



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLİSTİN NEFROTOKSİSİTESİNE BAĞLI GELİŞEN AKUT
TUBÜLER NEKROZA KARŞI RESEPTÖR ETKİLEŞİMLİ
KİNAZ-3 İNHİBİTÖRÜ DABRAFENİB'İN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dr. Fesih AKTAR

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. İlker KELLE

DİYARBAKIR 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KOLİSTİN NEFROTOKSİSİTESİNE BAĞLI GELİŞEN AKUT
TUBÜLER NEKROZA KARŞI RESEPTÖR ETKİLEŞİMLİ
KİNAZ-3 İNHİBİTÖRÜ DABRAFENİB'İN KORUYUCU
ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

DOKTORA TEZİ

Dr. Fesih AKTAR

FARMAKOLOJİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. İlker KELLE

DİYARBAKIR 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ONAY





**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını ve tezimi Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Klavuzu standartlarına uygun bir şekilde hazırladığımı beyan ederim.

08.06.2023

Öğrencinin Adı ve Soyadı

TEŞEKKÜR

Bu tez Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından TIP.20.023 numaralı proje ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER DİZİNİ

Sayfa No

BEYAN SAYFASI	I
TEŞEKKÜR SAYFASI	II
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	III
ŞEKİLLER DİZİNİ	V
TABLolar DİZİNİ	VI
RESİMLER DİZİNİ	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	VIII
1. ÖZET	1
1.1. Türkçe Özet	1
1.2. Abstract	3
2. GİRİŞ VE AMAÇ	5
3. GENEL BİLGİLER	8
3.1. Kolistin	8
3.1.1. Genel Özellikler	8
3.1.2. Etki mekanizması	9
3.1.3. Farmakokinetiği	10
3.1.4. Farmakodinamiği	12
3.1.5. Klinik kullanımı	13
3.1.6. Yan etkileri	15
3.2. Kolistin Nefrotoksitesitesi	16
3.2.1. Akut tubüler nekroz	18
3.3. Kolistin nefrotoksitesitesinin oluşum mekanizmaları	20
3.3.1. Tubüler epitelyal membran geçirgenliğinin bozulması	20
3.3.2. Mitokondriyal disfonksiyon	21
3.3.3. Kolistin aracılı hücre ölümü	23
3.3.3.1. Apoptoz	23
3.3.3.2. Nekroptoz	24
3.3.4. Nekroptoz inhibitörleri	26
3.3.4.1. Nekrostatin-1	26
3.3.4.2. Dabrafenib	27

4. GEREÇ VE YÖNTEM	30
4.1. Gereç	30
4.1.1. Kullanılan araç ve gereçler	30
4.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler	31
4.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması	32
4.1.4. Kullanılan deney hayvanlarının temini	33
4.1.5. Deney gruplarının dizaynı	34
4.2. Yöntem	35
4.2.1. Farmakolojik incelemeler	36
4.2.2. Biyokimyasal incelemeler	37
4.2.3. Histopatolojik incelemeler	38
4.2.4. Western-Blotting incelemesi	39
4.2.4.1. Total protein ekstraksiyonu	39
4.2.4.2. Total protein kuantifikasyonu	39
4.2.4.3. SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakriamid Jel) elektroforezi	40
4.2.4.4. Elektrobloklama işlemi	43
4.2.4.5. Bloklama işlemi	44
4.2.4.6. Antikorların inkübasyonu	44
4.2.4.7. Kemilüminesans görüntüleme	45
4.3. İstatistiksel analizler	45
5. BULGULAR	46
5.1. Farmakolojik bulgular	46
5.2. Biyokimyasal bulgular	47
5.3. Histopatolojik bulgular	49
5.4. Western Blotting bulguları	54
6. TARTIŞMA	56
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	60
8. KAYNAKLAR	61
9. ÖZGEÇMİŞ	72
10. EKLER	73
10.1. Etik Kurul Kararı	73
10.2. Orijinallik Raporu	74

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Kolistin metansülfonatın kimyasal yapısı	9
Şekil 2. Bütün gruplarda perfüzyon basınç değişimleri	46
Şekil 3. Bütün gruplarda üre düzeyi değişimleri	47
Şekil 4. Bütün gruplarda kreatinin düzeyi değişimleri	48
Şekil 5. Bütün gruplarda MDA düzeyi değişimi	49
Şekil 6. Gruplara göre doku protein ekspresyon düzeyleri	55
Şekil 7. Bütün gruplarda çalışılan proteinlere ait Western Blot bant görüntüleri	55

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Gönüllülerde farmakokinetik parametre değerleri: Kolistimetat sodyum intravenöz uygulama sonrası	11
Tablo 2. Krebs Henseleit çözeltisinin içeriği	33
Tablo 3. BSA standartlarının hazırlanması için kullanılan şema	40
Tablo 4. Ayırıcı jelin içeriği (%10'luk)	42
Tablo 5. Yoğunlaştırıcı jelin içeriği (%5'lik)	42
Tablo 6. Antikorlar ve seyreltme oranları	45

RESİMLER DİZİNİ

	Sayfa No
Resim 1. Sağ ve sol böbrek izolasyonu	35
Resim 2. Böbreğin kanülizasyonu	36
Resim 3. Langendorff düzeneğine asılmış rat böbreği	37
Resim 4. SDS-PAGE jel elektroforez sistemi	41
Resim 5. Elektroforez düzeneğine numunelerin yüklenmesi	42
Resim 6. Proteinlerin sabit akımla ayrıştırılması	43
Resim 7. Elektrobloklama sistemi	44
Resim 8. Kontrol grubu. Korunmuş fırçamsı kenar içeren böbrek	50
Resim 9. Kolistin grubu. Çok sayıda nükleus kaybı içeren böbrek	51
Resim 10. Kolistin+nekrostatin grubu. Hafif tubüler dilatasyon ve az sayıda nükleus kaybı içeren böbrek	52
Resim 11. Kolistin+dabrafenib grubu. Hafif tubüler dilatasyon ve az sayıda nükleus kaybı içeren böbrek	52
Resim 12. Nekrostatin grubu. Grade 0 ile karakterize korunmuş böbrek dokusu	53
Resim 13. Dabrafenib grubu. Grade 0 ile karakterize korunmuş böbrek dokusu	54

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABH	Akut böbrek hasarı
ABY	Akut böbrek yetersizliği
ATN	Akut tübüler nekroz
ATP	Adenozin trifosfat
CaMKII	Ca ²⁺ /kalmodulin bağlı protein kinaz II
CypD	Siklofilin D
Dab	Dabrafenib
DNA	Deoksi ribonükleik asit
ERK1/2	Ekstraselüler sinyal-regüle kinaz 1/2
FDA	ABD Gıda ve İlaç İdaresi
H&E	Hematoksilen-Eozin
IL	İnterlökin
IM	İntramusküler
IP	İntraperitoneal
IV	İntravenöz
KBY	Kronik böbrek yetmezliği
KMS	Kolistimetat sodyum
MDA	Malondialdehit
MLKL	Karışık soy kinaz bölgesi benzeri protein
NADPH	Nikotinamid Adenin Dinükleotid fosfat
Nec-1	Nekrostatin-1
NOX	NADPH oksidaz
RIP1	Reseptör etkileşimli protein kinaz 1
RIP3	Reseptör etkileşimli protein kinaz 3
RNA	Ribonükleik asit
ROS	Serbest oksijen radikalleri
TBA	Tiyobarbütirik asit
TBST	Tris-buffered saline with 0,1% Tween® 20
TCA	Trikloroasetik asit
TNF-α	Tümör nekroz faktör- α

1. ÖZET

Kolistin Nefrotoksisitesine Bağlı Gelişen Akut Tubüler Nekroza Karşı Reseptör Etkileşimli Kinaz-3 İnhibitörü Dabrafenib'in Koruyucu Etkilerinin Araştırılması

1.1. Türkçe Özet

Amaç: Bu çalışmanın amacı, selektif bir reseptör etkileşimli kinaz (RIP)3 enzim inhibitörü olan dabrafenib'in (Dab), kolistin tarafından tetiklenen nefrotoksisitede oluşan nekroptoza karşı koruyucu etkilerini araştırmak ve nekroptoza karşı koruyucu etkisi kanıtlanmış RIP1 inhibitörü olan nekrostatin-1 ile karşılaştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: 48 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat altı grupta incelendi. Yedi günlük intraperitoneal (IP) ve intramüsküler (IM) ilaç uygulamaları yapıldı. Kontrol grubuna günlük 1 ml serum fizyolojik, ikinci gruba ise 10 mg/kg kolistin (IM) uygulandı. Üçüncü ve dördüncü gruplar, 10 mg/kg kolistin (IM) ile birlikte sırasıyla 10 mg/kg dabrafenib (IP) ve 1,65 mg/kg nekrostatin (IP) aldı. Beşinci ve altıncı gruplar sırasıyla 10 mg/kg dabrafenib (IP) ve 1,65 mg/kg nekrostatin (IP) aldı. Yedi günlük uygulama sonrası tüm grupların ratlarından anestezi altında laparotomi yapılarak böbrekler izole edildi. Sağ böbrekler, histopatolojik incelemeler, Western-Blot analizleri (IP1, RIP3, CaMKII, CypD proteinlerinin ekspresyon seviyeleri) ve malondialdehit (MDA) ölçümleri için ayrıldı. Sol böbreklerin perfüzyon basınçları ölçüldü ve ratlardan kardiyak yolla alınan kan örneklerinden serum üre ve kreatinin düzeyleri belirlendi.

Bulgular: Dabrafenib uygulaması ile birlikte, kolistin grubunda böbrek perfüzyon basıncı, üre, kreatinin seviyeleri, MDA düzeyleri ve nekroptotik proteinlerin ekspresyon seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalmıştır ($p<0.05$). Ayrıca, dabrafenib ve nekrostatin'nin koruyucu etkileri karşılaştırıldığında,

dabrafenib'in nekroptoza karşı anlamlı bir şekilde daha koruyucu olduğu bulunmuştur ($p<0.05$).

Sonuç: Dabrafenib, kolistin ile indüklenen nefrotoksik hasarda gelişen nekroptoza karşı koruyucu etki gösterirken, daha önce yapılan çalışmalarda koruyucu etkisi kanıtlanmış olan Nekrostatin-1 ile karşılaştırıldığında, dabrafenib'in koruyuculuğunun daha yüksek olduğu görülmüştür.

Anahtar Sözcükler: Kolistin, Nefrotoksisite, Dabrafenib, Reseptör etkileşimli kinaz-3, Nekrostatin-1



Investigation of the Protective Effects of Dabrafenib, Receptor Interacting Protein Kinase-3 Inhibitor, Against Acute Tubular Necrosis due to Colistin Nephrotoxicity

1.2. Abstract

Aim: The aim of this study was to investigate the protective effects of dabrafenib (Dab), a selective receptor-interacting kinase (RIP)3 enzyme inhibitor, against necroptosis induced by colistin-induced nephrotoxicity and to compare its protective effects against necroptosis with necrostatin-1, a proven RIP1 inhibitor.

Material and Method: 48 male Sprague-Dawley rats were studied in six groups. Seven-day intraperitoneal (IP) and intramuscular (IM) drug administration was performed. The control group received 1 ml of saline daily and the second group received 10 mg/kg colistin (IM). The third and fourth groups received 10 mg/kg colistin (IM) and 10 mg/kg dabrafenib (IP) and 1.65 mg/kg necrostatin (IP), respectively. The fifth and sixth groups received 10 mg/kg dabrafenib (IP) and 1.65 mg/kg necrostatin (IP), respectively. After seven days of administration, the kidneys were isolated from the rats of all groups by laparotomy under anesthesia. Right kidneys were separated for histopathologic examinations, Western-Blot analyses (expression levels of RIP1, RIP3, CaMKII, CypD proteins) and malondialdehyde (MDA) measurements. Perfusion pressures of the left kidneys were measured and serum urea and creatinine levels were determined from blood samples obtained from rats via cardiac access.

