [102,105].

2.2.6. Kateter enfeksiyonlarında tanı

İntravasküler kateteri olan bir hastada farklı bir enfeksiyon bölgesi olmadan sistemik bir inflamatuvar yanıt gelişirse kateterin enfeksiyonun kaynağı olduğu düşünülmektedir. Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu kriterleri arasında $>38^{\circ}\text{C}$ ateş, $>90/\text{dk}$ kalp atış hızı, $>20/\text{dk}$ solunum hızı ve $>12\ 000/\text{mL}$ periferik beyaz kan hücre sayısı sıralanmaktadır [102]. Ancak kateter ile ilişkili enfeksiyonlarda inflamatuvar belirtiler güvenilir göstergeler değildir, bu sebeple mikrobiyolojik tekniklerin uygulanmasına ihtiyaç duyulmaktadır [103].

KİE kesin tanısı için, kateterin enfeksiyonun kaynağı olduğuna dair açık kanıtlarla birlikte pozitif kültür sonucu gerekmektedir. KİE için kesin tanı yöntemlerinden biri kateterin distal ucundan kültürünün yapılmasıdır [102,113,119]. KİKDE tanısı için yarı kantitatif (>15 CFU/kateter segmenti) veya kantitatif ($>10^2$ CFU/kateter segmenti) kateter ucu kültürünün pozitif olmalı, kateter segmentinden ve periferik kan kültüründen aynı tür mikroorganizma izole edilmelidir [119,131]. Kateter kültürü, referans yöntem olmasına rağmen tanı için kateterin çıkarılmak zorunda olması sebebiyle sınırlı bir tekniktir. Şüpheli enfeksiyon nedeniyle çıkarılan SVK'ların yaklaşık %15-25'inin enfekte olduğu bildirilmiştir ve tanı her zaman geriye dönük olarak konulmaktadır. Bu nedenle karşılaştırmalı kan kültürleri, pozitiflik zaman farkı ve sitolojiye dayalı yöntemler gibi kateterin çıkarılmasını gerektirmeyen yeni tanı teknikleri geliştirilmiştir. Bu teknikler, kateterin çıkarılmasıyla ilişkili rahatsızlık, maliyet ve potansiyel risklerden kaçınırken KİE teşhisinin doğruluğunu ve verimliliğini artırmayı amaçlamaktadır [113].

Hastanın periferik damardan alınan en az bir pozitif kan kültürü ile ateş, titreme ve hipotansiyon gibi klinik belirtilere sahip olması durumu da KİKDE olarak kabul edilmektedir [102,119]. Kateteri çıkarmadan kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonlarını (KİKDE) teşhis etmek amacıyla ilaç tedavisine başlamadan önce hem kateterden hem de periferik damardan karşılaştırmalı kan kültürleri alınması önerilmektedir [117,119]. Eş zamanlı olarak biri santral venöz kateterden (SVK) diğeri periferik damardan olmak üzere

iki set kan kültürü aynı anda alınmalıdır. Kateterden elde edilen kan kültüründeki koloni sayısı periferik venden elde edilen kan kültüründeki koloni sayısından en az üç kat daha fazla olduğunda KİKDE teşhis edilebilmektedir [117,119,131].

Bu yönteme alternatif olarak, iki kan kültürünün pozitiflik zamanının karşılaştırılmasıyla da tanı konulmaktadır. Kan kültüründe inkübasyon süresi, kan örneğindeki mikrobiyal yükün güvenilir bir ölçüsüdür. Kateterden alınan kantitatif olmayan kan kültürünün periferik kan kültüründen en az 2 saat önce pozitif hale gelmesi de KİKDE'nin göstergesidir. Bu yöntem, mikroorganizmaların kan dolaşımına geçmeden önce kateteri kolonize etme eğiliminde olduğu ve kateter kan kültüründe periferik kan kültürüne kıyasla daha yüksek konsantrasyonda mikroorganizma bulunması ilkesine dayanmaktadır [117,119,132]. Periferik damardan kan örneği alınamadığı durumlarda farklı kateter lümenlerinden iki kan örneği alınması önerilmektedir [117,119].

2.2.7. Kateter enfeksiyonlarında tedavi

Kateter ilişkili enfeksiyonlar (KİE) iki standart yöntemle tedavi edilmektedir:

1. Kateterin çıkarılması
2. Antimikrobiyal tedavi

Bu yöntemlerin her birinin avantajları ve dezavantajları vardır, kullanımları KİE'nin durumuna bağlı olarak değişmektedir. Kateter ilişkili enfeksiyonlarda kateterin kurtarıldığı koşullar:

- Kateterin ulaşılması zor bir konumda bulunması veya hastanın sınırlı venöz erişime sahip olması
- Hasta kanının 48-72 saat içerisinde steril değerlendirilmesi
- Tünel veya cep enfeksiyonu belirtilerinin olmaması
- Metastatik komplikasyon belirtisi olmaması
- Enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların tıbbi olarak tedavi edilebilir olması
- Hastanın hemodinamik olarak stabil durumda olması

Belirli koşullar sağlanıyorsa kateterin kurtarılması bir seçenek olarak değerlendirilmektedir. Bu koşullardan herhangi birinin karşılanmadığı durumlarda komplikasyonu önlemek ve hastanın güvenliğini sağlamak amacıyla kateterin çıkarılması gerekmektedir. Kateter ilişkili enfeksiyonlarda kateterin çıkarılması gereken koşullar:

- Enfeksiyon şüphesi olan kısa süreli periferik kateter varlığı
- 48-72 saatten fazla devam eden bakteriyemi/sepsis
- Tünel veya cep enfeksiyonu belirtileri gibi lokal komplikasyonların varlığı
- Arteriyel kateterlerde enfektif endokardit, pulmoner emboli veya periferik emboli gibi metastatik komplikasyonların varlığı
- *S. aureus*, *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Pseudomonas* spp., mikobakteriler ve mantarlar gibi yok edilmesi zor mikroorganizmaların varlığı
- Kantitatif veya semikantitatif kültür sonuçlarına göre ciddi kolonizasyon varlığı
- Antibiyotik tedavisi kesildikten sonra enfeksiyonun nüksetmesi

Kateterle ilişkili enfeksiyonlarda ampirik antibiyotik tedavinin başlatılması geleneksel bir uygulamadır. Ampirik tedavi için antibiyotik seçimi, hastanın klinik durumuna, enfeksiyonla ilişkili risk faktörlerine ve kateterle ilişkili potansiyel patojenlere bağlıdır [117]. Kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonu (KİKDE) olduğu şüphelenilen hastalarda;

- Santral venöz kateter (SVK)
- Sepsis
- Süpüratif tromboflebit
- Akciğer embolisi veya periferik emboli gibi metastatik komplikasyonlar
- Endovasküler protez
- İmmüsupresyon varlığında kateter çıkarıldıktan sonra ampirik antimikrobiyal tedaviye başlanmalıdır [113].

Kateteri kurtarmak için ise antibiyotik kilit tedavi (AKT) uygulanmalıdır. Antibiyotik kilit tedavi uygulanamıyorsa kolonize kateter yoluyla sistemik antibiyotikler kullanılmalıdır [119].

2.3. Antimikrobiyal Fotodinamik Tedavi (aFDT)

Fototerapi, bir hastalığın tedavisinde ışığın kullanımınıdır. Işığa duyarlı bir kimyasal ajanın kullanıldığı fototerapi uygulamaları ise fotokemoterapi olarak isimlendirilmektedir. Fotodinamik tedavi (FDT), ışığa duyarlı kimyasal ajan ile boyanmış olan hedef hücrelerin, mikroorganizmaların veya moleküllerin belirli dalga boyunda ışık ile öldürülmesi prensibine dayanan fotokemoterapi yöntemi olarak tanımlanmaktadır [133,134].

Antimikrobiyal fotodinamik tedavi (aFDT), mikroorganizmalar tarafından meydana gelen enfeksiyonların tedavisinde uygulanan girişimsel olmayan güncel ve alternatif bir yaklaşımdır. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi, “fotodinamik antimikrobiyal kemoterapi”, “fotoaktif dezenfeksiyon”, “fotodinamik inaktivasyon”, “letal fotosensitizasyon” gibi terimler ile de tanımlanabilmektedir [133,135,136].

2.3.1. Antimikrobiyal fotodinamik tedavinin tarihçesi

Dünyanın birçok yerinde güneş tanrılarına tapan eski medeniyetler, güneşin hastalıkları iyileştirme gücü olan sağlık getiren bir tanrı olduğu inancına sahipti [133,137]. Bu nedenle bedensel ve ruhsal birçok hastalığın tedavisi amacıyla ışığın kullanımıyla fototerapi uygulaması çok eski tarihlere dayanmaktadır. Antik Yunan, Roma, Mısır, Hindistan ve Uzak Doğu medeniyetleri yüzyıllar önce hastalıkları tedavi etmek için güneş ışığından yararlanmışlardır. Yunan hekim Herodot, sağlık için güneş ışığının önemini sık sık vurgulamıştır. Antik Yunan medeniyetinde güneş ışığı kullanılarak uygulanan bu tedavi yöntemi “helioterapi” olarak isimlendirilmiştir [133,138-140].

Arnold Rikli yüzlerce yıldır unutulmuş güneş ışığının, kronik hastalıklar ve fonksiyonel bozukluklar üzerine olumlu etkilerinin 19. yüzyılda yeniden keşfedilmesinde önemli bir rol oynamıştır. Rikli 'nin fototerapi alanında bugün hala geçerli olan terapötik kılavuzları bulunmaktadır [133,137]. 20. yüzyılın başlarında kırmızı ışık kullanımı ile püstüllerin iltihaplanmasını önleyerek çiçek hastalığını başarılı bir şekilde tedavi eden Danimarkalı hekim Niels Ryberg Finsen fototerapinin modern çağdaki öncüsü olmuştur [133,138,141]. Finsen, güneşten gelen ultraviyole (UV) ışığın bakterileri öldürebildiğini ve UV ışınlarının insan vücuduna yararlı etkilerini keşfetmiştir [133,137]. Karbon ark lambasından elde ettiği

ultraviyole ışığı kullanarak lupus vulgaris (deri tüberkülozu) tedavisini başarıyla gerçekleştirmiş ve yapmış olduğu bu çalışmayla 1903 yılında Nobel Ödülü almıştır [133,142]. Finsen, Danimarka’da güneş bahçesi adını verdiği açık alanda hastaları güneşlenerek tedavi ettiği, bugün hala varlığını sürdüren Işık Enstitüsünü kurmuştur. Finsen'den beri, X-ışınları ve gama ışınları hastalıkların tanı ve tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır [133,137].

Hintlilerin vitiligo, Mısırlıların ise lökoderma tedavisinde psoralen ve güneş ışığını birlikte kullanımıyla fotokemoterapi tarihi de çok eskilere uzanmaktadır. Binlerce yıl önce şifacılar, hastaları *Ammi majus*, *Psoralea corylifolia* gibi doğal psoralen içeren bitki ekstrelerinin kullanımı sonrası güneş ışığına maruz bırakarak birçok cilt hastalığını tedavi etmişlerdir. Günümüzde psoralen ve ultraviyole A (UVA) kombinasyonundan oluşan ve PUVA tedavisi olarak bilinen yöntem halen uygulanmakta olup, dermatolojik hastalıkların sağaltımında büyük önem taşımaktadır [133,140,142-144].

20. yüzyılın başında Almanya'nın Münih kentinde akridin turuncusunun ışık ile birlikte *Paramecium* üzerine toksik bir etki oluşturduğunun gözlemlenmesi fotodinamik antimikrobiyal kemoterapinin temelini oluşturur. Profesör Herman von Tappeiner’in öğrencisi Oscar Raab, doktora tezi sırasında akridin ile boyanan *Paramecium caudatum* hücrelerinde mikroskopik inceleme yaparken ışığa maruz kalan taraftaki hücrelerde ölüm gerçekleşirken, karanlıkta kalan hücrelerde canlılığın korunduğunu fark etmiştir. Raab, bu sonucu deneyin kapalı bir havada, fırtına sırasında yapılmasıyla ortamın aydınlatma koşullarının olağandışı olduğu sırada şans eseri farketmiştir. Deneyin güvenilirliğini kanıtlamak için *Paramecium* üzerine sadece ışığı, sadece akridini, akridin ve ışığı birlikte uygulayarak kontrol çalışmaları yapmıştır [133,138,144].

Oscar Raab ve hocası Tappeiner, floresansın optik özelliğini keşfetti ve *in vitro* toksisiteyi indükleyenin ışık değil, floresansın bir ürünü olduğu sonucuna varmıştır. Bu etkinin bitkilerde görülene benzer şekilde ışığın klorofil tarafından emilmesinden sonra, ışıktan kimyasala enerji transferinden kaynaklandığı tahmininde bulunmuştur [133,138]. 1904 yılında Tappenier, fotosensitizasyon reaksiyonlarının oksijen bağımlı olduğunu göstererek “fotodinamik etki” terimini literatüre kazandırmıştır [133,137]. 1905 yılında Tappeiner ve dermatolog Albert Jesionek, cilt karsinomu tedavisinde ksanten boya eozini ve beyaz ışığı birlikte kullanarak fotodinamik tedaviyi ilk kez klinik olarak uygulamıştır [133,137,145].

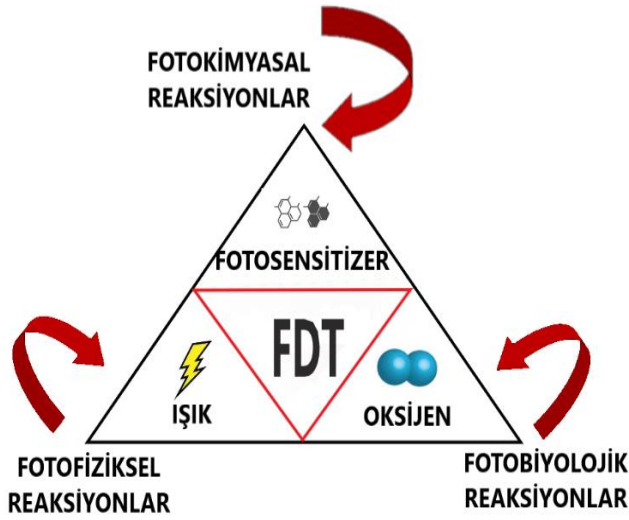
Friedrich Meyer Betz, porfirinlerin fototoksik etkilerini inceleyen ilk kişidir. 1912'de Meyer-Betz, hematorporfirini intravenöz yolla kendi vücuduna uygulamış ve kendini güneş ışığına maruz bırakmıştır. Fototoksik reaksiyon, fotosensitizör madde birikimine bağlı olarak vücudunda ödem ve hiperpigmentasyona sebep olmuştur. Bu deney ile hematorporfirinin çeşitli dokular için aktif bir fotosensitizör olduğu ortaya konmuştur [133,137,146]. Hematorporfirin türevi porfimer sodyum (Photofrin), 1995 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration-FDA) tarafından özafagus kanseri için klinik kullanım izni alan ilk fotosensitizördür [133,147].

Fotodinamik tedavinin gelişmesiyle 1986 yılında Uluslararası Fotodinami Derneği kurulmuştur ve FDT günümüze kadar çeşitli tıbbi uygulamalarda kullanım alanı bulmuştur [148]. FDT özellikle kanser, dermatoloji ve oftalmoloji alanında ilgi odağı haline gelmiştir. Penisilinin 1928'de Alexander Fleming tarafından keşfiyle beraber antimikrobiyal fotodinamik tedavi eski önemini yitirmiştir. Ancak, antimikrobiyallere karşı mikroorganizmaların geliştirmiş olduğu direnç sorunu yeniden gündeme gelmesine neden olmuştur [133,149].

Son yıllarda aFDT ile ilgili çalışmalar hız kazanmış, yeni fotosensitizör maddelerin bulunması ve değişik ışık kaynaklarının geliştirilmesi ile fotodinamik tedavi, enfeksiyon hastalıklarının tedavisinde güncel bir konu haline gelmiştir [133,150].

2.3.2. Antimikrobiyal fotodinamik tedavinin etki mekanizması

Fotodinamik tedavinin etki mekanizması basit olarak bir dizi fotofiziksel, fotobiyolojik ve özellikle fotokimyasal reaksiyon sonucu hedef hücrede meydana gelen geri dönüşümsüz tahribattır [151]. Şekil 2.4' te gösterildiği gibi fotodinamik etki; ışığa duyarlı kimyasal ajan (fotosensitizör), ışık kaynağı ve moleküler oksijen olmak üzere üç temel komponent varlığında gerçekleşmektedir [133,152].



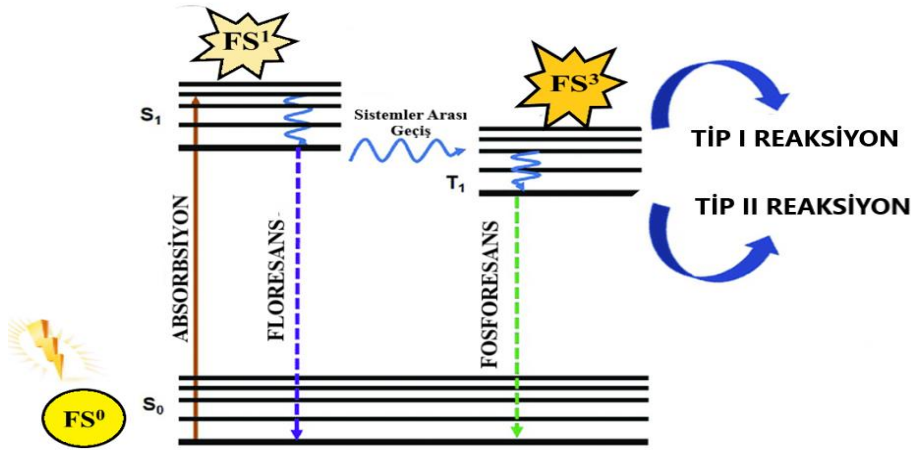
Şekil 2.4. Fotodinamik antimikrobiyal kemoterapinin temel bileşenleri [133]

Işık ile uyarılan fotosensitizörün (FS) ortamdaki oksijeni reaktif oksijen türlerine dönüştürerek protein, lipid ve nükleik asit gibi mikroorganizmada hedef aldığı yapılarda oksidatif hücre hasarını indüklemesi antimikrobiyal fotodinamik etki olarak tanımlanmaktadır. Hücresel hasar sonucu, nekroz ya da apoptoz mekanizmaları ile hücre ölümü gerçekleşmektedir [133,153,154].

Fotodinamik antimikrobiyal kemoterapinin etki mekanizması ışık enerjisinin ışığa duyarlı kimyasal ajanlar tarafından absorbe edilmesi ile başlar. Fotosensitizörler, temel durumda iken en düşük enerji seviyesine sahiptir, ışığa maruz kaldıklarında enerji seviyesi yükselir [133,155,156].

Fotosensitizör (FS), spesifik dalga boyunda ışık enerjisine maruz bırakıldığında uyarılır. Temel durumdaki fotosensitizör (FS^0) ışığı absorbe ettiğinde uyarılmış tekil forma (FS^1) geçer. Uyarılmış fotosensitizör, tekil enerji seviyesinden (S^1) temel enerji seviyesine (S^0) geri dönebildiği gibi sistemler arası geçiş ile uzun ömürlü üçlü enerji seviyesine de (T^1) uyarılabilir. Ortamda var olan moleküler oksijen ile uyarılmış üçlü enerji formundaki fotosensitizörün (FS^3) girdiği reaksiyon sonucu reaktif oksijen metabolitleri açığa çıkar ve hedef hücre yapısında ve fonksiyonlarında geri dönüşümsüz tahribat gerçekleşir. Bu reaksiyon sonucunda üçlü enerji seviyesindeki fotosensitizör, temel enerji seviyesine geri dönebilir [133,155-158].

Üçlü enerji durumuna uyarılan ışığa duyarlı kimyasal ajanın biyomoleküller ile etkileşimi sonucu antimikrobiyal fotodinamik etki tip I reaksiyon ve tip II reaksiyon olmak üzere iki farklı mekanizma ile gerçekleşir [133,157,159]. Fotodinamik tedavinin mekanizması Jablonski diyagramıyla gösterilmektedir (Şekil 2.5.).

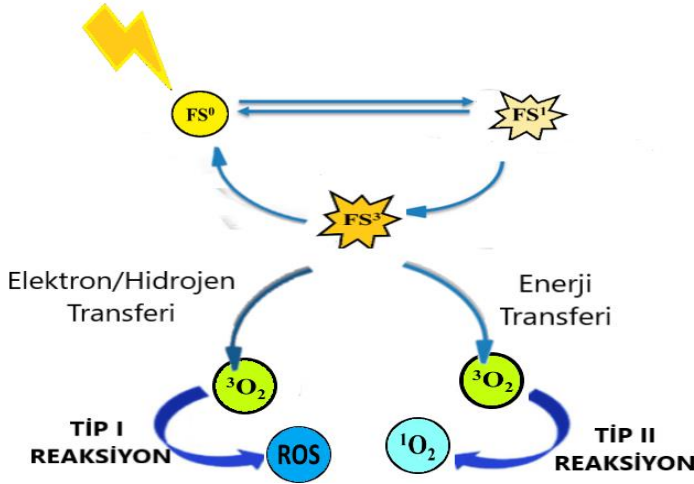


Şekil 2.5. Fotodinamik tedavinin etki mekanizması: Jablonski diyagramı [133]

FDT'de tip I reaksiyonlarda elektron transferi, tip II reaksiyonlarda enerji transferi etkindir. Her iki mekanizmanın da fotodinamik etki için ortamdaki moleküler oksijene ($^3\text{O}_2$) ihtiyacı vardır. Tip I reaksiyon ile uyarılmış üçlü enerji durumundaki fotosensitizör, hücrelerdeki organik substrata elektron/hidrojen transferi gerçekleştirir ve serbest oksijen radikalleri açığa çıkar. Serbest oksijen radikalleri, moleküler oksijen ile tepkimeye girer ve süperoksit (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi reaktif oksijen türleri (Reactive Oxygen Species-ROS) açığa çıkar [133,155,160,161]. Temel enerji durumuna geri dönen fotosensitizör, tekrar tepkimeye girebilir. Reaktif oksijen türleri ile etkileşimde bulunan fotosensitizör değişime veya yıkıma da uğrayabilir. Böyle bir durumda FS, ışığa karşı duyarlılığını kaybeder, floresans azalır veya gerçekleşmez [133,158].

Uyarılmış üçlü enerji durumundaki fotosensitizörün, tip II reaksiyon yoluyla ortamdaki moleküler oksijene ($^3\text{O}_2$) enerjisini transfer etmesi ile oksijenin yüksek reaktif formu tekil oksijen ($^1\text{O}_2$) açığa çıkar [133,155,160,161].

Fotosensitizör hiçbir değişikliğe uğramadan en düşük enerji seviyesine geri dönebilmekte ve bu sayede moleküler oksijene enerji transferi defalarca tekrarlanabilmektedir [158,160,161]. Tip I reaksiyon ve Tip II reaksiyon mekanizmaları şematik olarak gösterilmektedir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Tip I ve Tip II reaksiyon [133]

Her iki mekanizma sonunda açığa çıkan reaktif oksijen metabolitleri mikroorganizmalarda tahribata yol açar. Antimikrobiyal fotodinamik tedavide tip I ve tip II reaksiyonun eş zamanlı gerçekleşmesine rağmen mikrobiyal hücreleri hasara uğratan başlıca mekanizma tip II reaksiyondur [133,155,162,163]. Tip II reaksiyon sonucu açığa çıkan tekil oksijen ($^1\text{O}_2$), fotodinamik tedavide rol olan yüksek derecede reaktif, primer sitotoksik üründür [133,158,164]. Yaşam süresinin kısa, etki alanının kısıtlı olması sebebiyle tahribat çok küçük bir bölge ile sınırlı kalır, bu sayede uygulama alanının çevresindeki sağlıklı hücrelere toksik etki göstermez [133,164]. Mikrobisidal fotodinamik etki için oksijen ve fotosensitizer konsantrasyonu oldukça önem taşımaktadır [133,155]. Oksijen konsantrasyonu düştükçe fotodinamik etki azalmaktadır [133,159].

Son zamanlarda, bazı bilim adamları, oksijenden bağımsız “Tip III fotokimyasal yol” olarak adlandırdıkları başka bir fotoinaktivasyon mekanizmasının varlığından bahsetmektedirler. Bu mekanizma, foto-indüklenmiş elektron transferi ile reaktif inorganik radikaller üretilmesi temeline dayanır. Bu mekanizmanın anaerobik bakteriler üzerine etkili olduğu tahmin edilmektedir [133,165,166].

2.3.3. Antimikrobiyal fotodinamik tedavide fotosensitizörler

Fotosensitizerler (FS), ışığı absorbe ederek elektron transferini gerçekleştiren veya ışık enerjisini etrafına aktarabilen ışığa duyarlı kimyasal ajanlardır [133,167,168]. FDT’ de kullanılabilen boyaların, aromatik bileşikler gibi doğal veya sentetik çok sayıda toksik olmayan fotoaktif kimyasal ajan olduğu bilinmektedir [133,155].

Fotokemoterapide ışığa duyarlı ajanlar önemli bir rol oynamaktadır. Fotosensitizörler, ortamda ışık ve oksijen varlığında oksidatif tepkimelerin gerçekleşmesine ve mikroorganizmalarda sitotoksik etkiye sebep olurlar [168]. Fotodinamik etki için ışık kaynağının dalga boyu ile uyumlu bir fotosensitizer kullanımı büyük önem taşımaktadır [133,155,169]. Fotosensitizörler topikal, intravenöz veya oral yolla farklı şekillerde uygulanabilir [133,153]. Fotodinamik etki, FS ‘nin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri ile yakından ilişkilidir [133,155].

aFDT’de kullanılacak ideal bir fotosensitizör;

- Kimyasal bileşimi belirli saf bir madde olmalı
- Seçici toksisite göstermeli
- Sadece ışık ile aktif olmalı, karanlıkta uygulandığında toksik olmamalı
- Enfeksiyon etkeni mikroorganizmalarda kısa sürede yüksek konsantrasyona ulaşmalı
- Tedavi sonrası patojen mikroorganizmaların tekrar çoğalmasını engellemeli
- Enfeksiyon bölgesindeki konak dokuda minimal hasara yol açmalı
- Sağlıklı dokudan hızlı bir şekilde elimine olmalı
- Yüksek verimle üçlü uyarılmış hale geçme eğilimine yani yüksek kuantum verimine sahip olmalı
- Yüksek miktarda sitotoksik tekil oksijen üretebilmeli
- Suda, enjeksiyon çözeltilerinde ve kan ürünlerinde yüksek çözünürlüğe sahip olmalı
- Maliyeti düşük ve ticari olarak temin edilebilir olmalı ve
- Uzun süre saklanabilmelidir [133,155,170,171].

Maalesef, günümüzde tüm bu özellikleri karşılayabilen bir fotosensitizör bulunmamaktadır [133,159]. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi uygulamasında mikroorganizmaların

inaktivasyonu amacıyla halojenize ksantinler, fenotiyazinler ve konjuge klorinler fotosensitizör olarak kullanılmaktadır. En sık kullanılan fotosensitizörler fenotiyazin türevleridir [133,145,161,172].

Fotosensitizörler farklı şekillerde sınıflandırılmaktadır. Genellikle fotosensitizörlerin sınıflandırılması birinci, ikinci ve üçüncü kuşak fotosensitizörler şeklinde yapılmaktadır. Kimyasal olarak modifiye edilmiş hematoporfirinden sentezlenen maddeler birinci nesil fotosensitizörlerdir. Bu kimyasalların fotodinamik performansı kısa dalga boyu ile sınırlıdır ve derin dokuların uyarılmasında yetersizdir. Bu problemi çözümlmek amacıyla birinci kuşak ışığa duyarlı ajanlardan ikinci kuşak ışığa duyarlı ajanlar geliştirilmiştir. Ancak, ikinci nesil fotosensitizörlerin düşük hücre ve doku özgüllüğü klinik tedavide kullanımını sınırlandırmıştır. İkinci kuşak fotosensitizörlerin yetersizlikleri nedeniyle üçüncü kuşak fotosensitizörler geliştirilmiştir [133,151,173].

Antimikrobiyal fotodinamik tedavide kullanılan fotosensitizörler, mikrobiyal hücrelere bağlanmalarına göre; klorinler (Klorin e6) gibi mikroorganizmaya kuvvetli bir şekilde bağlananlar, fenotiyazin türevleri (Toluidin Mavisi O) gibi mikroorganizmalara hafif bir şekilde bağlananlar ve ksantin türevleri (Rose Bengal) gibi mikroorganizmalara bağlanma göstermeyenler şeklinde de sınıflandırılabilir [133,165,174]. Fotosensitizörler aynı zamanda tetrapirel yapıdaki fotosensitizörler, sentetik fotosensitizörler, doğal yapıdaki fotosensitizörler ve nanoteknolojik fotosensitizörler olarak yapılarına göre de gruplandırılabilir [133,175,176]. Son yıllarda özellikle kurkumin, riboflavin, perilenekinonlar (hiperisin, hipokrellin), psoralenler ve klorofil türevleri gibi doğal fotosensitizörler antimikrobiyal fotodinamik inaktivasyon çalışmalarında yoğun ilgi görmektedir [133,173].

