



Çeşitli Porfirin Türevlerinin Kırmızı Işık ile Uyarılarak Çoklu İlaç Dirençli *Acinetobacter baumannii* Suşunun Yok Edilmesi

Elimination of Multi-drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Strain with Various Porphyrin Derivatives Stimulated by Red Light

Ayşe AKBİYİK_1, Hüseyin TAŞLI_2,

Nermin TOPALOĞLU_3,

Hemşirelik Esasları Anabilim Dalı, Sağlık Bilimleri Fakültesi, İzmir Katip Çelebi

Üniversitesi, İzmir, Türkiye

ayseakbyk@hotmail.com, 1

Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Ege Üniversitesi, İzmir,

Türkiye

huseyintasli@gmail.com 2

Biyomedikal Mühendisliği Bölümü, Mühendislik ve Mimarlık Fakültesi, İzmir Katip Çelebi

Üniversitesi, İzmir, Türkiye

nermin.topaloglu@ikc.edu.tr 3

Vildan ALPTÜZÜN_4, Sülünay PARLAR_5,

Selçuk KAYA_6

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

vildan.alptuzun@ege.edu.tr, 4

Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Eczacılık Fakültesi, Ege Üniversitesi, İzmir, Türkiye

sulunay.parlar@ege.edu.tr 5

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Tıp Fakültesi, İzmir Katip Çelebi Üniversitesi, İzmir, Türkiye

selcuk.kaya@ikc.edu.tr 6

Özetçe—Bu araştırmada, sentezini gerçekleştirdiğimiz dört katyonik porfirin türevleri (KPT) ile *in-vitro* koşullarda gerçekleştirilen antimikrobiyal fotodinamik tedavi (aPDT)'nin çoklu ilaç dirençli (ÇİD) *Acinetobacter baumannii* üzerindeki fotoanaktivasyon etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır. Farklı fotosensitizan konsantrasyonları ve farklı enerji yoğunlukları kullanılarak gerçekleştirilen aPDT deneylerinde bakteriyel sağkalımındaki azalma $>6 \log_{10}$ değerlerine ulaşmıştır. Minimal inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerinin altındaki konsantrasyonlarda KPT ile gerçekleştirilen aPDT ÇİD *A. baumannii* klinik izolatına karşı güçlü bir antimikrobiyal etkinlik gösterme potansiyelinde olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler — antimikrobiyal fotodinamik tedavi; porfirin; çoklu ilaç direnci; *Acinetobacter baumannii*.

Abstract— In the study, it was aimed to investigate the photoinactivation effect of antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) performed on *in-vitro* conditions with cationic-porphyrin derivatives (CPDs) on multidrug resistant (MDR) *A.baumannii*. In aPDT experiments using different photosensitizer concentrations and different energy densities, the reduction in bacterial survival reached to $> 6 \log_{10}$ values. aPDT carried out with CPDs at concentrations below the minimum inhibitory concentration (MIC) values has the

potential to display a strong antimicrobial activity against the MDR *A.baumannii* clinical isolate.

Keywords — antimicrobial photodynamic therapy; porphyrin; multiple drug resistance; *Acinetobacter baumannii*.

I. GİRİŞ

Acinetobacter baumannii, gram negatif, pleomorfik, çevresel koşullarda canlılığını uzun süre koruyabilen ve hastalarda rahatlıkla kolonize olabilen önemli bir sağlık hizmeti ile ilişkili enfeksiyon (SHİE) patojenidir. Klinik izolatların çoğunun giderek artan oranlarda antibiyotik direnci dikkat çekmekte olup, tedaviye yanıtız kalan ÇİD *A.baumannii* enfeksiyonlarının %50-60'sı ölümle sonuçlanmaktadır (1). Başlangıçta yalnızca tümörlerin tedavisi için onaylanan, fotosensitizan (PS) olarak adlandırılan ışığa duyarlı non-toksik bir boya ve PS'yi duyarlaştıran uygun dalga boyundaki zararsız ışık kombinasyonundan oluşan fotodinamik tedavi, antibiyotige dirençli enfeksiyonların tedavisinde alternatif olma potansiyeli nedeniyle ilgi çekmeye başlamıştır (2).