Results: Dabrafenib administration significantly decreased renal perfusion pressure, urea, creatinine levels, MDA levels and expression levels of necroptotic proteins in the colistin group ($p < 0.05$). Furthermore, when the protective effects of dabrafenib

and necrostatin were compared, dabrafenib was found to be significantly more protective against necroptosis ($p < 0.05$).

Conclusion: Dabrafenib showed a protective effect against necroptosis in colistin-induced nephrotoxic injury, while dabrafenib was found to be more protective than Necrostatin, which has been proven to be protective in previous studies.

Key Words: Colistin, Nephrotoxicity, Dabrafenib, Receptor Interacting Kinase-3, Necrostatin-1



2. GİRİŞ VE AMAÇ

Polimiksin E (kolistin); katyonik bir polipeptid yapılı bakterisid etki gösteren bir antibiyotiktir. Kolistin, Gram-negatif bakterilerin hücre membranlarındaki lipopolisakkarit ve fosfolipid yapılarına afinitesi olan bir moleküldür. Hücre membranının lipid komponentlerinde bulunan fosfat gruplarına divalent katyonlar üzerinde kompetitif bir etki uygulayarak, hücre zarının bozulmasına ve dolayısıyla intraselüler komponentlerin ekstrasellüler ortama akışına yol açar (1-3). 1980'lerin başından itibaren, çeşitli ülkelerde kolistin kullanımı, yüksek nefrotoksisite insidansı ve alternatif yeni antibiyotik moleküllerinin geliştirilmesi ile beraber gerilemiştir (4). Kolistin ile ilişkili nefrotoksisite riski, ilacın klinik kullanımını önemli ölçüde sınırlayan bir faktör olmuştur ve 1970'lerden bu yana çeşitli vaka serilerinde yoğun bir şekilde rapor edilmiştir (5-7). Kritik durumdaki hastaların yönetiminde, özellikle dirençli hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde önemli bir rol oynayan kolistin, nefrotoksisite riski nedeniyle hem ciddi morbidite ve mortaliteye hem de renal replasman terapilerinin ihtiyacına ve hastane veya yoğun bakım sürelerinin uzamasına bağlı ekonomik yüklerin artmasına neden olmaktadır (8,9).

Nörotoksisite, hipersensitivite reaksiyonları, kas güçsüzlüğü, gastrointestinal yakınmalar gibi yan etkileri bulunan bu ilacın en önemli doz kısıtlayıcı yan etkisi nefrotoksitedir. Kolistin nefrotoksitesi genellikle doza bağımlıdır ve reversibldir (8,9). Kolistin tarafından tetiklenen böbrek toksitesi, temelde kreatinin klirensinde azalış ve serum üre ve kreatinin seviyelerinde artış ile karakterize akut tübüler nekroz (ATN)'un meydana gelmesini içermektedir (8).

Kolistin kaynaklı ATN'nin mekanizması belirsiz olup, proksimal tübülüslerin etkilendiği varsayılmaktadır. Reversibl olan bu nefropatinin gelişiminde tübüler epitelyal membranda meydana gelen hasarlar, mitokondriyel bozukluklar, oksidatif stres ve bunlara bağlı olarak indüklenen hücresel ölüm yolları gibi birçok hücresel mekanizmanın sorumlu olabileceği çeşitli deneysel çalışmalarda gösterilmiştir (10-12).

Serbest oksijen radikalleri (ROS)'ne bağlı gelişen nefrotoksitede, özellikle apoptoz ve programlanmış nekroz olarak ifade edilen nekroptozu ait sinyal yollarının aktive

edildiği görülmektedir (13). Son yıllarda yapılan birçok çalışmada nekroptozun sinyal yolları açıklanmaya çalışılmaktadır; ancak henüz tam olarak anlaşılamayan nekroptozun, kaspazlarla bağlantısız bir şekilde, tümör nekroz faktör reseptörü (TNFR) ve Fas ligandının aktivasyonu ile başladığı ve mekanizmasında reseptör etkileşimli kinaz 1 (RIP1) ve reseptör etkileşimli kinaz 3 (RIP3) enzimlerinin rol oynadığı kanıtlanmıştır (14). Bu enzimlerin inhibisyonu ile nekrotik hasarın ve dolayısıyla da kolistine bağlı nefrotoksisitenin azalması sağlanabilir (14). Nekroptoz mekanizmasındaki bir diğer önemli enzim olan RIP3 enziminin ise dabrafenib (Dab) ile inhibe edilebildiği görülmüştür (15).

Nekroptozis, nörodejeneratif hastalıklar, kanser ve viral enfeksiyon gibi birçok hastalığın moleküler patogeneğinde önemli bir rol oynayan bir hücre ölüm mekanizmasıdır. Aynı zamanda, nefrotoksisite mekanizmasında da etkili olduğu gözlenmiştir. Nekroptotik sinyal yollarının aktive olması için hücre ölüm reseptörleriyle etkileşime girmesi gerekmektedir. Bu etkileşimden sonra, RIP1 veya RIP3 enzimlerinin kinaz aktivitesi gerekmektedir (16). Son çalışmalar, nekroptozun iki ayrı sinyal yoluyla indüklenebileceğini göstermiştir: RIP1-RIP3-Karışık soy kinaz bölgesi benzeri protein (MLKL) ve RIP3-Ca²⁺/kalmodulin bağlı protein kinaz II (CaMKII)-mitokondriyel transfer poru (mPTP) yolları. RIP1 enzimi, ilk yolaktaki devamındaki RIP3 enzimini fosforlayarak kinaz aktivitesini gösterir ve bu enzimin inhibisyonu, nekrostatin-1 (Nec-1) molekülü ile sağlanır (17,18). Nekrostatin molekülünün koruyucu etkisi, yapılan in vivo ve in vitro çalışmalarla kanıtlanmıştır (18). RIP3 enzimi ise her iki yolda da bulunur ve özellikle inflamasyon ve ROS üretimi ile ilişkilidir (19). Bu nedenle, nefrotoksik hasarla ilişkili nekroptozu karşı direnç sağlanabilmesi için RIP3 enziminin inhibe edilmesi oldukça önemlidir. Yapılan çalışmalar, selektif RIP3 enzim inhibisyonunun Dabrafenib ile mümkün olduğunu göstermiştir (19,20). Dabrafenib, melonoma tedavisinde kullanılan bir BRAF enzim inhibitörüdür ve hücre proliferasyonunu düzenleyen ERK1/2 sinyal kaskadı aktivasyonunu hedefler. Bazı çalışmalar, Dabrafenib'in RIP3 enzim inhibisyonu yoluyla nekroptoz karşı koruyucu olarak kullanılabileceğini göstermiştir (18-20).

Mevcut literatürde, dabrafenib'in kolistin ilişkili nefrotoksisite üzerindeki potansiyel koruyucu etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmanın amacı,

kolistin ile ilişkili ATN modeli oluşturulan ratlarda, nekroptotik RIP3 enziminin kolistin tarafından inhibe edilmesi durumunda olası koruyucu etkisini farmakolojik, biyokimyasal, histolojik ve moleküler olarak incelemektir. Ayrıca, bu etkinin daha önce yapılan çalışmalarda kanıtlanmış olan RIP1 inhibitörü nekrostatin-1'in koruyucu etkisiyle karşılaştırılması hedeflenmektedir. Çalışmanın verileri, bu alandaki literatür boşluğunu doldurma amacını taşımakta olup, dabrafenib'in kolistinin yan etkilerine karşı böbrek koruyucu olarak kullanılması için ileride yapılacak klinik çalışmalara ışık tutma ve tedaviye yeni bir yaklaşım sunma potansiyeline sahip olabilir.



3. GENEL BİLGİLER

3.1. Kolistin

3.1.1. Genel özellikler

Kolistin, siklik yapılı katyonik polipeptid antibiyotiklerden biridir ve polimiksinler ailesine aittir (4,21,22). Son yıllarda, polipeptid yapısında yüzlerce antimikrobiyal etkili bileşik tanımlanmıştır. Katyonik özellikte ve doğal kaynaklardan elde edilen bu antimikrobiyal peptitler, mikroorganizmalardan bitkilere ve insanlara kadar birçok canlı tarafından üretilmektedir. Bu antimikrobiyal peptitler iki kategoriye ayrılır: Glikopeptitler, gramisidinler ve polimiksinler gibi non-ribozomal sentezlenen peptitlerle birlikte yer alırken, ikinci kategori ribozomal sentezlenen doğal peptitlerden oluşmaktadır (23-25).

Polimiksinler, ilk defa 1947 yılında, toprak kaynaklı sporlu bir bakteri olan *Bacillus polymyxa*'dan elde edilmiştir. Sonraki araştırmalarda çeşitli *Bacillus* türlerinden polipeptid yapılı ve farklı kimyasal yapıya sahip olan A, B1, B2, C, D1, D2, E1, E2, M, sirkülin A, sirkülin B ve polipeptin adı verilen türevler elde edilmiştir (26). Kolistin, klinik kullanım için ilk defa 1959 yılında Koyama tarafından Japonya'da *Bacillus polymyxa* var. *colistinus*'dan izole edilmiş ve tanımlanmıştır (27). Kolistin, keşfedildiği zaman yeni bir antibiyotik olarak düşünülmüştür; ancak 1963 yılında yapılan bir çalışma, kolistinin aslında polimiksin E grubunun bir üyesi olduğunu ortaya koymuştur (28). 1970 yılında, bu maddeye ilk verilen isim olan "polimiksin E" terimi kullanılmıştır. Bununla birlikte, dar etki spektrumu ve toksisitesi kullanımının sınırlı olmasına neden olmuştur (29).

Kolistin, moleküler yapısında, bir yağ asidi ile substitüe edilmiş bir tripeptit ve siklik bir heptapeptit içerir. Kolistin içerisinde en az 30 farklı kimyasal bileşenin bulunduğu belirlenmiştir (**Şekil 1**).

membranındaki lipopolisakkarid bileşenidir. Polimiksinlerin yüksek derecede pozitif yük taşıdıkları ve hidrofobik bir asil zincire sahip oldukları için, lipopolisakkarid molekülleri ile yüksek bağlanma afinitesine sahiptirler. Bu moleküllerle elektrostatik etkileşimde bulunurlar ve divalent katyonları rekabetçi bir şekilde displace ederler, bu da membran hasarına yol açar. Bu, hücre duvarının geçirgenliğinin artmasına, hücre içeriğinin sızmasına ve sonuç olarak hücre ölümüne yol açar (37-39). Peptit yapılı antibiyotiklerden biri olan kolistin metansülfonat, bakteri hücre membranı fonksiyonlarını bozarak etkisini gösterir. Deterjanlara benzer bir etki mekanizması ile gram-negatif bakterilerin dış membranında bulunan fosfolipit ve lipopolisakkaritlerle etkileşime girerek hücre membranının bütünlüğünü bozar. Katyonik peptitler, lipopolisakkarite magnezyum ve kalsiyum gibi divalent katyonlara kıyasla 3 kat daha fazla bağlanma eğilimindedirler. Dış membranın bütünlüğünün bozulması sonucunda, katyonik peptitler de dâhil olmak üzere çeşitli moleküllerin geçişine izin veren kanallar oluşur. Ozmotik bariyerini kaybeden hücreden dış ortama hücre içeriği sızar ve hücre ölür. Memeli hücre duvarına benzer şekilde bağlanma potansiyeli katyonik peptitlerin toksik etkilerini açıklamaktadır (37). Diğer katyonik peptitler gibi, kolistin de anti-endotoksin etki gösterir. Endotoksik etkinliği sergileyen bölüm, gram-negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan lipopolisakkarit yapısıdır ve bu aktivitenin kaynağı özellikle lipid-A bölümüdür. Bu özgül bölge, söz konusu bakteri türlerinin endotoksik karakteristiğini belirleyen temel unsurdur. Kolistin, lipopolisakkarit molekülünün lipid-A bölgesine bağlanarak ve bu bileşeni nötralize ederek anti-endotoksin etkisini gösterir (40).