Nanomalzeme bazlı yeni ışığa duyarlı ajanlar da avantajları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir [133,173]. Klinikte aFDT teknolojisinin yaygın kullanımı için çözümlenmesi gereken konulardan bir tanesi de hücrelerde fotosensitizör birikimidir. Mikroorganizmaların özellikle katyonik fotosensitizörleri hücre içerisine alımı normal memeli hücrelerine göre daha hızlı gerçekleşmektedir ancak, vücudun normal hücrelerinde spesifik olmayan FS birikimi kutanöz fotosensivite gibi yan etkiler ile sonuçlanabilmektedir. Hedef hücreye özgü taşıyıcı molekül ile işaretlenmiş lipozomlar gibi nanopartiküller ile fotosensitizörün enkapsülasyonu bu problemin çözüm yolu olarak düşünülmektedir.

Bu yaklaşım, fotodinamik etkiyi sadece mikroorganizma üzerine lokalize etmektedir. Lipozom enkapsülasyonu, uygulanan kimyasalların sürekli salınımını sağlar ve enfekte olmuş dokuda etkisinin uzun süre devam etmesine yardımcı olur [133,177].

Fotodinamik etki için bakteriler ışığa duyarlı ajanlarla muamele edilerek, ışığa maruz bırakılmaktadır. Ancak, *Porphyromonas sp.* ve *Prevotella sp.* gibi anaeroblar ışığa duyarlı yapıları nedeniyle uygun dalga boyunda ışığa maruz bırakıldıklarında FS yokluğunda dahi fotoinaktivasyon gerçekleşir. Bunun sebebi, siyah pigmentli bu bakterilerin doğal yolla porfirin üretmeleridir [133,172].

Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilerin aFDT'ye karşı duyarlılıkları farklıdır. Bu farklılığın sebebi bakterinin hücre duvar yapısı ve fotosensitizörün yük durumudur. Bakterisidal etki için fotosensitizerin hücre membranından geçerek sitoplazmada DNA ve protein sentezi inhibisyonuna neden olması gerekir [133,178]. Gram pozitif bakterilerde peptidoglikan ve lipoteikoik asitten oluşan hücre duvarı fotosensitizerin geçişine olanak tanır. Antimikrobiyal fotodinamik etki için Gram-pozitif bakterilerde nötral, katyonik veya anyonik özellikte FS kullanılabilir. Bu nedenle, aFDT Gram-negatif bakterilere kıyasla Gram-pozitif bakterilere karşı daha etkilidir [133,172,179].

Katyonik fotosensitizörler, hem Gram-pozitif hem Gram-negatif bakterilerde etkilidir. Lipopolisakkarit dış membran sebebiyle Gram- negatif bakteriler güçlü negatif yüke sahiptir. Bu durum, nötral veya anyonik fotosensitizörlerin hücre içerisine girişini engellemektedir. Etkin aFDT için Gram-negatif bakterilerde sadece katyonik özellikte FS kullanılması gerekmektedir [133,172,179]. Fotoinaktivasyon için Gram-negatif bakterilerin fotosensitizörlere karşı duyarlılığı pozitif yüklü fonksiyonel grupların bağlı olduğu fotosensitizörler kullanılarak arttırılabilir. Pozitif yüklü fonksiyonel grupların bağlı olduğu bu FS 'ler, polikasyonik moleküler yapıların doğal veya yapay bir şekilde FS 'e bağlanmasıyla meydana gelmektedir. Bu şekilde bakteri hücrelerinin dış yüzeyindeki negatif yüklü bölgeler ile sıkı bir elektrostatik etkileşimi teşvik edebilirler. Nötral fotosensitizörler polilizin ile; anyonik fotosensitizerler ise dış membran geçirgenliğini değiştiren metal şelatörü ajanlarla (polimiksin B, EDTA vb.) kombine edildiğinde hem Gram-negatif hem de Gram-pozitif bakterilere karşı etkili antimikrobiyal fotodinamik inaktivasyon meydana gelmektedir [133,172].

2.3.4. Antimikrobiyal fotodinamik tedavide kullanılan ışık kaynakları

FDT, fotosensitizörü aktive edebilecek yeterli enerjiye sahip ışık kaynağı gerektirir. Uygun penetrasyon derinliği ile hedef bölgeye hızla iletilebilen ışık kaynakları fotodinamik etki için büyük önem taşımaktadır [137]. Kullanılan ışığın doku penetrasyonu dalga boyuna göre değişmektedir. Işığın dalga boyu ise kullanılan fotosensitizöre bağlıdır. Işığın dalga boyu arttıkça dokulara penetrasyonu da artar [180]. FDT 'de lazer ve lazer olmayan ışık kaynakları kullanılmaktadır. Kullanılan ışık kaynakları lazerler (argon, diyot, Nd:YAG lazerler vb.), ışık yayan diyotlar (Light Emitting Diode- LED) ve gaz boşaltmalı lambalar (kuvars, tungsten, halojen, ksenon boşaltmalı lambalar vb.) olmak üzere üç sınıfta incelenir [133,145,181].

Günümüzde fotodinamik tedavide en yaygın kullanılan ışık kaynakları lazerlerdir. Lazerler, tek renkte ve koherent ışık dalgaları halinde ışık verirler. Lazerlerin yüksek enerjili ışık kaynakları olmaları tedavi süresini kısaltmaktadır. Lazerler ile spesifik fotosensitizörler için dar spektrumda ışık elde edilir. Lazerlerin kullanımı geniş olmayan bölgelerde uygundur ancak ışığın odaklanması açısından oldukça avantajlıdır [137,182]. Lazerlerin dezavantajları arasında kompleks yapısı, maliyetinin yüksek olması ve sınırlı dalga boyu spektrumu sıralanabilir [133,155]. Lazer uygulaması sırasında eğer hasta ve uygulamayı yapan kişi gözlerini korumaz ise gözde ciddi tahribat oluşabilir, lazer olmayan ışık kaynakları için böyle bir risk söz konusu değildir.

FDT'de kullanılan ilk ışık kaynakları, koherent olmayan geleneksel ark lambalarıdır [133,137]. Geniş dalga boyu aralığında ışık yayan gaz boşaltımlı lambalar, farklı absorbansta çok sayıda fotosensitizör ile uyumlu olması açısından avantajlıdır. Herhangi bir fotosensitizöre uygun şekilde spektral olarak filtrelenebilir [133,145,182]. Lazer ışık kaynaklarıyla karşılaştırıldığında geniş bir bölgede uygulanabilirler, maliyeti düşük ve kullanımı kolaydır [133,159,181]. Ancak, bu ışık kaynaklarında aşırı ısınma söz konusudur [133,158,181,183]. Fotodinamik tedavi esnasında uygulama bölgesinde hasara sebebiyet vermemek amacıyla ışık kaynağından ısı çıkışına dikkat edilmelidir [133,145].

Geniş emisyon spektrumuna sahip ışık yayan diyotlar (LED) yarı iletken ışık kaynaklarıdır. LED'ler, görünür ışık spektrumunda emisyonu sahiptir [133,145,158]. Son zamanlarda PACT üzerine yapılan araştırmalarda ışık yayan diyotların kullanımı giderek artmıştır.

LED'ler uygulaması kolay, hafif ve ucuz olması sebebiyle kullanımı oldukça yaygındır [133,155,160,184]. Diğerleriyle kıyaslandığında LED'ler aynı zamanda termal hasar riski taşımayan güvenilir ışık kaynakları olmaları açısından da avantajlıdır [133,148]. İnorganik LED tabanlı ışık kaynakları ile geniş alan tedavisi elde etmek oldukça verimlidir. Son zamanlarda geliştirilen hafif, ince ve esnek insan derisine uyumlu organik ışık yayan diyotların (OLED) ışık kaynağı olarak kullanımı ayaktan fotodinamik antimikrobiyal kemoterapide umut vaat etmektedir [133,183]. Işık kaynaklarının FDT'de etkisi, hangi tip ışık kaynağı olduğundan çok öncelikle emisyon spektrumu, ışık şiddeti ve ışığın dağılımına bağlıdır [133,145,184,185].

2.3.5. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi uygulamaları

Fotodinamik tedavi, hem onkolojik hastalıklar hem de onkolojik olmayan hastalıklar üzerine etkilidir. FDT' nin klinik uygulamaları arasında dermatolojik hastalıklar, oftalmik hastalıklar, peridontolojik hastalıklar, kardiyovasküler hastalıklar, üriner hastalıklar, jinekolojik hastalıklar ve kanser sayılabilir [133,182]. Fotodinamik antimikrobiyal kemoterapinin klinik uygulamaları arasında potansiyel alanlar ise özellikle oral enfeksiyonlar, cilt enfeksiyonları ve kronik yaralardır [133,145].

Mikroorganizmalar üzerine FDT çalışmalarının tarihi yaklaşık 100 yıl öncesine dayanmaktadır. Ancak 1970'lerden 2010'a kadar olan dönem boyunca FDT araştırmaları kanser üzerine yapılmıştır. Patojenik mikroorganizmalar arasında çoklu ilaç direncinin önlenemez yükselişiyle fotodinamik antimikrobiyal kemoterapi tekrar önem kazanmıştır [133,176]. FDT teknolojisi, antimikrobiyal tedavi amacıyla yapılan çok sayıda çalışma ile kapsamlı bir şekilde incelenmektedir. Enfeksiyonlar üzerine yapılan çalışmalarda bu yöntemin bakterilere, mantarlara, parazitlere ve virüslere karşı antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmıştır [133,135,165]. Fotodinamik antimikrobiyal kemoterapi, geniş antimikrobiyal etkinlik gösterir. FDT, hem Gram pozitif hem de Gram negatif çok sayıda patojen bakteriye karşı *in vitro* ve *in vivo* etkinliği ispatlanmış bir yöntemdir [133,186].

Yüzeyel mantarlar, çeşitli maya ve küflere karşı aFDT'nin antifungal etkisinin gösterildiği çok sayıda çalışma mevcuttur [133,187,188].

Mantar hücrelerinin daha büyük olması ve mantarlarda nükleer membran varlığı fotosensitizörün hedefe nüfuz etmesi önünde büyük bir engeldir. Bu nedenle mantarlar fotodinamik etkiye karşı bakterilere göre daha dirençlidir [133,172].

Özel floresan kutularda kan ürünlerinin içerdiği virüsleri ortadan kaldırmak amacıyla antiviral fotodinamik etkinlik araştırmaları da yapılmıştır. Özellikle, Human Papilloma Virüs ve Herpes Simpleks Virüsün neden olduğu viral cilt enfeksiyonları üzerine çok sayıda FDT uygulaması vardır [133,135,172]. Son zamanlarda, küresel bir problem olan COVID-19 pandemisinin önlenmesi ve tedavisi için yeni yöntemler geliştirilmesi gerekmektedir. Yapılan *in vitro* PACT uygulamaları SARS-CoV-2'ye karşı antiviral etkinlik göstermiş, FDT uygulaması COVID-19 içinde etkili bulunmuştur [133,189]. Parazitik protozoanlara karşı da fotodinamik kemoterapi çalışmaları mevcuttur. *Leishmania* başta olmak üzere, *Plasmodium falciparum* ve *Acanthamoeba palestinensis* üzerine antimikrobiyal fotodinamik etkinlik çalışılmıştır [133,172,190].

2.3.6. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi avantajları ve dezavantajları

Antibiyotiklerin yaygın kullanımı, bakterilerin ilaç direncini büyük oranda arttırmıştır. Antibiyotiğe dirençli bakterilerin 2050 yılına kadar milyonlarca kişinin ölümüne ve trilyonlarca dolar ekonomik kayba neden olacağı tahmin edilmektedir. Antimikrobiyal direnç sadece sağlık sorunu değildir, ekonomik açıdan bakıldığında pahalı yeni nesil antibiyotiklerin geliştirilmesi ve enfeksiyon yönetiminin sağlanması ihtiyacı doğuran ve giderek büyüyen küresel bir problemdir [133,183,191].

Antimikrobiyal fotodinamik tedavi, standart antimikrobiyal ve antiseptik maddelerin uygulanmasıyla karşılaştırıldığında tedavi alanı dışındaki normal konak hücrelerine ve mikrofloraya minimal hasar gibi avantajları mevcuttur [133,172]. Fotodinamik tedavi, mikroorganizmaların olduğu enfeksiyon bölgesi gibi sağlıklı olmayan dokulara karşı seçicidir. FDT'de fotosensitizörün selektif olarak biriktiği bölgede tahribat gerçekleşir. Kümülatif toksisiteye sebep olmadığından tekrarlayan tedaviler dahi zararsızdır [133,192,193].

Antimikrobiyal direnç, bakteri, mantar ve virüsler dahil olmak üzere tüm insan patojenlerin etken olduğu hem hastane kaynaklı hem de toplum kaynaklı enfeksiyonların tedavisini etkileyen global bir problemdir. Özellikle, hastane patojenlerinde giderek artan antibiyotik direnci sorunu göz önüne alındığında, mevcut antimikrobiyallerden daha etkili olabilecek alternatif yöntemler önem kazanmaktadır [133,165]. Geleneksel antimikrobiyal ilaç tedavisi ile karşılaştırıldığında aFDT uygulaması enfeksiyonların tedavisinde çeşitli avantajlara sahiptir. Mevcut kaynaklar, antimikrobiyal fotodinamik tedavi etkinliğinin mikroorganizmaların vahşi kökenleri ile çoklu ilaç direnci olan kökenlerinde aynı olduğunu göstermektedir [133,172,173].

Aynı zamanda çok tekrarlı FDT uygulamalarının yer aldığı çalışmalarda mikroorganizmalarda fotodinamik tedaviye karşı direnç gelişimi de bildirilmemiştir. Fotodinamik tedavi, kanser hücrelerinde de direnç gelişimi göstermemektedir. FDT 'nin antibiyotik, antiseptik ve antikanser kemoterapisi gibi diğer sitotoksik stratejilerden farklı olarak direnç geliştirmede bilinmemektedir [133,177]. Antimikrobiyaller, mikroorganizmaların belirli bir bölgesini hedef almakta ve burada tahribata yol açmaktadır. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi seçici olmayan, eş zamanlı olarak mikroorganizmada çok sayıda yapıyı ve metabolik yolu hedef alan bir yaklaşımdır. FDT, mikroorganizmayı oksidatif hasara uğratmakta ve birden çok bölgede yıkıma neden olmaktadır. Bunun sonucunda hasarlı tüm bölgelerin direnç kazanması düşük bir olasılıktır. Patojen mikroorganizmalarda direnç gelişimi, antibiyotiklerde olduğu gibi spesifik tek bir yapıyı hedefleyen yaklaşımlar için daha olasıdır. Bu sebeple, fotodinamik tedavide antimikrobiyal ajanlara karşı oluşan direnç gelişiminden bahsetmek pek mümkün görünmemektedir [133,145,152].

Fotodinamik tedaviye karşı mikroorganizmaların direnç geliştirmemesinin diğer nedenlerinin de patojenin direnç geliştirmesi için fotosensitizör ile FDT uygulaması arasındaki sürenin çok kısa olması, fotosensitizörlerin karanlıkta toksik olmamaları sebebiyle mikroorganizmanın FS' e karşı hayatta kalma mekanizmalarının devreye girmemesi ve hücrelerin tedaviden sonra çok ağır hasara uğraması olduğu düşünülmektedir [133,164,194].

Bakteriyel biyofilmlerin sebep olduğu antibiyotik direnci de dünyada çok büyük bir sorundur. Alternatif teknolojilerin geliştirilmesinin bu sorunun çözümüne yardımcı olacağı d ş n lmektedir. Biyofilmleri kontrol etmeye yönelik umut verici yaklaşımlardan biri de fotodinamik antimikrobiyal kemoterapidir. FDT sadece enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla değil, aynı zamanda çeşitli yüzeylerde mikroorganizmaların büyümesini kontrol etmek amacıyla da kullanılmaktadır. Fotodinamik tedavi ile hem biyofilm hem de planktonik hücre dekontaminasyonu sağlanabilir [133,165].

Gram-negatif bakteri antibiyotiğe maruz kaldığında hücre ölümü gerçekleşir ve dış membran komponenti lipopolisakkaritler (LPS) açığa çıkar. Bu durum, proenflamatuar sitokin salınımı sonucu konakta istenmeyen doku hasarına sebep olmaktadır. FDT, proteazlar ve çeşitli ekzotoksinler gibi salgılanan virülans faktörlerinin aktivitesini azaltma veya yok etme yeteneğine sahiptir [133,164]. FDT antibiyotiklerden farklı olarak proenflamatuar sitokinlerin salınımı gerçekleştirmezler. FDT ile hücre membranında oluşan tahribatın lipid peroksidasyonu ve protein hasarı yolu ile olduğu gözlenmiştir. Sadece enfeksiyondan sorumlu mikroorganizmaları öldürmekle kalmayıp, aynı zamanda konakçı doku yıkımından sorumlu birçok molekülün ekspresyonunu inaktive etme veya azaltma yeteneği hem antimikrobiyal hem de antienflamatuar yaklaşımı tek tedavide bir araya getirerek antibiyotiklere göre önemli bir avantaj sağlar. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi, g r ld ğu üzere sadece antimikrobiyal etkili değildir, aynı zamanda biyostim latif, antienflamatuar ve antibiyofilm etkinlik de göstermektedir [133,148,154] Antienflamatuar etkinlik, proenflamatuar sitokin salınımında azalma ve lipopolisakkarit inhibisyonu ile gerçekleşmektedir [133,148,195].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Deneyde Kullanılan Mikroorganizmalar

Çalışmada -80°C derin dondurucuda muhafaza edilen standart bakteri suşları *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ile standart mantar suşları *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida parapsilosis* ATCC 96142 kullanılmıştır. *Staphylococcus* referans kökenlerinin koyun kanlı agara (BD, Almanya), *Candida* referans kökenlerinin Sabouraud dekstroza agara (RTA, Türkiye) ekimi yapılarak 37°C’de 24 saat etüvde inkübe edilmiştir.

3.2. Deneyde Kullanılan Kimyasal Malzemeler

3.2.1. Deneyde kullanılan besiyerleri

- Triptik Soy Broth (TSB) Besiyeri (Oxoid, BK)
- Triptik Soy Agar (TSA) Besiyeri (Oxoid, BK)
- Sabouraud Dekstroza Broth (SDB) Besiyeri (Oxoid, BK)
- Sabouraud Dekstroza Agar (SDA) Besiyeri (Oxoid, BK)

3.2.2. Deneyde kullanılan fotosensitizörler ve özellikleri

- Metilen mavisi (MB) (Merck, Almanya)
- Toluidine mavisi O (TBO) (Sigma, Almanya)
- Rose Bengal (RB) (Merck, Almanya)
- Eozin Y (EOY) (Merck, Almanya)
- Ribofilavin (RBF) (Aromel Kimya, Türkiye)
- Kurkumin (CUR) (Gemma Kimya, Türkiye)

(Çizelge 3.1.)

Çizelge 3.1. Kullanılan fotosensitizörlere ait özellikler

Ticari adı	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı	Aktive olduğu dalga boyu (nm)
Metilen mavisi (MB)	$C_{16}H_{18}ClN_3S \cdot xH_2O$	329,85	610-665 nm
Toluidin mavisi O (TBO)	$C_{15}H_{16}N_3SCl$	305,83	520-700 nm
Rose Bengal (RB)	$C_{20}H_2Cl_4I_4Na_2O_5$	1017,64	480-580 nm
Eozin Y (EOY)	$C_{20}H_8Br_4O_5$	647,89	450-550 nm
Ribofilavin (RBF)	$C_{17}H_{20}N_4O_6$	376,36	349-532 nm
Kurkumin (CUR)	$[HOC_6H_3(OCH_3)CH=CHCO]_2CH_2$	368,38	405-470 nm

3.2.3. Deneyde kullanılan diğer kimyasal maddeler

- Kristal viyole (Merck, Almanya)
- Fosfat tamponlu salin (Phosphate buffer saline, PBS) (Sigma-aldrich, Almanya)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Isolab, Almanya)
- Asetik asit (Merck, Almanya)
- Gluteraldehit (Merck, Almanya)
- Etil alkol (Isolab, Almanya)

3.3. Deneyde kullanılan Araç ve Gereçler

3.3.1. Deneyde kullanılan ışık kaynağı ve özellikleri

Fotodinamik tedavi deneylerinde kullanılmak üzere LED (Light Emitting Diodes) ışık kaynağı tasarlanmıştır. Işık kaynağı, optik düzenek üzerindeki tablada kırmızı, yeşil ve mavi olmak üzere üç farklı renkte ve dalga boyunda ışık verebilen toplam on altı adet RGB LED'den (Ptec-PL16, ABD) oluşmaktadır. (Resim 3.1.) (Çizelge 3.2.)



Resim 3.1. Çalışmada kullanılan LED ışık kaynağı

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan ışık kaynağına ait özellikler

LED Çeşidi	Dalga boyu
Kırmızı LED	630 nm
Yeşil LED	520 nm
Mavi LED	470 nm

3.3.2. Deneyde kullanılan diğer cihazlar ve laboratuvar malzemeleri

- Etüv (Elektro-mag, Türkiye)
- Otoklav (Sanyo, Japonya)
- Çalkalayıcı inkübatör (Biosan, Letonya)
- Pastör fırını (Nüve, Türkiye)
- Derin dondurucu -80°C (Sanyo, Japonya)
- Buzdolabı (Arçelik, Türkiye)
- ELISA okuyucu (Mindray MR-96A, Çin)
- Hücre densitometre cihazı (Biosan, Letonya)
- Hassas terazi (Kern, Almanya)
- Çalkalayıcı
- pH metre
- Otomatik pipet seti (Labmate, Türkiye)
- Santral venöz kateter (Able, Almanya)
- Düz tabanlı 24 kuyucuklu hücre kültür plağı (Sarstedt, ABD)
- Düz tabanlı 96 kuyucuklu hücre kültür plağı (SPL, Kore)
- Petri (Isolab, Almanya)
- Mikropipetler ve uçları (Beta pette™, ABD)
- Membran filtre (0,22 µm) (Corning, ABD)
- Cam tüpler, falkon tüpler, ependorflar, pensler, özeler ve enjektörler

3.4. Yöntemler

3.4.1. Besiyerlerinin hazırlanması

Sıvı besiyerlerinin hazırlanması

Triptik Soy Broth (TSB) besiyerinin içeriği:

Pankreatik sindirilmiş kazein	17 g/L
Enzimatik sindirilmiş soya fasulyesi	3 g/L
Sodyum klorit	5 g/L
Dipotasyum hidrojen fosfat	2,5 g/L
Glukoz	2,5 g/L
pH	7.3

Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) besiyerinin içeriği:

Dekstroz	20g/L
Pankreatik sindirilmiş kazein	5 g/L
Pepton A	5 g/L
pH	5.6

Toz halindeki besiyerlerinin her birinden 30 g tartılmış ve üzerine 1 L distile su eklenerek çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121°C’de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Sıvı besiyerleri kullanılıncaya kadar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

Katı besiyerlerinin hazırlanması

Triptik soy agar (TSA) besiyerinin içeriği:

Pankreatik sindirilmiş kazein	15 g/L
Enzimatik sindirilmiş soya fasulyesi	5 g/L
Sodyum klorit	5 g/L
Agar	15 g/L
pH	7.3

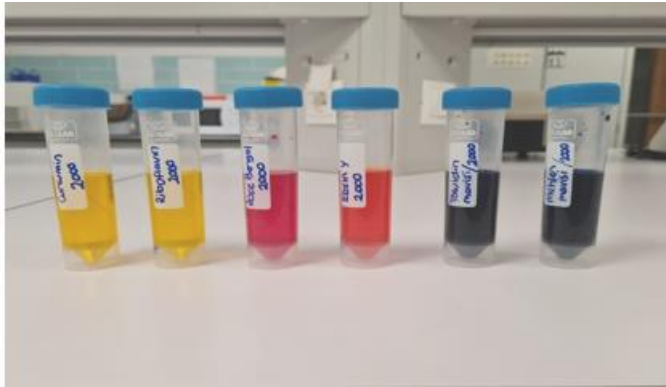
Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) besiyerinin içeriği:

Pepton	10g/L
D (+) Glukoz	40 g/L
Agar	15 g/L
pH	5.6

Toz halindeki besiyerlerinden TSA için 40 g ve SDA için 65 g tartılmış ve üzerlerine 1 L distile su eklenerek çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyerleri otoklavda 121°C’de 15 dakika 1 atm basınçta sterilize edilmiştir. Steril petri kaplarına 25’er ml dökülerek katılaşıncaya kadar bekletilmiş ve katı besiyerleri kullanılıncaya kadar +4°C’de buzdolabında saklanmıştır.

3.4.2. Fotosensitizörlerin hazırlanması

Çalışmada FS ajan olarak Metilen mavisi (MB), Toluidin mavisi O (TBO), Rose Bengal (RB), Eozin Y (EOY), Riboflavin (RBF) ve Kurkumin (CUR) kullanılmıştır. Toz halde bulunan MB, TBO, RB ve EOY fotosensitizörleri fosfat tampon solüsyonu (PBS, pH 7.4), RBF ve CUR fotosensitizörleri ise dimetil sülfoksit (DMSO) içerisinde çözünerek 2000 mikrogram/mililitre ($\mu\text{g/ml}$) stok konsantrasyonda çözelti hazırlanmıştır (Resim 3.2.).



Resim 3.2. Çalışmada kullanılan fotosensitizörlerin stok solüsyonları

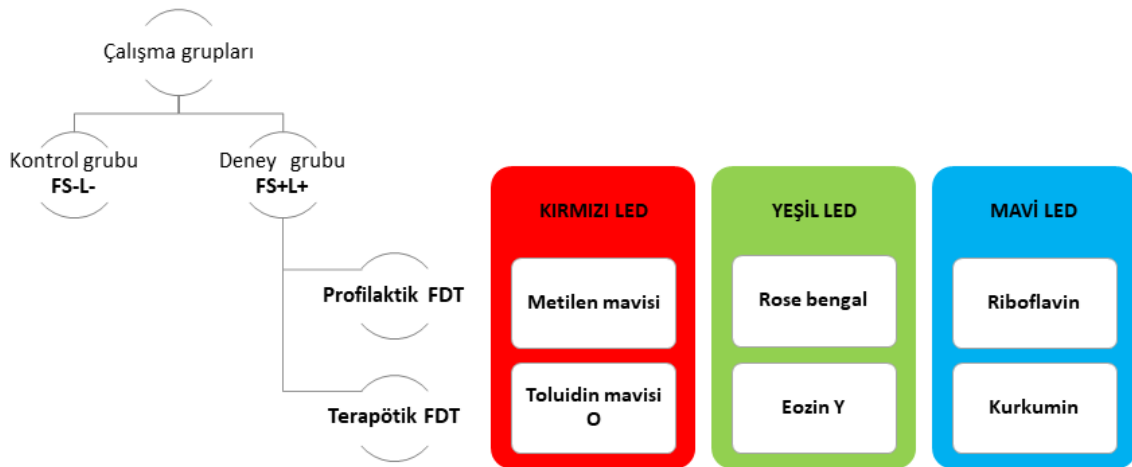
Stok solüsyonlar 0.22 μm por genişliğine sahip membran filtreden geçirilerek steril edilmiştir ve kullanılıncaya kadar iki hafta süre ile +4°C’de buzdolabında saklanmıştır. Tüm fotosensitizör solüsyonları falkon tüplerin içerisinde hazırlanmış ve alüminyum folyo ile kaplanarak karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Her grup için FDT uygulamasından önce 1000 µg/ml (%0,1) konsantrasyonda solüsyonlar, stok solüsyondan PBS ile dilüe edilerek hazırlanmıştır. Fotosensitizör seçimi ve konsantrasyon belirlenmesinde, daha önce yapmış olduğumuz çalışmada [1] ve literatürde yer alan in vitro deneylerdeki veriler baz alınmıştır.

3.4.3. Çalışma grupları ve deney tasarımı

İn vitro kateter biyofilm modelinde yapılacak olan deneyler, uygulanacak tedavi yöntemine göre gruplara ayrılmıştır. Çalışma içerisinde tedavi uygulanmayan kontrol grubu ve tedavi uygulanan deney grubu olmak üzere iki temel grup bulunmaktadır. Fotosensitizör (FS) veya LED (L) ışık uygulamasına maruz kalmayan sadece bakteri/maya inokülumu içeren plaklarda, kateterde gelişen biyofilm kontrol grubu (FS-L-) olarak belirlenmiştir. Deney grubu (FS+L+), fotosensitizör ve ışığa maruz bırakılarak fotodinamik tedavi uygulanan çalışma grubudur.

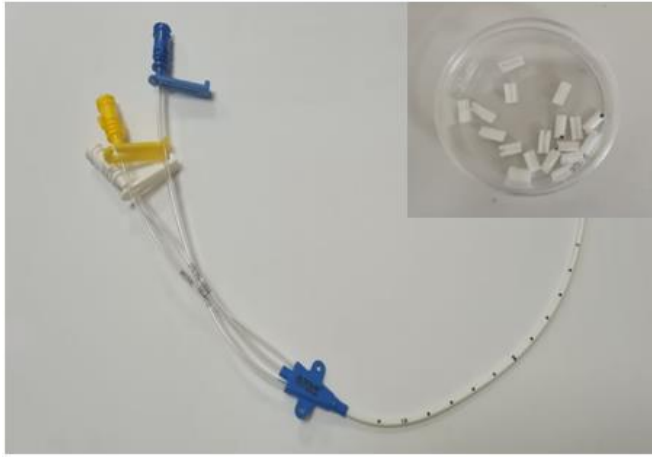
Deney grubu içerisinde profilaktik fotodinamik tedavi ve terapötik fotodinamik tedavi grubu yer almaktadır. Deney gruplarına göre biyofilm oluşturulması basamağından önce veya sonra katetere belirlenen tedavi yöntemi uygulanmaktadır. Kateterde biyofilm oluşumu öncesi uygulanan tedavi profilaktik FDT olarak isimlendirilmiştir. Bu deney grubunda fotodinamik tedavinin kateterde biyofilm oluşumuna önleyici etkisi araştırılmaktadır. Biyofilm oluşturma basamağından sonra uygulanan tedavi terapötik FDT olarak isimlendirilmiştir. Bu deney grubunda fotodinamik tedavinin kateterde var olan biyofilm üzerine tedavi edici etkisi araştırılmaktadır.