Ağırlıklı olarak protoporfirin IX (PPIX)'dan türemiş olan porfirinler canlılarda birçok biyolojik süreçlere

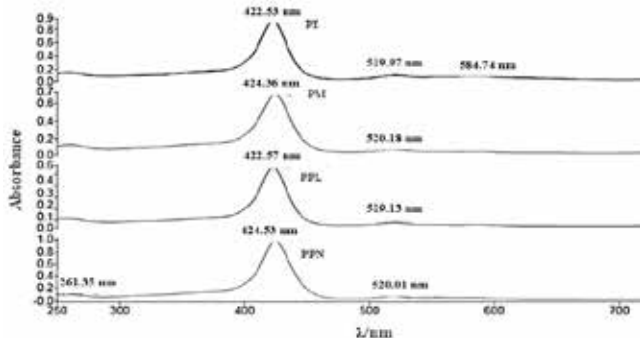
katılmakta olup, yaşam için büyük öneme sahiptir. Demir-PPIX bileşiklerinin kullanılması bazı gram pozitif ve gram negatif bakteriler için önemli virülans özelliğidir. Hem gram pozitif bakterilerde hem de *A.baumannii*'de dahil gram negatif bakterilerde Fe²⁺PPIX (hem)'un bakteri hücrelerinin içine girişin sağlayan hem reseptörü kompleksi, TonB ve ExbBD proteinleri, hem-spesifik bağlanma ve taşıma proteinleri mevcuttur (3-5). Araştırmalarda, gram pozitif bakterilere olan etkinliğinin yanı sıra gram negatif bakterilere karşı güçlü bir fotoinaktivasyon etkinlik için katyonik özellik kazandırılmış porfirinlerin ilave bir permeabilizasyon ajan bulunmadan Fe²⁺PPXI-alım mekanizmaları ile gram negatif ve gram pozitif bakterilerin içerisine rahatlıkla nüfus ettiği; bakterilerde elektronları aktarma, peroksidaz ve oksidaz reaksiyonlarını katalizleme, fotonları absorbe etme, reaktif oksijen türleri (reactive oxygen species-ROS)'nin üretimi gibi bir takım biyokimyasal süreçlere katıldığı bildirilmektedir (3,4). Bu araştırmada sentezini gerçekleştirdiğimiz KPT bileşiklerinin tedavisi güç ve hatta imkansız hale gelen yara enfeksiyonlarından sıklıkla izole edilen *ÇİD A.baumannii* klinik izolatına karşı fotoinaktivasyon etkinliğinin incelenmesi amaçlanmıştır.

II. YÖNTEM

A. Porfirin Türevlerinin Sentezi

Araştırmada PS olarak, dört KPT bileşiği sentezlendi. P_M, P_E, P_{PN}, P_{PL} olmak üzere dört KPT'nin sentezi literatürdeki yöntemlere göre Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi (6).

PDT deneylerinde kullanılacak uygun dalga boyundaki lazer cihazının tespiti için İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları-Spektroskopi Laboratuvarında KPT bileşiklerinin ışık absorpsiyonları değerlendirildi. KPT 250-800 nm arasında değişim gösteren geniş spektrumda bir dalga boyunu absorbe etme yeteneklerine sahip olup, maksimal ışık absorpsiyonu her birinde 422±3 nm'dir (Şekil 1).



Şekil 1. Katyonik Porfirin Türevleri'nde ışık absorpsiyonu.

Araştırmada, KPT bileşiklerinin tek başlarına antimikrobiyal etkinlik gösterip göstermediğinin belirlenmesi, ek olarak fotoinaktivasyon deneylerinde kullanılacak maksimal düzeydeki PS konsantrasyon

düzeylerinin öngörülebilmesi amacıyla, KPT'nin *ÇİD A.baumannii* klinik izolatı üzerindeki minimal inhibisyon konsantrasyonları (MİK) CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute) kurallarına göre Ege Üniversitesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda mikrodilüsyon metodu kullanılarak değerlendirildi.

B. Bakteri Suşu

Araştırmada *ÇİD A.baumannii* klinik izolatı kullanıldı. Klinik izolatın izolasyonu ve antimikrobiyal duyarlılığının değerlendirilmesi İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. İzolatın imipenem, meropenem, amikasin, netilmisin, siprofloksasine karşı dirençli olduğu tespit edildi.

C. Lazer Cihazı ve Optik Düzenek

Çalışmada ışık kaynağı olarak KPT bileşiklerinin ışık absorpsiyonunun gerçekleştirileceği bilgisayar kontrollü 655 nm dalga boyuna sahip diyot lazer kullanıldı (PSU III.LED; Changchen New Industries optoelectronics Tech Ltd.).