3.1.3. Farmakokinetiği

Kolistimetat sodyum (KMS), çözelti halindeyken otomatik olarak aktif hali olan kolistine dönüşür. KMS, inaktif bir öncü ilaç (prodrug) olarak işlev görür ve proteinlere düşük bir bağlanma seviyesi gösterir. Hem in vitro hem de in vivo koşullarda stabil değildir ve insan plazmasında kolistin de dâhil olmak üzere yaklaşık 32 farklı ürüne hidrolize olur. KMS'nin yarı ömrü 4 saatten daha uzundur (41,42). KMS'nin intravenöz (IV) uygulama sonrası farmakokinetik özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir (41). KMS intraventriküler veya intratekal olarak uygulanabilir.

KMS'nin önemli bir bölümü böbreklerle atılırken, bir kısmı da hidrolize olup kolistine dönüşür. Kolistin inhalasyon yoluyla veya intratekal olarak da uygulanabilir (4,43-45).

Tablo 1. Gönüllülerde farmakokinetik parametre değerleri: Kolistimetat sodyum intravenöz uygulama sonrası

CI (mL/min)	[KMS klirensi]	148 (5)
V _c (L)	[Santral komponent dağılım hacmi]	8.92 (6)
Q (mL/min)	[Kompartmanlar arası klirens]	41.4 (5)
V _p (L)	[Periferik komponent dağılım hacmi]	5.1 (-)
CIR (mL/min)	[Renal KMS klirensi]	103 (8)

Kolistin, IM kullanıma göre IV kullanımda daha hızlı ve yüksek pik konsantrasyona ulaşır. Ancak, IV uygulama ile elde edilen bu yüksek konsantrasyonun düşüşü de hızlıdır. KMS, 2.5 mg/kg IM uygulandığında serum seviyelerinde 5-7 µg/ml seviyesine ulaşır. KMS IV uygulandığında, 10 dakika içinde 20 µg/ml'lik maksimum serum seviyesine ulaşır. Diğer yandan, hidrolize olmuş serbest kolistinin serumdaki maksimum seviyesi 2 µg/ml düzeyinde bulunur (46). 60 kg ağırlığındaki bir yetişkinde, 8 MIU KMS (640 mg KMS-400 mg kolistin sülfat) yükleme dozunun 2 mg/ml hedef konsantrasyona ancak ulaşabildiği bildirilmiştir. Bu dozun ardından idame dozu 24 saat sonra başlanması önerilmektedir. Toksisite nedeniyle yükleme dozunun 10 MIU'nun üzerinde olmaması önemlidir (42).

Kolistimetat sodyum, vücut sıcaklığında hidrolize olduktan sonra aktif hale gelen kolistin, plazma proteinlerine yaklaşık %50 oranında bağlanır (33). KMS'nin dokulara dağılımı ile ilgili bilgiler kısıtlıdır. Plevral boşluk, akciğer parankimi, kemikler ve beyin-omurilik sıvısına penetrasyonu sınırlıdır. Sadece plazma seviyesinin yaklaşık %25'i beyin-omurilik sıvısına geçebildiği belirtilmiştir. KMS'nin plazma dışına dağılım hacmi yetersizdir. Doku dağılımının yetersiz olmasının nedeni, büyük moleküler ağırlığı ve polaritesine bağlı olabileceği düşünülmektedir (33). Vücuda verilen KMS'nin yaklaşık %60'ı, ilk 24 saat içerisinde metabolize olmadan idrar yoluyla atılır. Kolistinin vücuttan atılımının, böbrek dışı

yollar aracılığıyla da sağlandığı düşünülürken, bu süreç hala tam anlamıyla açıklanmış değildir. Kolistin gastrointestinal sistemden emilmez ve biliyer salınımı bildirilmemiştir (33).

3.1.4. Farmakodinamiği

Kolistin, çoklu dirençli Gram negatif bakterilerde farmakodinamik parametreler açısından incelenmiştir. Kolistin, başlangıçta çok aktif olmasına rağmen konsantrasyon bağımlı bakterisidal etkisi nedeniyle özellikle 24. saatte gözlenen yeniden üreme üzerinde etkili olmaz. Bu durum, heterorezistan suşların varlığı ve kolistinin postantibiyotik etkinliğinin çok az veya hiç olmamasıyla açıklanır (47). Kolistin, hızlı bakterisidal etkili ve konsantrasyon bağımlı bir bileşendir. Kolistin gibi konsantrasyon bağımlı antibiyotiklerde birincil farmakodinamik parametre, hastanın serumundaki maksimum ilaç konsantrasyonu (C_{max}) ile minimum inhibisyon konsantrasyonu (MIC) arasındaki oran olan (C_{max}/MIC) değeridir. İkinci farmakodinamik parametre ise 24 saatlik serum konsantrasyon eğrisinin altında kalan alanın (AUC), MIC'e oranı olan (AUC/MIC) değeridir. Yüksek bir AUC değerine ulaşmak için antibiyotiğin sık aralıklarla veya yüksek dozda verilmesi önerilmiştir (48). Mevcut çalışmalarda, kolistinin günlük toplam dozunun günde üçe ayrılarak uygulanması önerilmektedir. Kolistinin *Pseudomonas aeruginosa* üzerinde post-antibiyotik bir etkisi bulunmaktadır. Heterojen direnç oluşma potansiyeli nedeniyle, kolistinin diğer aktif ajanlarla birlikte kombinasyon halinde ve sık uygulamalarla kullanılması tavsiye edilir (46). İn vitro çalışmalarda, kolistin+ karbapenem ve kolistin+rifampisin kombinasyonunun in vitro olarak sinerjistik aktivite gösterdiği gözlemlenmiştir (47).

Bu klinik açıdan kolistinin tek başına kullanılmaması gerektiğini ve doz aralıklarının iyi ayarlanması gerektiğini gösterir. Kolistinin doku dağılımı sınırlıdır (%25'e kadar). Bu durum, elektriksel polarite ve molekül büyüklüğüne bağlı olabilir. KMS ve kolistin, ağır hastalarda ve kistik fibrozisli hastalardaki gibi önceden çalışılmış gruplardan farklı farmakokinetik-farmakodinamik özellikler gösterebilir. Doğru kolistin dozajı ile kolistin direncinin engellenebileceği düşünülmektedir. Kolistinin farmakodinamiği hakkında daha fazla araştırma gereklidir. Kolistinin karmaşık

kimyasal yapısı ve instabilitesi, bu tür araştırmaların gerçekleştirilmesini karmaşıktır (46).

3.1.5. Klinik kullanımı

Kolistin, klinik kullanım için KMS ve kolistin sülfat olmak üzere iki formda sunulmaktadır. KMS, kolistin sülfata kıyasla daha düşük etkinlik ve toksisiteye sahip bir moleküldür. Kolistin sülfat, oral, topikal ve inhalasyon yoluyla uygulanabilir ve bağırsakta emilmediği için bağırsak dekontaminasyonunda da kullanılabilir. KMS'nin IV, IM ve inhalasyon formu mevcutken, özellikle gram-negatif bakteri enfeksiyonlarında intratekal ve intraventriküler uygulamalar için tercih edilir (4,33-36).

Kolistinin farmakodinamik ve farmakokinetik özellikleri oldukça karmaşıktır ve sürekli olarak yeni çalışmalar yapılmaktadır. Türkiye'de KMS içeren "Colimycin IM/IV® - Koçak Farma" adlı ruhsatlı bir preparat bulunmaktadır. Bu preparat, 150 mg kolistin bazına denk gelecek miktarda KMS içermektedir. Kolistin IV, IM, intratekal, intraventriküler ve inhaler yollarla uygulanabilir (9). Ayrıca intravezikal uygulama ile ilgili olgu bildirimleri de mevcuttur (50).

Böbrek fonksiyonları normal olan hastalar için genellikle günde 2,5-5 mg/kg olarak KMS doz önerisi bulunmaktadır ve bu doz 2-4'e bölünmüş şekilde uygulanabilir. Kolistin dozu böbrek yetersizliği olan hastalarda ayarlanmalıdır. 2020'de yayımlanan Sanford Kılavuz'unda, bu tür hastalarda kreatinin klirensine bağlı olarak uygulanması gereken dozları belirtmektedir (51,52).

Ancak, ağır enfeksiyonlar ve dirençli durumlarda, antibiyotiğin kararlı durum konsantrasyonu temel alınarak doz ayarlaması yapılması zorunlu olabilir. Plachouras ve arkadaşları tarafından yapılan farmakokinetik çalışmalar, kolistin konsantrasyonlarının kanda yavaş yükselmesi nedeniyle vücut ağırlığına göre ayarlanacak bir yükleme dozunun faydalı olabileceğini öngörmüşlerdir (42). Öncelikle, tedavi etkinliğinin artırılması amacıyla 5 mg/kg'lık bir başlangıç yükleme dozunun uygulanması önerilmektedir. İdame dozu, yükleme dozundan 12 saat sonrasına kadar başlanmalı ve bu doz 8-12 saatlik aralıklarla uygulanmalıdır. Kolistin, inhaler formda KMS olarak kullanılmaktadır. Kolistinin inhaler formu,

çoklu ilaca dirençli gram negatif bakteriler nedeniyle ortaya çıkan ventilatör ile ilişkili pnömoni tedavisinde, IV antibiyotik tedavisine ek olarak önerilmektedir (53). İnhalasyon yoluyla uygulanan tedavi, sistemik kan konsantrasyonunu artırmaz. Pediatrik hastalarda, günde 2-3 kez 4 mg/kg doz verilebilir. Bu doz, 3-4 ml tuzlu su ile 50-75 mg kolistine tamamlanabilir ve inhaler olarak uygulanabilir. Çoklu ilaca dirençli *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* ve *Acinetobacter baumannii*'ye bağlı olarak gelişen ventilatör ile ilişkili pnömoni vakalarında, IV ve inhalasyon yoluyla KMS ile birlikte başka bir antibiyotiğin verilmesiyle %83 oranında klinik ve bakteriyolojik yanıt alındığı yapılan çalışmalarda bildirilmiştir (54). Diğer çalışmalarda, inhalasyon ve IV yoldan verilen kolistin tedavisi alan ventilatör ile ilişkili pnömoni vakalarında, sadece IV yoldan verilenlere göre daha yüksek iyileşme oranları elde edilmiştir. Bu bulgular, kolistin inhalasyon yoluyla verilmesinin bu tür enfeksiyonların tedavisinde potansiyel bir faydası olduğunu göstermektedir (55,56). Menenjit durumunda, intratekal veya intraventriküler kullanım için doz 3,2-10 mg/gün olarak önerilmektedir (57). *Acinetobacter baumannii* nedeniyle oluşan menenjit tedavisinde, intratekal ve IV kolistin kullanımının kombinasyonu tavsiye edilmektedir. Bazı hastalarda günlük dozun 20 mg'a kadar çıktığı da bildirilmiştir. Ancak, tek bir uygulamada verilecek dozun 10 mg'ı aşmaması önem taşır. Bir dozun 10 mg'ı aşmamasının nedeni, ilacın potansiyel yan etkileri ve toksisitesini minimize etmek içindir. Bu nedenle, dozun kontrol altında tutulması ve tedavi sürecinde düzenli olarak böbrek fonksiyonlarının izlenmesi önemlidir (58,59). Karaciğer yetmezliği durumunda doz ayarlaması gerekmemektedir. Kolistin, yenidoğan dâhil olmak üzere tüm çocuk yaş gruplarında ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) onayına sahiptir. Oral alımda kolistin sülfat gastrointestinal sistemde emilmez ve intestinal dekontaminasyon amacıyla kullanılabilir (60). Ülkemizde, kolistin sülfatın oral formu mevcut değildir.