Şekil 3.1. Tez çalışmasında yer alan gruplar

3.4.4. İn vitro kateter modelinde bakteriyel ve fungal biyofilm oluşturulması

Biyofilm oluşum aşaması Güzel Tunçcan ve ark. [1] ve Manoil ve ark. [196] kullandıkları metotlar modifiye edilerek çalışılmıştır. Çalışmada 7 French (7F), üç lümenli, poliüretan santral venöz kateterler kullanılmıştır. Kateterler 0,5 cm uzunluğunda eşit parçalar şeklinde kesilmiştir ve vertikal düzlemde neşter yardımıyla iki eş parçaya ayrılmıştır (Resim 3.3.). Elde edilen kateter segmentleri Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkezi Sterilizasyon Ünitesinde etilen oksit ile steril edilmiştir.



Resim 3.3. Santral venöz kateter ve steril kateter segmentleri

Çalışmada in vitro kateter enfeksiyon modeli oluşturmak amacıyla bakteriyel biyofilm için *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984, fungal biyofilm için *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida parapsilosis* ATCC 96142 kökenlerinin inokulum süspansiyonu 0.5 McFarland standartına uygun olarak hazırlanmıştır. Bakteri süspansiyonu 10^8 hücre/ml, mantar süspansiyonu 10^6 hücre/ml'dir.

Eşit boyutlarda kesilmiş olan steril kateter segmentleri 24 kuyucuklu hücre plağı içerisine her bir kuyucukta bir kateter segmenti olacak şekilde yerleştirilmiştir. Kateterlerin bulunduğu kuyucuklara deney grubuna bağlı olarak FDT öncesi veya sonrası hazırlanan 200 µl bakteri/maya süspansiyonu ve 1,8 ml sıvı besiyeri eklenmiştir. Bakteriyel biyofilm oluşumu için Tryptic Soy Broth (TSB), fungal biyofilm oluşumu için Sabouraud Dekstroz Broth (SDB) besiyeri kullanılmıştır. Hücre plakları içerisindeki kateterler, çalkalayıcı inkübatörde 150 rpm'da 37 °C'de 48 saat inkübe edilerek in vitro kateter biyofilm modeli oluşturulmuştur.

Steril pens yardımıyla yeni bir kuyucuğa aktarılan kateter segmentleri fosfat tamponlu salin (PBS) ile 3 kez yıkanarak biyofilm oluşturmaya mikrobiyal hücreler kateter yüzeyinden uzaklaştırılmıştır. Kateter parçaları oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

3.4.5. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi uygulaması (AFDT)

Fotodinamik tedavi uygulanan deney gruplarında, 6 adet fotosensitizör ve 3 adet farklı renk ve dalga boyunda LED kullanılmıştır. Görünür ışık kaynağı olarak kullanılan LED'ler kırmızı, yeşil ve mavi renktedir. Kullanılan fotosensitizörler; kırmızı LED için metilen mavisi ve toluidin mavisi O, yeşil LED için rose bengal ve eosin Y, mavi LED için ribofilavin ve kurkumindir (Resim 3.4.).

Deney grubu; biyofilm oluşumu öncesi fotodinamik tedavi uygulanan kateterleri içeren profilaktik tedavi grubu ve biyofilm oluşumu sonrası fotodinamik tedavi uygulanan kateterleri içeren terapötik tedavi grubunu içermektedir. Deneyler, ortam ışığının fotoinaktivasyon sonucunu etkilememesi için tamamen karanlık alanda gerçekleştirilmiştir.



Resim 3.4. Farklı renklerde LED ile FDT uygulaması

Profilaktik fotodinamik tedavi

Profilaktik antimikrobiyal fotodinamik tedavi uygulaması, biyofilm oluşumu basamağından önce her bir katetere bir defa yapılmıştır. Fotosensitizasyon 24 kuyucuklu steril hücre plağı içerisinde uygulanmıştır. Kuyucukların içerisine 1000 µg/ml konsantrasyonda 1 ml fotosensitizör ve uygun bulanıklıkta hazırlanmış 1 ml inokulum eklenerek kapağı kapatılan

plak, fotodinamik tedavi öncesi 5 dakika karanlıkta bekletilmiştir. FDT uygulamasında bu bekleme süresi ışınlama öncesi zaman olarak isimlendirilmektedir. FS ile muamele edilmesini takiben, fotosensitizöre uygun dalga boyunda ve renkte LED ışığa 15 dakika süre ile maruz bırakılmıştır. FDT uygulanan hücre süspansiyonu bekletilmeden profilaktik FDT deney grubu için biyofilm oluşum basamağında kullanılmıştır.

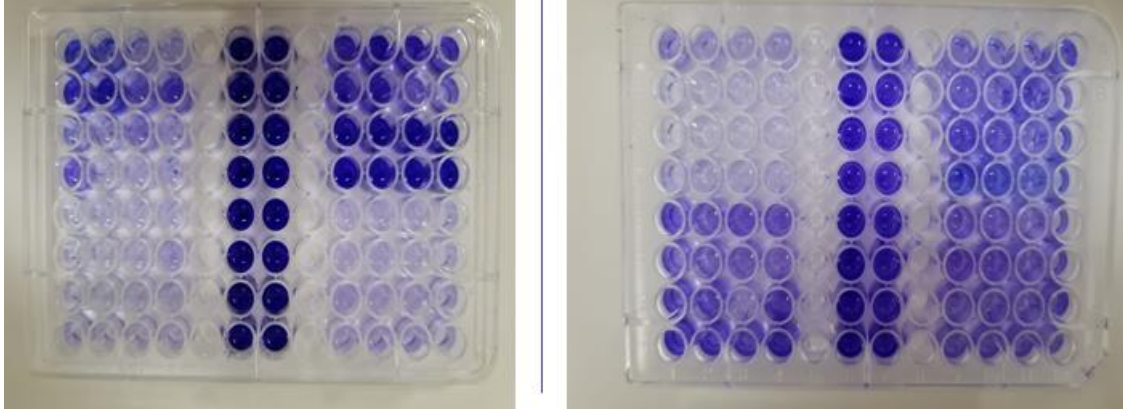
Terapötik fotodinamik tedavi

Terapötik antimikrobiyal fotodinamik tedavi uygulaması, biyofilm oluşumu basamağından sonra her bir katetere bir defa yapılmıştır. Terapötik antimikrobiyal fotodinamik tedavi uygulaması için üzerinde bakteriyel veya fungal biyofilm oluşturulan santral venöz kateter parçaları her kuyucukta bir kateter olacak şekilde 24 kuyucuklu steril hücre plağı içerisine alınmıştır. Kuyucuk içerisine 1000 µg/ml konsantrasyondaki fotosensitizörden 1 ml eklenmiştir. Işınlama öncesi karanlıkta bekleme süresi 5 dakikadır. Fotosensitizör ile muamele edilen kateterler, uygun dalga boyunda ve renkte LED ışığa 15 dakika süre ile maruz bırakılmıştır. FDT sonrası kateter parçaları yeni bir kuyucuğa alınarak 1 ml PBS ile üç kez yıkanmış ve oda ısısında kurumaya bırakılmıştır.

3.4.6. Kristal viyole testi ile biyofilm biyokütlesinin ölçümü

Biyofilm biyokütlesinin varlığının tespiti ve kantitatif ölçümü için kristal viyole ile boyama yöntemi kullanılmıştır. Kristal viyole ile boyama yöntemi, Misba ve ark. [197] ve Winter ve ark. [198] kullandıkları metotlar modifiye edilerek belirlenmiştir. Üzerinde biyofilm içeren kontrol ve deney grubundaki kateterler, her kuyucukta bir kateter segmenti olacak şekilde 24 kuyucuklu yeni bir plağa aktarılmıştır. Kuyucuklara %0,5 konsantrasyonda kristal viyole boyasından 1 ml eklenerek 15 dakika süre ile bekletilmiştir. Bu aşamada kateterin yüzeyine biyofilm ile tutunmuş olan mikroorganizmalar boyanmaktadır. Boyama aşamasından sonra kateterlere 1 ml steril distile su ile 3 kez yıkama işlemi uygulanmış ve biyofilm yapısına katılmayan maddeler yıkama aşamasıyla uzaklaştırılmıştır. Yıkama sonrasında kateterler oda ısısında kurumaya bırakılmıştır. Kuruyan kateter segmentleri hücre plağında yeni bir kuyucuğa aktarılmıştır. Kristal viyole ile boyanan kateterlerin üzerine %33'lük 1 ml glasiyel asetik asit eklenmiş ve biyofilme bağlanan boyanın çözünmesi için çalkalayıcıda 100 rpm'da 5 dakika süre ile bekletilmiştir. Glasiyel asetik asit, kateterdeki kristal viyole ile boyalı

biyofilm kütlesinin dolaylı olarak ölçümüne olanak sağlamaktadır. Kuyucuk içerisinden alınan 200 µl sıvı, 96 kuyucuklu düz tabanlı mikropalak içerisine aktarılmıştır (Resim 3.5.).



Resim 3.5. Kristal viyole testi optik dansite okuma plakları

Çözülmüş olan boya miktarı spektrofotometrik olarak değerlendirilmiştir. Kristal viyole deneyi uygulanan kateterlere ait optik dansite değerleri dalga boyu 630 nm olan filtre ile optik ELİSA okuyucuda ölçülmüştür. Güvenilirliği arttırmak amacıyla her grupta kuyucuk içerisinden alınan sıvı, mikropalak içerisinde dört farklı kuyucuğa aktarılmış ve dört okuma yapılmıştır. Elde edilen optik dansite değerlerinin ortalaması alınarak absorbans verisi belirlenmiştir. Deney grubunda yer alan kateterlerde azalan veya yok olan biyofilm yapısı, tedavi uygulanmayan biyofilm içeren kontrol grubu kateterlerine ait absorbans değerleriyle karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

3.4.7. İstatiksel analiz

Çalışmada kontrol ve deney gruplarının her birinde 5 kateter segmenti kullanılmıştır ve her kateter segmentine ait ortalama absorbans değerleri baz alınarak Excel (Microsoft, USA) programına veri girişi yapılmıştır. Veriler Excel programında düzenlendikten sonra SPSS 29.0 IBM programı kullanılarak analiz edilmiştir. Sayısal veriler ortalama, standart sapma ve medyan değerleri ile ifade edilmiştir. Her grupta bulunan veri sayısının 30'un altında olması sebebiyle parametrik olmayan testler uygulanmıştır. Her mikroorganizmaya ait deney ve kontrol grupları arasındaki farklılığı analiz etmek amacıyla parametrik olmayan bir test olan Kruskal-Wallis testinden yararlanılmıştır. Farklılığın hangi değişkenler arasında olduğunu saptanması Bonferroni düzeltmeli post hoc analizi kullanılarak yapılmıştır.

P değerinin 0,05'in altında bulunduğu analiz sonuçları istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

3.4.8. Hücre canlılığı testi

Hücre canlılığı analizi testi, Austin ve ark. [199] kullandıkları metot modifiye edilerek uygulanmıştır. Hücre canlılığı analizi için kontrol ve tedavi gruplarındaki kateter parçaları her bir kuyucukta tek bir kateter olacak şekilde 24 kuyucuklu plaklara yerleştirilmiştir. Bakteriyel biyofilm içeren kateterler için Tryptic Soy Broth (TSB), fungal biyofilm içeren kateterler için Sabouraud Dekstrozo Broth (SDB) besiyeri kullanılmıştır. Kuyucuklara 2 ml uygun besiyeri eklendikten sonra plaklar 37 °C'de etüvde 48 saat inkübe edilmiştir.

Her kateter segmentinin bulunduğu kuyucuktan alınan üst sıvı seri dilüsyon metodu uygulanarak PBS ile seyreltilmiştir. Dilüsyondan alınan 10 µl sıvının uygun katı besiyeri içeren çift plağa yaygın ekimi yapılmıştır. Besiyeri olarak *Staphylococcus* suşları için Tryptic Soy Agar (TSA), *Candida* suşları için Sabouraud Dektrozo Agar (SDA) kullanılmıştır. Etüvde 37 °C'de 48 saat inkübasyon sonrası besiyerinde koloni sayımı yapılarak kob/ml'de hücre sayısı hesaplanmıştır. Hücre canlılığı deneyi sonucunda her mikroorganizma için elde edilen değerlerin on tabanına göre logaritması alınarak deney ve kontrol grupları karşılaştırılmıştır.

3.4.9. Taramalı elektron mikroskopu (SEM) örnek hazırlanması ve analizi

Taramalı elektron mikroskopu analizi için örnek hazırlama yöntemi Costa ve ark. [200] ve Chandra ve ark. [201] kullandıkları metotlar modifiye edilerek belirlenmiştir. Uygulanan tedavi sonrası kateterler, her kuyucukta bir kateter olacak şekilde içerisinde %2,5 konsantrasyonda, 2 ml gluteraldehit içeren yeni plağa aktarılmıştır. Işık almayacak şekilde alüminyum folyo ile kaplanan plaklar +4°C'de buzdolabında bir gece bekletilmiştir. Fikse edilen kateter parçaları steril pens yardımıyla gluteraldehit solüsyonu içerisinde çıkarılarak temiz bir kuyucuğa aktarılmıştır ve dehidrasyon aşamasına geçilmiştir.

Her katetere sırasıyla %25, %50, %75 ve %95 konsantrasyonlarda 2 ml etil alkol eklenerek, her konsantrasyonda 15 dakika bekleme sonrası sıvı aspire edilmiştir. Dehidrasyonun son aşamasında kateterler %100 konsantrasyonda 2 ml etil alkol içerisinde 15 dakika bekletilmiş

ve aspire edilmiştir, bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir. SEM hazırlık aşaması tamamlanan kateter parçaları oda ısısında 24 saat bekletilerek kurutulmuştur. Görüntüleme öncesi örneklerin iletken olmaması sebebiyle püskürtmeli kaplama cihazı (Polaron, İngiltere) ile kateterlere 3 nm kalınlığında altın-paladyum (Au-Pd) kaplama yapılmıştır (Resim 3.6.)



Resim 3.6. Püskürtmeli Au-Pd kaplama cihazı

Taramalı elektron mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) analizi, Orta Doğu Teknik Üniversitesi (ODTÜ) Merkez Laboratuvarı AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezinde bulunan QUANTA 400F Field Emission SEM (Oregon, USA) (Resim 3.7.) cihazı ile gerçekleştirilmiştir. Biyofilmdeki etki, başlangıçtaki biyofilm kontrolü görüntüleri ile anlamlı bulunan tedavi gruplarındaki kateter görüntüleri karşılaştırılarak görsel olarak değerlendirilmiştir.



Resim 3.7. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

4. BULGULAR

4.1. Biyofilm Biyokütle Ölçümünün İstatistiksel Analizinin Değerlendirilmesi

Kristal viyole ile boyanan kateterlerin absorbans ölçümü yapılarak tüm çalışma gruplarında biyofilm varlığı ve miktarı tespit edilmiştir. Tedavi gruplarında yer alan kateterlerde biyofilm biyokütlesindeki değişim, tedavi uygulanmayan biyofilm içeren kateterlere ait absorbans değerleriyle karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

4.1.1. Profilaktik FDT grubuna ait biyofilm biyokütlesi bulguları

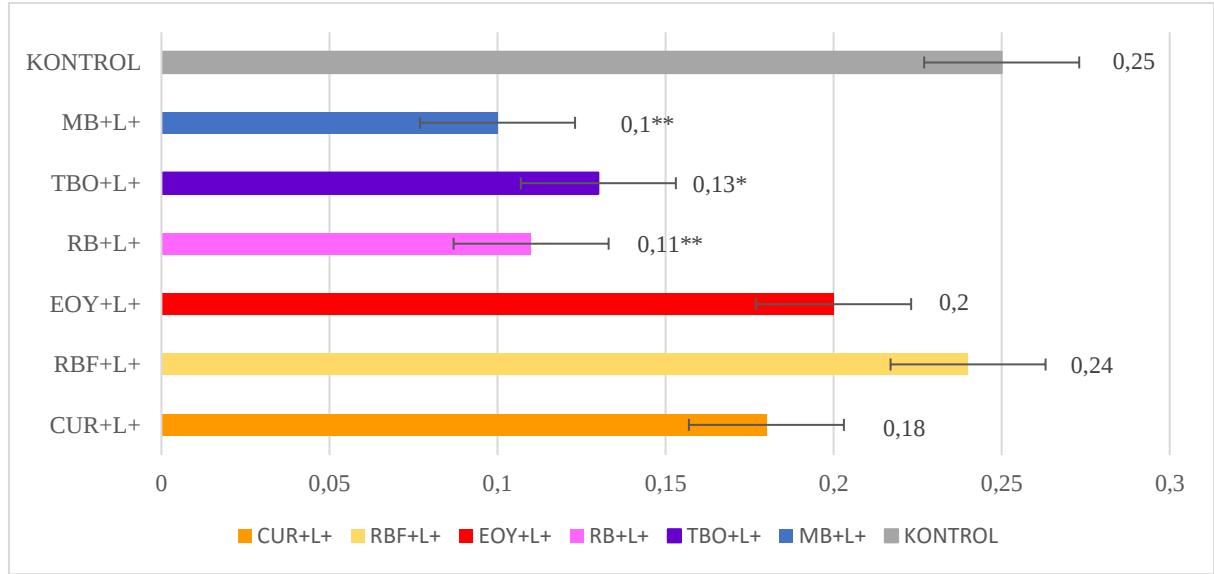
Staphylococcus aureus biyofilmine uygulanan profilaktik FDT sonrası elde edilen optik dansite değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.1’te belirtilmiştir.

Çizelge 4.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi

		<i>S. aureus</i> -Profilaktik FDT				
Grup		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum
Kontrol (FS-LED-)		0,25	0,05	0,24	0,21	0,33
Metilen mavisi+LED		0,10	0,02	0,10	0,07	0,13
Toluidin mavisi O+LED		0,13	0,02	0,13	0,10	0,16
Rose Bengal+LED		0,11	0,03	0,09	0,09	0,16
Eozin Y+LED		0,20	0,05	0,22	0,14	0,24
Riboflavin+LED		0,24	0,03	0,26	0,19	0,26
Kurkumin+LED		0,18	0,01	0,19	0,17	0,20

Kruskal-Walis Testi, $p<,05^*$; $p<,001^{**}$

Analiz sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar içeren gruplar mevcuttur. Yapılan Bonferroni düzeltmeli post hoc analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile metilen mavisi ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,001$), toluidin mavisi O ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,05$), rose bengal ve yeşil LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,001$) arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *S. aureus* için en etkili profilaktik fotodinamik tedavinin metilen mavisi ve kırmızı LED kombinasyonu olduğu ifade edilmiştir ($0,10\pm0,02$).



Şekil 4.1. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Staphylococcus epidermidis biyofilmine uygulanan profilaktik FDT sonrası elde edilen optik dansite değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.2’de belirtilmiştir.

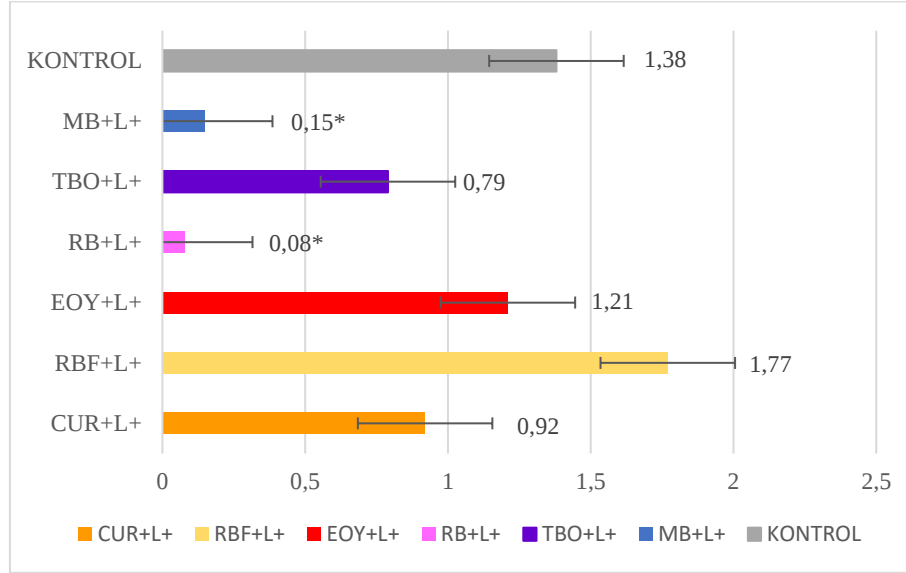
Çizelge 4.2. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi

		<i>S. epidermidis</i> -Profilaktik FDT					
		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p değeri
Grup	Kontrol (FS-LED-)	1,38	0,09	1,34	1,27	1,50	
	Metilen mavisi+LED	0,15	0,06	0,16	0,09	0,23	0,019*
	Toluidin mavisi O+LED	0,79	0,37	0,85	0,38	1,32	0,229
	Rose Bengal+LED	0,08	0,02	,08	0,06	0,10	0,001*
	Eozin Y+LED	1,21	0,33	1,40	0,72	1,48	0,781
	Riboflavin+LED	1,77	0,47	1,60	1,43	2,58	0,308
	Kurkumin+LED	0,92	0,78	0,89	0,14	1,76	0,517

Kruskal-Walis Testi, $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{**}$

Analiz sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar içeren deney grupları mevcuttur. Yapılan Bonferroni düzeltmeli post hoc analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile metilen mavisi ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p < 0,05$), rose bengal ve yeşil LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p < 0,05$) arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *S. epidermidis* için en etkili profilaktik fotodinamik tedavinin rose bengal ve yeşil LED kombinasyonu olduğu ifade edilmiştir ($0,08 \pm 0,02$).



Şekil 4.2. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Candida albicans biyofilmine uygulanan profilaktik FDT sonrası elde edilen optik dansite değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.3'te belirtilmiştir.

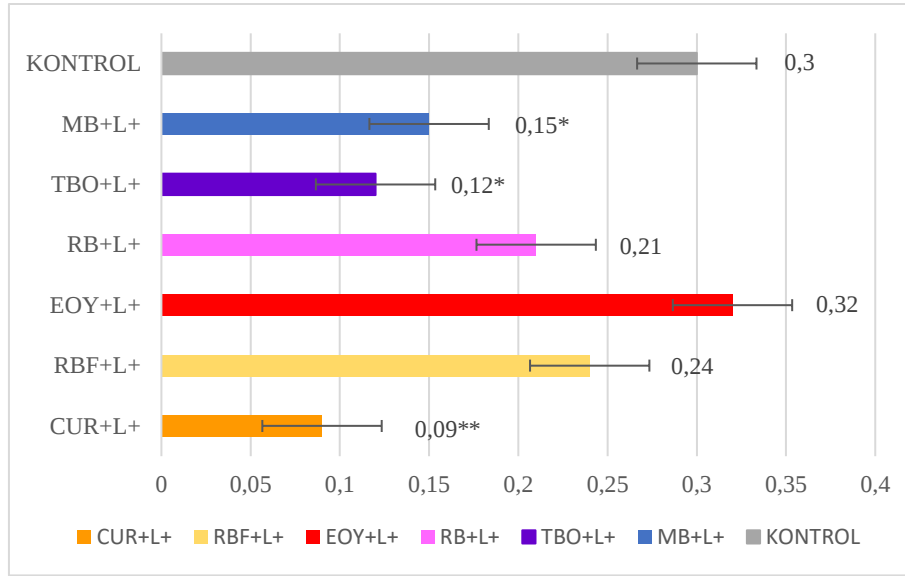
Çizelge 4.3. *Candida albicans* ATCC 10231 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi

		<i>C. albicans</i> - Profilaktik FDT					
		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p değeri
Grup	Kontrol (FS-LED-)	0,30	0,03	0,28	0,27	0,34	
	Metilen mavisi+LED	0,15	0,06	0,11	0,10	0,23	0,036*
	Toluidin mavisi O+LED	0,12	0,04	0,11	0,08	0,19	0,008*
	Rose Bengal+LED	0,21	0,08	0,24	0,10	0,29	0,247
	Eozin Y+LED	0,32	0,17	0,43	0,12	0,45	0,865
	Riboflavin+LED	0,24	0,08	0,28	0,10	0,28	0,413
	Kurkumin+LED	0,09	0,01	0,08	0,07	0,10	<0,001**

Kruskal-Walis Testi, $p < 0,05^*$; $p < 0,001^{**}$

Analiz sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar içeren deney grupları mevcuttur. Yapılan Bonferroni düzeltilmeli post hoc analizi sonuçlarına göre kontrol grubu

ile metilen mavisi ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,05$), toluidin mavisi O ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,05$), kurkumin ve mavi LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,001$) arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *C. albicans* için en etkili profilaktik fotodinamik tedavinin kurkumin ve mavi LED kombinasyonu olduğu ifade edilmiştir ($0,09\pm0,01$).



Şekil 4.3. *Candida albicans* ATCC 10231 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütesinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

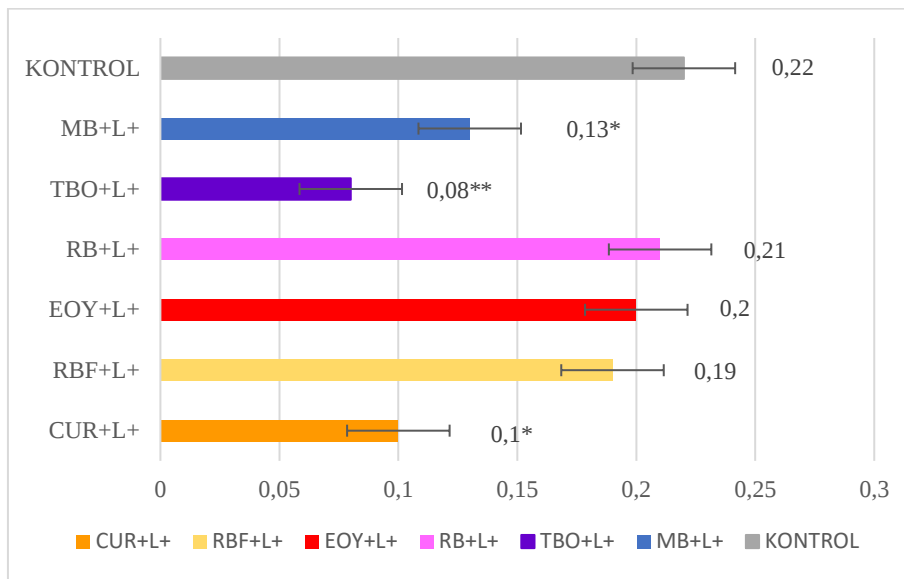
Candida parapsilosis biyofilmine uygulanan profilaktik FDT sonrası elde edilen optik dansite değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.4'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.4. *Candida parapsilosis* ATCC 96142 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi

<i>C. parapsilosis</i> - Profilaktik FDT							
Grup		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p değeri
Kontrol (FS-LED-)		0,22	0,01	0,22	0,21	0,24	
Metilen mavisi+LED		0,13	0,04	0,12	0,08	0,19	0,010*
Toluidin mavisi O+LED		0,09	0,01	0,09	0,08	0,11	<0,001**
Rose Bengal+LED		0,21	0,04	0,23	0,16	0,25	0,746
Eozin Y+LED		0,20	0,05	0,20	0,13	0,26	0,478
Riboflavin+LED		0,19	0,01	0,18	0,18	0,20	0,247
Kurkumin+LED		0,10	0,01	0,10	0,09	0,11	0,002*

Kruskal-Wallis Testi, $p<0,05^*$; $p<0,001^{**}$

Analiz sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılıkları içeren deney grupları mevcuttur. Yapılan Bonferroni düzeltilmeli post hoc analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile metilen mavisi ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,05$), toluidin mavisi O ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,001$), kurkumin ve mavi LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,05$) arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *C. parapsilosis* için en etkili profilaktik fotodinamik tedavinin toluidin mavisi ve kırmızı LED kombinasyonu olduğu ifade edilmiştir ($0,09\pm0,01$).



Şekil 4.4. *Candida parapsilosis* ATCC 96142 suşunun profilaktik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

4.1.2. Terapötik FDT grubuna ait biyofilm biyokütlesi bulguları

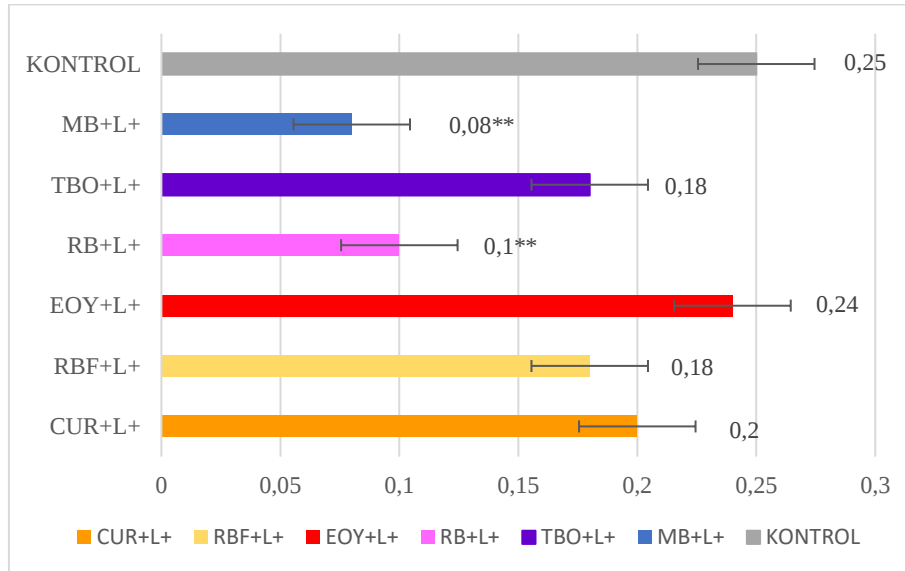
Staphylococcus aureus biyofilmine uygulanan terapötik FDT sonrası elde edilen optik dansite değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.5'te belirtilmiştir.