D. Fotoinaktivasyon

Fotoinaktivasyon deneyleri İzmir Katip Çelebi Üniversitesi Merkezi Araştırma Laboratuvarları Biyomedikal Optik ve Lazer Uygulamaları Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Çalışmamızda, minimal düzeyde PS konsantrasyonu kullanılarak maksimal düzeyde fotoinaktivasyon etkinlik elde edecek parametrelerin belirlenmesi amacıyla her bir fotoinaktivasyon deneyinde farklı enerji dozu ve farklı PS konsantrasyonu kombine edildi. Kombine edilen aPDT parametrelerinde güçlü bir fotoinaktivasyon etkisinin görüldüğü andan itibaren enerji dozu kademeli bir şekilde artırılıp, PS konsantrasyonu fotoinaktivasyon etkisinin azaldığı veya kaybolduğu seviyelere kadar kademeli bir şekilde düşürüldü.

Fotoinaktivasyon deneyleri genel hatları ile şu şekilde gerçekleştirildi: Her bir deney öncesinde çalışma grupları yalnızca lazerin uygulandığı "lazer [L] grubu", yalnızca fotosensitizerin uygulandığı "fotosensitizer [PS] grubu" her ikisinin birlikte uygulandığı "antimikrobiyal fotodinamik tedavi [aPDT] grubu" ve PBS dışında herhangi bir uygulamanın yapılmadığı "kontrol grubu [K]" olmak üzere dört gruba ayrıştırıldı. [PS], [aPDT], [L] ve [K] grubu olarak belirlenen 96 kuyucuklu plakların her birinin belirli kuyucuklarına yaklaşık 10⁷⁻⁹ cfu/ml bakteri süspansiyonundan 50 µl transfer edildi. [PS] ve [aPDT] grubu plaklarının bakteri bulunan kuyucuklarına spesifik konsantrasyonlarda 50 µl'lik stok süspansiyonlardan PS eklendi. [L] ve [K] grubu plaklarının bakteri bulunan kuyucuklarına ise 50 µl PBS eklendi. Her dört grup 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. [L] ve [aPDT] grubu plakaları lazer ışığına maruz bırakıldı. Işık uygulaması sonrasında tüm gruplardaki bakteri süspansiyonları, seri dilüsyon metodu ile PBS'de



seyreltildi. Seyreltilerden 100 µl allikot alınıp TSA içerikli plaklara ekilip ve 37 °C'de karanlık alanda bir gecelik inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrasında cfu/ml'de bakteri sağkalımı hesaplandı. Her bir deney 3'lü kopyalar halinde üç kere tekrarlandı (7).

III. BULGULAR VE TARTIŞMA

A. Katyonik Porfirin Türevlerinin Antimikrobiyal Etkinlikleri

Araştırmada, KPT'nin ÇİD *A.baumannii* üzerindeki MİK değerleri, sırasıyla P_M'de 3682.75 µM, P_E'de 6803.18 µM, P_{PN}'de 3160.32 µM, P_{PL}'de 1461.90 µM'dir (Tablo 1).

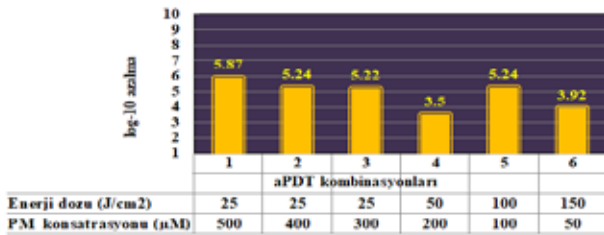
Tablo 1. KPT'lerin *A.baumannii* klinik izolatu üzerindeki antimikrobiyal etkinliği

KPT ¹	PS konsantrasyonu	
	µg/ml	µM
P _M	2500	3682.75
P _E	5000	6803.18
P _{PN}	2500	3160.32
P _{PL}	1250	1461.90
CİP ²	µg/ml	>16

¹ Katyonik porfirin türevleri; ² Siprofloksasin

B. Fotoinaktivasyonun Klinik İzolatlar Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliği

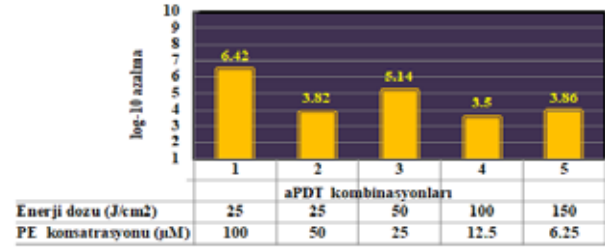
Grafik 1'de görüldüğü gibi 50-500 µM aralığında değişen P_M konsantrasyonları ve 50-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ile kombine edilerek aPDT'nin fotoinaktivasyon etkisi değerlendirildi. 1. deneyde [500 µM+25 J/cm²], 2. deneyde [400µM+25 J/cm²] kombinasyonları sırasıyla 5.87 log₁₀ ve 5.24 log₁₀'luk azalmalar sağladı. Enerji dozunun 150 J/cm²'ye çıkartıldığı 6.deneyde 50 µM P_M konsantrasyonu ÇİD *A.baumannii* klinik izolatında 3.92 log₁₀'luk sağkalım azalması sağladı.