Kolistin, dar etki spektrumlu bir lipopeptit antimikrobiyal ajandır ve özellikle *Pseudomonas aeruginosa* gibi çeşitli gram-negatif bakteriler üzerinde etkilidir. Enterobacteriaceae familyası ve *Aeromonas* cinsinden çok sayıda türe karşı etkili olmasına karşın, *Vibrio* cinsi ve bazı non-fermentatif gram-negatif bakterilere karşı etkisi bulunmamaktadır. *Serratia marcescens*, *Providencia*, *Proteus* ve *Morganella morganii* gibi türler kolistine dirençlidir. *Aeromonas* türleri arasında sadece

Aeromonas jandaei bazı dirençlere sahip olabilirken, diğerleri genellikle duyarlıdır. *Pseudomonas aeruginosa* ve *Acinetobacter* cinsindeki türler gibi klinik olarak önemli veya sık rastlanan non-fermentatif bakteriler doğal olarak duyarlıdır, ancak *Stenotrophomonas maltophilia* bazı suşlarda direnç geliştirebilir. *Burkholderia pseudomallei* ve *cepacia* kompleksi kolistine karşı dirençli mikroorganizmalardır. Kolistin ayırt edici bir özelliği, çoklu ilaç dirençli *Pseudomonas aeruginosa* suşlarına karşı etkili olmasıdır. Kolistin, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Klebsiella* ve *Escherichia coli* cinslerine karşı etkiliyken, aynı zamanda *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis* ve *Legionella pneumophila* gibi patojenlere de etkilidir (61). Kolistin, *Mycobacterium tuberculosis* dâhil birçok mikobakteri türlerine karşı etkili bir antibiyotiktir. Ancak, gram-pozitif bakteriler, anaeroblar, mantarlar ve parazitler üzerinde etkili değildir (4).

3.1.6. Yan etkileri

Kolistinin klinik kullanımı sırasında nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi önemli yan etkiler gözlenebilir (62-64). Kolistin nefrotoksitesisi genellikle doza bağımlıdır ve reversibldir. Nörotoksisite daha nadir görülür, hafiftir ve ilacın kesilmesi ile kısa sürede düzelme görülür (33,65). Nörolojik yan etkiler genellikle uzun süreli ilaç kullanımıyla ortaya çıkar. Nörolojik toksisitelerin klinik yansıması vertigo, periferik ve fasiyal paralizi, görsel değişiklikler, konfüzyon, ataksi, solunum yetmezliği ve nöromusküler blok şeklindedir (66). Çalışmalarda, kolistine bağlı %7 oranında nörotoksositeye rastlanılmış ve en sık bildirilen yan etki %30 oranında parestezi olarak belirtilmiştir (67).

Kolistin kullanımına bağlı diğer yan etkiler hipersensitivite reaksiyonları (ateş, ürtiker, kaşıntı ve döküntü), kas güçsüzlüğü ve hafif gastrointestinal yakınmalar hastaların %2'sinde gözlenmektedir (68,69). Kolistin inhalasyon yoluyla kullanımı bronkokonstriksiyon ve göğüs sıkışması gibi sonuçlara yol açabilmektedir. Ancak, aerosolize kolistin tedavisine başlamadan önce inhale alfa-2 agonistlerinin kullanılması, bronkokonstriksiyon gelişimini engelleyebilir (70,71). Ancak son dönemde yapılan çalışmalar, kistik fibrozisli hastalarda inhale kolistin kullanımına bağlı olarak böyle bir yan etkinin tanımlanmadığını göstermektedir (72,73).

Kolistinle ilgili gerçekleştirilen eski ve yeni çalışmaların karşılaştırılması sonucunda, nefrotoksik ve nörotoksik yan etkilerin daha az olduğu görülmüştür (74). Bu durumun temel sebepleri arasında hastaların daha yakından izlenmesi, nefrotoksik etkilere sahip ilaçların kolistin ile birlikte kullanılmaması ve sağlık profesyonellerinin bu konuda daha dikkatli olması sayılabilir. Ayrıca, kolistin içeriğindeki toksik maddelerin azaltılması ve daha saf bir formunun sunulması da bu değişikliğe katkı sağlamaktadır (73,74).

3.2. Kolistin Nefrotoksitesi

Kolistimetat sodyumun %60'ı böbrekler aracılığıyla atılırken, geri kalan kısmı metabolize olarak aktif form olan kolistine dönüşür. Kolistin ise böbrek tubüllerinde yeniden emilerek böbrek dışı yollarla temizlenir. Ancak, bu miktar böbreklerle temizlenen miktarla karşılaştırıldığında oldukça azdır. Bu nedenle, klinik kullanımda polimiksinlerin renal eliminasyonu dikkate alınmalı ve ilaç kullanımından önce hastanın böbrek fonksiyonları değerlendirilmelidir (75).

Kolistinin klinik kullanıma başladığı dönem olan 1959-1975 arasındaki yaklaşık 15 yıllık süreçteki nefrotoksite oranları ile daha sonraki 15 yıllık dönem (1995 sonrası) arasında farklılıklar gözlemlenmektedir. Bu yan etkinin, günümüzde geçmişe kıyasla daha kabul edilebilir bir düzeyde olduğu düşünülmektedir (65,76). Falagas ve Kasiakou, eski ve yeni çalışmaları içeren, KMS toksisitesi hakkında kapsamlı bir literatür incelemesi gerçekleştirmiştir. 1975 öncesi, KMS çoğunlukla IM yoluyla ve günümüzden daha yüksek dozlarda kullanılmıştır. Bu dönemdeki nefrotoksite oranı yaklaşık %30 (%20-50) olarak rapor edilmiştir. Son 15 yıllık döneme ait çalışmalarda ise nefrotoksite oranı yaklaşık %15 (%6-55) civarında bulunmuştur (65,76).

Nefrotoksite oranlarında gözlenen bu tür farklılıkların temel nedeni, çalışmalarda böbrek yetersizliğini tanımlamak için farklı parametrelerin kullanılmasıdır. Akut böbrek yetersizliği (ABY) tanısı için ortak bir tanımlama kriteri benimsenmemiştir ve bu durum son derece önemlidir. Günümüzde, ABY sınıflandırmasında RIFLE kriterlerini kullanarak bir standardizasyon sağlayabiliriz (77).

Kolistin, eski bir ilaç olması nedeniyle dozajı genellikle üretici firmanın önerilerine göre belirlenmektedir. Ancak doz birliği sağlanması için daha fazla bilgiye ihtiyaç vardır. Bugüne kadar küresel kabul edilmiş standart bir kolistin dozajı bulunmamaktadır. Bu durum geçmişte dozların aşırı verilmesine yol açmış olabilir. Günümüzde, yaklaşık olarak 12,500 IU (1 mg) KMS karşılığı olarak kabul edilmektedir ($2 \text{ MU} = 160 \text{ mg KMS} = 60 \text{ mg kolistin baz}$) ($2.67 \text{ mg KMS} = 1 \text{ mg kolistin baz}$). Kronik böbrek hastalığı olmayan hastalarda, günlük olarak $160 \text{ mg} \times 3$ doz IV KMS'nin güvenli olduğu bilinmektedir. Diğer bir risk faktörü ise, kolistin ile birlikte diğer nefrotoksik ilaçların kullanılmasıdır. Geçmişte nefrotoksisite nedeniyle tercih edilen aminoglikozitlerin günümüzde daha az nefrotoksik olduğu anlaşılmıştır. Kolistin, yoğun bakım hastalarında da iyi tolere edilmektedir. Ancak aminoglikozitlerle birlikte kullanılması önerilmez (65,76). Çalışmaların çoğunda, nefrotoksisitenin zamanı hakkında raporlar bulunmamaktadır. Ancak bildirilen çalışmaların çoğunda nefrotoksisitenin genellikle ilk hafta içinde ortaya çıktığı belirtilmektedir (65). İlacın kesilmesinden sonra ise, ABY'nin %90'ına kadar düzeldiği gözlemlenmiştir. IV kolistin ile inhalasyon yoluyla verilen kolistin, ek bir nefrotoksisiteye neden olmamaktadır.

Çoklu ilaç dirençli (MDR) *Acinetobacter baumannii* merkezi sinir sistemi (MSS) enfeksiyonlarında, kolistinin tek başına ve yalnızca intratekal/intraventriküler yöntemle uygulanmasıyla yüksek oranda klinik iyileşme sağlanabilmektedir. Ancak bu yöntem, konvülsiyon ve kimyasal ventrikülit gibi yan etkilere yol açabilir. Kolistini 14 günden uzun süre kullananlarda, nefrotoksisite olasılığının yaklaşık dört kat arttığı belirtilmektedir. Nefrotoksisite genellikle reversibldir ve böbrek fonksiyonları genellikle bir ay içinde normale döner (65).

Nefrotoksisite, özellikle yoğun bakım ünitelerindeki kritik hastalar ve hastanede yatan diğer hastalar arasında morbidite ve mortaliteyi artıran bir durumdur. Kolistine bağlı böbrek toksisitesi gelişme oranı %8 ile %58 arasında değişmekte olup, genellikle bu toksisite durumu reversibldir (66,78,79). Kolistinin renal toksisitesine geriatrik yaş grubu (65 yaş üstü), hastalığın ciddiyeti, hipoalbuminemi, dehidratasyon, paraproteinemiler, kronik böbrek yetmezliği (KBY), hemodinamik durum, diyabet ve birlikte kullanılan potansiyel nefrotoksik ilaçlar (diüretikler,

nonsteroid anti-enflamatuar ilaçlar, aminoglikozidler,) ile birlikte radyokontrast maddeler, kolistin kaynaklı nefrotoksisiteye katkıda bulunabilen faktörlerdir (64).

Kolistin nefrotoksisitesi, serum kreatinin seviyesinde artış, glomerüler filtrasyon hızında azalma ve idrarda patolojik bulguların (glikozüri, proteinüri, hematüri, silindirüri, oligüri) ortaya çıkmasıyla kendini gösterebilir. Bunun yanı sıra, kolistin nefrotoksisitesinin önemli bir böbrek hasarı olan ATN'ye yol açabileceği bilinmektedir (64-66,78,79).

3.2.1. Akut tubüler nekroz

Akut böbrek hasarı (ABH), böbrek fonksiyonlarında aniden ortaya çıkan bozukluklar sonucunda üre ve diğer nitrojenli atık maddelerin birikmesine, ekstraselüler sıvı hacminin ve elektrolit dengesinin bozulmasına yol açan bir durumdur. ABH terimi, genellikle akut böbrek yetmezliği terimini de içine alan, morbidite ve mortaliteye neden olan geniş bir hastalık spektrumunu tanımlamak için kullanılmaktadır. Akut böbrek yetmezliği terimi ise, ABH durumunda renal replasman tedavisinin gerektiği durumları ifade etmek için kullanılmaktadır (80,81).