Çizelge 4.5. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi

		<i>S. aureus</i> -Terapötik FDT					
Grup		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p değeri
Kontrol (FS-LED-)		0,25	0,05	0,24	0,21	0,33	
Metilen mavisi+LED		0,08	0,00	0,09	0,08	0,09	<0,001**
Toluidin mavisi O+LED		0,18	0,04	0,20	0,12	0,21	0,066
Rose Bengal+LED		0,10	0,00	0,10	0,10	0,11	<0,001**
Eozin Y+LED		0,24	0,04	0,24	0,20	0,29	0,688
Riboflavin+LED		0,18	0,04	0,18	0,13	0,23	0,056
Kurkumin+LED		0,20	0,02	0,20	0,17	0,23	0,211

Kruskal-Walis Testi, $p<0,05^*$; $p<0,001^{**}$

Analiz sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar içeren deney grupları mevcuttur. Yapılan Bonferroni düzeltmeli post hoc analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile metilen mavisi ve kırmızı LED tedavisi alan deney grubu ($p<0,001$), rose bengal ve yeşil LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,001$) arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *S. aureus* için en etkili terapötik fotodinamik tedavinin metilen mavisi ve kırmızı LED kombinasyonu olduğu ifade edilmiştir ($0,08\pm0,00$).



Şekil 4.5. *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

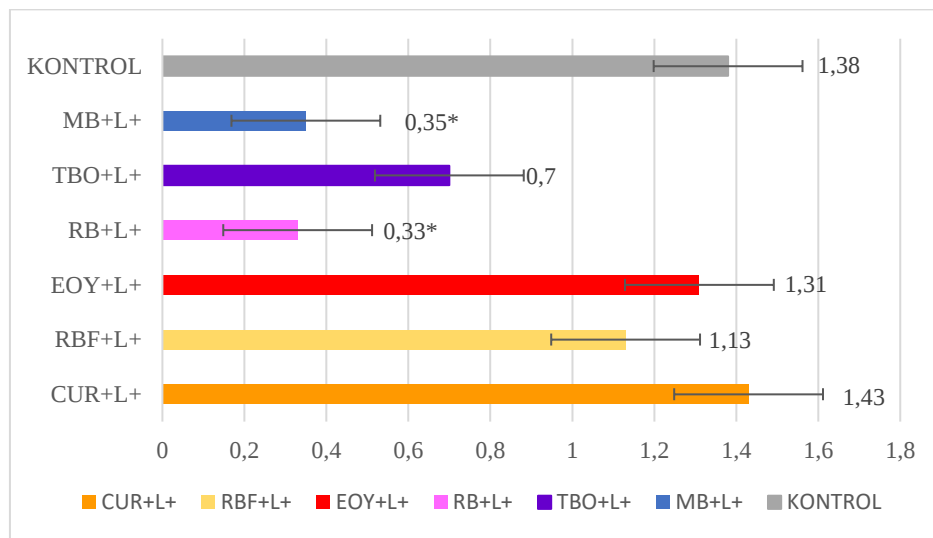
Staphylococcus epidermidis biyofilmine uygulanan terapötik FDT sonrası elde edilen optik dansite değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.6’da belirtilmiştir.

Çizelge 4.6. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümü istatistik analizi

		<i>S. epidermidis</i> -Terapötik FDT					p değeri
		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	
Grup	Kontrol (FS-LED-)	1,38	0,09	1,34	1,27	1,50	
	Metilen mavisi+LED	0,35	0,27	0,25	0,14	0,82	0,009*
	Toluidin mavisi O+LED	0,70	0,47	0,51	0,33	1,49	0,115
	Rose Bengal+LED	0,33	0,24	0,19	0,13	0,66	0,006*
	Eozin Y+LED	1,31	0,40	1,43	0,85	1,81	0,926
	Riboflavin+LED	1,13	0,59	1,43	0,34	1,64	0,769
	Kurkumin+LED	1,43	0,17	1,38	1,24	1,65	0,829

Kruskal-Walis Testi, $p<0,05^*$; $p<0,001^{**}$

Analiz sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar içeren gruplar mevcuttur. Yapılan Bonferroni düzeltmeli post hoc analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile metilen mavisi ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,05$), rose bengal ve yeşil LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,05$) arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *S. epidermidis* için en etkili terapötik fotodinamik tedavinin rose bengal ve yeşil LED kombinasyonu olduğu ifade edilmiştir ($0,33\pm0,24$).



Şekil 4.6. *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

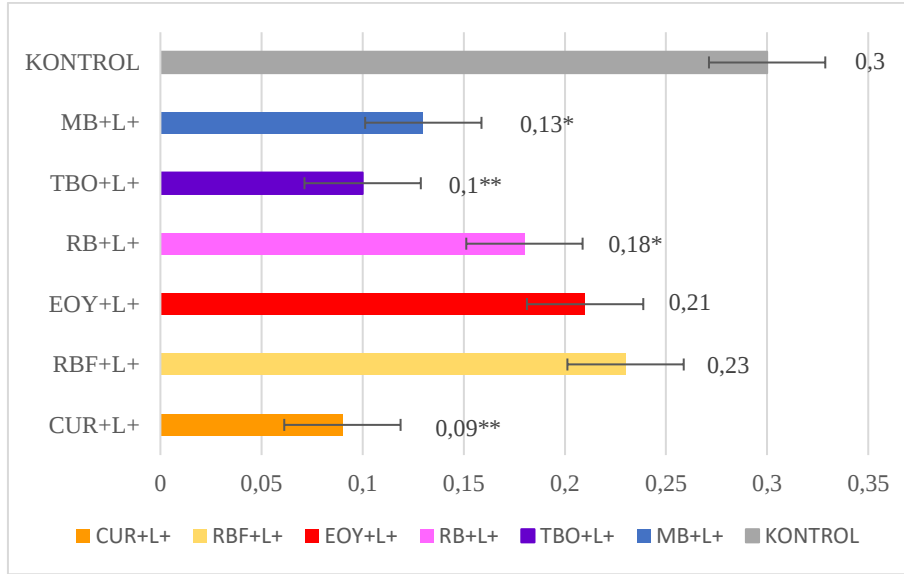
Candida albicans biyofilmine uygulanan terapötik FDT sonrası elde edilen optik dansite değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan analiz sonuçları Çizelge 4.7’de belirtilmiştir.

Çizelge 4.7. *Candida albicans* ATCC 10231 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümü istatistik analizi

		<i>C. albicans</i> – Terapötik FDT					p değeri
		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	
Grup	Kontrol (FS-LED-)	0,30	0,03	0,28	0,27	0,34	
	Metilen mavisi+LED	0,13	0,07	0,11	0,08	0,25	0,003*
	Toluidin mavisi O+LED	0,10	0,02	0,10	0,08	0,14	<0,001**
	Rose Bengal+LED	0,18	0,06	0,22	0,11	0,24	0,042*
	Eozin Y+LED	0,21	0,02	0,21	0,17	0,22	0,073
	Riboflavin+LED	0,23	0,05	0,26	0,17	0,27	0,206
	Kurkumin+LED	0,09	0,01	0,09	0,07	0,10	<0,001**

Kruskal-Walis Testi, $p<0,05^*$; $p<0,001^{**}$

Analiz sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar içeren deney grupları mevcuttur. Yapılan Bonferroni düzeltmeli post hoc analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile metilen mavisi ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu, rose bengal ve yeşil LED tedavisi uygulanan deney grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). Kontrol grubu ile toluidin mavisi ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu, kurkumin ve mavi LED tedavisi uygulanan deney grubu arasındaki fark istatistiksel açıdan daha anlamlı bulunmuştur ($p<0,001$). Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *C. albicans* için en etkili terapötik fotodinamik tedavi kurkumin ve mavi LED kombinasyonu iken ($0,09\pm0,01$), en az etki gösteren terapötik fotodinamik tedavinin riboflavin ve mavi LED kombinasyonu olduğu ifade edilmiştir ($0,23\pm0,05$).



Şekil 4.7. *Candida albicans* ATCC 10231 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

Candida parapsilosis biyofilmine uygulanan terapötik FDT sonrası elde edilen optik dansite değerlerinin gruplar arasında farklılık gösterip göstermediğini belirlemek amacıyla yapılan istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 4.8’de belirtilmiştir.

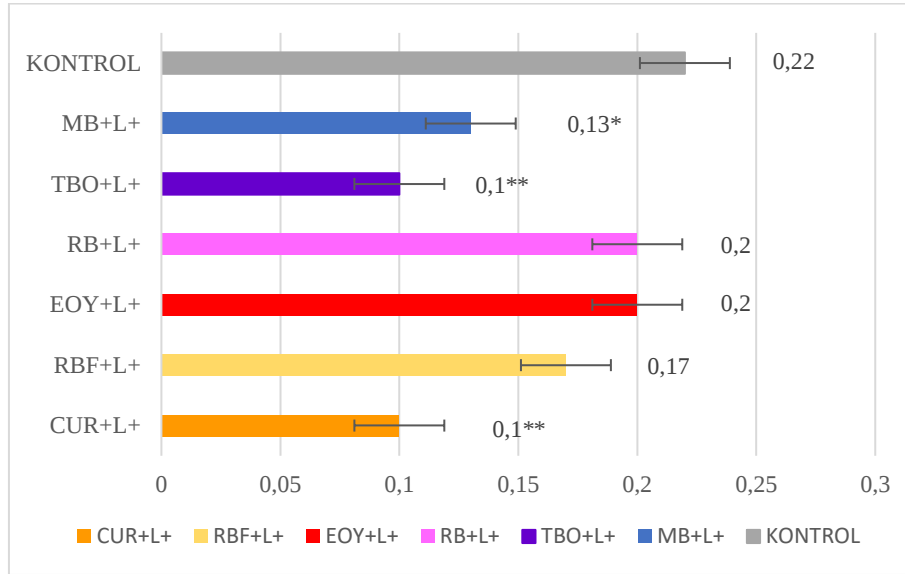
Çizelge 4.8. *Candida parapsilosis* ATCC 96142 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütle ölçümünün istatistik analizi

		<i>C. parapsilosis</i> – Terapötik FDT					
		Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Minimum	Maksimum	p değeri
Grup	Kontrol	0,22	0,01	0,22	0,21	0,24	
	Metilen mavisi+LED	0,13	0,01	0,13	0,11	0,15	0,005*
	Toluidin mavisi O+LED	0,10	0,02	0,09	0,08	0,13	<0,001**
	Rose Bengal+LED	0,20	0,03	0,20	0,17	0,24	0,241
	Eozin Y+LED	0,20	0,01	0,20	0,19	0,21	0,267
	Riboflavin+LED	0,17	0,04	0,19	0,12	0,21	0,052
	Kurkumin+LED	0,10	0,01	0,10	0,09	0,12	<0,001**

Kruskal-Walis Testi, p<,05*; p<,001**

Analiz sonuçlarına göre istatistiksel açıdan anlamlı farklılıklar içeren deney grupları mevcuttur. Yapılan Bonferroni düzeltilmeli post hoc analizi sonuçlarına göre kontrol grubu ile metilen mavisi ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,05$), toluidin mavisi ve kırmızı LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,001$), kurkumin ve mavi LED tedavisi uygulanan deney grubu ($p<0,001$) arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı bulunmuştur.

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında *C. parapsilosis* için en etkili terapötik fotodinamik tedavi kurkumin ve mavi LED ile toluidin mavisi O ve kırmızı LED kombinasyonudur. İki terapötik tedavi uygulamasının da aynı etkiye sahip olduğu ifade edilmiştir.

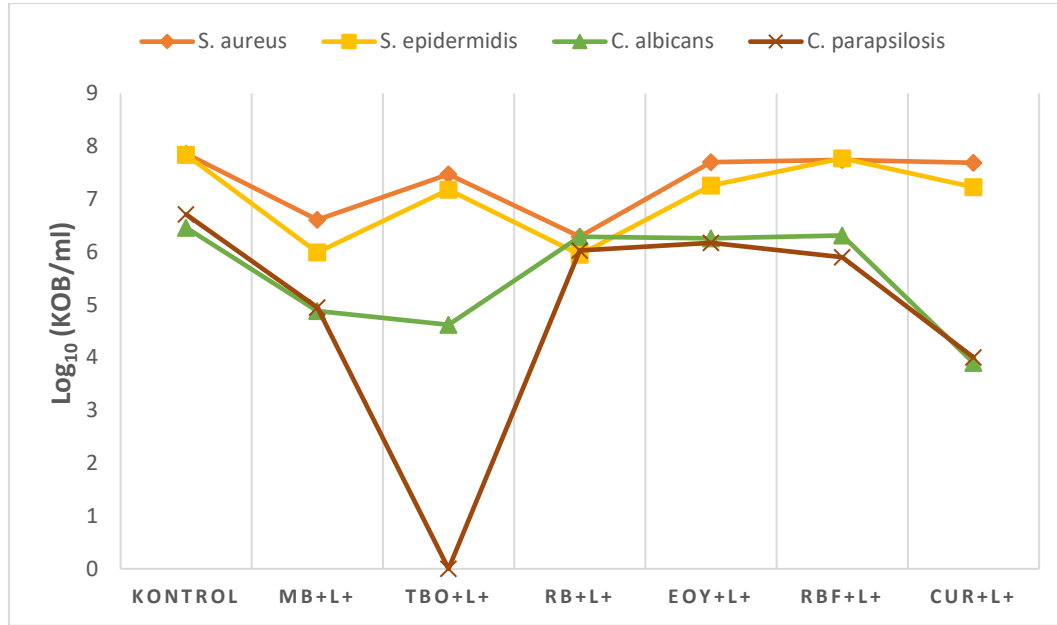


Şekil 4.8. *Candida parapsilosis* ATCC 96142 suşunun terapötik fotodinamik tedavi sonrası biyofilm kütlelerinin spektrofotometrik ölçüm sonuçları

4.2. Hücre Canlılığı Deneyinin Değerlendirilmesi

Kontrol ve deney gruplarında besiyerinde üremiş olan kolonilerin sayımı yapılarak, KOB/ml biriminde hesaplanmış ve on tabanında logaritması alınmıştır. Elde edilen sayısal veriler grafik yardımıyla gösterilmiştir. Hücre canlılığındaki değişim deney ve kontrol grupları karşılaştırılarak yorumlanmıştır.

4.2.1. Profilaktik FDT grubuna ait bulgular

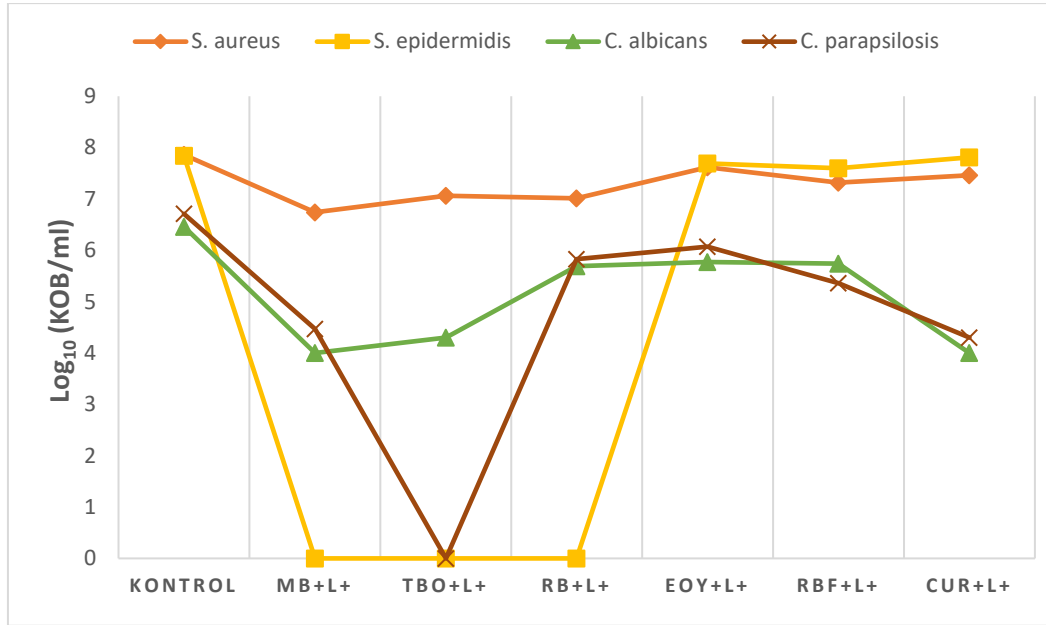


Şekil 4.9. Profilaktik tedavi sonucu hücre canlılığı grafiği

Çalışmada yer alan tüm mikroorganizmalar için profilaktik fotodinamik tedavi sonrası hücre canlılığı analizine ait grafik Şekil 4.9'da gösterilmektedir. *Staphylococcus aureus* canlılık analizinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en etkili profilaktik tedavi grupları 1,57 log₁₀ azalma ile rose bengal ve yeşil LED uygulamasıdır. Metilen mavisi ve kırmızı LED kombinasyonunun profilaktik uygulaması ile 1,25 log₁₀ azalma görülmektedir. *Staphylococcus epidermidis* canlılık analizinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en etkili profilaktik tedavi 1,89 log₁₀ azalma ile rose bengal ve yeşil LED uygulamasıdır. Metilen mavisi ve kırmızı LED kombinasyonunun profilaktik uygulaması ile 1,85 log₁₀ azalma görülmektedir.

Candida albicans canlılık analizinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en etkili profilaktik tedavi 2,56 log₁₀ azalma ile kurkumin ve mavi LED uygulamasıdır. Toluidin mavisi O ve kırmızı LED kombinasyonunun profilaktik uygulaması ile 1,84 log₁₀ azalma görülmektedir. Metilen mavisi ve kırmızı LED kombinasyonunun profilaktik uygulaması hücre canlılığında azalma oranı 1,58 log₁₀'dur. *Candida parapsilosis* canlılık analizinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en etkili profilaktik tedavi log 6,71 azalma ile toluidin mavisi O ve kırmızı LED kombinasyonudur. Kurkumin ve mavi LED kombinasyonunun profilaktik uygulaması ile hücre canlılığında 2,71 log₁₀ azalma görülmektedir.

4.2.2. Terapötik FDT grubuna ait bulgular



Şekil 4.10. Terapötik tedavi sonrası hücre canlılığı grafiği

Çalışmada yer alan tüm mikroorganizmalar için terapötik fotodinamik tedavi sonrası hücre canlılığı analizine ait grafik Şekil 4.10'da gösterilmektedir. *Staphylococcus aureus* canlılık analizinde, kullanılan bütün fotosensitizör ve LED tedavileri sonucunda görülen logaritmik azalma miktarı benzerdir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en etkili terapötik tedavi grubu, hücre canlılığında 1,12 log₁₀ azalma ile metilen mavisi ve kırmızı LED kombinasyonudur. Rose bengal ve yeşil LED kombinasyonunun terapötik uygulaması ile hücre canlılığında azalma 0,85 log₁₀ iken toluidin mavisi O ve kırmızı LED ile 0,80 log₁₀'dur. *Staphylococcus epidermidis* canlılık analizinde metilen mavisi ve kırmızı LED, toluidin mavisi O ve kırmızı LED, rose bengal ve yeşil LED ile uygulanan terapötik tedaviler bakterisidal etkilidir. Tedavi sonrası besiyerinde üreme görülmemektedir. Hücre canlılığında 7,84 log₁₀ azalma mevcuttur.

Candida albicans canlılık analizinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en etkili terapötik tedavi grupları metilen mavisi ve kırmızı LED ile kurkumin ve mavi LED uygulamalarıdır. İki tedavi grubu hücre canlılığında 2,46 log₁₀ azalma ile benzer etki göstermektedir. *Candida parapsilosis* canlılık analizinde, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında en etkili terapötik tedavi 6,71 log₁₀ azalma ile toluidin mavisi O ve kırmızı LED uygulamasıdır.

Bu tedavi mantar hücreleri için fungisidal etkiye sahiptir, tedavi sonrası besiyerinde üreme görülmemektedir. Kurkumin ve mavi LED kombinasyonunun terapötik uygulaması ile hücre canlılığında azalma $2,41 \log_{10}$ 'dur.

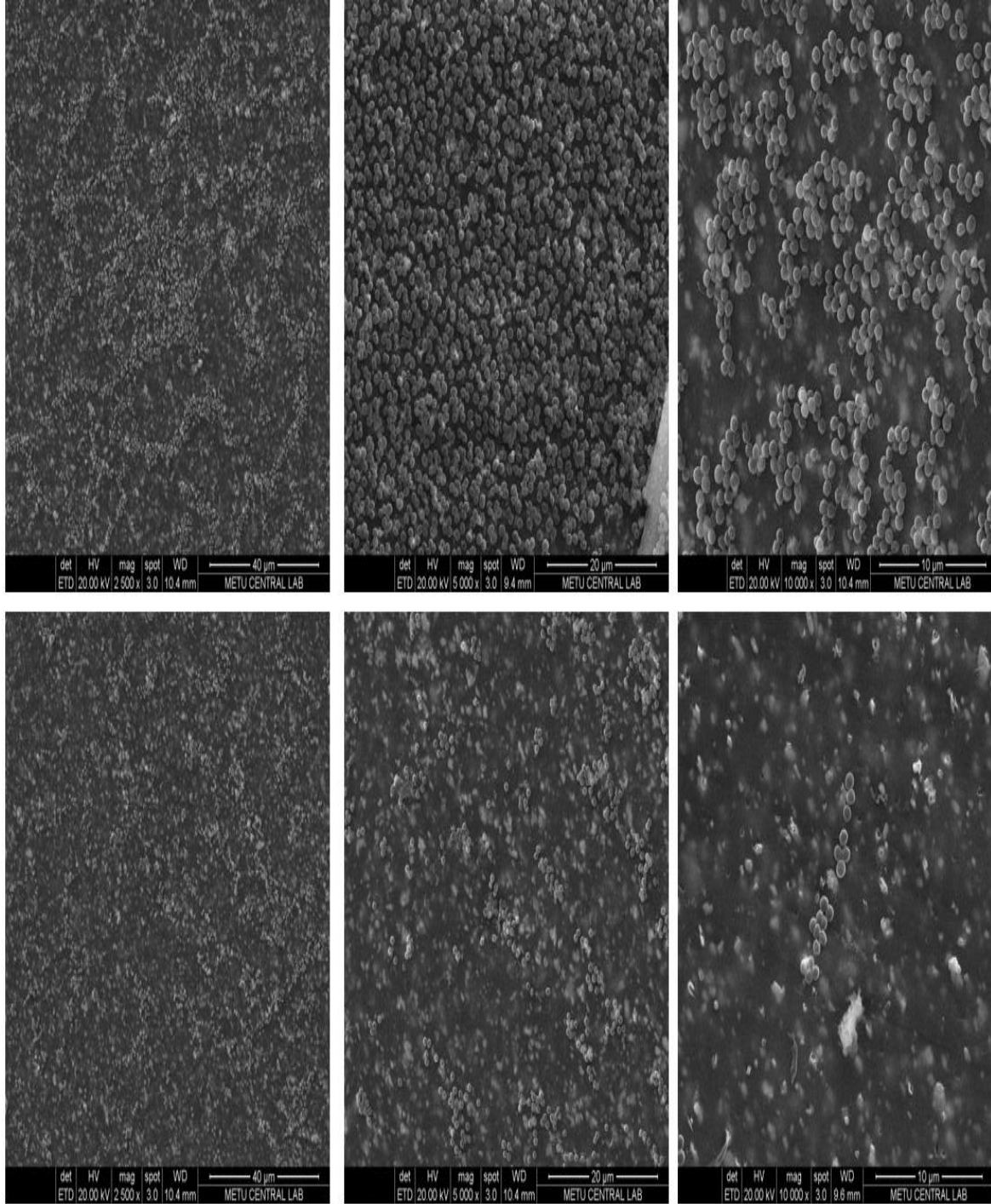
4.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizi Sonuçları

Taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenen biyofilm yapısındaki değişiklikler, tedavi uygulanmayan biyofilm görüntüleri ile kantitatif deneylerde anlamlı bulunan tedavi gruplarındaki biyofilm görüntüleri karşılaştırılarak görsel olarak değerlendirilmiştir.

4.3.1. Profilaktik fotodinamik tedavinin antibiyofilm etkisinin SEM ile incelenmesi

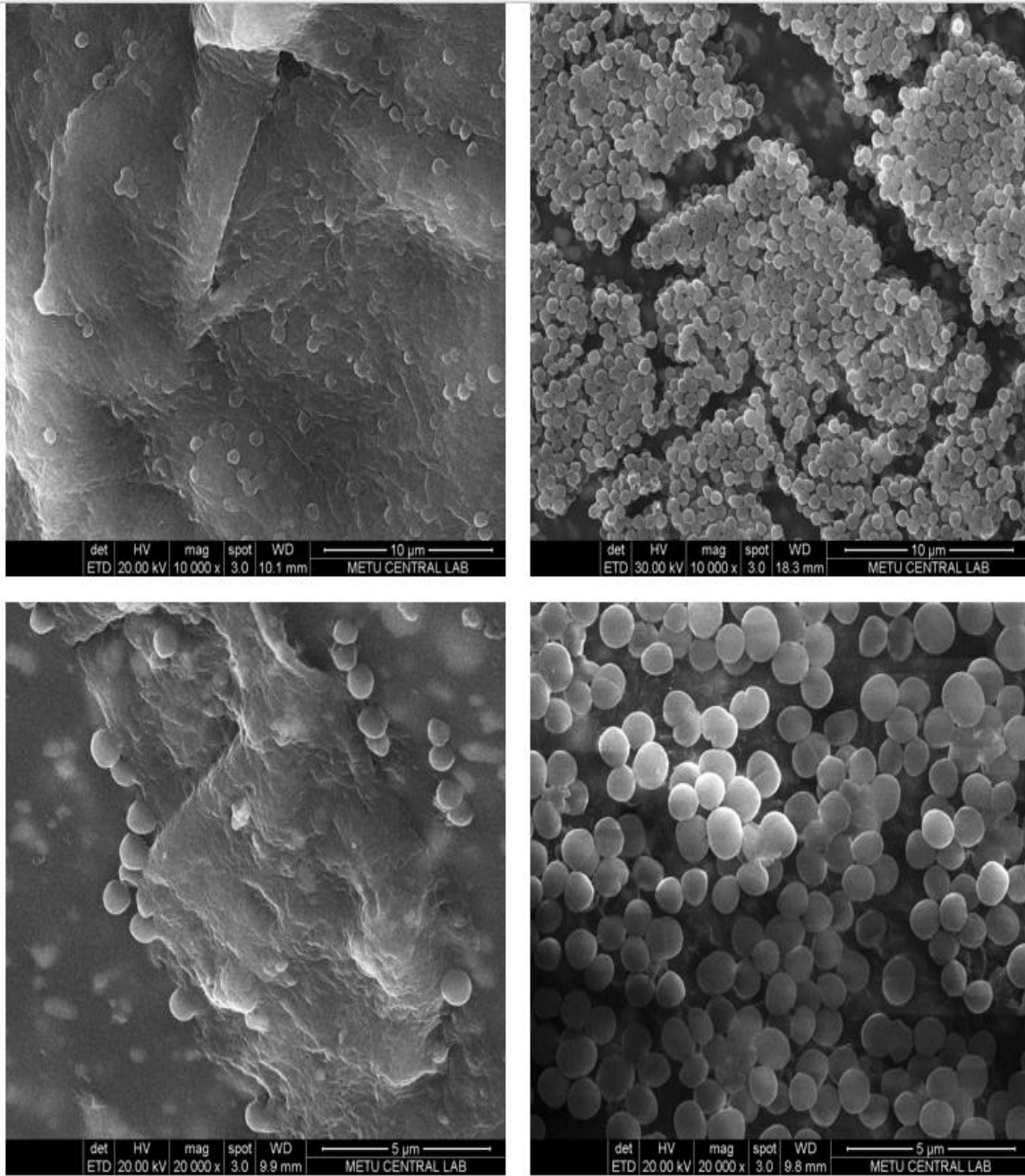
İn vitro kateter modelinde fotodinamik tedavinin profilaktik etkisi SEM analizi ile elde edilen görseller aracılığıyla Resim 4.1., 4.2., 4.3. ve 4.4.'te gösterilmektedir. Biyofilm oluşum basamağından önce mikroorganizmalara uygulanan FDT etkinliği, kontrol grubuna ait görsellerle karşılaştırılmış ve biyofilm yapısının oluşumundaki değişiklikler gözlemlenmiştir.

Staphylococcus aureus kontrol grubunda yer alan bakteriler, yoğun bir şekilde kümelenen sıkıştırılmış hücre toplulukları halinde görüntülenmektedir. *S. aureus* fotodinamik tedaviye (MB+L+) maruz bırakıldığında, biyofilm oluşumu sırasında katetere yapışan bakteri sayısında azalma gözlenmektedir. Ayrıca, bakteriler normal biyofilm düzeninden farklı olarak kateter yüzeyinde dağınık halde yerleşim göstermektedir (Resim 4.1.).