Grafik 1. P_M'nin kullanıldığı kombinasyonlarında aPDT gruplarındaki sağkalım azalması.

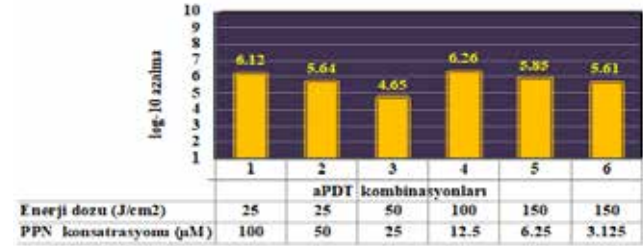
Fotosensitizan olarak P_E'nin kullanıldığı deneylerde 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ile 6.25-100 µM aralığında değişen PS konsantrasyonları kombine edildi. Test edilen kombinasyonlarda 3.50-6.12 log₁₀ aralığında değişim gösteren sağkalım azalmaları görüldü. En iyi fotoinaktivasyon 1.deneyde kullanılan [100 µM+25 J/cm²] kombinasyonunda görülürken, enerji dozunun 150 J/cm², P_E konsantrasyonunun 6.25 µM olduğu 5.deneyde antimikrobiyal etkinlik belirgin ölçüde azaldı (Grafik 2).

P_{PN}'de P_E ile gerçekleştirilen deneylerden farklı olarak PS konsantrasyonu 3.125 µM kadar düşürüldü (Grafik 3).



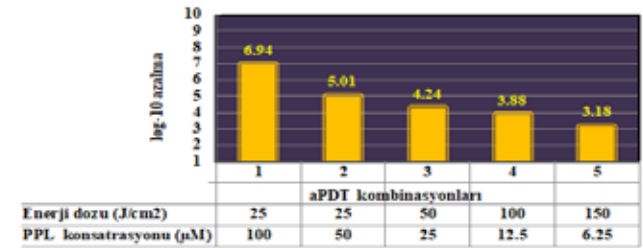
Grafik 2. P_E'nin kullanıldığı kombinasyonlarında aPDT gruplarındaki sağkalım azalması.

150 J/cm² enerji dozunun kullanıldığı bu deneyde güçlü bir fotoinaktivasyon etkinlik elde edilmiş olup, ÇİD *A.baumannii* sağkalımındaki azalma 5.61 log₁₀'dur. (Grafik 3).



Grafik 3. P_{PN}'nin kullanıldığı kombinasyonlarında aPDT gruplarındaki sağkalım azalması.

Grafik 4'de görüldüğü gibi P_{PL}'nin fotosensitizan amaçlı kullanıldığı deneylerde 25-100 µM aralığında değişen PS konsantrasyonlarının fotoinaktivasyon etkinliği incelendi. Maksimal fotoinaktivasyon etkinlik [100 µM+25 J/cm²] kombinasyonunda görülürken, [6.25 µM+150 J/cm²] kombinasyonunun kullanıldığı 5.deneyde antimikrobiyal etkinlik önemli ölçüde azaldı.



Grafik 4. P_{PL}'nin kullanıldığı kombinasyonlarında aPDT gruplarındaki sağkalım azalması.