Akut tubüler nekroz, ABH'nin en yaygın renal nedenidir ve tüm ABH vakalarında ikinci sıklıkta görülür. ABH, aniden ortaya çıkan böbrek fonksiyon bozukluğuyla karakterize olan ve kan üre ve kreatinin seviyelerinde akut yükselmeye beliren bir durumdur. Gelişimi günler ve haftalar içinde gerçekleşir. Akut böbrek hasarı (ABH), üç ana kategoriye ayrılır: prerenal, renal (intrinsik) ve postrenal. Prerenal ABH, genellikle normal işleyişte olan bir böbreğin hipoperfüzyonu (yetersiz kan akışı) sonucunda meydana gelir. Postrenal böbrek hasarı ise, başlangıçta normal işleyişte olan bir böbreğin, üriner sistemdeki bir tıkanıklıkla ilişkili olarak ortaya çıkar (80,82).

Renal ABH belirleyici özelliği, böbrekteki yapısal hasardır ve en sık görülen formu ATN'dir. ATN, renal iskemi, sepsis ve nefrotoksik ajanlara bağlı olarak ortaya çıkabilen üç temel nedene sahiptir. Renal iskemi, böbreğe yetersiz kan akışı nedeniyle oluşan bir durumu ifade ederken, sepsis ise vücutta yaygın enfeksiyonun yol açtığı inflamatuvar yanıtı kaynaklanır. Nefrotoksik ajanlar ise böbrek

hücrelerine zarar veren toksik maddeleri ifade eder. Bu üç etken, ATN'nin ana nedenleri olarak kabul edilmektedir (83).

ATN'ye neden olan bir dizi ilaç ve eksojen ile endojen toksin vardır. Bu maddeler; sisplatin, vankomisin, radyokontrast maddeler, pentamidin, mannitol, aminoglikozitler, tenofovir, hem pigmentleri, foscarnet, intravenöz (IV) immünoglobulin, cidofovir ve kolistini içermektedir. Bu ilaçlar ve toksinler, farklı mekanizmalarla böbrek hücrelerine zarar verebilir ve ATN'ye yol açabilirler. Bu nedenle, bu maddelerin kullanımı sırasında böbrek fonksiyonlarının düzenli olarak izlenmesi önemlidir (83).

Toksik nedenlere bağlı ATN'de, tubül hücre hasarı çeşitli faktörlere bağlı olarak meydana gelir. Bu faktörler arasında direkt toksinlere bağlı hücresel hasar, intrarenal vazokonstriksiyon ve intratubüler obstrüksiyon bulunur. Toksik etkenlere bağlı olarak, bu komponentlerin farklı kombinasyonları böbrek hasarına neden olabilir (80,82,84). Akut tubüler nekrozun klinik seyri, üç aşamadan oluşan tanımlanmış bir patern izler: başlangıç, idame ve iyileşme aşaması. Başlangıç aşamasında, serum üre ve kreatininde hızlı bir yükselme görülür. İdame aşamasında, glomerüler filtrasyon hızı (GFR) önemli ölçüde azalmış durumdadır ve etiyolojik faktöre bağlı olarak genellikle bir ila iki hafta kadar sürer. İyileşme aşamasında ise, tubüler fonksiyonlar geri dönmeye başlar ve tipik olarak poliürik bir yanıt ortaya çıkar. Bu aşamada, serum üre ve kreatininde düşme gözlenir ve çoğu vakada bazal seviyeye geri dönülür (80,82,84,85).

Kolistine bağlı böbrek toksisitesi, genellikle azalmış kreatinin klirensi ve yükselmiş serum üre ve kreatinin seviyeleriyle kendini gösteren ATN'yi içermektedir. Polimiksinlerin sistemik kullanımı, oligüri, proteinüri, hematüri ve akut tubüler nekroz (ATN)'e bağlı akut böbrek yetmezliği ile ilişkilendirilmiştir; bu nedenle tedavi sürecinde böbrek fonksiyonlarının dikkatlice izlenmesi gerekmektedir. Kolistin nedeniyle ortaya çıkan böbrek hasarı genellikle reversibldır ve renal toksisite insidansı %20 ila %60 arasında değişmektedir. Bu geniş aralık, böbrek toksisitesinin farklı tanımlamalarına, başlangıçta var olan böbrek işlev bozukluğuna, ilacın uygulama dozuna ve doz ayarlamalarındaki değişikliklere bağlıdır (86,87).

3.3. Kolistin nefrotoksisitesinin oluşum mekanizmaları

Kolistin, oklu ilaca dirençli gram-negatif bakteri enfeksiyonlarının tedavisinde sıklıkla başvurulan bir antibiyotik olarak karşımıza çıkmaktadır. Kolistinin klinik kullanımını kısıtlayan en önemli yan etkisi, böbrek hasarı veya toksisitesine neden olmasıdır. Kolistin kaynaklı nefrotoksisitenin moleküler mekanizması tam olarak anlaşılmamış olsa da, bu konuda birçok teori ne sürülmüştür. Bunlardan en önemlileri renal tubüler epitel hücre membranının bozulması, kolistinin hücre içindeki birikimi, serbest oksijen türlerinin (ROS) oluşumunun indüklenmesi, pro-inflamatuar sitokinlerin salınımı, hücresel ölüm yolaklarının aktifleşmesi olarak sayılabilir (88).

3.3.1. Tubüler epitelyal membran geçirgenliğinin bozulması

Kolistin, fosfolipidler ve lipopolisakkaritler gibi hücre zarının anyonik bileşenleriyle etkileşimde bulunabilen bir katyonik polipeptit antibiyotiktir. Kolistin, böbrek korteks bölgelerinde yoğun bir şekilde birikme eğilimindedir ve hücresel düzeydeki toksik etkileri, böbrek hücrelerinin mitokondrisinde ciddi hasara yol açar (89).

D-aminoasit içeriği ve yağ asidi bileşenleri kolistinin hem prokaryotik hem de ökaryotik hücre zarında bulunan anyonik lipidlerle etkileşime girmesine sebep olur. Bakterilerde bu yağ asidi zinciri hücre zarının lipid çift tabakasına yerleşerek zarın bozulmasına neden olur. Ökaryotik hücrelerde ise tubüler epitelyal hücrelerin hücre zarı fosfatidilserin (PS) ve fosfatidilinositol (PI) gibi anyonik lipidler içerir. Kolistin, bu anyonik lipidlerle elektrostatik kuvvetler aracılığıyla etkileşime girerek kolistin-lipid komplekslerinin oluşumuna neden olur. Ayrıca, düşük sitoplazmik kolistin içeriği hücre tarafından tolere edilebilir ve hasar hücrenin onarım mekanizmaları tarafından telafi edilebilmektedir. Ancak ilacın yüksek konsantrasyonlarda veya uzun süreli kullanılması çift lipid tabakalı zarın yapısal bileşenleri üzerinde fazla stres oluşturarak zarın çözülmesine yol açar. Bu etkileşim sonucunda hücre zarının geçirgenliği artarak, hücreye katyon, anyon ve su girişi artmasına, hücre şişmesine ve lize neden olabilir. Hücre zarından artan iyon geçişi, tubüler böbrek hücrelerinin hassas osmotik homeostazını etkiler ve hücrenin apoptoz, nekroptoz veya nekroz gibi

hücrelölüm yolaklarının aktivasyonu ile sonuçlanan bir sinyal kaskatını tetikler (90).

Tübüler epitel hücrelerinde bulunan taşıyıcılar, tübüler epitel hücrelerinin plazma membranlarında (bazolateral veya fırçamsı kenar) yoğun bir şekilde bulunur ve hücreleri birçok ilaç veya diğer xenobiyotiklere duyarlı hale getirir. Kolistin, proksimal tübül hücreleri tarafından yoğun bir şekilde geri emilir. Fizyolojik pH değerlerinde polikasyonik bir yapıya sahip olan kolistin, lipit çift tabakasını zayıf bir şekilde geçer. Bu nedenle, kolistinin tübüler geri emilimi muhtemelen bir veya daha fazla aktif taşıma sistemi içermektedir. Yapılan çalışmalar, kolistinin proksimal tübül hücre membranında bulunan megaline bağlanarak absorbe edildiğini göstermiştir. Ayrıca, insan peptid taşıyıcısı 2 (PEPT2) ve karnitin/organik kasyon taşıyıcısı 2 (OCTN2) gibi solut taşıyıcı proteinlerinin de kolistin taşınmasında rol oynadığı tespit edilmiştir. Yüksek konsantrasyonda ya da uzun süreli kolistin maruziyetinin bu taşıyıcıların mekanizması üzerinde olumsuz etkiler yaptığı gözlenmiştir (89).

3.3.2. Mitokondriyal disfonksiyon

Mitokondri, enerji üretimi ve hücrel homeostazda hayati öneme sahip olan organellerdir. Oksidatif fosforilasyon adı verilen bir süreç aracılığıyla ATP (adenozin trifosfat) üretirler. Reaktif oksijen türleri (ROS), hücrel metabolizmanın doğal yan ürünleri olarak oluşan, oksijen içeren kimyasal olarak reaktif moleküllerdir. Farklı fizyolojik süreçlerde önemli rolleri olmasına rağmen, aşırı ROS üretimi oksidatif stresi tetikleyerek hücrel hasar ve işlev bozukluğuna neden olabilir. Mitokondri, hem ROS üretiminin önemli bir kaynağı hem de hedefidir. Oksidatif fosforilasyon sırasında, elektron taşıma zincirinden sızan elektronlar süperoksit radikallerinin oluşumuna neden olur ve bu radikaller daha sonra diğer ROS türlerine dönüşebilir. ROS, zararlı potansiyelleriyle bilinmesine rağmen, hücrel süreçlerde önemli bir sinyal molekülü olarak işlev görür, redoks sinyalleşme ve transkripsiyonel düzenleme gibi süreçleri etkiler. Bununla birlikte, aşırı ROS üretimi veya bozulmuş antioksidan savunma mekanizmaları oksidatif stresi tetikleyerek mitokondriyal disfonksiyona yol açabilir. Bu durum, ATP üretimi, elektron taşıma ve kalsiyum homeostazı gibi mitokondriyal fonksiyonların bozulduğu bir süreci içerir. ROS

tarafından indüklenen hasar, lipitler, proteinler ve mitokondriyal Deoksi ribonükleik asit (DNA)'e zarar verir ve mitokondriyal yapı ve işlev bozukluğuna neden olur. Bu hasar, bozulmuş mitokondrilerin daha fazla ROS üretmesiyle artan bir pozitif geri besleme döngüsü oluşturur ve mitokondriyal disfonksiyonu ve hücrel hasarı daha da kötüleştirir (91).

Kolistin nefrotoksitesine neden olan mekanizmalardan biri olarak mitokondriyal fonksiyon bozukluğudur. Kolistin tedavisi sırasında, ilaç böbrek hücrelerine ulaşır ve mitokondrilerdeki elektron taşıma zincirini etkileyebilir. Elektron taşıma zinciri, mitokondrilerde enerji üretimi için elektronları taşır ve aynı zamanda ROS üretiminin bir yan ürünü olan oksijenin redoks reaksiyonlarına katılır. Kolistin, elektron taşıma zincirindeki protein komplekslerini ve enzimleri etkileyerek mitokondriyal fonksiyonları bozabilir. Bu durum, elektron akışının düzensizleşmesine, elektronların serbest radikallerle reaksiyona girmesine ve ROS üretiminin artmasına yol açabilir. Kolistin kaynaklı nefrotoksitede, ROS seviyelerindeki artış ve SOD2, eNOS ve GSH gibi antioksidan savunmaların azalması, renal hücre hasarı ve hücrel ölüm yollarının aktivasyonuna katkıda bulunabilir (92).