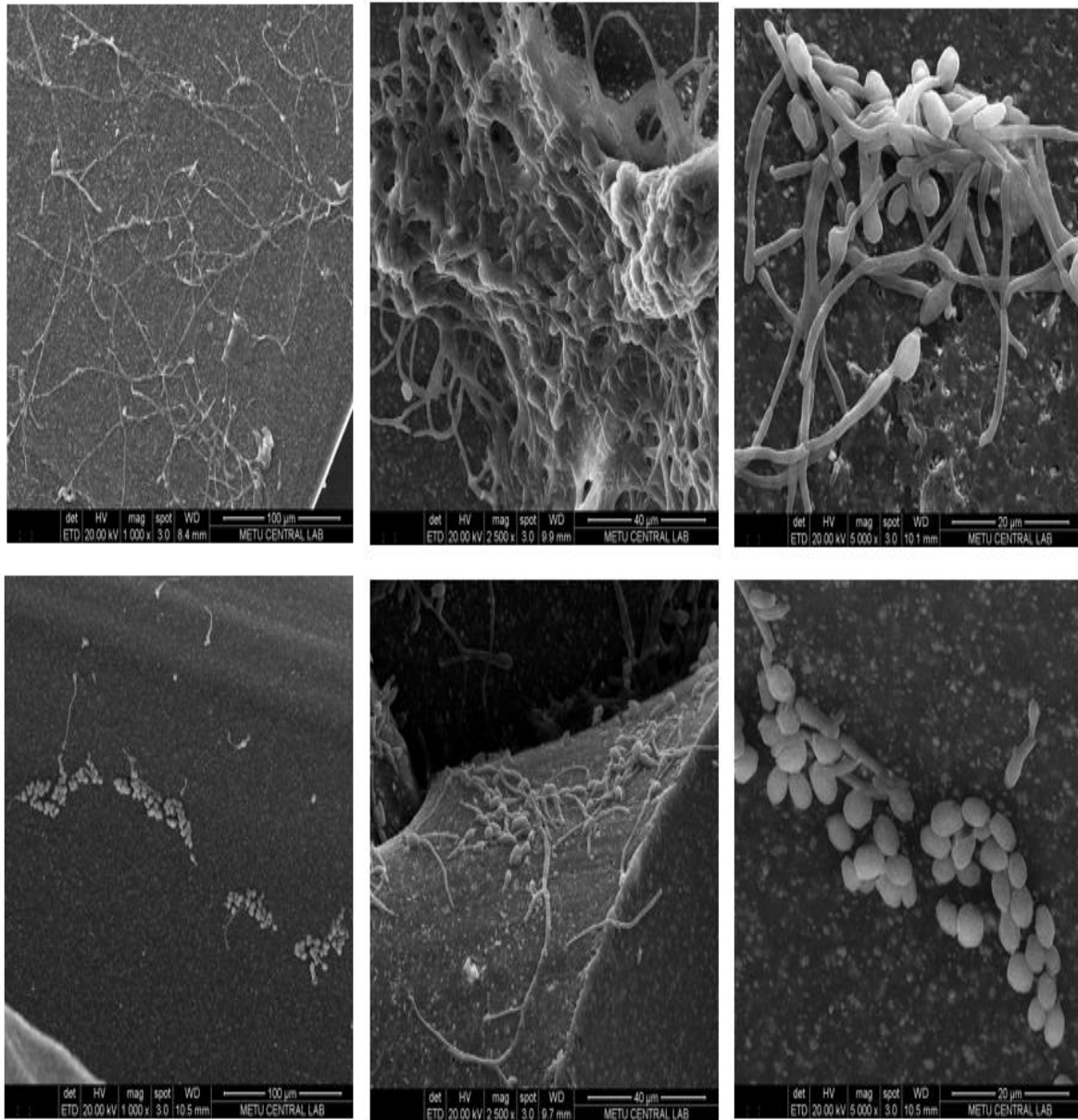
Resim 4.1. Kateter yüzeyinde *Staphylococcus aureus* biyofilmi SEM analizi, kontrol (üstte) ile MB+L profilaktik FDT (altta) görüntüleri

Kontrol grubunda yer alan *Staphylococcus epidermidis* bakterileri, biyofilm içerisinde hücre dışı polisakkarit matrikse gömülü halde bulunmaktadır. Fotodinamik tedavi (RB+L+), biyofilmdeki *S. epidermidis* hücrelerinin yapışkan bir yapı oluşturma kabiliyetini bozmaktadır. FDT uygulanan bakterilerin biyofilm oluşumu incelendiğinde, ekstraselüler polimerik madde (EPS) içermediği görülmektedir (Resim 4.2.).



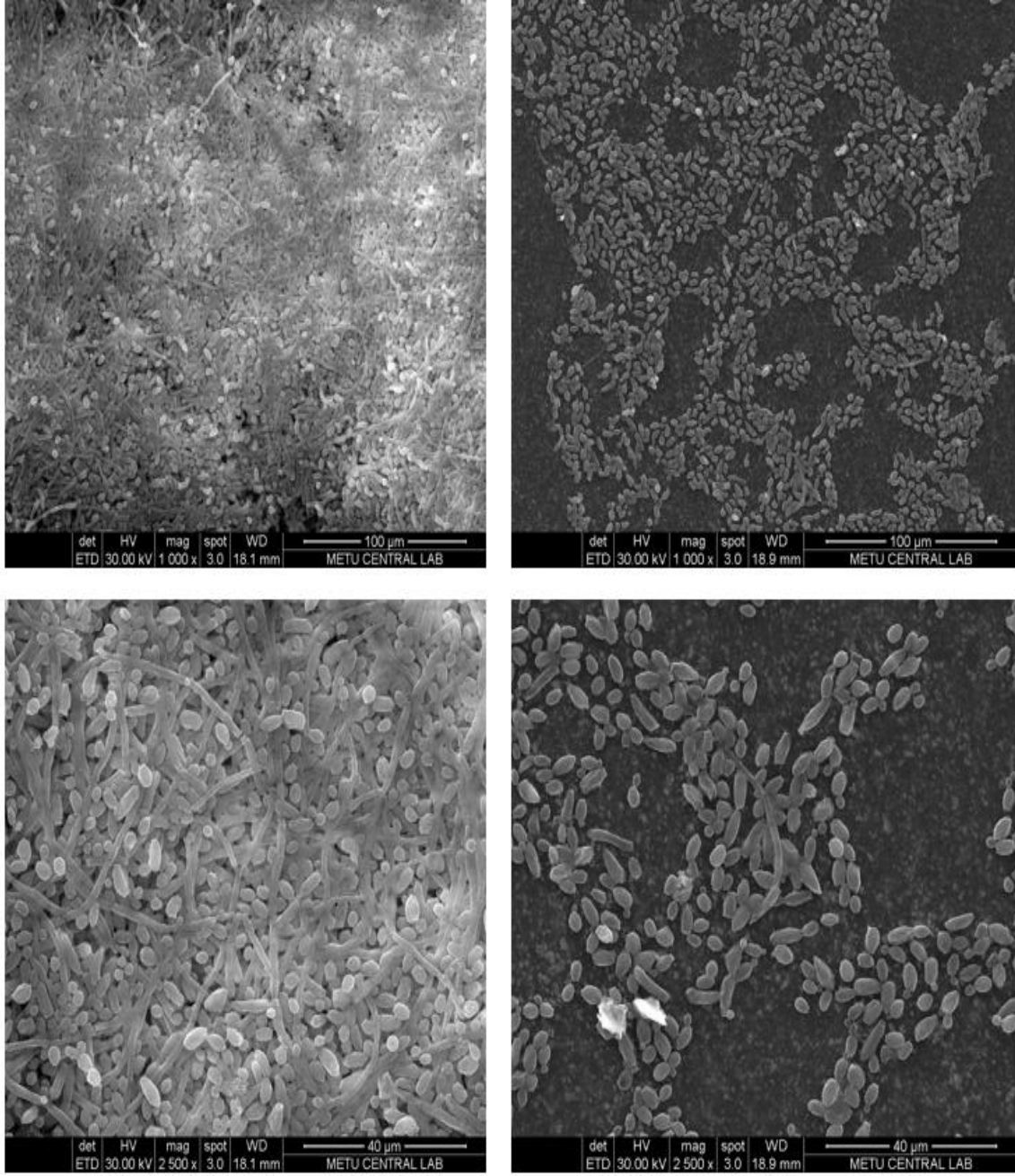
Resim 4.2. Kateter yüzeyinde *Staphylococcus epidermidis* biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile RB+L profilaktik FDT (sağda) görüntüleri

Candida albicans kontrol grubundaki biyofilmlerin SEM analizinde blastokonidya, psöдохif ve hiflerden oluşan karmaşık bir yapı görülmesiyle beraber hücre dışı polisakkarit matriks de tespit edilmiştir. Fotodinamik tedavi (CUR+L+) uygulaması sonrası *C. albicans* biyofilm oluşumu esnasında özellikle filamentöz formlarında azalma sergilemektedir. Ayrıca, kateterde EPS oluşumu görülmemektedir (Resim 4.3.).



Resim 4.3. Kateter yüzeyinde *Candida albicans* biyofilmi SEM analizi, kontrol (üstte) ile CUR+L profilaktik FDT (altta) görüntüleri

Candida parapsilosis kontrol grubundaki biyofilmin SEM görüntüleri *C. albicans* biyofilminin özelliklerine benzerdir, ancak *C. parapsilosis* biyofilmi daha az sayıda filamentöz form içermektedir. Ayrıca, mikroorganizmalar yoğun hücre kümeleri halinde görüntülenmelerine rağmen hücre dışı polisakkarit matriks tespit edilmemiştir. Fotodinamik tedavi (TBO+L+) sonrası biyofilm oluşumunda hem maya hem de filamentlerin sayısında büyük bir azalma görülmektedir (Resim 4.4.).

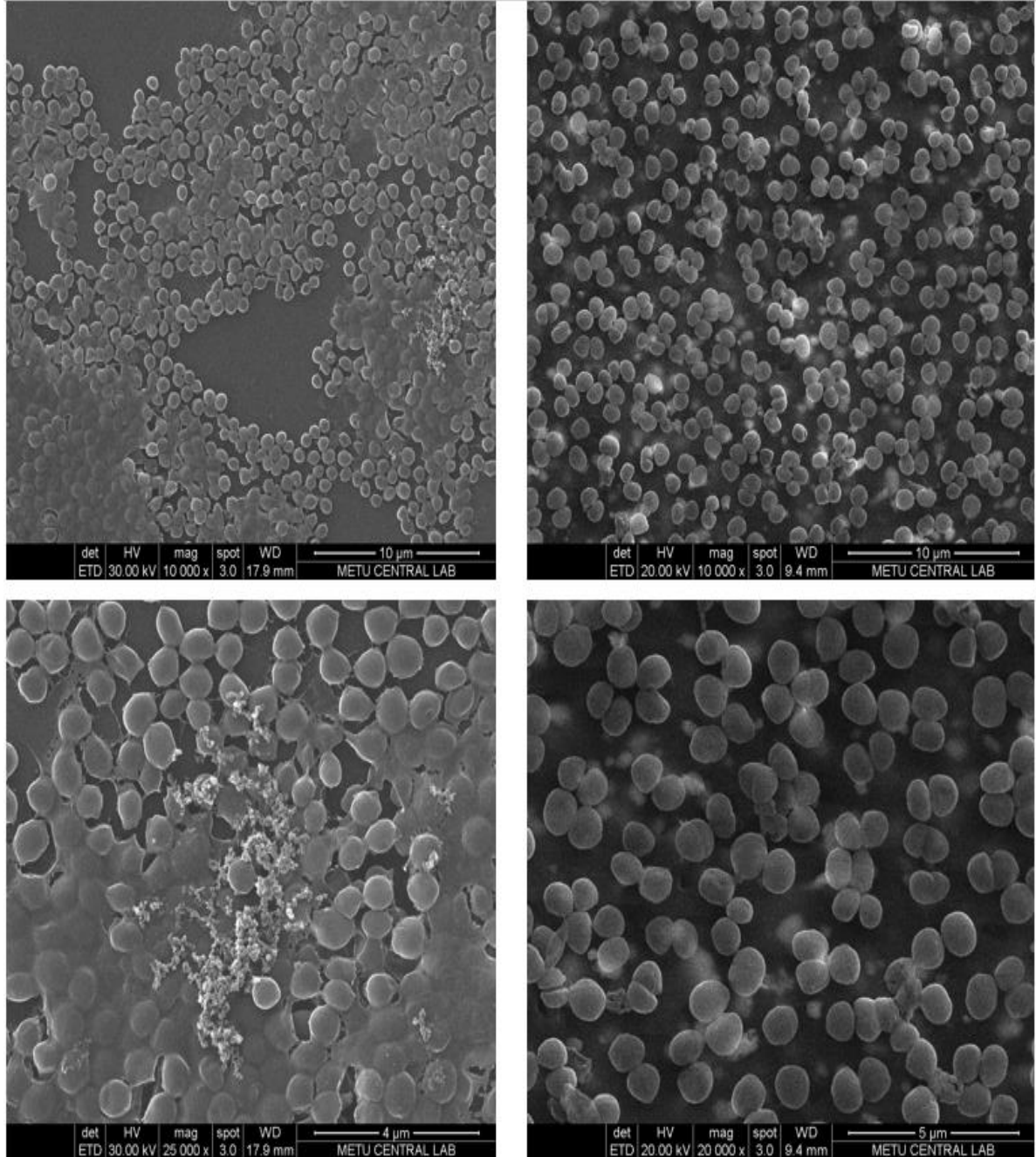


Resim 4.4. Kateter yüzeyinde *Candida parapsilosis* biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile TBO+L profilaktik FDT (sağda) görüntüleri

4.3.2. Terapötik fotodinamik tedavinin antibiyofilm etkisinin SEM ile incelenmesi

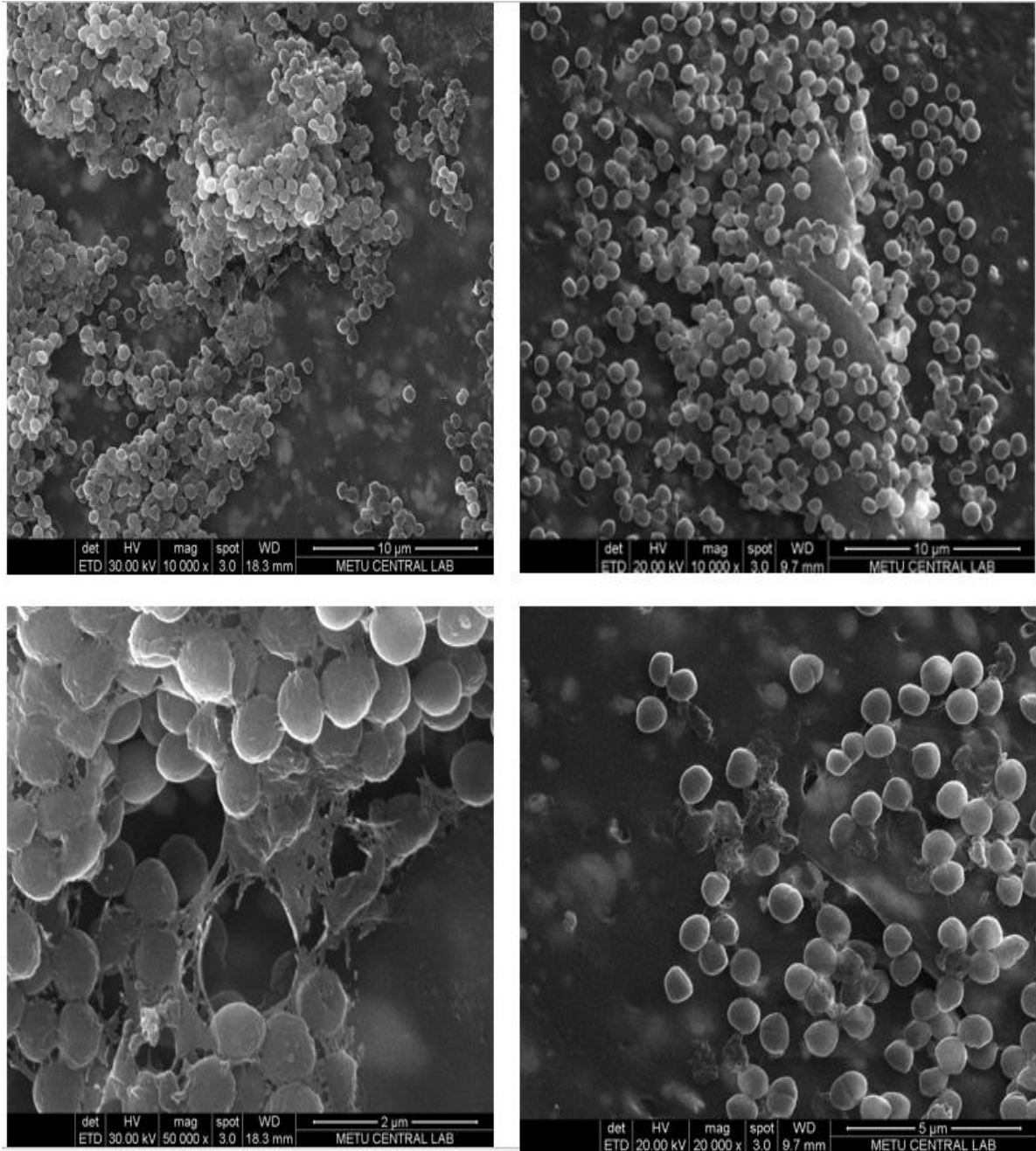
İn vitro kateter modelinde fotodinamik tedavinin terapötik etkisi SEM analizi ile elde edilen görseller aracılığıyla Resim 4.5, 4.6, 4.7 ve 4.8’de gösterilmektedir. Biyofilm oluşum basamağından sonra uygulanan FDT etkinliği görselleri kontrol grubuna ait görsellerle karşılaştırılmış ve biyofilm yapısındaki değişiklikler gözlemlenmiştir.

Staphylococcus aureus biyofilminde fotodinamik tedavi (MB+L+) sonrası bakterilerin büyük bir kısmının tek başına ya da kısa zincirler halinde organize olduğunu görülmektedir. SEM görüntüleri, FDT ile mikrobiyal hücelere verilen hasara ek olarak hücreleri çevreleyen polisakkarit matriksinde çözüldüğünü göstermektedir (Resim 4.5.).



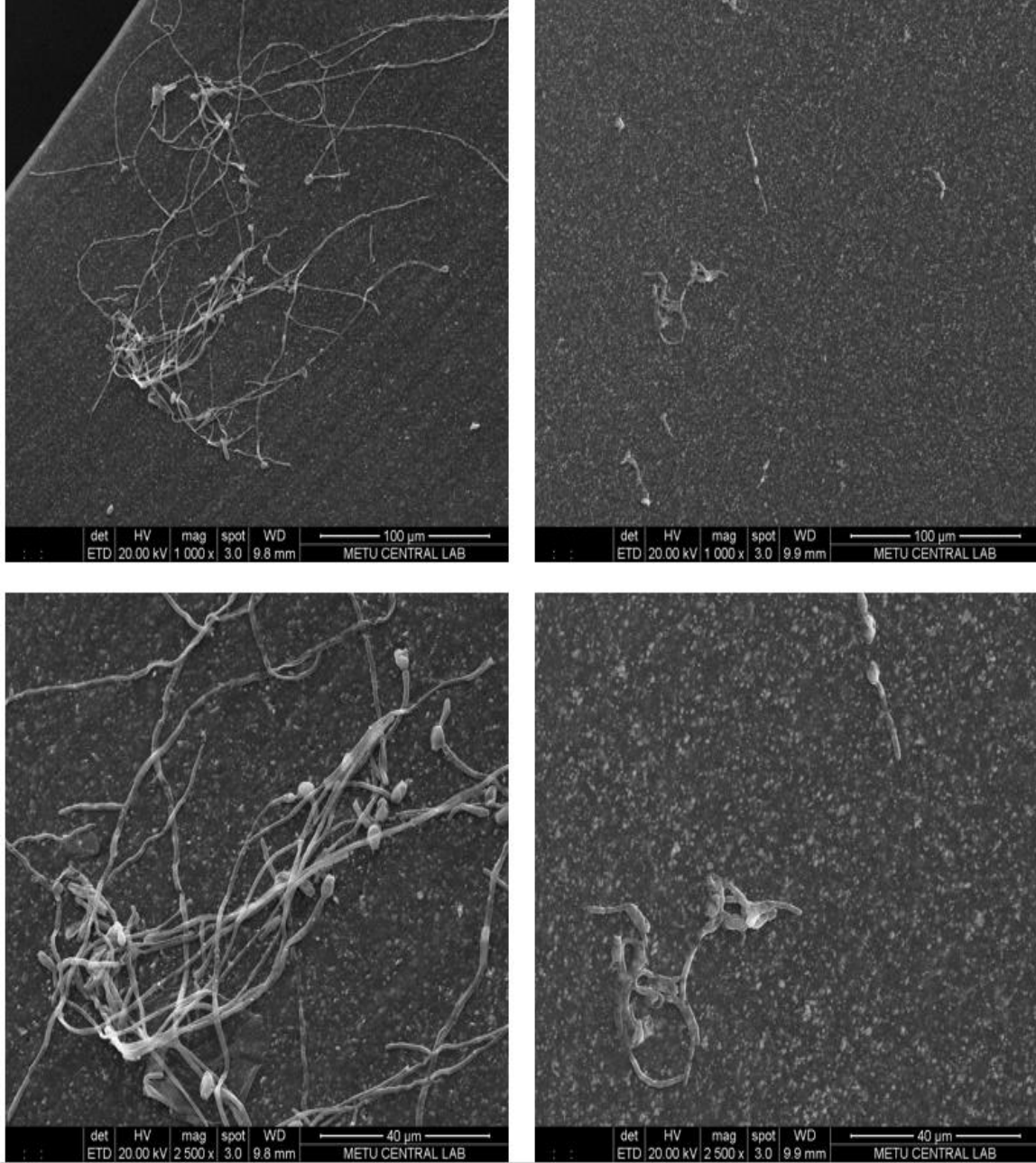
Resim 4.5. Kateter yüzeyinde *Staphylococcus aureus* biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile MB+L terapötik FDT (sağda) görüntüleri

Staphylococcus epidermidis SEM görüntülerine göre, FDT (RB+L) hücre dışı matriksi bozarak biyofilm hücrelerini planktonik hücrelere dönüştürmektedir. SEM görüntüleri fotodinamik tedavinin biyofilmdeki hücre sayısını azaltmada da etkili olduğunu göstermektedir. Bakteriler fotodinamik tedavinin neden olduğu hasarı gösteren düzensiz bir şekil sergilemektedir (Resim 4.6.).



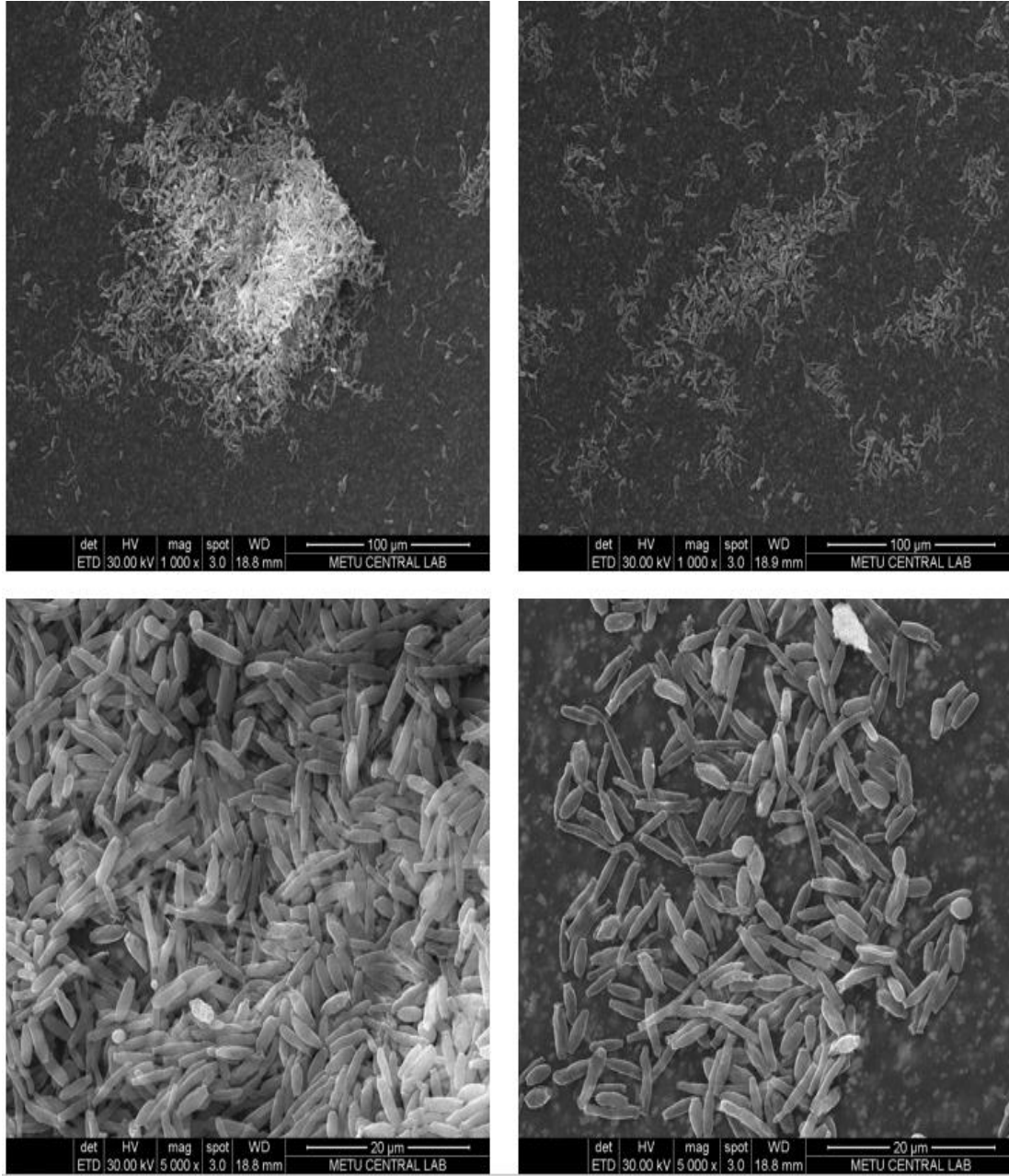
Resim 4.6. Kateter yüzeyinde *Staphylococcus epidermidis* biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile RB+L terapötik FDT (sağda) görüntüleri

Candida albicans kontrol grubuna ait biyofilm görüntüleri ile karşılaştırıldığında, fotodinamik tedavi (CUR+L+) uygulanan deney grubunda fungal yapıların sayısında bariz bir azalma görülmektedir. FDT'yi takiben biyofilm içerisindeki maya hücreleri buruşuk ve düzensiz bir yüzeysel görünüm sergilemektedir (Resim 4.7.).



Resim 4.7. Kateter yüzeyinde *Candida albicans* biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile CUR+L terapötik FDT (sağda) görüntüleri

Fotodinamik tedavi (TBO+L+) uygulanan deney grubu kontrol ile karşılaştırıldığında çok daha az miktarda maya hücresi içermektedir. SEM görüntüleri, biyofilimde *Candida parapsilosis* hücrelerinin daha küçük kümeler oluşturduğunu ve kateter yüzeyinde daha dağınık halde bulunduklarını göstermektedir. FDT sonrası biyofilm yapısında hücre-hücre etkileşiminin ve hücreler arasındaki fiziksel temasın kaybı ile düzensiz hücre şekilleri gözlenmektedir (Resim 4.8.).



Resim 4.8. Kateter yüzeyinde *Candida parapsilosis* biyofilmi SEM analizi, kontrol (solda) ile TBO+L terapötik FDT (sağda) görüntüleri

5. TARTIŞMA

Kateterle ilişkili kan dolaşımı enfeksiyonları (KİKDE), sağlık hizmetinde morbidite ve mortalite artışına sebep olmaktadır. Günümüzde tıp uygulamaları hastaların tedavisi için çok çeşitli kateter seçenekleri sunmaktadır. Yoğun bakım üniteleri içerdikleri özellikli hasta popülasyonu nedeniyle damar içi kateter uygulamalarının en sık yapıldığı ünitelerdir. Özellikle bu hastalarda yaşam desteği ve tedavi anlamında büyük öneme sahip, en sık kullanılan intravenöz araçlar santral venöz kateterlerdir [128].

Kateteri enfekte eden mikroorganizmaların çoğunluğu biyofilm oluşturmaktadır. Biyofilmler hem abiyotik hem de biyotik olmak üzere farklı yüzeylere yapışan ve koruyucu bir tabaka oluşturan mikroorganizma topluluklarıdır. Tüm mikrobiyal enfeksiyonların %60'ından fazlasının biyofilm kaynaklı olduğu bilinmektedir [202]. Kateter enfeksiyonunun etiyolojisinde çeşitli bakteri ve mantarlar, özellikle de cilt florasındaki mikroorganizmalar rol almaktadır. *Staphylococcus* ve *Candida*, biyofilmle ilişkili kateter enfeksiyonunun en yaygın etkenleridir. Bunun sebebi cilt florasının üyesi olmaları ve biyofilm oluşturma yeteneğine sahip olmalarıdır. Çalışmada bakteriyel etkenler *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 ve *Staphylococcus epidermidis* ATCC 35984 ve fungal etkenler *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida parapsilosis* ATCC 96142 ile in vitro kateter enfeksiyon modeli oluşturulmuştur.