ÇİD *A.baumannii* klinik izolatu üzerinde aPDT'nin fotoinaktivasyon etkinliğinin değerlendirilmesi için 25-150 J/cm² aralığında değişen enerji dozları ve P_M'de 50-500 µM, P_E ve P_{PL}'nin her birinde 6.25-100 µM, P_{PN}'de ise 3.125-100 µM aralığında değişen konsantrasyonlar kombine edildi. Deneylerde kullanılan fotosensitizanın türüne ve konsantrasyon miktarına göre farklılık göstermekle birlikte ÇİD *A.baumannii* sağkalımındaki düşüş >6 log₁₀ değerlerine ulaştı. Minimal düzeyde fotosensitizan ile güçlü bir antimikrobiyal etkinlik elde edilmesini



hedeflediğimiz aPDT deneylerinde $5 \rightarrow 6 \log_{10}$ aralığında sağkalım azalmasını sağlayan optimal kombinasyonlar [$100 \mu\text{M P}_M + 100 \text{ J/cm}^2$], [$25 \mu\text{M P}_E + 50 \text{ J/cm}^2$], [$6.25 \mu\text{M P}_{PN} + 150 \text{ J/cm}^2$] ve [$50 \mu\text{M P}_{PL} + 25 \text{ J/cm}^2$] şeklindedir.

Nitzan ve Ashkenazi (2001)'nin çalışmasında $29,4 \mu\text{mol/L}$ TMPyP konsantrasyonunda ÇİD *A.baumannii* suşlarına eradikasyonu için gerekli enerji dozlarının mavi ışıkta ($400\text{--}450 \text{ nm}$) 2 J/cm^2 , yeşil ışıkta ($480\text{--}550 \text{ nm}$) 15 J/cm^2 , kırmızı ışıkta ($600\text{--}700 \text{ nm}$) 24 J/cm^2 şeklinde olduğu, en iyi etkinin mavi ışıkta görülebileceği, ancak dalga boyu arttırıldıkça enerji dozu artışı ile de benzer fotoinaktivasyonun sağlanabileceği bildirilmiştir. 40 W/cm^2 gücünde ışık kaynağının ve $0.5 \mu\text{M}$ konsantrasyonunda Tetra-Py+-Me'nin kullanıldığı aPDT deneylerinde ÇİD *A.baumannii*'ye karşı antimikrobiyal etkinliğin ışık maruziyeti süresine göre değişim gösterdiği 270 dakikada sağkalımdaki azalmanın $6 \log_{10}$ olduğu saptanmıştır (8). Yuan ve arkadaşlarının *in vivo* koşullarda gerçekleştirdikleri deneyde aminoasit porfirin konjugatı ve 650 nm dalga boyuna sahip ışık kaynağı kullanılmış olup, çalışmada düşük aPDT parametrelerin [$3.9 \mu\text{M} + 6 \text{ J/cm}^2$] ÇİD *A.baumannii*'de güçlü bir antimikrobiyal etki gösterdiği belirlenmiştir. Diğer yandan bu çalışmada canlı hücre toksisitenin de belirgin şekilde arttığı saptanmıştır. Bu çalışmada daha düşük konsantrasyonlarda PS ile gerçekleştirilen aPDT'nin aksine doku iyileşmesini hızlandırdığı ve FGF, IL-6, TNF- α sitokinlerinin ekspresyonunu arttırdığı tespit edilmiştir (9). Literatürde, PPIX gibi nötröl yapıdaki porfirilerin ilave bir permeabilizasyon ajan bulunmadan gram pozitif bakterilere rahatlıkla nüfus edebileceği ve güçlü bir fotoinaktivasyon elde edilebileceği bildirilmektedir. Ancak, gram negatif bakterilerde benzer etkinliğin, porfirinlerin katyonikleştirilmesi veya konjugatların eklenmesi ile gerçekleşebileceğinden bahsedilmektedir. Porfirin-mannose-hPG (hyperbranched polyglycerol), katyonik porfirin-polymyxin B konjugatı, Tetra-Py+-Me gibi katyonikleştirilmiş veya konjugat eklenmiş porfirinlerin nötröl yapıdaki porfirinlere kıyasla gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı güçlü bir fotoinaktivasyon etkinliği elde edilen çalışma örnekleri mevcuttur (8,10,11).

Çalışmamızda, P_M dışındaki KPT'lerde çok düşük konsantrasyonlarda güçlü antimikrobiyal etkinlik elde edildi. Diğer yandan, düşük PS konsantrasyonlarında güçlü bir fotoinaktivasyon etkinliği ancak enerji dozu 150 J/cm^2 'ye kadar yükseltilecek şekilde elde edildi. Bu durumun kullandığımız dalga boyundan kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Nitekim Nitzan ve Ashkenazi (2001)'nin çalışması bu varsayımı doğrular niteliktedir. Yine de bu varsayımın doğrulanması için farklı ışık dalga boylarında fotosensitizan absorpsiyonu, ROS ve $^1\text{O}_2$ oluşum miktarlarının ölçümü gibi daha ileri analizlerin yapılmasına ihtiyaç olduğunu düşünmekteyiz.