Kolistin, NADPH oksidaz (Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat Oksidaz) enzim kompleksinin aktivitesini uyararak ROS üretimini artırır. Hücrelerde, enerji metabolizmasında önemli roller üstlenen NADPH enzimleri, dehidrojenaz enzimlerinin koenzimi olarak oksidoredüksiyon reaksiyonlarında görev alır. NOX enzim ailesi tarafından okside edildiğinde, oksijenden süperoksit radikalinin oluşumu gözlenir. Kolistin, NADPH oksidaz enziminin aktive olmasını sağlayarak, enzim kompleksinin elektronları oksijene transfer etmesini teşvik eder. Bu süreç sonucunda artan ROS seviyeleri hücrelerde oksidatif stresi tetikler (93).

Antioksidan savunma sistemleri, hücrelerin oksidatif stresten kaynaklanan zararlı etkileri sınırlamak için tasarlanmış moleküler mekanizmalardır. Bu sistemler, ROS'ları nötralize eden enzimler, antioksidan moleküller ve diğer koruyucu bileşenlerden oluşur. Antioksidan enzimler, ROS moleküllerini nötralize etmek ve onları zararsız hale getirmek için önemli bir rol oynar. Örneğin, süperoksit dismutaz (SOD) enzimi, süperoksit radikallerini hidrojen peroksit'e dönüştürerek ROS hasarını

azaltır. Katalaz enzimi, hidrojen peroksiti su ve oksijene dönüştürerek hücreleri ROS hasarından korur. Glutasyon peroksidaz enzimi, hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitleri glutasyon aracılığıyla nötralize eder. Glutasyon, hücrelerde doğal olarak bulunan önemli bir antioksidan moleküldür. Glutasyon, ROS'ları doğrudan nötralize eder ve diğer antioksidan enzimlerin aktivitesini destekler. Kolistin tedavisi, bu enzimlerin ve moleküllerin aktivitesini etkileyerek antioksidan savunma sistemlerinin etkinliğini azaltabilir (94).

3.3.3. Kolistin aracılı hücre ölümü

Kolistin kaynaklı nefrotoksisite, renal hücrelerdeki hücresel ölüm yollarının aktive olmasıyla karakterizedir ve çoklu karmaşık mekanizmaları içerir. Kolistin uygulaması ile indüklenen mitokondriyal işlev bozukluğu, ATP tükenmesi, artmış ROS üretimi, artmış oksidatif stres pro-enflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin salınması ile hücresel hasar daha da artar. Bunlara bağlı olarak gelişen hücresel ölüm sinyal yollarının aktivasyonu ile renal hücre hasarına ve nefrotoksisitenin ilerlemesine neden olur. Kolistin ile indüklenen nefrotoksisitede apoptozun rolü kanıtlanmış olmasına rağmen, sürekli olarak yeni moleküller ve mekanizmalar keşfedilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar, Kolistin ile indüklenen nefrotoksisite mekanizmasında bir diğer programlanmış hücre ölüm yolağı olan nekroptozun önemli görevlere sahip olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmalar ayrıca renal hücre ölümlerinde hem apoptoz hem de nekroptoz mekanizmalarının oldukça önemli roller oynadığını kanıtlamıştır (95).

3.3.3.1. Apoptoz

Programlanmış hücre ölüm yollarının en iyi bilineni olan apoptoz, kaspaz enzimleri aracılığıyla düzenlenir. İntrinsik ve ekstrinsik olmak üzere iki aktivasyon yolları apoptoza yol açar. Her iki yolda da çeşitli kaspaz enzimleri rol alsa da, apoptoza girmek için kaspaz 3'ün aktivasyonu gereklidir. Kolistin ile indüklenen nefrotoksisitede en çok araştırılan ve en iyi karakterize edilen hücre ölüm yolu apoptozdur. Kolistin tedavisi, artmış oksidatif stres ve mitokondriyal hasara bağlı olarak apoptoz dâhil hücre ölüm yollarını tetikler. Artan oksidatif stres, apoptozun

intrinsik yolağını aktive eder ve mitokondriyal kalsiyum yüklenmesi, mitokondriyal membran potansiyel kaybı, mitokondriyal şişme ve sonunda mitokondriyal dış membranın yırtılmasıyla sonuçlanan mitokondriyal hasara neden olur. Sitokrom c'nin sitozolden salınmasını sağlayan apoptozom kompleksinin oluşumu apoptoza yol açar. Ayrıca, Kolistin, Bcl2 gen ailesi ile ilişkili Bax/Bak enzimlerinin aktivasyonunu ve apoptotik proteinlerin sitoplazmaya difüzyonunu sağlayarak apoptozun intrinsik yolağını aktive eder. Kolistin, ekstrinsik apoptoz yolunu da aktive eder. Ölüm ligandları Fas ve Tümör nekroz faktör- α (TNF- α), reseptörlerine bağlanarak apoptoz yolunu tetikler. Kolistin, Fas/FasL ve p53'ün upregülasyonuna neden olan NFAT4 ve NF-KB'yi aktive ederek ve Fas-aracılı hücre ölümünü indükleyerek apoptozun ekstrinsik yolaklarını aktive edebilir. Apoptoza giren hücrelerde mitokondriyal zar permeabilizasyonu, kromatin kalınlaşması, DNA parçalanması ve çekirdek küçülmesi gibi belirtiler gözlenir. Apoptotik cisimcikler, parçalanmış çekirdek artıklarını içeren hücreler, çevre dokuya ve hücrelere zarar vermeden fagositoza uğrar (91).

3.3.3.2. Nekroptoz

Hücre içi veya dışındaki homeostatik denge ve mikro ortamın bozulmasıyla başlayan, FAS veya TNF- α reseptörü gibi reseptörlerin aktivasyonu ile indüklenen programlanmış hücre ölümüdür. Nekroptozun önceden sadece bakteriyel ve viral enfeksiyonlara karşı ortaya çıktığı düşünülse de, iskemi-reperfüzyon hasarları, Alzheimer, Parkinson, ateroskleroz, miyokardiyal enfarktüs, pankreatit ve enflamatuvar gastrointestinal sistem hastalıklarının moleküler patogenezi içinde önemli bir rol oynadığı belirlenmiştir. Bu tür programlanmış hücre ölümü, özellikle ROS ve oksidatif stres seviyelerinin yükseldiği, mitokondriyal disfonksiyonların ve non-apoptotik proteazların indüklendiği hücrelerde aktive olmuştur (96).

Nekroptozun indüksiyon mekanizmasının nedenleri arasında TNF- α , TNF reseptör bağlantılı faktör 2 (TRAF2), tümör baskılayıcı silindromatoz (CYLD), Fas ligandları, patojen kaynaklı DNA/RNA, interferonlar ve genotoksik stres bulunmaktadır. İndüklenen nekroptoz reseptörleri, RIP1 enzimini fosforlayarak ve RIP1 enzimi de RIP3 ve MLKL enzimlerini fosforlayarak nekrozomu oluşturur. MLKL enzimi,

plazma zarını yırtarak ve organellerin ve inflamatuvar faktörlerin salınmasına izin vererek immün yanıtın oluşmasını ve hücre ölümünün indüklendiğini sağlar. Ayrıca, fosforile ve upregüle olan RIP3 enzimi, Ca²⁺/kalmodulin bağlı protein kinaz II (CaMKII) enzimi ile birleşerek ve onu indükleyerek Siklofilin D (CypD) proteinini aracılığıyla mitokondriyal permeabilite geçiş kanalının açılmasını sağlayarak nekroptozu indükleyebilir (18).

Nekroptoz yollarında yer alan ve hücre ölümü reseptörlerinin aktivasyonu ile fosforlanan RIP1 enzimi 671 amino asitten oluşur. RIP1 enzimi, beyin, kalp, karaciğer, böbrek ve diğer birçok dokuda sentezlenir ve çoğunlukla hücre sitoplazmasında bulunur. Fosforile RIP1 enzimi, RIP3 enzimi ve MLKL molekülüne bağlanarak nekrozom kompleksi oluşturur. Eğer hücrede kaspaz 8 enzimi inhibe edilirse, bu nekrozom kompleksi aktive olur ve nekroptozu başlatır. RIP1 enziminin inhibisyonu, nekrostatin-1 molekülüyle sağlanır ve birçok dokuda yapılan hem in vitro hem de in vivo çalışmalarla bu molekülün nekroptozu karşı koruyucu etkinliği kanıtlanmıştır (97).

RIP3 enzimi ise 518 amino asitten oluşur ve glikojen fosforilaz (PYGL), glutamin sentetaz (GLUL), glutamat dehidrojenaz 1 (GLUD1) gibi birçok metabolik enzimle etkileşime girer ve oksidatif fosforilasyon için gereken substratları artırır. Bu nedenle RIP3 enzimi, önemli bir ROS kaynağı olarak kabul edilebilir. Ayrıca, RIP3 enziminin özellikle kardiyomiyositlerde sentezlendiği ve mitokondride lokalize olduğu, inflamasyon, ROS üretimi ve miyokardiyal enfarktüs sonrası remodellemede görev aldığı bildirilmiştir. Bu yolda önemli bir rol oynayan diğer bir enzim olan CaMKII enzimi, serin treonin protein kinaz ailesinin bir üyesidir. Bu multifonksiyonel enzim, iskemi/reperfüzyon hasarı, miyokardiyal enfarktüs, kalp yetmezliği gibi birçok kardiyopatolojik durumda rol oynadığı tespit edilmiştir. RIP3 enzimi, CaMKII enzimini hem doğrudan fosforilayarak hem de artan ROS miktarıyla oksidasyonunu sağlayarak dolaylı olarak aktive edebilir. İndüklenen CaMKII enzimi, CypD proteinin ekspresyonunu artırarak mPTP'nin açılmasını sağlar ve bu da hücrede nekroptozun başlamasına yol açar (18,98).

Nekroptoz, çeşitli böbrek hastalıklarının patogenezi ile ilişkilendirilmiştir. Apoptozdan farklı olarak, inflamatuvar olmayan bir hücre ölümü şekli olan

nekroptoz, doku hasarı ve inflamasyona katkıda bulunabilen pro-enflamatuar moleküllerin salınması ile karakterizedir. Nekroptoz, ATN patogeneziyle ilişkili bulunmuştur ve bu, ABH'ın yaygın bir nedenidir. ATN'de, nekroptoz, iskemi-reperfüzyon hasarı, kolistin veya sisplatin gibi belirli ilaçlara veya toksinlere maruz kalma gibi çeşitli uyarıcılardan tetiklenebilir. Nekroptoz nedeniyle tubüler epitelyal hücre kaybı, nefron kaybına ve uyumsuz renal fibrojenezise yol açabilir, bu da KBY gelişimine katkıda bulunabilir. Ayrıca, nekroptoz, diyabetik nefropati ve lupus nefrit gibi diğer böbrek hastalıklarında da rol oynadığı düşünülmektedir. Bu nedenle, böbrek hücre ölümündeki nekroptozun rolünün anlaşılması, böbrek hastalıklarını önleme veya tedavi etme için yeni terapötik hedeflerin belirlenmesi açısından önemlidir. Nekroptoz hedef almak, AKI ve KBY'nin önlenmesi veya tedavisi için potansiyel bir terapötik stratejiyi temsil edebilir (99).

3.3.4. Nekroptoz inhibitörleri

3.3.4.1. Nekrostatin-1

Aleksey Degretev ve Junying Yuan tarafından 2005 yılında sentezlenen Nekrostatin-1 (Nec-1), nekrotik hücre ölümünü engelleme yeteneği ile dikkat çeken bir bileşiktir. Nekrostatin-1'in kimyasal yapısı, 5-(1H-indol-3-ilmetil)-2-tiohidantoin molekülüdür. İlk bulgular, nekrostatin-1'in iskemik beyin hasarında koruyucu etkisinin olduğunu göstermiştir. Bu, hücre ölümünü engelleyerek beyinde hasarı azaltabileceğini düşündüren bir özelliktir (17).