Biyofilmler cihaz ile ilişkili enfeksiyonlardaki rolü nedeniyle halk sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. Biyofilm enfeksiyonlarının tanısı ve tedavisi zorlu bir süreçtir. Biyofilm antimikrobiyal direnç gelişimi, direncin plazmid ile transferi ve hücreler arası iletişim için uygun ortam oluşturmaktadır. Biyofilm kontrolü için yeni ve etkili stratejiler geliştirilmelidir. Bu sebeple doğal bileşikler, fajlar, CRISPR-Cas gen düzenleme, nano aracılı teknikler ve antimikrobiyal fotodinamik terapi (aFDT) gibi biyofilmlerle mücadeleyle yönelik yenilikçi, çok hedefli yaklaşımlar araştırılmaktadır [203].

Işığın antimikrobiyal etkisi geçmişten beri bilinmektedir. Fotodinamik tedavi tıpta uzun yıllardır kullanılan ve etkinliği bilinen bir uygulamadır. FDT'nin biyofilm üzerine etkisi son zamanlarda güncel bir konu haline gelmiştir. Antimikrobiyal fotodinamik tedavi (aFDT) belirli bir dalga boyuna sahip görünür ışık kaynağı, fotosensitizör madde ve oksijen

bileşenlerinden meydana gelmektedir. Bu etkileşim sonucunda açığa çıkan reaktif oksijen türleri/tekil oksijen hedef mikroorganizmalar üzerine sitotoksik etki göstermektedir. Bu sitotoksik etki DNA, hücre membranı ve protein yapılarına hasar vererek hücre ölümüne yol açmaktadır [133,146].

LED düşük enerji veren ancak dokuda reaktif oksijen türleri/tekil oksijen oluşumuna neden olarak antimikrobiyal etkinlik gösteren görünür ışık kaynağıdır. Ultraviyole ışık kaynağından farkı göze zararı olmadan her mekânda, uzun süre rahatlıkla kullanılabilmesidir. LED uygulamasının dokuya zararsız olduğu, uygun fotosensitizör ile ek hasar oluşturmada antimikrobiyal ve antibiyofilm etkili olduğu bilinmektedir [2]. Bu avantajları sayesinde kateterlerin çıkarılmadan, yerinde temizlenmesinde ve korunmasında etkili olabileceği düşünülmektedir. Bu çalışmada 630 nm dalga boyunda kırmızı renkte, 520 nm dalga boyunda yeşil renkte ve 470 nm dalga boyunda mavi renkte üç farklı LED ışık kaynağı kullanılmıştır.

Son on yıldır, mikroorganizmaların farklı fotosensitizör kullanılarak fotoinaktivasyon etkinliği kapsamlı bir şekilde araştırılmaktadır ancak biyofilmde yer alan mikroorganizmalara karşı potansiyel kullanımları hakkında çok az bilgi mevcuttur [197]. Fotosensitizörler, FDT'deki etkinliklerini belirleyen farklı kimyasal yapılara ve özelliklere sahiptir. Bu çalışmada fenotiyazin türevi metilen mavisi ve toluidin mavisi O, ksanten türevi rose bengal ve eozin Y, doğal bileşikler riboflavin ve kurkumin olmak üzere altı farklı fotosensitizör kullanılmıştır.

Biyofilmlerin farklı yönlerini (yapı, morfoloji, genetik) tanımlamak için literatürde çeşitli yöntemler mevcuttur. Biyofilmleri incelemek için canlı hücre sayımı ve kristal viyole (KV) testi gibi geleneksel teknikler yaygın olarak kullanılmaktadır. Canlı hücre sayımı, biyofilm içindeki koloni oluşturan birimlerin (KOB) sayısını ölçmek için kullanılan mikrobiyolojik bir tekniktir; KV testi ise hem EPS'yi hem de hücreleri boyayan bir boya kullanarak biyokütleyi ölçmek amacıyla kullanılmaktadır [204]. Çalışmamızda kantitatif test analizi, kristal viyole testi ile absorbans ölçümlerindeki istatistiksel değişikliğin yanı sıra canlı hücre sayımında logaritmik değişikliğin belirlenmesini içermektedir. Biyofilm varlığı ve biyofilmdeki değişim taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görsel olarak doğrulanmaktadır.

Fotodinamik tedavinin bakteriyel ve fungal biyofilme etkisi üzerine tarafımızca daha önce yapılmış ve yayınlanmış in vitro biyofilm çalışmamız mevcuttur. 96 kuyucuklu mikropalak içerisinde *Staphylococcus* ve *Candida* biyofilm modeli oluşturulmuştur. Kullanılan ışık kaynağının dalga boyuna uygun fotosensitizör ile muamele edilen biyofilmler üzerine 370 nm dalga boyunda UVA lambası, 660 nm dalga boyunda kırmızı LED, 518 nm boyunda yeşil LED ile ışık uygulanmıştır. Fotosensitizör olarak metilen mavisi (25 µg/mL), rose bengal (%0,1) ve riboflavin, (%0,1) kullanılan bu in vitro çalışmada, biyofilm biyokütlesinde %45,4 inhibisyon oranı ile en etkili olan uygulama metilen mavisi ve 660 nm kırmızı LED olarak belirtilmiştir [1]. Tez çalışmasında biyofilm modeli santral venöz kateter segmentleri üzerinde oluşturulmuştur. Kullanılan ışık kaynakları ve dalga boyu, ışınlama süresi, fotosensitizör çeşidi, sayısı ve konsantrasyonları farklılık göstermektedir. Biyofilm üzerine antibiyofilm etkinliğin değerlendirilmesinin yanı sıra biyofilm gelişimi üzerine de fotodinamik tedavi etkinliği değerlendirilmiştir. Örneklem sayısı artırılmış ve sonuçlar istatistiksel olarak analiz edilmiştir. Tüm deney gruplarında metilen mavisi ve kırmızı LED uygulaması etkili bulunmuştur. Ancak deney gruplarına göre en etkili fotodinamik tedavi kombinasyonu farklılık göstermektedir.

FDT için modern klinik çalışmalarda kullanılan başlıca ışığa duyarlı ajanlar (FS'ler) metilen mavisi (MB) ve toluidin mavisi O (TBO)'dur. MB ve TBO, optimum 600-660 nm absorpsiyon dalga boyuna sahiptir ve insan kullanımı için klinik olarak onaylanmıştır [148]. Metilen mavisi ve toluidin mavisi O gibi fenotiyazinler, biyofilmleri inaktive etme yetenekleri açısından kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Çalışmamızda *S. aureus* için en etkin profilaktik fotodinamik tedavi uygulamaları metilen mavisi, rose bengal ve toluidin mavisi O fotosensitizörleri ile birlikte kullanılan uygun dalga boyundaki LED kombinasyonlarıdır. En etkin terapötik tedavi uygulamaları ise metilen mavisi ve rose bengal fotosensitizörleri ile birlikte kullanılan uygun dalga boyundaki LED kombinasyonlarıdır. Bu çalışmada hem profilaktik hem terapötik fotodinamik tedavi için en etkili fotosensitizör metilen mavisidir.

Park ve arkadaşlarının 2023 yılında yayınladıkları çalışmada, fotosensitizör olarak metilen mavisi (MB) ve toluidin mavisi O (TBO) kullandıkları fotodinamik tedavi yöntemi titanyum yüzeylerde *Staphylococcus aureus* biyofilmini etkili bir şekilde azaltmıştır. TBO+L+ grubu,

MB+L+ grubundan önemli ölçüde daha düşük canlılık oranına sahiptir, çalışmada TBO'nun ışığa duyarlılaştırıcı ajan olarak MB'den daha etkili olduğu sonucu çıkarılmıştır [205]. Boyaların dimer oluşturma yeteneği, fotomikrobisidal aktiviteleri ile ilişkilidir. MB ve TBO'nun etkili dimerizasyon sabitleri farklı bakteri suşları varlığında değerlendirilmiş ve TBO'nun MB'den daha fazla dimer oluşturma yeteneğine sahip olduğu gözlenmiştir. Bu bulgu TBO moleküllerinin hücresel zarın hidrofobik bölgesine nüfuz etme ve birikme yeteneğinin daha yüksek olduğunu ve daha fazla fotomikrobisidal etkiye sahip olduğunu göstermektedir [206]. Çalışmamızda poliüretan kateter yüzeyinde oluşturduğumuz *S. aureus* biyofilm modelinde antibiyofilm etkinliği en yüksek fotosensitizörün metilen mavisi olduğu görülmektedir. Ancak *Candida* biyofilm modelinde TBO, MB'den daha etkilidir.

Metilen mavisi ile fotodinamik tedavi, planktonik metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'a (MRSA) karşı etkili bulunmuştur ve 4-7 log₁₀ KOB azalma gözlenmiştir. Silikon üzerinde biyofilm olarak incelendiğinde FDT etkinliğinin 1-2 log₁₀ azaldığı bildirilmiştir [207]. Planktonik hücrelerin, biyofilm içerisinde yer alan hücrelere göre fotodinamik tedaviye daha duyarlı olduğu bilinmektedir [208]. Bu bulgular, FDT için de biyofilmlerin etkili bir direnç oluşturduğu düşüncesini desteklemektedir.

Vilela ve arkadaşları, akrilik rezin segmentleri üzerinde oluşturdukları biyofilm modelinde MB-FDT ve TBO-FDT sonrası çalışmada yer alan herhangi bir suş için canlı sayısında önemli bir azalma (≥ 3 log₁₀) tespit etmemiştir. *S. aureus* biyofilminde mikrobiyal azalma 300 µM MB ile uygulanan fotodinamik tedavide 0,8 log₁₀, 150 µM TBO ile uygulanan fotodinamik tedavide 0,9 log₁₀ olarak bildirilmiştir [209]. Kashef ve arkadaşlarının çalışmasında, farklı konsantrasyonlarda (5 µg/ml, 50 µg/ml, 500 µg/ml) MB ve TBO ile farklı sürelerde (10,15,20 dakika) fotodinamik tedavinin *Staphylococcus aureus* biyofilmlerine karşı bakterisidal aktiviteye sahip olmadığı bulunmuştur. Hücre canlılığı testi sonuçlarında çalışılan bütün suşlarda (*S. aureus* ATCC 25923, UTMC 1440, UTMC 1454), MB-FDT (0,6 log₁₀) ve TBO-FDT (0,7 log₁₀) ile azalmanın anlamlı olmadığı belirtilmiştir. Yüksek konsantrasyonda fotosensitizör (500 µg/ml) ile uzun süre ışınlama (20 dakika) yapılmasına rağmen kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde bir değişim görülmemiştir [210]. Çalışmamızda 1000 µg/ml fotosensitizör varlığında 15 dakika ışınlama sonrası terapötik tedavi grubunda MB-FDT (1,12 log₁₀) ve TBO-FDT (0,8 log₁₀) ile canlı hücre sayısında minimal azalma görülmektedir. Ancak, kristal viyole deneyi bulgularına göre biyofilm biyokütlesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlıdır.

Wang ve arkadaşları, 415 nm dalga boyunda mavi ışık kullanımı ile FDT uygulamasının planktonik formda MRSA'nın 4,61 log₁₀ inaktivasyonu ve 24 saatlik biyofilmlerde 2,56 log₁₀ inaktivasyonu ile sonuçlandığı bildirmiştir [211]. Çalışmamızda RBF+L+ terapötik tedavi grubunda 0,54 log₁₀, CUR+L+ terapötik tedavi grubunda 0.40 log₁₀ azalma görülmektedir. Uygun fotosensitizörlerle kırmızı LED ve yeşil LED fotodinamik tedavi etkinliği anlamlı iken, mavi LED ile FDT'nin *S. aureus* suşu üzerine antimikrobiyal etkinliği anlamlı değildir.

Staphylococcus aureus biyofilmine gentamisin ile birlikte veya tek başına RB kullanıldığında aFDT etkisini değerlendirmeyi amaçlayan çalışmada, 0.03-64 µg/ml konsantrasyon aralığında RB ile 18 J/cm² yeşil LED ve 37 J/cm² beyaz metal halojen ışığa maruz kalan *S. aureus* biyofilmlerinde hücre canlılığı analiz edilmiştir. Deney, *Staphylococcus* biyofilmlerinin 8 µg/ml RB ile 2 saat inkübe edilmesini takiben 18 J/cm² LED ışığa maruz bırakılmıştır. Deney sonucunda, canlı bakteri sayısında 3,3 log₁₀ azalma gözlenmiştir. Çalışma, RB'nin fotodinamik tedavide *Staphylococcus* biyofilmlerine karşı maksimum antimikrobiyal etkiyi göstermesi için optimal bir fotosensitizör konsantrasyonu ve ışık enerjisi olduğunu göstermektedir [212]. Bizim çalışmamızda *S. aureus* biyofilminde canlı bakteri sayısında azalma profilaktik RB-FDT grubunda 1,57 log₁₀, terapötik RB-FDT grubunda 0.85 log₁₀ olmasına karşın, biyofilm biyokütlesindeki azalma istatistiksel olarak anlamlıdır. SEM görüntüleri incelendiğinde bu durum, tedavi sonrası EPS yapısının ortadan kalkması ile açıklanmaktadır.

Bakteriyel biyofilmlerde özellikle ekstraselüler matriks (EPS) bakterileri aFDT'ye karşı koruyabilmektedir. EPS, biyofilm oluşumunda ilk adım olan mikroorganizmaların yüzeye yapışmasını sağlamaktadır. EPS, biyofilm yapısının bütünlüğünün korunmasına yardımcı olmakta, mikroorganizmaların biyofilmden ayrılmasını önlemekte ve biyofilm içerisine difüzyonu sınırlandırarak antimikrobiyal tedaviye karşı mikroorganizmayı daha dirençli hale getirmektedir. EPS tabakası, fotodinamik tedavi sırasında üretilen oldukça reaktif ve zararlı bir molekül olan tekil oksijeni nötralize etme yeteneğine sahip proteinler içermektedir. Ayrıca EPS, FS'nin hücrelere difüzyonunu önleyen fiziksel bir bariyer görevi görmektedir, FS'nin hücre içindeki hayati organellere ulaşmasını ve onlara zarar vermesini engellemektedir [143,213]. EPS tabakasının bu özellikleri sebebiyle bizim çalışmamızda MB-FDT'nin biyofilme gömülü halde bulunan *S. aureus* hücrelerini öldürmedeki etkinliği azalttığı, ilk hedef olarak ekstraselüler matriksin uzaklaştırıldığı düşünülmektedir.

Literatürde, EPS'nin esas olarak katyonik ışığa duyarlılaştırıcılar kullanıldığında FDT'den etkilenen ilk hedef olduğu bildirilmektedir [133]. Katyonik ışığa duyarlılaştırıcılar, negatif yüklü EPS ile etkileşime girebilen, bozulmasına ve uzaklaştırılmasına yol açan pozitif yüklü moleküllerdir [213]. Metilen mavisi, katyonik bir fotosensitizördür.

Ronqui ve arkadaşlarının çalışmasındaki SEM görüntüleri ile fotodinamik tedavinin hem biyofilm yapısını bozduğu hem de biyofilmdeki hücre sayısını azalttığı gösterilmiştir. FDT sonrası biyofilmler, kontrol grubunda gözlenen yoğun ve kompakt biyofilmlere kıyasla dağınık biyofilm yapısı, mikrokoloni oluşumları gibi morfolojik değişiklikler sergilemiştir [214]. SEM analizi yapılan başka bir çalışmada, kontrol grubundaki hücreler hücre dışı polisakkarit matrikse gömülü halde görüntülenmiştir. Kontrol grubunda bulunan ekzopolisakkarit matriks, TBO-FDT'den sonra tamamen çözünmüştür. Bu bulgu, fotodinamik tedavinin sadece bakteri hücrelerini etkilemediğini, aynı zamanda biyofilmin yapı ve bütünlüğünü de bozduğunu göstermektedir [215]. Bizim çalışmamızda da benzer şekilde *S. aureus* için MB-FDT sonrası biyofilm kütlelerinde temas kaybı, bozulmuş agregasyon ve hücre sayısında azalma etkisi SEM analizi ile doğrulanmaktadır. SEM analizi, tedavinin biyofilmdeki bakteri hücrelerinin organizasyonu ve kümelenmesi üzerinde olumsuz bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda *S. epidermidis* için en etkin tedavi uygulamaları ise metilen mavisi ve rose bengal fotosensitizörleri ile birlikte kullanılan uygun dalga boyundaki LED kombinasyonlarıdır. Hem profilaktik hem terapötik tedavi için en etkili fotosensitizör rose bengaldir. *S. epidermidis* biyofilminde terapötik FDT grubunda RB ve yeşil LED uygulaması ile canlı bakteri sayısında 7,84 log₁₀ azalma görülmüştür ve bakterisidal etkilidir.

S. epidermidis biyofilminde terapötik FDT'nin inhibitör etkisi, biyofilm içindeki mikroorganizmaları çevreleyen ve koruyan hücre dışı matriks olan biyofilm bariyerini aşabilmektedir. Bu, FDT'nin biyofilme nüfuz edebildiği anlamına gelmektedir. SEM görüntüleri incelendiğinde FDT'nin ekstraselüler matriksi bozarak ve biyofilm hücrelerini planktonik hücrelere dönüştürerek biyofilm duyarlılığını artırdığı düşünülmektedir. FDT'nin önceden var olan biyofilm üzerine etkisi oldukça önemlidir, çünkü yerleşik biyofilmlerin tedavisi daha zordur ve geleneksel antimikrobiyal tedavilere karşı artan direnç ile ilişkilidir.

Sharma ve arkadaşları, FDT'nin *Staphylococcus* biyofilmi üzerine etkilerini incelemiş ve toluidin mavisi O ile diyot lazerin düşük antibakteriyel aktivite gösterdiğini gözlemlemiştir. *S. aureus* fotodinamik tedaviye *S. epidermidis*'ten daha dirençli bulunmuştur [216]. Katalaz ve peroksidaz gibi antioksidan enzimler bazı reaktif oksijen türlerine karşı koruma sağlarken, katalaz gibi bazı antioksidan enzimleri inaktive eden tekil oksijene karşı koruma sağlamamaktadır. Mikroorganizmaların fotodinamik tedavi duyarlılığı karmaşık bir olgudur, fotodinamik etki için gerekli olan bir dizi faktörle ilişkili olabilir [196].

Çalışmamızda *C. albicans* için en etkin profilaktik fotodinamik tedavi uygulamaları metilen mavisi, toluidin mavisi O ve kurkumin fotosensitizörleri ile birlikte kullanılan uygun dalga boyundaki LED kombinasyonlarıdır. En etkin terapötik tedavi uygulamaları ise metilen mavisi, toluidin mavisi O, rose bengal ve kurkumin fotosensitizörleri ile birlikte kullanılan uygun dalga boyundaki LED kombinasyonlarıdır. Hem profilaktik hem terapötik tedavi için en etkili fotosensitizör kurkumindir.

Kurkumin (CUR), yaygın olarak zerdeçal olarak bilinen *Curcuma longa* rizomlarından elde edilen fenolik doğal bir bileşiktir. Doğal özellikleri ve sağlığa faydası nedeniyle gıda katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Son yıllarda kurkuminin, fotodinamik tedavide fotosensitizör olarak potansiyeli dahil olmak üzere çeşitli biyolojik aktiviteleri çalışılmaktadır. CUR, özellikle görünür spektrumda ışığı emme konusunda yüksek bir yeteneğe sahiptir. Ayrıca önemli oksidatif özelliklere de sahiptir, bu da mikroorganizmalarda oksidatif stresi indüklemeye kabiliyeti olduğu anlamına gelmektedir. Bu özellikleri sebebiyle sarı bir boya olan kurkumin, fotodinamik tedavide ışığa duyarlılaştırıcı ajan olarak kullanılmaktadır. CUR-FDT, apoptoz yoluyla hücre ölümünü indükleyen yüksek düzeyde reaktif oksijen türleri (ROS) üretmektedir [2, 190].

Narayanan ve arkadaşlarının 2020 yılında yayınladığı çalışmada, yüksek konsantrasyonlarda (0.1-2 mg/mL) kurkuminin, çalışmada test edilen tüm *Candida* suşlarının planktonik formunu etkili bir şekilde inhibe ettiği ancak, *Candida albicans*'ın JY suşunun olgun biyofilmine karşı etkisiz olduğu bildirilmiştir [217]. Bu araştırmalardan yola çıkarak mikroorganizmaların biyofilm formu söz konusu olduğunda antimikrobiyal etkinliğin aynı türün farklı kökenlerine göre farklılık gösterdiği düşünülmektedir. *C. albicans* ATCC 90028 suşunda CUR ve 455 nm LED ile uygulanan FDT'den sonra biyofilmin inhibisyon oranı

%90,87 iken klinik izolatlar grubunda inhibisyon oranları, standart suşa kıyasla CCA1’de %66,44 ve CCA2’de %86,74 ile daha düşük bulunmuştur [218]. Bu çalışmanın bulguları, CUR-FDT’nin *C. albicans* biyofilmlerinin büyümesini etkili bir şekilde engelleyebileceğini göstermektedir. Klinik izolatlar grubunda gözlenen daha düşük inhibisyon oranları, bu suşların standart suşa kıyasla CUR-FDT’ye daha dirençli olabileceğini göstermektedir. Bizim çalışmamızda, deney gruplarında yer alan her mikroorganizma için tek bir referans köken kullanılmaktadır.

Hsieh ve arkadaşlarının kurkumin ve mavi ışık kullanan fotodinamik tedavi ile *C. albicans* biyofilmlerini etkili bir şekilde ortadan kaldırdığı çalışmasında, 80 µM kurkumin ve toplam 30 dakika boyunca 6 periyot ışık uygulaması ile hücre canlılığı yaklaşık olarak %15’e düşmüştür. Tek bir periyotta FDT uygulamasının, biyofilmde etkisinin planktonik hücrelere göre oldukça az olduğu görülmüştür [219]. Bizim çalışmamızda, fotodinamik tedavi tek bir periyot şeklinde uygulanmış olmasına rağmen 2,46 log₁₀ azalma ile hücre canlılığı üzerine majör etkinlik göstermektedir.

Rajasekar ve arkadaşlarının 2020 yılında yapmış olduğu çalışmada, kurkumin-soforolipid nano-konjugatın (CU-ASL) 9.37 µg/mL konsantrasyonda substratlara kandidal yapışmayı, biyofilm gelişimini, olgunlaşmayı ve filamentasyonu önemli ölçüde inhibe ettiği görülmüştür. CU-ASL, *C. albicans* için biyofilm oluşumu ve filamentasyon gibi ana virülans özelliklerinin inhibisyonu bizim çalışmamıza benzer şekilde elektron mikroskobu ile gösterilmiştir [220]. Ma ve arkadaşlarının çalışmasında, CUR-FDT’den sonra *C. albicans*’ın hife özgü ve biyofilm ile ilgili genlerinin (EFG1, UME6, HGC1 ve ECE1) ekspresyon seviyelerinde azalmanın 1.627 ile 6.887 aralığında değiştiği ve bu azalmanın anlamlı bulunduğu bildirilmiştir [218].

Leonel ve arkadaşları, fotodinamik tedavinin *Candida albicans*’ın biyofilm yapısı ve gelişimi üzerine etkilerini araştırmıştır. Çalışmada MB-FDT *C. albicans* biyofilm gelişimini inhibe etmede, büyüme kinetiğini değiştirmede, biyofilm yapısındaki maya ve filamentlerin sayısını azaltmada potansiyel göstermiştir. FDT, mantarın daha yavaş büyümesini sağlamış ve büyüme şeklini değiştirmiştir. Maya hücrelerinden filamentli forma geçiş, *C. albicans*’ta biyofilm oluşumu için gereklidir. FDT, germ tüp oluşumunu inhibe ederek biyofilm oluşumunu büyük oranda önlemiştir [221]. Bizim çalışmamızda da profilaktik ve terapötik CUR-FDT’nin maya ve filamentöz hücreleri azaltıcı etkisi SEM ile görüntülenmektedir.

Candida albicans 'ın filamentöz formu artan virülans ve antifungal tedavilere karşı direnç ile ilişkilidir. Bu nedenle, FDT sonrası filamentöz hücrelerdeki azalma, bu tedavinin *Candida albicans* biyofilmlerinin virülansını hedeflemede ve azaltmada etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Başka bir çalışma, TBO'nun kullanıldığı FDT uygulamasının farklı gelişim aşamalarında *C. albicans* tarafından üretilen biyofilm üzerine etkileri araştırılmıştır. Bizim çalışmamızda elde edilen bulgulara uyumlu olarak, FDT'nin hem biyofilm oluşumunu hem de canlılığını inhibe ederek hücre sayısını ve hifal formları azalttığı belirtilmiştir. Çalışma sonucunda, TBO'nun fotosensitizör olarak kullanıldığı profilaktik ve terapötik fotodinamik tedavinin biyofilmlere zarar verdiği gösterilmiştir [222].

2019'da yayınlanan bir çalışmada, akrilik plaka üzerindeki *Candida* biyofilmlerine TBO-FDT uygulanmış ve antimikrobiyal fotodinamik tedavi etkinliği değerlendirilmiştir. Tüm çalışma gruplarında, FDT sonrası *Candida* türlerinin koloni oluşturan birimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma saptanmıştır [223]. Sousa ve arkadaşları tarafından yürütülen akrilik plakalar üzerindeki *C. albicans* biyofilmine karşı MB-FDT etkinliğini değerlendiren in vitro çalışma sonucunda en güçlü enerji dozuna (171 J/cm^2) ve en uzun lazer ışınlama süresine (10 dk) sahip grup önemli bir azalma göstermiştir, ancak tam eradikasyon sağlanamamıştır [224]. Bizim çalışmamızda da hem MB ($2,46 \log_{10}$) hem de TBO ($2,16 \log_{10}$) ile uygulanan terapötik fotodinamik tedavi etkinliği anlamlıdır.

Hem MB hem de TBO, uygun dozda ve uygun dalga boyunda ışık maruziyeti ile mantarların hücre membranına etki ederek yapısal hasara neden olabilmektedir. Bu FS'lerin *Candida*'ya karşı antimikrobiyal fotodinamik tedavide etkili olduğu bilinmektedir [148]. Çalışmamızda *C. parapsilosis* için en etkin profilaktik ve terapötik fotodinamik tedavi uygulamaları metilen mavisi, toluidin mavisi O ve kurkumin fotosensitizörleri ile birlikte kullanılan uygun dalga boyundaki LED kombinasyonlarıdır. Hem profilaktik hem terapötik tedavi için en etkili fotosensitizör toluidin mavisi O'dur.

Soares ve arkadaşları tarafından *Candida* türlerinin büyümesini ve yapışmasını engellemek amacıyla fotodinamik tedavi kullanılmıştır. Çalışmada, $25 \mu\text{M}$ toluidin mavisi O ve 15 dakika kırmızı LED ışınlama (180 J/cm^2) ile uygulanan FDT, hücre canlılığında azalmalara

ve bukkal epitel hücrelere (BEC) yapışmanın inhibisyonuna neden olmuştur. Bu çalışmada *Candida albicans* ile karşılaştırıldığında *Candida parapsilosis*'in fotodinamik inaktivasyona karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir. *Candida albicans* izolatları hücresel büyümede ciddi oranda azalma göstermiş ($5,20 \log_{10}$) ve BEC'ye yapışmaları da önemli ölçüde azalmıştır (%61,5). Buna karşılık, *C. parapsilosis* izolatı hücresel canlılıkta daha düşük azalma ($2,15 \log_{10}$) ve BEC'e yapışmada minimal inhibisyon (%34,5) göstermiştir [225]. Bizim çalışmamızda *Candida albicans*' in fotodinamik inaktivasyona karşı daha dirençli olduğu görülmektedir. TBO ($1000 \mu\text{g/ml}$) ve 15 dakika kırmızı LED ışınlama uygulanan profilaktik fotodinamik tedavi grubunda hücresel canlılığın azalma oranı *Candida albicans* için $1,84 \log_{10}$ iken *Candida parapsilosis* için $6.71 \log_{10}$ 'dur.

Candida albicans planktonik hücreleri $200 \mu\text{M}$ konsantrasyonda rose bengal ve eozin Y ile tedavi edildiğinde koloni oluşturan birimlerin (KOB/ml) sayısında sırasıyla 4 ve $6 \log_{10}$ azalma göstermiştir. Ayrıca bu çalışmada, RB-FDT'nin biyofilmi $0.22 \log_{10}$ azalttığı, EOY-FDT 'nin ise $0.45 \log_{10}$ azalttığı gösterilmiştir [175]. Bizim çalışmamızda terapötik deney grubunda mikrobiyal azalma RB-FDT ile $0.78 \log_{10}$ ve EOY-FDT ile $0.69 \log_{10}$ 'dur. Profilaktik FDT grubunda ise RB-FDT ile $0.17 \log_{10}$ ve EOY-FDT ile $0.20 \log_{10}$ azalma görülmektedir. Brovko ve arkadaşları, $5\text{-}500 \mu\text{g/mL}$ konsantrasyonlarda malaşit yeşili ve rose bengal ile fotodinamik tedavi uygulamasını değerlendirmiştir. Malaşit yeşili ve rose bengalin Gram pozitif bakterileri ortadan kaldırdığı, ancak Gram negatif bakterilere ve mantarlara karşı etkili olmadığı sonucuna ulaşılmıştır [226]. *Candida* biyofilminde mikrobiyal azalma için bu ışığa duyarlılaştırıcıların daha yüksek konsantrasyonlarına ihtiyaç duyulmaktadır.