IV. SONUÇ

Farklı enerji yoğunlukları kullanılarak gerçekleştirilen aPDT deneylerinde bakteriyel sağkalımdaki azalma >6

\log_{10} değerlerine ulaştı. Sentezlediğimiz KPT'ler ÇİD *A.baumannii* klinik izolatına karşı güçlü bir fotoinaktivasyon etkinliği gösterme potansiyelindedir. Fotoinaktivasyonda antimikrobiyal etkinlik gösteren kombinasyonların herhangi birinde [L] veya [PS] gruplarında bakteriyel sağkalımda azalmalar görülmedi. *A.baumannii* üzerindeki fotoinaktivasyon etkinliğinin KPT türüne göre değişim göstermesinin nedenlerinin araştırılması için ileri analizlerin yapılması, fotoinaktivasyon etkinliği gösteren kombinasyonların canlı hücre üzerinde toksisitenin *in vivo* koşullarda geliştirilen enfekte yara üzerinde araştırılması bir sonraki hedefimizdir.

KAYNAKÇA

- [1] Karabay, O., Yahyaoglu, M., Oğütü, A., Sandıkçı, O., Tuna, N., & Ceylan, S., "[Factors Associated with Mortality in Acinetobacter baumannii Infected Intensive Care Unit Patients].", *Mikrobiyol. Bul.*, 46(2):335–357, 2012.
- [2] Vera, D. M. A., Haynes, M. H., Ball, A. R., Dai, T., Astrakas, C., Kelso, M. J., ... Tegos, G. P., "Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes", *Photochem. Photobiol.*, 88(3):499–511, 2012.
- [3] Igor Stojiljkovic, B. D. E. and V. K. D., "Antimicrobial properties of porphyrins," *Exp. Opin. Invest. Drugs*, vol. 10, no. 2, pp. 309–320, 2001.
- [4] Lippert, R., Shubina, T. E., Vojnovic, S., Pavic, A., Veselinovic, J., Nikodinovic-Runic, J., ... Ivanovic-Burmazovic, I., "Redox behavior and biological properties of ferrocene bearing porphyrins," *J. Inorg. Biochem.*, 171:76–89, 2017.
- [5] Barona-Castaño, J. C., Carmona-Vargas, C. C., Brocksom, T. J., De Oliveira, K. T., Graça, M., Neves, P. M. S., ... Faustino, F., "Porphyrins as catalysts in scalable organic reactions," *Molecules*, vol. 21(3):22–27, 2016.
- [6] Gomes, M., Woranovicz-Barreira, SM Faustino, M., Fernandes, R., Neves, M., Tomé, A., Gomes, N., ... Tomé, J., "Photodynamic inactivation of *Penicillium chrysogenum* conidia by cationic porphyrins," *Photochem Photobiol Sci.*, 10(11):1735–1743, 2011.
- [7] Topaloglu, N., Yuksel, S. and Gulsoy, M., "Optimization of parameters in photodynamic therapy to kill *p. aeruginosa* with 809-nm diode laser and indocyanine green", 8210(821012):1–6, 2013.
- [8] Almeida, J., Tomé, J. P. C., Neves, M. G. P. M. S., Tomé, A. C., Cavaleiro, J. A. S., Cunha, A., ... Almeida, A., "Photodynamic inactivation of multidrug-resistant bacteria in hospital wastewaters: influence of residual antibiotics," *Photochem. Photobiol. Sci.*, 13(4):626–633, 2014.
- [9] Yuan, Y., Liu, Z.-Q., Jin, H., Sun, S., Liu, T.-J., Wang, X., ... Ding, H., "Photodynamic antimicrobial chemotherapy with the novel amino acid-porphyrin conjugate 4I: In vitro and in vivo studies," *PLoS One*, 12(5):1–20, 2017.
- [10] Staegemann, M. H., Gitter, J., Dervede, B., Kuehne, C., Haag, R. and Wiehe A., "Mannose-Functionalized Hyperbranched Polyglycerol Loaded with Zinc Porphyrin: Investigation of the Multivalency Effect in Antibacterial Photodynamic Therapy," *Chem. - A Eur. J.*, 23(16):3918–3930, 2017.
- [11] Le Guern, F., Sol, V., Ouk, C., Arnoux, P., Frochot, C. and Ouk, T.-S., "Enhanced Photobactericidal and Targeting Properties of a Cationic Porphyrin following the Attachment of Polymyxin B," *Bioconjug. Chem.*, 30:2–40, 2017.