Nekroptoz, programlı nekrotik hücre ölümünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan RIP1 ve RIP3 kinazları tarafından düzenlenen bir süreçtir (100).

Nekrostatin-1 hedefi, öncelikle RIP1 olarak tanımlanmıştır. RIP1, programlanmış hücre ölümü yolu olan nekroptozun anahtar bir düzenleyicisidir. Nekrostatin-1, RIP1'in kinaz aktivitesini seçici bir şekilde inhibe ederek bu hücre ölüm yolu üzerinde etki eder. RIP1, genellikle RIP3 ile birlikte çalışır. Bu iki protein, nekroptozu tetikleyen ve düzenleyen bir protein kompleksi olan nekrosomu oluşturur. RIP3'ün de kinaz aktivitesi vardır ve bu aktivite, nekroptoz yolu boyunca

ilerlemek için gereklidir. RIP1 ve RIP3 arasındaki etkileşim, bu iki proteinin birbirine bağlanmasını ve fosforilasyonunu gerektirir, bu da proteinlerin aktivasyonunu ve nekroptozun başlatılmasını sağlar. Nekrostatin-1, RIP1'in kinaz aktivitesini inhibe ederek bu süreci engeller. Ancak, literatürdeki mevcut bilgilere göre, Nekrostatin-1'in RIP3 üzerinde doğrudan bir etkisi yoktur. Yani, Nekrostatin-1'in etkisi, esas olarak RIP1 üzerindedir (100-102).

Nekrostatin-1'in nekroptozun yanı sıra diğer hücre ölümü yollarında da potansiyel olarak etkili olabileceğini düşündürmüştür. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda, Nekrostatin-1'in TNF- α tarafından uyarılan nekroptozda, RIP1 enzimini inhibe ederek nekroptozu engelleyebildiği bulunmuştur (101). TNF- α , hücre ölümünü indükleyebilen ve inflamatuvar yanıtları tetikleyebilen bir sitokindir. Bu bulgu, Nekrostatin-1'in TNF- α indüklenen inflamasyon ve hücre ölümünün tedavisi için potansiyel bir ilaç olabileceğini düşündürmektedir (103).

Nekrostatin-1'in nefrotoksisitedeki koruyucu rolü ile ilgili olarak, böbrek hasarına sıklıkla karışan nekroptoz yolunu inhibe ederek işlev gördüğü görülmektedir. Nekrostatin-1, RIP1'i ve ardından nekroptozu inhibe ederek böbrek hasarını azaltabilir ve çeşitli deneysel modellerde böbrek fonksiyonunu iyileştirebilir. Çeşitli çalışmalar, genellikle nefrotoksisite olarak adlandırılan çeşitli böbrek hasarı modellerinde Nekrostatin-1'in potansiyel koruyucu rolünü göstermiştir. Bu modeller arasında, böbreğe giden kan akışının geçici olarak kesildiği ve daha sonra yeniden sağlanarak önemli hasara neden olduğu iskemi-reperfüzyon hasarı ve yaygın bir kemoterapi ilacı olan sisplatinin neden olduğu gibi ilaca bağlı nefrotoksisite yer almaktadır (20,91).

3.3.4.2. Dabrafenib

Dabrafenib, ATP'ye karşı rekabet eden bir BRAF enzim inhibitörü olup, bu özelliği sayesinde belirgin bir antitümör aktiviteye sahiptir. "Tafinlar" ve "Rafinlar" adlarıyla ticarileştirilmiş olan bu bileşen, FDA tarafından 29 Mayıs 2013 tarihinde, BRAF geninde V600E mutasyonu bulunan ilerlemiş melanom ve non-small cell lung cancer (NSCLC) hastaları için monoterapi olarak onaylanmıştır. Dabrafenib ilk olarak 2013

yılında FDA tarafından ilerlemiş veya metastatik melanom tedavisi için onaylandı (104). Daha sonra, 2015 yılında, NSCLC tedavisi için kullanımı da onaylandı (104).

BRAF geni, hücre büyümesi ve bölünmesiyle ilgili sinyalleri düzenleyen bir protein olan B-Rafı kodlar. V600E mutasyonu, bu proteinin sürekli aktif hale gelmesine ve hücrelerin kontrolsüz bir şekilde bölünmesine neden olur, bu da kanserin oluşmasına yol açar. Dabrafenib, bu sürekli aktif B-Raf proteinini inhibe ederek kanserli hücrelerin büyümesini ve bölünmesini durdurur (105).

Ekstraselüler sinyal-regüle kinaz 1/2 (ERK1/2) kaskadı, hücre bölünmesini indükleyerek hızla çoğalan hücrelerde, örneğin kanser hücrelerinde, kritik bir rol oynar. Bu kaskatın aktivasyonu, ARAF, BRAF ve RAF1 gibi Raf kinazlarının aktive ettiği, mitojen-aktive protein kinaz 1/2 (MKK1/2) tarafından fosforlanma gerektirir. ERK1/2 kaskadının aktivasyonuna sebep olan mutasyonlar, özellikle BRAF enzimini aktive eden mutasyonlar, kanserin oluşmasına katkıda bulunur. Bu mutasyonlar, tüm kanserlerin %30'u ve melanomların %60'ında görülür. Dolayısıyla, dabrafenib gibi etkin BRAF inhibitörlerinin geliştirilmesi, kanser tedavisinde önemli bir adımdır (106).

Preklinik çalışmalar, dabrafenib'in, BRAFV600E kinaz enzim mutasyonuna sahip melanom hücrelerinde MAPK sinyal yolunu inhibe ederek, xsenograft fare modellerinde hücre çoğalmasını ve tümör büyümesini azalttığını göstermiştir (107). Dabrafenib, B-Raf V600E mutasyonunu seçici bir şekilde inhibe eden reversibl bir B-Raf inhibitörüdür ve bu, yakın zamanda klinik çalışmalarda test edilmiştir. Faz I/II çalışmasında, günde iki kez 150 mg dozunda dabrafenib uygulandığında, melanom, beyin metastazları ve diğer solid tümörlerin tedavisinde etkili olduğu bulunmuştur. Bu çalışmalar, dabrafenib'in yönetilebilir bir güvenlik profiline sahip olduğunu göstermiştir (106,107). Ek olarak, dabrafenib'in antikanser etkisinin, Raf1 gibi proapoptotik kinazları inhibe etme yoluyla ve ayrıca RIP3 enzimini inhibe etme yoluyla olabileceği belirtilmiştir. Bu ikincisi, RIP3 enziminin nekroptoz yollarında inhibisyonu ile nefrotoksik hasara karşı direncin artırılmasında önemli bir role sahip olabilir. Ancak, bu koruyucu etkilerin daha iyi anlaşılması ve tedavi stratejilerine entegre edilmesi için daha fazla klinik ve laboratuvar araştırmalarına ihtiyaç vardır (20,108,109).

Dabrafenib'in böbrek koruyucu mekanizmaları hakkında çok fazla bilgi bulunmamaktadır. Kanser ilaçlarının böbrek koruyucu etkileri genellikle dolaylıdır. Örneğin, kanser hücrelerinin büyümesini ve çoğalmasını durdurarak, bu hücrelerin böbreklere zarar verme potansiyelini azaltabilirler. Ancak, böbrekler üzerindeki direk etkiler genellikle ilacın toksik profiline ve böbrek hasarına yol açabilecek diğer faktörlere bağlıdır (20,108,109).



4. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Araştırma ve Uygulama Merkezi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'nun (DÜHADEK) 31 Ocak 2019 tarihli ve 5/1 karar sayılı onayı ile Dicle Üniversitesi Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜSAM) laboratuvarında yürütülmüştür. Bu proje Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından olarak desteklenmiştir (Proje Numarası: TIP.18.037).

4.1. Gereç

4.1.1. Kullanılan araç ve gereçler

- Biopac MP30 amplifikatör (dört kanalda birçok parametrenin kayıt ve analizini yapar)
- MAY FDT-10A Force Displacement Transducer cihazı
- MAY WBC30-440C organ banyosu için su sirkülatör cihazı
- Santrifüj cihazı (Thermo MicroCL 17R)
- Langendorff sistemi (MAY 0702)
- Vortex cihazı (Nüve NM 110)
- Hassas terazi (Sartorius BP 121 S)
- pH metre (Mettler Toledo S220-K)
- Isıtcılı manyetik karıştırıcı (VELP ARE Aluminum)
- MagNA Lyser Homojenizatör (Roche)
- NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre (Thermo ND-2000/2000c)
- Hızlı Elektrobloklama Sistemi (Thermo G2 Fast Blotter) (Thermo FP-94060103)
- Dikey Elektroforez Sistemi (Thermo OWL-P8DS-1)

- Yatay alkalayıcı (Stuart SSM4)
- Güç Kaynağı (Thermo OWL-EC300XL2)
- Standart Otomatik Pipet Seti (Eppendorf Research® plus)
- iBright Western Blotting Görüntüleme Sistemleri [Thermo Fisher (CL 1000)]
- Mikrotom Cihazı (Leica, RM2245)
- Otomatik Doku Takibi Cihazı ile (Thermo, Excelsior AS)
- Otomatik Boyama Cihazı (Shardon, Varistain Gemini)
- Işık Mikroskobu (Nikon, Eclipse 50i)

4.1.2. Kullanılan kimyasal maddeler

- Ketamin HCL (Ketalar 50 mg/ml,10ml flakon, Pfizer)
- Ksilazin (Rompun %2, Bayer)
- Heparin (Nevparin flakon 5.000 IU, Mustafa Nevzat)
- Kolistin (Koçak-Farma)
- Dabrafenib (GlaxoSmithKline)
- Nekrostatin-1 (Nec-1) (MedChemExpress)
- Dimetil sülfoksit (DMSO) (Sigma Aldrich)
- Krebs Henseleit Solüsyonu [Sodyum Klorür (NaCl) (Sigma Aldrich), Sodyum Bikarbonat (NaHCO₃) (Sigma Aldrich), Potasyum Klorür (KCl) (Sigma Aldrich), Kalsiyum Klorür (CaCl₂) (Sigma Aldrich), Magnezyum Klorür (MgCl₂) (Sigma Aldrich), Disodyum Fosfat (Na₂HPO₄) (Sigma Aldrich), Glikoz (Sigma Aldrich)]
- Tiyobarbütirik Asit (TBA) (Sigma Aldrich)
- Trikloroasetik asit (TCA) (Sigma Aldrich)
- T-PER™ Total Protein Ekstraksiyon Reaktifi (Thermo Pierce)

- Halt™ Proteaz ve Fosfotaz İnhibitör Kokteyli (100X) (Thermo Pierce)
- Total Protein Kuantifikasyon Kiti (Thermo Pierce)
- Sample Laemmli Buffer (Sigma Aldrich)
- Acrylamide/Bis-acrylamide (30%/0.8% w/v) (Sigma Aldrich)
- Tetrametiletildiamin (TEMED) (Sigma Aldrich)
- Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Sigma Aldrich)
- Amonyum Persülfat (APS) (Sigma Aldrich)
- Tris Baz (Sigma Aldrich)
- Tris Hidroklorür (Tris HCl) (Sigma Aldrich)
- Glisin (Sigma Aldrich)
- 1 Step Transfer Buffer (1 L) (Thermo Pierce)
- Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder (10 – 250 kDa) (Thermo Pierce)
- Tris-buffered saline with 0.1% Tween® 20 (TBST) Tablet (Sigma Aldrich)
- Filtre Kâğıdı (Thermo Pierce)
- Poliviniliden florür transfer membranı (GVS)
- ECL Kit (Thermo Pierce)
- MagNA Lyser Green Beads Tüpleri

4.1.3. Kullanılan çözeltilerin hazırlanması

1. **Krebs Henseleit Solüsyonu:** Tablo 2’de belirtilen kimyasallardan ilk 5’i ayrı bir beherde 700 ml distile su ile çözündürüldü. Daha sonra son ikisi ayrı bir beherde 200 ml distile su ile çözündürüldü. En sonunda, iki çözelti yavaş yavaş karıştırıldı ve çözelti hacmi 1 L’ye tamamlandı.
2. **%5 TCA Çözeltisi:** 5 gr TCA 100 ml distile suda çözülür.
3. **%10 TCA Çözeltisi:** 10 gr TCA 100 ml distile suda çözülür.
4. **%0,67 TBA Çözeltisi:** 0,67 gr TCA 100 ml distile suda çözülür.