Bizim çalışmamızın parametreleri ile antimikrobiyal fotodinamik tedavi etkinliğinin, kristal viyole testi ile biyofilm biyokütlesi üzerinden değerlendirildiği literatürdeki çalışmaların sayısı yetersizdir. Bundan dolayı, bulguların karşılaştırılabilmesi açısından çalışmamıza başka bir kantitatif deney olan hücre canlılığı testi de dahil edilmiştir. Üç lümenli, 7 Fr boyutunda santral venöz kateter kullanılmasından dolayı kesilen kateter segmentlerinin yüzeyinin girintili çıkıntılı olması ve segmentin boyutu sebebiyle, yüzeydeki biyofilm tabakasının kazıma işlemi ile mekanik olarak düzgün bir şekilde çıkarılması mümkün olmamıştır. Bu sebeple canlılık ölçümü için literatürde yer alan farklı bir yöntem tercih edilmiştir [199]. Biyofilimde hücre canlılığının analizi için kullandığımız bu teknik sıvı besiyerinde bir süre bekletilen kateterlerin yüzeyinde yer alan mikroorganizmaların sıvı

besiyerine aktararak üremesi öncülüne dayanmaktadır. Başka bir çalışmada bu teknikten FDT'nin hücre canlılığı üzerine geç etkisinin analizinde bahsedilmiştir [222]. Pinto ve arkadaşları bu çalışmalarında, hücre canlılığın tespiti için XTT deneyinin optik dansite verileriyle metabolik aktiviteyi değerlendirmiştir. Bizim çalışmamızda besiyerinde koloni oluşturan birimlerin sayımı ile değerlendirme yapılmıştır.

Çalışmamızdaki her mikroorganizma üzerine kantitatif deneylerde en etkili bulunan fotosensitizör ve LED uygulamasına ait SEM görüntüleri, fotodinamik tedavinin hem bakteriyel hem de fungal biyofilmlerin yapısında görsel değişikliklere de sebep olduğunu ortaya koymaktadır. Taramalı elektron mikroskobu ile incelenen deney gruplarında yer alan kateterlerde *Staphylococcus* suşlarında EPS yapısında ve mikroorganizma miktarında azalma görülürken, *Candida* suşlarında bu etkilerin yanı sıra hifal yapılarda azalma gözlemlenmektedir.

C. parapsilosis için TBO-FDT grubunda, hücre canlılığı analiz edildiğinde fungisidal etkinlik söz konusudur. Buna rağmen, kristal viyole test sonuçlarında biyofilm biyokütlesinin tamamen inhibe olmadığı ve SEM görüntülerinde kateter yüzeyinde mikroorganizmaya ait yapıların var olduğu bilinmektedir. *S. epidermidis* MB+L+, TBO+L+ ve RB+L+ terapötik FDT gruplarında da benzer bulgular elde edilmiştir. Çalışmamızda kullanılan taramalı elektron mikroskobunda gözlenen hücreler canlı değildir. Elektron mikroskopları, canlı hücrelerin görüntülenmesi için uygun görüntüleme araçları değildir. Biyofilm yapısında canlılık analizinin görsel olarak da teyit edilebilmesi açısından konfokal mikroskop kullanımı önerilmektedir.

Çalışmamızda literatürle ilgili farklılıklar, antimikrobiyal fotodinamik tedavi için önceden tanımlanmış parametrelerin olmamasından kaynaklanmaktadır. Çalışılan mikroorganizma türleri ve aynı türdeki farklı kökenler, mikroorganizmaların büyüme fizyolojisi (planktonik/biyofilm), biyofilm oluşturma yöntemleri, biyofilmin olduğu yüzey özellikleri, ışık kaynağına ve fotosensitizöre ait parametreler farklılık göstermektedir. FDT'de kullanılan ışığın enerjisi, dalga boyu ve ışınlama süresi gibi parametreler tedavi sonucunu önemli ölçüde etkilemektedir. Benzer şekilde kullanılan FS türü, konsantrasyonu, FS çözücülerinin çeşitliliği, ışınlama öncesi inkübasyon süresi de etkinliği değiştirebilmektedir.

Deneysel koşullardaki bu varyasyonlar, farklı FDT protokollerinin mikroorganizmalar üzerindeki etkisinin karşılaştırılmasını zorlaştırmaktadır [190].

Biyofilm üzerine yapılan in vitro çalışmaların büyük bir kısmı, mikropalak içerisinde az sayıda değişkenin değerlendirildiği deneylerdir. Çalışmamızda birçok değişken birlikte kullanıldı ve etkileri karşılaştırıldı. Ayrıca, bu çalışma kantitatif ve kalitatif analiz verilerini birlikte içermesi açısından geniş bir araştırmadır. Çalışmamızda, in vitro kateter modelinde profilaktik ve terapötik antimikrobiyal fotodinamik tedavi etkisine ait sonuçlar elde edilmiştir. Literatürdeki çalışmalar özellikle terapötik FDT üzerine yoğunlaşmıştır, profilaktik FDT konusunda yapılan çalışma sayısı kısıtlıdır. Biyofilme canlılığın uygun kombinasyonlarda FDT ile tedavi uygulanmayan biyofilme kıyasla logaritmik olarak azaldığı tespit edilmiştir. Biyofilm kütlesi ölçümü ile elde edilen optik dansite verilerinde istatistiksel farklılık anlamlı bulunması ve bu verilerin görsel olarak desteklenmesi, FDT'nin *Staphylococcus* ve *Candida* biyofilmlerinde azaltıcı etkisi olduğunu ve bu sonucun da kateter ilişkili enfeksiyonları önlemek için umut verici bir yeni yaklaşım sunduğu düşünölmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmada *Staphylococcus* ve *Candida* in vitro kateter modelinde altı farklı fotosensitizör ve LED ışığı kombinasyonu ile biyofilm oluşumu öncesi profilaktik fotodinamik tedavi etkinliği, biyofilm oluşumu sonrası terapötik fotodinamik tedavi etkinliği araştırılmıştır. Biyofilm yapısı taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenmiş ve kantitatif verilerin analizi yapılmıştır. Elde edilen tüm veriler hiçbir tedaviye maruz kalmamış kontrol grubu verileriyle karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmektedir;

- ✓ *S. aureus* ATCC 29213 suşu için en etkili profilaktik fotodinamik tedavi metilen mavisi ile kırmızı LED, rose bengal ile yeşil LED ve toluidin mavisi O ile kırmızı LED uygulamasıdır.
- ✓ *S. aureus* ATCC 29213 suşu için en etkili terapötik tedavi metilen mavisi ile kırmızı LED ve rose bengal ile yeşil LED uygulamasıdır.
- ✓ *S. aureus* ATCC 29213 suşu için hem profilaktik hem terapötik en etkili antimikrobiyal fotodinamik tedavi metilen mavisi ve kırmızı LED kombinasyonudur.
- ✓ *S. epidermidis* ATCC 35984 suşu için en etkili tedavi metilen mavisi ile kırmızı LED ve rose bengal ile yeşil LED uygulamasıdır.
- ✓ *S. epidermidis* ATCC 35984 suşu için hem profilaktik hem terapötik en etkili antimikrobiyal fotodinamik tedavi rose bengal ile yeşil LED kombinasyonudur.
- ✓ *C. albicans* ATCC 10231 suşu için en etkili profilaktik tedavi metilen mavisi ile kırmızı LED, toluidin mavisi O ile kırmızı LED ve kurkumin ile mavi LED uygulamasıdır.
- ✓ *C. albicans* ATCC 10231 suşu için en etkili terapötik tedavi metilen mavisi ile kırmızı LED, toluidin mavisi O ile kırmızı LED, rose bengal ile yeşil LED ve kurkumin ile mavi LED uygulamalarıdır.
- ✓ *C. albicans* ATCC 10231 suşu için hem profilaktik hem terapötik en etkili antimikrobiyal fotodinamik tedavi kurkumin ve mavi LED kombinasyonudur.
- ✓ *C. parapsilosis* ATCC 96142 suşu için en etkili profilaktik ve terapötik fotodinamik tedavi metilen mavisi ile kırmızı LED, toluidin mavisi O ile kırmızı LED ve kurkumin ile mavi LED uygulamasıdır.

- ✓ *C. parapsilosis* ATCC 96142 suşu için hem profilaktik hem terapötik tedavi için en etkili kombinasyon toluidin mavisi O ve kırmızı LED uygulamasıdır.

Çalışmamızda fotodinamik tedavinin in vitro kateter modelinde biyofilm yapısı üzerine etkili olduğu gösterilmiştir. Belirli fotosensitizör ve LED kombinasyonlarıyla uygulanan profilaktik fotodinamik tedavi ile kateterde biyofilm oluşumunun kısmen engellendiği, terapötik fotodinamik tedavi ile oluşan biyofilmin azaldığı gösterilmiştir.

Kateterlerin enfekte olmaması veya enfeksiyon sonrasında çıkarılmadan temizlenebilmesi sağlık hizmeti açısından çok önemlidir. Bu çalışma, tek çözüm yolu olan kateterin uzaklaştırılmasına gerek kalmadan biyofilm ilişkili kateter enfeksiyonunun oluşmasını önleyen veya oluşan biyofilmi azaltmayı/yok etmeyi amaçlayan hasta dostu, alternatif bir tedavi yöntemi olan antimikrobiyal fotodinamik tedavinin geliştirilmesi için bir basamak niteliğindedir.

Antimikrobiyal fotodinamik tedavinin etkinliğine ilişkin çalışmaların büyük kısmı planktonik mikroorganizmaları içermektedir ve biyofilm etkinliği çalışmaları sınırlıdır. Biyofilme karşı aFDT etkinliği araştırmaları çoğunlukla ağız ve diş enfeksiyonlarına neden olan etkenler üzerine yapılmaktadır. Ayrıca çalışmalar tek tür içeren biyofilmler ve referans suşlara odaklanmıştır, FDT 'nin birden fazla mikroorganizma içeren karışık biyofilmler ve klinik suşlar üzerindeki potansiyeli için daha fazla çalışma önerilmektedir. Fotodinamik tedavinin sağlık kurumlarında ultraviyole ışık uygulamaları gibi, günlük rutin LED uygulamaları da gerçekleştirilebilir. LED ışığın uygun fotosensitizör ile oluşturduğu antimikrobiyal etkinin kateter bakımına eşlik edebileceği düşünülmektedir. *Staphylococcus* ve *Candida* türleri tarafından üretilen biyofilmleri ortadan kaldırmak amacıyla uygun fotosensitizör dozu ve ışık enerjisinin tespit edilmesi için ileri doz belirleme çalışmalarına ihtiyaç vardır. Gelecekte, in vivo deneyler ile kateter enfeksiyonlarında klinik antimikrobiyal etkinlik potansiyeli araştırılabilir.

KAYNAKLAR

1. Tunçcan, Ö., Kalkancı, A., Ünal, E. A., Abdulmajed, O., Erdoğan, M., Dizbay, M., Çağlar, K. (2018). The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 48(4), 873-879.
2. Mozayeni, M. A., Vatandoost, F., Asnaashari, M., Shokri, M., Azari-Marhabi, S., Asnaashari, N. (2020). Comparing the efficacy of toluidine blue, methylene blue and curcumin in photodynamic therapy against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 11(Suppl 1), S49.
3. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711-745.
4. Kolter, R., Greenberg, E. P. (2006). The superficial life of microbes. *Nature*, 441(7091), 300-302.
5. Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., Michiels, J. (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in Microbiology*, 16(10), 496-506.
6. James, G. A., Beaudette, L., Costerton, J. W. (1995). Interspecies bacterial interactions in biofilms. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 15(4), 257-262.
7. Wuertz, S., Okabe, S., Hausner, M. (2004). Microbial communities and their interactions in biofilm systems: an overview. *Water Science and Technology*, 49(11-12), 327-336.
8. Donlan, R. M. (2001). Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*, 33(8), 1387-1392.
9. Wolska, K. I., Grudniak, A. M., Rudnicka, Z., Markowska, K. (2016). Genetic control of bacterial biofilms. *Journal of Applied Genetics*, 57(2):225-38.
10. O'Toole, G., Kaplan, H. B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
11. Elder, M. J., Stapleton, F., Evans, E., Dart, J. K. (1995). Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye*, 9(1), 102-109.
12. Carpentier, B., Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 499-511.
13. Costerton, J. W., Stewart, P. S., Greenberg, E. P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
14. Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881.
15. Percival, S. L., Knottenbelt, D. C., Cochrane, C. A. (2011). *Biofilms and veterinary medicine* (Vol. 6). Springer Science & Business Media.

16. Westall, F., de Wit, M. J., Dann, J., Van Der Gaast, S., de Ronde, C. E., Gerneke, D. (2001). Early Archean fossil bacteria and biofilms in hydrothermally-influenced sediments from the Barberton greenstone belt, South Africa. *Precambrian Research*, 106(1-2), 93-116.
17. Post, J. C., Stoodley, P., Hall–Stoodley, L., Ehrlich, G. D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Current opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 12(3), 185-190.
18. Høiby, N. (2017). A short history of microbial biofilms and biofilm infections. *Apmis*, 125(4), 272-275.
19. Sakarya, S. (2005). Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. *Klinik Dergisi*, 18(1), 3-8.
20. Donlan, R. M., Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167-193.
21. Zobell, C. E., Allen, E. C. (1935). The significance of marine bacteria in the fouling of submerged surfaces. *Journal of Bacteriology*, 29(3), 239-251.
22. Henrici, A. T. (1933). Studies of freshwater bacteria: I. A direct microscopic technique. *Journal of Bacteriology*, 25(3), 277-287.
23. Vu, B., Chen, M., Crawford, R. J., Ivanova, E. P. (2009). Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules*, 14(7), 2535-2554.
24. Heukelekian, H., Heller, A. (1940). Relation between food concentration and surface for bacterial growth. *Journal of Bacteriology*, 40(4), 547-558).
25. Zobell, C. E. (1943). The effect of solid surfaces upon bacterial activity. *Journal of Bacteriology*, 46(1), 39-56.
26. Hoiby, N., Flensburg, E. W., Beck, B., Friis, B., Jacobsen, S. V., Jacobsen, L. (1977). *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Diagnostic and prognostic significance of *Pseudomonas aeruginosa* precipitins determined by means of crossed immunoelectrophoresis. *Scandinavian Journal of Respiratory Diseases*, 58(2), 65-79.
27. Høiby, N. (2014). A personal history of research on microbial biofilms and biofilm infections. *Pathogens and Disease*, 70(3), 205-211.
28. McCoy, W. F., Bryers, J. D., Robbins, J., Costerton, J. W. (1981). Observations of fouling biofilm formation. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(9), 910-917.
29. Nickel, J. C., Ruseska, I., Wright, J. B., Costerton, J. W. (1985). Tobramycin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* cells growing as a biofilm on urinary catheter material. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 27(4), 619-624.
30. Jones, H. C., Roth, I. L., Sanders III, W. M. (1969). Electron microscopic study of a slime layer. *Journal of Bacteriology*, 99(1), 316-325.

31. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209.
32. Lindsay, D., Von Holy, A. (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64(4), 313-325.
33. Arnold, J. W., Silvers, S. (2000). Comparison of poultry processing equipment surfaces for susceptibility to bacterial attachment and biofilm formation. *Poultry Science*, 79(8), 1215-1221.
34. Palmer, J., Flint, S., Brooks, J. (2007). Bacterial cell attachment, the beginning of a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(9), 577-588.
35. Meadows, P. S. (1971). The attachment of bacteria to solid surfaces. *Archiv für Mikrobiologie*, 75, 374-381.
36. Tormo, M. A., Knecht, E., Gotz, F., Lasa, I., Penades, J. R. (2005). Bap-dependent biofilm formation by pathogenic species of *Staphylococcus*: evidence of horizontal gene transfer? *Microbiology*, 151(Pt 7), 2465-2475.
37. Donlan, R. M. (2001). Biofilms and device-associated infections. *Emerging Infectious Diseases*, 7(2), 277.
38. Allison, D. G., Lappin-Scott, H. M., Wilson, M., Gilbert, P. (2000). *Community structure and cooperation in biofilms*. Cambridge University Press, 59, 87-106.
39. Flemming, H. C., Wingender, J. (2001). Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs)-Part I: Structural and ecological aspects. *Water Science and Technology*, 43(6), 1-8.
40. Flemming, H. C., Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology*, 8(9), 623-633.
41. Sutherland, I. W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*, 147(1), 3-9.
42. Hussain, M., Wilcox, M. H., White, P. J. (1993). The slime of coagulase-negative staphylococci: biochemistry and relation to adherence. *FEMS Microbiology Reviews*, 10(3-4), 191-208.
43. Tolker-Nielsen, T., Molin, S. (2000). Spatial organization of microbial biofilm communities. *Microbial Ecology*, 40, 75-84.
44. Fisher, K., Phillips, C. (2009). The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155, 1749-57.
45. Padera, R. F. (2006). Infection in ventricular assist devices: the role of biofilm. *Cardiovascular Pathology*, 15(5), 264-270.
46. Flemming, H. C., Wingender, J., Griegbe, T., Mayer, C. (2000). Physico-chemical properties of biofilms. Biofilms: recent advances in their study and control. *Amsterdam: Harwood Academic Publishers*, 19-34.

47. Ruiz, B., Jaspe, A., SanJose, C., Gilbert, P., Allison, D. G. (1999). Compositional diversity among exopolysaccharides from planktonic and biofilm populations of *Pseudomonas fluorescens*. *Biofilms: the Good, the Bad and the Ugly*, 269-77.
48. Flemming, H. C. (2000). Cohesiveness in biofilm matrix polymers. *Community structure and cooperation in biofilms*, 87-105.
49. Magana, M., Sereti, C., Ioannidis, A., Mitchell, C. A., Ball, A. R., Magiorkinis, E., Tegos, G. P. (2018). Options and limitations in clinical investigation of bacterial biofilms. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(3), 10-1128.
50. Vuong, C., Otto, M. (2002). Staphylococcus epidermidis infections. *Microbes and Infection*, 4(4), 481-489.
51. Shrout, J. D., Tolker-Nielsen, T., Givskov, M., Parsek, M. R. (2011). The contribution of cell-cell signaling and motility to bacterial biofilm formation. *Mrs Bulletin*, 36(5), 367-373.
52. Öztürk, Ş. B., Sakarya, S., Öncü, S., Ertuğrul, M. B. (2008). Biyofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları. *Klinik Dergisi*, 21(3), 79-86.
53. Chmielewski, R. A. N., Frank, J. F. (2003). Biofilm formation and control in food processing facilities. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 22-32.
54. Simões, M., Simões, L. C., Vieira, M. J. (2010). A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology*, 43(4), 573-583.
55. Wright, K. J., Seed, P. C., Hultgren, S. J. (2007). Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cellular Microbiology*, 9(9), 2230-2241.
56. Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), 7-12.
57. Lavery, G., Gorman, S. P., Gilmore, B. F. (2014). Biomolecular mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* biofilm formation. *Pathogens*, 3(3), 596-632.
58. Heilmann, C., Schweitzer, O., Gerke, C., Vanittanakom, N., Mack, D., Götz, F. (1996). Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Molecular Microbiology*, 20(5), 1083-1091.
59. Danese, P. N., Pratt, L. A., Kolter, R. (2000). Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of Bacteriology*, 182(12), 3593-3596.
60. Dufour, D., Leung, V., Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2-16.

61. Shi, X., Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407-413.
62. Romanova, I. M., Gintsburg, A. L. (2011). Bacterial biofilms as a natural form of existence of bacteria in the environment and host organism. *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii Immunobiologii*, (3), 99-109.
63. Gjermansen, M., Ragas, P., Sternberg, C., Molin, S., Tolker-Nielsen, T. (2005). Characterization of starvation-induced dispersion in *Pseudomonas putida* biofilms. *Environmental Microbiology*, 7(6), 894-904.
64. Römling, U., Galperin, M. Y., Gomelsky, M. (2013). Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 77(1), 1-52.
65. Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512.
66. Albuquerque, P., Casadevall, A. (2012). Quorum sensing in fungi—a review. *Medical Mycology*, 50(4), 337-345.
67. Kovács, R., Majoros, L. (2020). Fungal quorum-sensing molecules: A review of their antifungal effect against *Candida* biofilms. *Journal of Fungi*, 6(3), 99.
68. Jain, A., Gupta, Y., Agrawal, R., Jain, S. K., Khare, P. (2007). Biofilms-a microbial life perspective: a critical review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 24(5), 393-443.
69. Nealson, K.H. (1977). Autoinduction of bacterial luciferase. Occurrence, mechanism and significance. *Archives of Microbiology*, 112, 73-79.
70. Singh, B. P., Ghosh, S., Chauhan, A. (2021). Development, dynamics and control of antimicrobial-resistant bacterial biofilms: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 19, 1983-1993.
71. Priti, S., Yogesh, J., Kartik, R., Renu, B. (2019). Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. *Indian Journal of Microbiology*, 59(1), 3-12.
72. Preda, V. G., Săndulescu, O. (2019). Communication is the key: biofilms, quorum sensing, formation and prevention. *Discoveries*, 7(3), e100.
73. Parsek, M. R., Greenberg, E. P. (2005). Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 27-33.
74. Irie, Y., Parsek, M. R. (2008). Quorum sensing and microbial biofilms. *Bacterial Biofilms*, 322, 67-84.
75. Solano, C., Echeverz, M., Lasa, I. (2014). Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current Opinion in Microbiology*, 18, 96-104.

76. Mukherjee, S., Bassler, B. L. (2019). Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nature Reviews Microbiology*, 17(6), 371-382.
77. Saxena, P., Joshi, Y., Rawat, K., Bisht, R. (2019). Biofilms: architecture, resistance, quorum sensing and control mechanisms. *Indian Journal of Microbiology*, 59, 3-12.
78. Miller, M. B., Bassler, B. L. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Reviews in Microbiology*, 55(1), 165-199.
79. Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 95-108.
80. Del Pozo, J. L. (2018). Biofilm-related disease. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 16(1), 51-65.
81. Römling, U., Kjelleberg, S., Normark, S., Nyman, L., Uhlin, B. E., Åkerlund, B. (2014). Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of Internal Medicine*, 276(2), 98-110.
82. Banerjee, D., Shivapriya, P. M., Gautam, P. K., Misra, K., Sahoo, A. K., Samanta, S. K. (2020). A review on basic biology of bacterial biofilm infections and their treatments by nanotechnology-based approaches. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 90, 243-259.
83. Wolcott, R. D., Rhoads, D. D., Bennett, M. E., Wolcott, B. M., Gogokhia, L., Costerton, J. W., Dowd, S. E. (2010). Chronic wounds and the medical biofilm paradigm. *Journal of Wound Care*, 19(2), 45-53.
84. Del Pozo, J. L., Patel, R. (2007). The challenge of treating biofilm-associated bacterial infections. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 82(2), 204-209.
85. Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: a review. *Archives of Microbiology*, 198, 1-15.
86. Nourbakhsh, F., Nasrollahzadeh, M. S., Tajani, A. S., Soheili, V., Hadizadeh, F. (2022). Bacterial biofilms and their resistance mechanisms: A brief look at treatment with natural agents. *Folia Microbiologica*, 67(4), 535-554.
87. Ilyina, T. S., Romanova, Y. M. (2021). The Role of Bacterial Biofilms in Chronic Infectious Processes and the Search for Methods to Combat Them. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 36(2), 68-78.
88. Fux, C. A., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W. (2003). Bacterial biofilms: a diagnostic and therapeutic challenge. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 1(4), 667-683.
89. Nett, J., Andes, D. (2006). *Candida albicans* biofilm development, modeling a host–pathogen interaction. *Current Opinion in Microbiology*, 9(4), 340-345.

90. Gristina, A. G., Naylor, P., Myrvik, Q. (1988). Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Medical Progress Through Technology*, 14(3-4), 205-224.
91. Raad, I. I., Bodey, G. P. (1992). Infectious complications of indwelling vascular catheters. *Clinical Infectious Diseases*, 197-208.
92. Römling, U., Balsalobre, C. (2012). Biofilm infections, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *Journal of Internal Medicine*, 272(6), 541-561.
93. Blankenship, J. R., Mitchell, A. P. (2006). How to build a biofilm: a fungal perspective. *Current Opinion in Microbiology*, 9(6), 588-594.
94. Chandra, J., Kuhn, D. M., Mukherjee, P. K., Hoyer, L. L., McCormick, T., Ghannoum, M. A. (2001). Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, 183(18), 5385-5394.
95. Del Pozo, J. L., Canton, E. (2015). *Candida* biofilm-related infections. *Revista Iberoamericana de Micología*, 33(3), 176-183.
96. Lynch, A. S., Robertson, G. T. (2008). Bacterial and fungal biofilm infections. *Annual Review of Medicine*, 59, 415-428.
97. Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., Lopez-Ribot, J. L. (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*, 4(4), 633-638.
98. Del Pozo, J. L., Patel, R. (2013). Are antibiotics and surgery sufficient to treat biofilm-associated infections?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 31(10), 641-642.
99. Rather, M. A., Gupta, K., Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology*, 52(4), 1701-1718.
100. Onbaşlı, D., Celik, G. Y., Ökçesiz, A. Mikrobiyal Biyofilmlere Karşı Yeni Antibiyofilm Stratejileri ve Nanoteknolojik Yaklaşımlar. *Sağlık Bilimleri Dergisi*, 26(3), 262-266.
101. Forsmann W. (1929). Catheterization of the right heart. *Klinische Wochenschrift*, 45, 2085-2087.
102. Shah, H., Bosch, W., Thompson, K. M., Hellinger, W. C. (2013). Intravascular catheter-related bloodstream infection. *The Neurohospitalist*, 3(3), 144-151.
103. Bouza, E., Guembe, M., Munoz, P. (2010). Selection of the vascular catheter: can it minimise the risk of infection?. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, 22-25.
104. O'grady, N. P., Alexander, M., Dellinger, E. P., Gerberding, J. L., Heard, S. O., Maki, D. G., Weinstein, R. A. (2002). Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clinical Infectious Diseases*, 35(11), 1281-1307.

105. Öcal, D., DOLAPÇI, İ. (2012). Santral venöz kateter ile ilişkili enfeksiyonlar. *Türk Mikrobiyoloji Cemiyeti Dergisi*, 42, 1-9.
106. Mermel, L. A., Farr, B. M., Sherertz, R. J., Raad, I. I., O'Grady, N., Harris, J. S., Craven, D. E. (2001). Guidelines for the management of intravascular catheter-related infections. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 22(4), 222-242.
107. Mandell, G.L., Bennett, J. L., Dolin, R. (2005). *Infections caused by percutaneous intravascular devices* (6th edition). Principles and Practice of Infectious Diseases, 3347–62.
108. Moretti, E. W., Ofstead, C. L., Kristy, R. M., Wetzler, H. P. (2005). Impact of central venous catheter type and methods on catheter-related colonization and bacteraemia. *Journal of Hospital Infection*, 61(2), 139-145.
109. Tünger, Ö., Tireli, M. (2013). İntravenöz Kateter İnfeksiyonları: Sorunlar ve Çözümler. *Ankem Dergisi*, 27(2), 96-105.
110. Leonidou, L., Gogos, C. A. (2010). Catheter-related bloodstream infections: catheter management according to pathogen. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 36, 26-32.
111. O'grady, N. P., Alexander, M., Burns, L. A., Dellinger, E. P., Garland, J., Heard, S. O., Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee. (2011). Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. *Clinical infectious diseases*, 52(9), 162-193.
112. Ghannoum, M., Roilides, E., Katragkou, A., Petraitis, V., Walsh, T. J. (2015). The role of echinocandins in Candida biofilm–related vascular catheter infections: in vitro and in vivo model systems. *Clinical Infectious Diseases*, 61(suppl 6), 618-621.
113. Bouza, E., Burillo, A., Munoz, P. (2002). Catheter-related infections: diagnosis and intravascular treatment. *Clinical Microbiology and Infection*, 8(5), 265-274.
114. Eggimann, P., Sax, H., Pittet, D. (2004). Catheter-related infections. *Microbes and Infection*, 6(11), 1033-1042.
115. Özsürekcı, Y., Karadağ Öncel, E. D. A., Ceyhan, M. (2013). Central venous catheter-related bloodstream infections: literature review. *Journal of Pediatric Infection*, 7(1), 25-30.
116. Scales, K. (2011). Reducing infection associated with central venous access devices. *Nursing Standard*, 25(36), 49-56.
117. Mermel, L. A., Allon, M., Bouza, E., Craven, D. E., Flynn, P., O'Grady, N. P., Warren, D. K. (2009). Clinical practice guidelines for the diagnosis and management of intravascular catheter-related infection: 2009 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases*, 49(1), 1-45.
118. Raad, I. I., Darouiche, R. O. (1996). Catheter-related septicemia: risk reduction. *Infections in Medicine*, 13(9), 807-812.

119. Gahlot, R., Nigam, C., Kumar, V., Yadav, G., Anupurba, S. (2014). Catheter-related bloodstream infections. *International Journal of Critical Illness And Injury Science*, 4(2), 162.
120. Mermel, L. A. (2000). Prevention of intravascular catheter-related infections. *Annals of Internal Medicine*, 132(5), 391-402.
121. Centers for Disease Control and Prevention (CDC. (2000). Monitoring hospital-acquired infections to promote patient safety--United States, 1990-1999. *Morbidity and mortality weekly report*, 49(8), 149-153.
122. Saint, S., Veenstra, D. L., Lipsky, B. A. (2000). The clinical and economic consequences of nosocomial central venous catheter-related infection: are antimicrobial catheters useful?. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 21(6), 375-380.
123. Pawar, M., Mehta, Y., Kapoor, P., Sharma, J., Gupta, A., Trehan, N. (2004). Central venous catheter related blood stream infections: incidence, risk factors, outcome, and associated pathogens. *Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia*, 18(3), 304-308.
124. Maki, D. G., Kluger, D. M., Crnich, C. J. (2006). The risk of bloodstream infection in adults with different intravascular devices: a systematic review of 200 published prospective studies. *In Mayo Clinic Proceedings Elsevier*, 81(9), 1159-1171.
125. Hollenbeak, C. S. (2011). The cost of catheter-related bloodstream infections: implications for the value of prevention. *Journal of Infusion Nursing*, 34(5), 309-313.
126. Dünder, V., Öztürk Dünder, D. (2002). Stafilokok infeksiyonları. *Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi Etkenlere Göre Enfeksiyonlar*, 2, 2065-77.
127. Raad, I. I., Luna, M., Khalil, S. A. M., Costerton, J. W., Lam, C., Bodey, G. P. (1994). The relationship between the thrombotic and infectious complications of central venous catheters. *Jama*, 271(13), 1014-1016.
128. Hakyemez, İ. N., Küçükbayrak, A., Akdeniz, H. (2012). Damar içi kateter infeksiyonlarına güncel yaklaşım. *Abant Tıp Dergisi*, 1(2), 94-98.
129. Yamin, D. H., Husin, A., Harun, A. (2021). Risk factors of Candida parapsilosis catheter-related bloodstream infection. *Frontiers in Public Health*, 9, 631865.
130. Dreesen, M., Foulon, V., Spriet, I., Goossens, G. A., Hiele, M., De Pourcq, L., Willems, L. (2013). Epidemiology of catheter-related infections in adult patients receiving home parenteral nutrition: a systematic review. *Clinical Nutrition*, 32(1), 16-26.
131. Rupp, M. E., Karnatak, R. (2018). Intravascular catheter-related bloodstream infections. *Infectious Disease Clinics*, 32(4), 765-787.
132. Seifert, H., Cornely, O., Seggewiss, K., Decker, M., Stefanik, D., Wisplinghoff, H., Fätkenheuer, G. (2003). Bloodstream infection in neutropenic cancer patients related to short-term nontunnelled catheters determined by quantitative blood cultures, differential time to positivity, and molecular epidemiological typing with pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(1), 118-123.

133. Erdal, B. (2021). *Mikrobiyolojide Güncel Konular*. Ankara: Akademisyen Kitabevi, 267-282.
134. Bonnett, R. (2000). *Chemical Aspects Of Photodynamic Therapy* (1st edition). London: CRC Press.
135. Kharkwal, G. B., Sharma, S. K., Huang, Y. Y., Dai, T., Hamblin, M. R. (2011). Photodynamic therapy for infections: clinical applications. *Lasers in Surgery and Medicine*, 43(7), 755-767.
136. De Melo, W. C., Avci, P., De Oliveira, M. N., Gupta, A., Vecchio, D., Sadasivam, M., Hamblin, M. R. (2013). Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 11(7), 669-693.
137. Kostron, H., Hasan, T. (2016). *Photodynamic Medicine: From Bench to Clinic*. Royal Society of Chemistry, 1-21.
138. Ackroyd, R., Kelty, C., Brown, N., Reed, M. (2001). The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), 656-669.
139. Moan, J., Peng, Q. (2003). An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Research*, 23(5A), 3591-3600.
140. Daniell, M. D., Hill, J. S. (1991). A history of photodynamic therapy. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, 61(5), 340-348.
141. Finsen, N. R. (1903). REMARKS on the RED-LIGHT TREATMENT of SMALL-POX: Is the Treatment of Small-pox Patients in Broad Daylight Warrantable?. *British Medical Journal*, 1(2214), 1297.
142. Mitton, D., Ackroyd, R. (2005). History of photodynamic therapy in Great Britain. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(4), 239-246.
143. Asim, S. A., Ahmed, S. (2013). Psoralen-ultraviolet A treatment with Psoralen-ultraviolet B therapy in the treatment of psoriasis. *Pakistan Journal Of Medical Sciences*, 29(3), 758-761.
144. Ledo, E., Ledo, A. (2000). Phototherapy, photochemotherapy, and photodynamic therapy: unapproved uses or indications. *Clinics in Dermatology*, 18(1), 77-86.
145. Raab, O. (1900). The effect of fluorescent agents on infusoria. *Z Biol*, 39, 524-546.
146. Cieplik, F., Deng, D., Crielaard, W., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., Maisch, T. (2018). Antimicrobial photodynamic therapy—what we know and what we don't. *Critical Reviews in Microbiology*, 44(5), 571-589.
147. Allison, R. R., Mota, H. C., Sibata, C. H. (2004). Clinical PD/PDT in North America: an historical review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(4), 263-277.

148. Baltazar, L. M., Ray, A., Santos, D. A., Cisalpino, P. S., Friedman, A. J., Nosanchuk, J. D. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. *Frontiers in Microbiology*, 6, 202.
149. Tekdal, G. P., Gürkan, A. (2014). Diş Hekimliği ve Periodontolojide Fotodinamik Tedavi Uygulamaları. *EÜ Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 35(3), 8-22.
150. Maisch, T., Szeimies, R. M., Jori, G., Abels, C. (2004). Antibacterial photodynamic therapy in dermatology. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(10), 907-917.
151. Calzavara, P. G. (1999). Photodynamic therapy: The present and the future. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2(2), 71.
152. Hamblin, M. R., Hasan, T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease?. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 3(5), 436-450.
153. Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., Hamblin, M. R. (2017). Photoantimicrobials—are we afraid of the light?. *The Lancet Infectious Diseases*, 17(2), e49-e55.
154. Raghavendra, M., Koregol, A., Bhola, S. (2009). Photodynamic therapy: a targeted therapy in periodontics. *Australian Dental Journal*, 54, S102-S109.
155. Soukos, N. S., Goodson, J. M. (2011). Photodynamic Therapy in the Control of Oral Biofilms. *Periodontology*, 55, 143-166.
156. Konopka, K. R. Y. S. T. Y. N. A., Goslinski, T. O. M. A. S. Z. (2007). Photodynamic therapy in dentistry. *Journal of Dental Research*, 86(8), 694-707.
157. Maisch, T., Baier, J., Franz, B., Maier, M., Landthaler, M., Szeimies, R. M., Bäumler, W. (2007). The role of singlet oxygen and oxygen concentration in photodynamic inactivation of bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(17), 7223-7228.
158. Foote, C. S. (1991). Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochemistry and Photobiology*, 54(5), 659-659.
159. Stepp, H. (2003). Principles of clinical photodynamic therapy. *Acta Endoscopica*, 33, 493-509.
160. Kutlubay, Z., Pehlivan, Ö., Engin, B. (2011). Fotodinamik tedavi. *Dermatoz*, 2(4), 391-404.
161. Lukšiene, Ž. (2005). New approach to inactivation of harmful and pathogenic microorganisms by photosensitization. *Food Technology and Biotechnology*, 43(4), 411-418.
162. Wainwright, M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42(1), 13-28.
163. Ormond, A. B., Freeman, H. S. (2013). Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, 6(3), 817-840.

164. Redmond, R. W., Gamlin, J. N. (1999). A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochemistry and Photobiology*, 70(4), 391-475.
165. Kömerik, N., Wilson, M., & Poole, S. (2000). The Effect of Photodynamic Action on Two Virulence Factors of Gram-negative Bacteria. *Photochemistry and Photobiology*, 72(5), 676-680.
166. Buchovec, I., Gricajeva, A., Kalėdienė, L., Vitta, P. (2020). Antimicrobial photoinactivation approach based on natural agents for control of bacteria biofilms in spacecraft. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6932.
167. Hamblin, M. R., Abrahamse, H. (2020). Oxygen-independent antimicrobial photoinactivation: type III photochemical mechanism?. *Antibiotics*, 9(2), 53.
168. Onat, H., Tosun, G. (2015). Dış hekimliğinde fotodinamik tedavi. *Atatürk Üniversitesi Dış Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 24(1), 119-124.
169. Wainwright, M., Crossley, K. B. (2002). Methylene blue-a therapeutic dye for all seasons?. *Journal of Chemotherapy*, 14(5), 431-443.
170. O’Riordan, K., Akilov, O. E., Hasan, T. (2005). The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2(4), 247-262.
171. Luksiene, Z. (2003). Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina*, 39(12), 1137-1150.
172. Allison, R. R., Downie, G. H., Cuenca, R., Hu, X. H., Childs, C. J., Sibata, C. H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 27-42.
173. Ryskova, L., Buchta, V., Slezak, R. (2010). Photodynamic antimicrobial therapy. *Central European Journal of Biology*, 5, 400-406.
174. Wei, G., Yang, G., Wang, Y., Jiang, H., Fu, Y., Yue, G., Ju, R. (2020). Phototherapy-based combination strategies for bacterial infection treatment. *Theranostics*, 10(26), 12241.
175. Demidova, T. N., Hamblin, M. R. (2005). Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(6), 2329-2335.
176. Ghorbani, J., Rahban, D., Aghamiri, S., Teymouri, A., Bahador, A. (2018). Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: An overview. *Laser Therapy*, 27(4), 293-302.
177. Abrahamse, H., Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal*, 473(4), 347-364.

178. Nakonechny, F., Nisnevitch, M., Nitzan, Y., Firer, M. A. (2011). New techniques in antimicrobial photodynamic therapy: scope of application and overcoming drug resistance in nosocomial infections. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*, 1, 684-691.
179. Trindade, A. C., De Figueiredo, J. A. P., Steier, L., Weber, J. B. B. (2015). Photodynamic therapy in endodontics: a literature review. *Photomedicine and Laser Surgery*, 33(3), 175-182.
180. Yin, R., Dai, T., Avci, P., Jorge, A. E. S., de Melo, W. C., Vecchio, D., Hamblin, M. R. (2013). Light based anti-infectives: ultraviolet C irradiation, photodynamic therapy, blue light, and beyond. *Current Opinion in Pharmacology*, 13(5), 731-762.
181. Maisch, T. (2007). Anti-microbial photodynamic therapy: useful in the future?. *Lasers in Medical Science*, 22, 83-91.
182. Nagata, J. Y., Hioka, N., Kimura, E., Batistela, V. R., Terada, R. S. S., Graciano, A. X., Hayacibara, M. F. (2012). Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9(2), 122-131.
183. Huang, Z. (2005). A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in Cancer Research & Treatment*, 4(3), 283-293.
184. Lian, C., Piksa, M., Yoshida, K., Persheyev, S., Pawlik, K. J., Matczyszyn, K., Samuel, I. D. (2019). Flexible organic light-emitting diodes for antimicrobial photodynamic therapy. *Flexible Electronics*, 3(1), 18.
185. Mang, T. S. (2004). Lasers and light sources for PDT: past, present and future. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 1(1), 43-48.
186. Purushothaman, T., Irfana, M. (2021). A critical review on antimicrobial photodynamic inactivation using light emitting diode (LED). *Shanlax International Journal of Arts, Science and Humanities*, 8(3), 124-130.
187. Mahmoudi, H., Bahador, A., Pourhajibagher, M., Alikhani, M. Y. (2018). Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control bacterial infections. *Journal of Lasers in Medical Sciences*, 9(3), 154.
188. Friedberg, J. S., Skema, C., Baum, E. D., Burdick, J., Vinogradov, S. A., Wilson, D. F., Nachamkin, I. (2001). In vitro effects of photodynamic therapy on *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(1), 105-107.
189. Shen, J. J., Jemec, G. B., Arendrup, M. C., Saunte, D. M. L. (2020). Photodynamic therapy treatment of superficial fungal infections: A systematic review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 31, 101774.
190. Liang, Y. I., Lu, L. M., Chen, Y., Lin, Y. K. (2016). Photodynamic therapy as an antifungal treatment. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 12(1), 23-27.

191. Svyatchenko, V. A., Nikonov, S. D., Mayorov, A. P., Gelfond, M. L., Loktev, V. B. (2021). Antiviral photodynamic therapy: Inactivation and inhibition of SARS-CoV-2 in vitro using methylene blue and Radachlorin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 33, 102112.
192. Gardlo, K., Horska, Z., Enk, C. D., Rauch, L., Megahed, M., Ruzicka, T., Fritsch, C. (2003). Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(6), 893-896.
193. Renwick, M. J., Simpkin, V., Mossialos, E., World Health Organization. (2016). Targeting innovation in antibiotic drug discovery and development: The need for a One Health–One Europe–One World Framework. World Health Organization. Regional Office for Europe.
194. Paschoal, M. A., Tonon, C. C., Spolidório, D. M., Bagnato, V. S., Giusti, J. S., Santos-Pinto, L. (2013). Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in a planktonic culture. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 10(3), 313-319.
195. Carrera, E. T., Dias, H. B., Corbi, S. C. T., Marcantonio, R. A. C., Bernardi, A. C. A., Bagnato, V. S., Rastelli, A. N. D. S. (2016). The application of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) in dentistry: a critical review. *Laser Physics*, 26(12), 123001.
196. Manoil, D., Filieri, A., Gameiro, C., Lange, N., Schrenzel, J., Wataha, J. C., Bouillaguet, S. (2014). Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11(3), 372-379.
197. Misba, L., Zaidi, S., Khan, A. U. (2017). A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 18, 24-33.
198. Colomer-Winter, C., Lemos, J. A., Flores-Mireles, A. L. (2019). Biofilm assays on fibrinogen-coated silicone catheters and 96-well polystyrene plates. *Bio-protocol*, 9(6), e3196-e3196.
199. Austin, P. D., Stapleton, P., Elia, M. (2022). Comparative effect of seven prophylactic locks to prevent biofilm biomass and viability in intravenous catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(8), 2191-2198.
200. Costa, A. C. B. P., de Campos Rasteiro, V. M., Pereira, C. A., da Silva Hashimoto, E. S. H., Junior, M. B., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2011). Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine-and LED-mediated photodynamic therapy. *Archives of Oral Biology*, 56(11), 1299-1305.
201. Chandra, J., Long, L., Ghannoum, M. A., & Mukherjee, P. K. (2011). A rabbit model for evaluation of catheter-associated fungal biofilms. *Virulence*, 2(5), 466-474.
202. Donlan RM. Biofilms on central venous catheters: is eradication possible? *Current Topics Microbiology Immunology*. 2008; 322: 133-61.

203. Mohamad, F., Alzahrani, R. R., Alsaadi, A., Alrfaei, B. M., Yassin, A. E. B., Alkhulaifi, M. M., Halwani, M. (2023). An explorative review on advanced approaches to overcome bacterial resistance by curbing bacterial biofilm formation. *Infection and Drug Resistance*, 19-49.
204. Angarano, V., Smet, C., Akkermans, S., Akritidou, T., Huyck, B., Chieffi, A., & Impe, J. F. V. (2020). A reproducible method for growing biofilms on polystyrene surfaces: biomass and bacterial viability evolution of *Pseudomonas fluorescens* and *Staphylococcus epidermidis*. *Applied Sciences*, 10(13), 4544.
205. Park, G. H., Lee, S. Y., Lee, J. B., Chang, B. S., Lee, J. K., Um, H. S. (2023). Effect of photodynamic therapy according to differences in photosensitizers on *Staphylococcus aureus* biofilm on titanium. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 41, 103-317.
206. Usacheva, M. N., Teichert, M. C., Biel, M. A. (2003). The role of the methylene blue and toluidine blue monomers and dimers in the photoinactivation of bacteria. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 71(1-3), 87-98.
207. Chan, H., Pavelka Jr, M. S., Baran, T. M. (2023). Methylene blue photodynamic therapy of bacterial species found in human abscesses: planktonic, biofilm, and 3D silicone models. *Photonic Diagnosis, Monitoring, Prevention, and Treatment of Infections and Inflammatory Diseases*, 12358, 9-24.
208. Dovigo, L. N., Pavarina, A. C., de Oliveira Mima, E. G., Giampaolo, E. T., Vergani, C. E., Bagnato, V. S. (2011). Fungicidal effect of photodynamic therapy against fluconazole-resistant *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Mycoses*, 54(2), 123-130.
209. Vilela, S. F. G., Junqueira, J. C., Barbosa, J. O., Majewski, M., Munin, E., Jorge, A. O. C. (2012). Photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms by malachite green and phenothiazine dyes: an in vitro study. *Archives of Oral Biology*, 57(6), 704-710.
210. Kashef, N., Akbarizare, M., Razzaghi, M. R. (2017). In vitro activity of Linezolid in combination with photodynamic inactivation against *staphylococcus aureus* biofilms. *Avicenna journal of medical biotechnology*, 9(1), 44.
211. Wang, Y., Dai, T., & Gu, Y. (2016, October). Antimicrobial blue light inactivation of Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. In *Optics in Health Care and Biomedical Optics VII* (Vol. 10024, pp. 148-154).
212. Pérez-Laguna, V., García-Luque, I., Ballesta, S., Pérez-Artiaga, L., Lampaya-Pérez, V., Samper, S., Soria-Lozano, P., Rezusta, A., Gilaberte, Y. (2018). Antimicrobial photodynamic activity of Rose Bengal, alone or in combination with Gentamicin, against planktonic and biofilm *Staphylococcus aureus*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21, 211-216.
213. Baptista, A., Sabino, C. P., Núñez, S. C., Miyakawa, W., Martin, A. A., Ribeiro, M. S. (2017). Photodynamic damage predominates on different targets depending on cell growth phase of *Candida albicans*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 177, 76-84.

214. Ronqui, M. R., de Aguiar, T. M. S. F., De Freitas, L. M., Miranda, E. T., Fontana, C. R. (2016). Synergistic antimicrobial effect of photodynamic therapy and ciprofloxacin. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 158, 122-129.
215. Misba, L., Zaidi, S., Khan, A. U. (2017). A comparison of antibacterial and antibiofilm efficacy of phenothiazinium dyes between Gram positive and Gram negative bacterial biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 18, 24-33.
216. Sharma, M., Visai, L., Bragheri, F., Cristiani, I., Gupta, P. K., Speziale, P. (2008). Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(1), 299-305.
217. Narayanan VS, Muddaiah S, Shashidara R, Sudheendra US, Deepthi NC, Samaranayake L. Variable antifungal activity of curcumin against planktonic and biofilm phase of different candida species. *Indian Journal of Dental Research*, 31(1),145-148.
218. Ma, J., Shi, H., Sun, H., Li, J., Bai, Y. (2019). Antifungal effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans* biofilms in vitro. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 27, 280-287.
219. Hsieh, Y. H., Zhang, J. H., Chuang, W. C., Yu, K. H., Huang, X. B., Lee, Y. C., Lee, C. I. (2018). An in vitro study on the effect of combined treatment with photodynamic and chemical therapies on *Candida albicans*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), 337.
220. Rajasekar, V., Darne, P., Prabhune, A., Kao, R. Y., Solomon, A. P., Ramage, G., Neelakantan, P. (2020). Curcumin-Sophorolipid nano-conjugate inhibits *Candida albicans* filamentation and biofilm development. *bioRxiv*, 2020-08.
221. de Carvalho Leonel, L., Carvalho, M. L., da Silva, B. M., Zamuner, S., Alberto-Silva, C., & Costa, M. S. (2019). Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT) using methylene blue inhibits the viability of the biofilm produced by *Candida albicans*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 26, 316-323.
222. Pinto, A. P., Rosseti, I. B., Carvalho, M. L., da Silva, B. G. M., Alberto-Silva, C., Costa, M. S. (2018). Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy (PACT), using Toluidine blue O inhibits the viability of biofilm produced by *Candida albicans* at different stages of development. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 21, 182-189.
223. Wiench, R., Skaba, D., Stefanik, N., Kępa, M., Gilowski, Ł., Cieślak, G., Kawczyk-Krupka, A. (2019). Assessment of sensitivity of selected *Candida* strains on antimicrobial photodynamic therapy using diode laser 635 nm and toluidine blue–In vitro research. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, 27, 241-247.
224. Sousa, A. S., Prates, R. A., de Santi, M. E. S. O., Lopes, R. G., Bussadori, S. K., Ferreira, L. R., Deana, A. M. (2016). Photodynamic inactivation of *Candida albicans* biofilm: influence of the radiant energy and photosensitizer charge. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 14, 111-114.

225. Soares, B. M., da Silva, D. L., Sousa, G. R., Amorim, J. C. F., de Resende, M. A., Pinotti, M., Cisalpino, P. S. (2009). In vitro photodynamic inactivation of *Candida* spp. growth and adhesion to buccal epithelial cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 94(1), 65-70.
226. Brovko, L. Y., Meyer, A., Tiwana, A. S., Chen, W., Liu, H., Filipe, C. D., Griffiths, M. W. (2009). Photodynamic treatment: a novel method for sanitation of food handling and food processing surfaces. *Journal of Food Protection*, 72(5), 1020-1024.

EKLER

EK-1. Etik Kurul Raporu



**T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Etik Komisyonu**

Sayı :
Konu : Bilimsel ve Eğitim Amaçlı

10.08.2021

Dağıtım Yerlerine

Üniversitemiz Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı **Doktora Öğrencisi Merve ERDOĞAN'ın, Prof.Dr.Ayşe KALKANCI'nın** danışmanlığında yürüttüğü *"Antimikrobiyal Fotodinamik Tedavi Etkinliğinin Kateter Modelinde İncelenmesi"* adlı tez çalışması ile ilgili konu Komisyonumuzun **22.06.2021** tarih ve **11** sayılı toplantısında görüşülmüş olup,

İlgilinin çalışmasının, yapılması planlanan yerlerden izin alınması koşuluyla yapılmasında etik açıdan bir sakınca bulunmadığına oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

EK-1. (devam) Etik Kurul Raporu

Evrak Tarih ve Sayısı: 10.08.2021-E.130619

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
ETİK KOMİSYONU KATILIM LİSTESİ

TOPLANTI TARİHİ : 22.06.2021		TOPLANTI SAYISI : 11	
ADI – SOYADI		İMZA	
Prof. Dr. İsmail KARAKAYA BAŞKAN			
Prof.Dr.Kemal ÖZTEMEL BAŞKAN YRD.			
Prof.Dr.C.Haluk BODUR			
Prof.Dr.Seçil ÖZKAN			
Prof.Dr.Cevriye TEMEL GENCER			
Prof.Dr.İsmet YÜKSEL			
Prof.Dr.Aymelek GÖNENÇ			
Prof.Dr.Gülray BAYRAMOĞLU			
Prof.Dr.Makbule GEZMEN KARADAĞ			
Prof.Dr.Zehra GÖÇMEN BAYKARA			
Doç.Dr.İlyas OKUR			
Doç.Dr.Nihan KAFA			
Doç.Dr.Melek Gülşah ŞAHİN			

Bu belge güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK-1. (devam) Etik Kurul Raporu



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Etik Komisyonu

Sayı :
Konu : Bilimsel ve Eğitim Amaçlı

08.08.2023

Dağıtım Yerlerine

Daha önce 10.08.2021 tarih ve E.130619 sayılı yazımız ile onay alan araştırmacı grubu Merve ERDOĞAN ve Prof.Dr.Ayşe KALKANCI 'dan oluşan 2021-713 kod numaralı, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı **Doktora Öğrencisi Merve ERDOĞAN'ın, Prof.Dr.Ayşe KALKANCI'nın** danışmanlığında yürüttüğü **"Antimikrobiyal Fotodinamik Tedavi Etkinliğinin Kateter Modelinde İncelenmesi"** adlı tez çalışması hakkında Komisyonumuza verilen 18.07.2023 tarihli dilekçe Komisyonumuzun **27.07.2023** tarih ve **14** sayılı toplantısında görüşülmüştür.

Dilekçede; çalışmada danışman değişikliği yapılması nedeniyle, çalışmaya tez danışmanı olarak atanmanız (Enstitünün 14.12.2022 tarih ve 09 sayılı kararında danışman değişikliği yapıldığı) ile daha önce tez danışmanı olan Prof.Dr.Ayşe KALKANCI'nın araştırmacı grubunda yer alması hakkındaki talebin uygun olduğuna oybirliği ile karar verilmiş ve karara ilişkin imza listesi ekte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim .

EK-1. (devam) Etik Kurul Raporu

Evrak Tarih ve Sayısı: 08.08.2023-E.715082		GAZİ ÜNİVERSİTESİ	
ETİK KOMİSYONU KATILIM LİSTESİ			
TOPLANTI TARİHİ : 27.07.2023		TOPLANTI SAYISI : 14	
ADI – SOYADI	İMZA		
Prof. Dr. İsmail KARAKAYA BAŞKAN			
Prof. Dr. Zehra GÖÇMEN BAYKARA BAŞKAN YRD.			
Prof. Dr. C. Haluk BODUR			
Prof. Dr. Seçil ÖZKAN			
Prof. Dr. Cevriye TEMEL GENCER			
Prof. Dr. İlkay ULUTAŞ			
Prof. Dr. Kemalettin DENİZ			
Prof. Dr. Makbule GEZMEN KARADAĞ			
Prof. Dr. İlyas OKUR			
Prof. Dr. Nihan KAFA			
Doç. Dr. Melek Gülşah ŞAHİN			
Doç. Dr. Gökhan DELİCEOĞLU			
Doç. Dr. Elvan İNCE AKA			

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Erdoğan, Merve
 Uyruğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri :
 Medeni hali :
 Telefon :
 e-mail :

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi/Tıbbi Mikrobiyoloji ABD	Devam ediyor
Yüksek Lisans	Gazi Üniversitesi/Tıbbi Mikrobiyoloji ABD	2016
Lisans	Ankara Üniversitesi/ Biyoloji	2012

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2017 – Devam ediyor	SANKO Üniversitesi, Tıp Fakültesi	Araştırma görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

- Oğuzülgen, K., Öztürk, A. B., Bacceoğlu, A., Aydın, Ö., Köycü Buhari, G., Damadoğlu, E., Öner Erkeköl, F., Göksel, Ö., Karakaya, G., Kalyoncu, A. F., Kalpaklıoğlu, F., Mungan, D., Türктаş, H., Pur Özyiğit, L., Ergin, Ç., Erdogan, M., Kalkancı, A. (2024). Inhaler Steroid Use Changes Oral and Airway Bacterial and Fungal Microbiome Profile in Asthma Patients. *International Archives of Allergy and Immunology*, 185(1), 10-19.
- Ozturk, A., Bozok, T., Erdogan, M., Ibrahim, B. M., Bozok, T. S. (2023). COVID-19-associated pulmonary aspergillosis (CAPA): identification of Aspergillus species and determination of antifungal susceptibility profiles. *Folia Microbiologica*, 1-9.
- Demirbakan, H., Koçer, I., Erdoğan, M., Bayram, A. (2022). Assessing humoral immune response after two doses of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthcare workers. *Public Health*, 205, 1-5.
- Bayram, A., Demirbakan, H., Günel, P., Erdoğan, M., Koçer, I. (2021). Quantitation of antibodies against SARS-CoV-2 spike protein after two doses of CoronaVac in healthcare workers. *Journal Medical Virology*, 93(9), 5560- 5567.

5. Ozturk, A., Güzel, Ö. T., Abdulmajed, O., Erdoğan, M., Kozan, R., Çağlar, K., Kalkancı, A. (2020). Evaluation of the bactericidal activity of some disinfectant agents against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. *International Journal of Environmental Health Engineering*, 9(1), 17.
6. Tecer, D., Gogus, F., Kalkanci, A., Erdogan, M., Hasanreisoglu, M., Ergin, Ç., Karakan, T., Kozan, R., Coban, S., Diker, K. S. (2020). *Succinivibrionaceae* is dominant family in fecal microbiota of Behçet's Syndrome patients with uveitis. *Plos One*, 15(10), e0241691.
7. Denkçeken, T., Atak, C., Demirbakan, H., Erdoğan, M., Günel Karadeniz, P. (2020). Investigation of bacterial presence in cerebrospinal fluid by bioimpedance technique. *European Journal of Therapeutics*, 26(3), 208-13.
8. Denkçeken, T., Atak, C., Koçer, İ., Erdoğan, M., Karadeniz, P., Demirbakan, H. (2020). Phase angle as a marker for Differentiating *Escherichia Coli* and *Candida Albicans* Pathogens. *National Journal of Medical Research*, 10(2), 119-122.
9. Ceylan, S. M., Denkçeken, T., Atak, C., Erdoğan, M., Demirbakan, H. (2020). Assessment of acute tonsillitis using fiber-optic system. *International Journal of Medical Science and Public Health*, 9(10),1.
10. Özdemir, H. B., Kalkancı, A., Bilgihan, K., Göçün, P. U., Ögüt, B., Karakurt, F., Erdoğan, M. (2019). Comparison of corneal collagen cross-linking (PACK-CXL) and voriconazole treatments in experimental fungal keratitis. *Acta Ophthalmologica*, 97(1), e91-e96.
11. Kalkanci, A., Bilgihan, K., Ozdemir, H. B., Yar Saglam, A. S., Karakurt, F., Erdogan, M. (2018). Corneal cross-linking has No effect on matrix metalloproteinase 9 and 13 levels during fungal keratitis on the early stage. *Mycopathologia*, 183, 329-336.
12. Tunçcan Güzel, Ö., Kalkancı, A., Ünal, E. A., Abdulmajed, O., Erdoğan, M., Dizbay, M., Çağlar, K. (2018). The in vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy on *Candida* and *Staphylococcus* biofilms. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 48(4), 873-879.
13. Özdemir, H.B., Kalkancı, A., Bilgihan, K., Uyar Göçün, P., Ögüt, B., Karakurt, F., Erdogan, M. (2018). Comparison of corneal collagen cross-linking (PACK-CXL) and voriconazole treatments in experimental fungal keratitis. *Acta Ophthalmologica*, 97(1),91-96.
14. Kalkancı, A., Fouad, A. A., Erdoğan, M., Altay, A., Aliyeva, Z., Bozdayı, G., Çağlar, K. (2015). Bazı bakteri ve mantarların virülansının araştırılmasında *Galleria mellonella*'nın in vivo model olarak kullanılması. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 49(3), 366-76.



GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR...