5. **%2 Agaroz Çözeltisi:** 2 gr agaroz 100 ml distile su ile karıştırıldı ve mikrodalga fırında yüksek ayar da 2 dk ısıtılarak çözündürüldü ve hiç beklemeden kullanıldı.
6. **0,5 M Tris HCl Çözeltisi (pH=6,8):** 3,94 gr Tris HCl distile su ile 50 ml çözündürüldü ve 1,5 M Tris Baz çözeltisi ile pH 6,8'e ayarlandı.
7. **1,5 M Tris Baz Çözeltisi (pH=8,8):** 11,82 gr Tris Baz distile su ile 50 ml çözündürüldü ve 0,5 M Tris HCl çözeltisi ile pH 8,8'e ayarlandı.
8. **%10 SDS Çözeltisi:** 10 gr SDS 100 ml distile suda çözülür.
9. **%10 APS çözeltisi:** 0,1 g APS 1 ml distile su içerisinde çözülür. Bu çözelti her western blotting deneyine başlamadan önce taze olarak hazırlanır.
10. **Yürütme tamponu (Running Buffer) (10x):** 30 gr Tris baz ile 144 gr glisin tartılıp 800 ml distile su ile balonjoje içerisinde karıştırıldı. Daha sonra ısıtıcılı magnetik karıştırıcı üzerinde tamamen çözündürüldü. En son 10 gr SDS eklenip, çözelti hacmi 1 L'ye tamamlandı.
11. **TBST Çözeltisi:** Hazır olarak satın alınan TBST tableti 500 ml distile su çözülür.
12. **Bloklama Çözeltisi:** 5 gr yağsız süt tozu 100 ml TBST çözeltisi ile çözülür.

Tablo 2. Krebs Henseleit çözeltisinin içeriği

NaCl	6,9 gr/L
KCl	0,35 g/L
NAHCO ₃	2,1 g/L
Na ₂ HPO ₄	0,12g/L
Glukoz	2 g/L
CaCl ₂	0,28 g/L
MgCl ₂	0,11 g/L

4.1.4. Kullanılan deney hayvanlarının temini

Bu çalışma, Dicle Üniversitesi Sabahattin Payzın Sağlık Bilimleri Uygulama ve Araştırma Merkezi (DÜSAM)'dan temin edilen, 10-12 haftalık ve 250-300 gram

ağırlığında 48 adet Sprague-Dawley cinsi erkek rat kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hayvanların bakımı, oda sıcaklığı 24-26 °C, %55-60 nem oranı, 12 saat gece ve 12 saat gündüz ışık döngüsüne sahip standart koşullarda yapıldı. Hayvanlar, ad libitum standart pelet yem ve içme suyu ile beslendi. Çalışma boyunca 'Hayvan Haklarının Korunması' esaslarına özen ve dikkatle uyulmuştur.

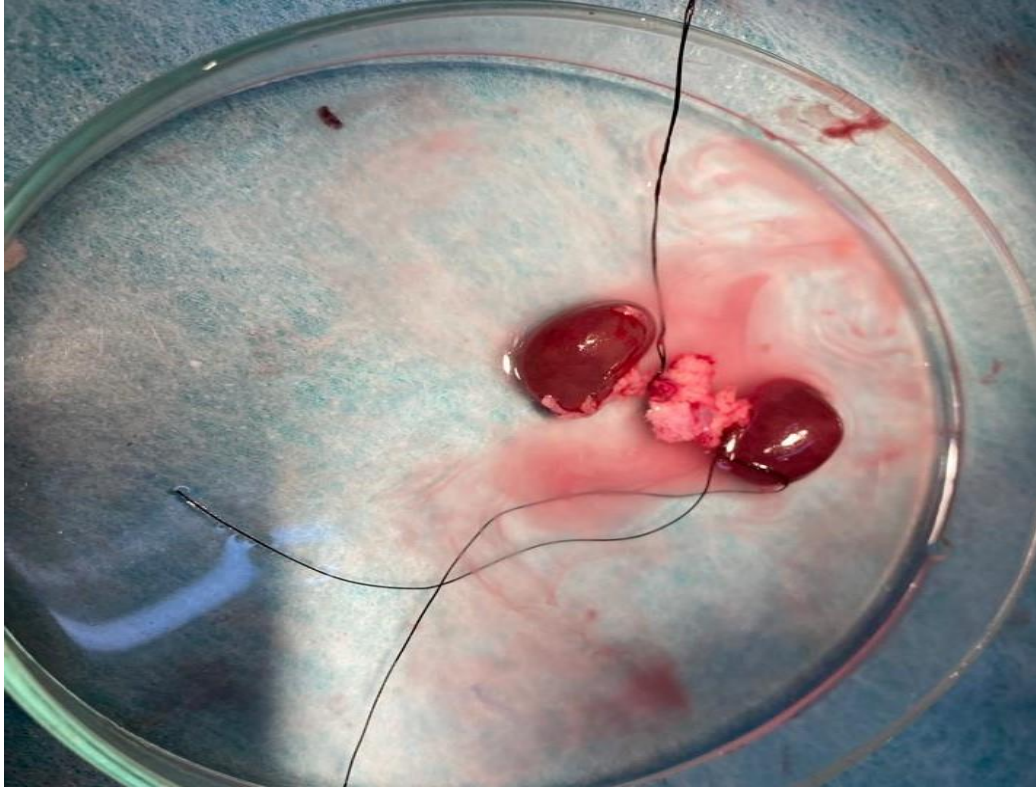
4.1.5. Deney gruplarının dizaynı

Erkek Sprague Dawley sıçanlarını kullanarak yürütülen bu deneysel çalışma, altı ayrı grupta (n=8) yapıldı.

- 1. Kontrol Grubu:** Üç gün boyunca 1 ml serum fizyolojik solüsyonu intraperitoneal (IP) olarak her gün uygulandı ve 4. günün sonunda hayvan sakrifiye edildi.
- 2. Kolistin Grubu:** Üç gün boyunca serum fizyolojik ile çözdürülen Kolistin solüsyonu günde 10 mg/kg tek doz IP olarak uygulandı ve 4. günün sonunda hayvan sakrifiye edildi.
- 3. Kolistin + Dabrafenib Grubu:** Üç gün boyunca serum fizyolojik ile çözdürülen Kolistin solüsyonu günde 10 mg/kg tek doz IP olarak uygulandı, ilave olarak her gün %80 DMSO ile çözdürülen dabrafenib 10 mg/kg dozunda IP olarak uygulandı ve 4. günün sonunda hayvan sakrifiye edildi.
- 4. Kolistin + Nekrostatin Grubu:** Üç gün boyunca serum fizyolojik ile çözdürülen Kolistin solüsyonu günde 10 mg/kg tek doz IP olarak uygulandı, ilave olarak her gün %2 DMSO ile çözdürülen Nekrostatin-1 1,65 mg/kg dozunda IP olarak uygulandı ve 4. günün sonunda hayvan sakrifiye edildi.
- 5. Dabrafenib Grubu:** %80 DMSO ile çözdürülen dabrafenib 10 mg/kg dozunda IP. olarak her gün uygulandı ve 4. günün sonunda hayvan sakrifiye edildi.
- 6. Nekrostatin Grubu:** %2 DMSO ile çözdürülen Nekrostatin-1, 65 mg/kg dozunda IP. olarak her gün uygulandı ve 4. günün sonunda hayvan sakrifiye edildi.

4.2. Yöntem

Bu çalışmada, tüm gruptaki ratlara yedi gün sonunda anestezi uygulandı. Cerrahi işlemler sırasında oluşabilecek koagülasyonu önlemek amacıyla ratlar heparinize edildi. Laparotomi işlemiyle ratların sağ böbrekleri açıldı ve mekanik bir hasar oluşturulmadan böbrekler izole edildi. Bu süreçte hayvanların sağlığı ve refahı üzerine özellikle dikkat edildi. Bu prosedür, hem deneyin geçerliliğini sağlamak hem de hayvanların acısını en aza indirmek için uygulandı (**Resim 1**). Sol böbrekler daha önce hazırlanan fizyolojik sıvı (Krebs Henseleit solüsyonu) verilip in vitro olarak Langendorff sistemine takıldı (**Resim 2 ve Resim 3**) ve peristaltik pompa yardımı ile (% 95 O₂ ve %5 CO₂ karışım ile havalandırılan) Krebs solüsyonu ile ayarlanan belli akım hızında perfüze edildi. Böylece hem kontrol hem de diğer ilaç gruplarında böbrek fizyolojisi karşılaştırılarak ilaçların böbrek hemodinamiği üzerindeki etkileri direkt olarak gözlemlendi. Yapılan bu farmakolojik deneye ilave olarak diğer böbrekte oluşan etkiler; histolojik olarak ve kardiyak kanda üre ve kreatinin seviyeleri ölçülerek değerlendirildi.

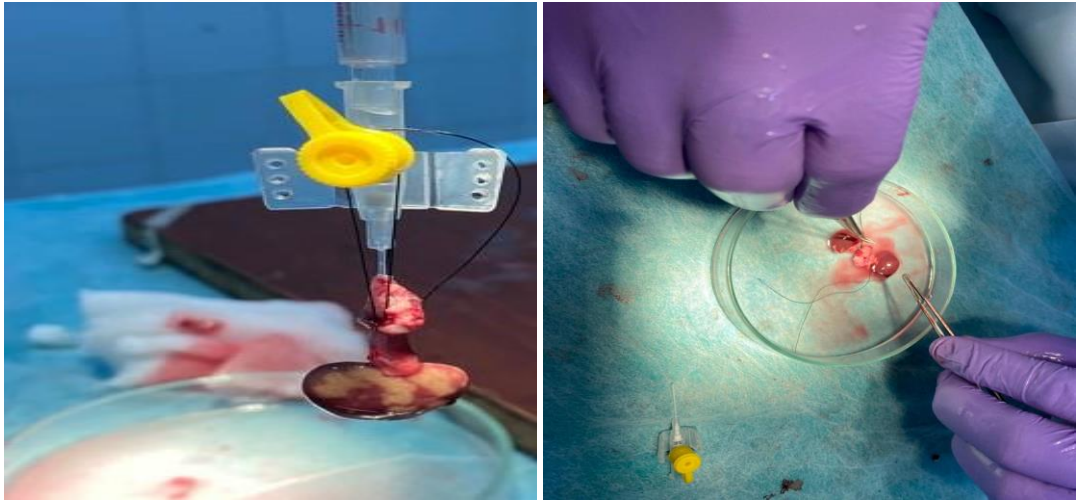


Resim 1. Sağ ve sol böbrek izolasyonu

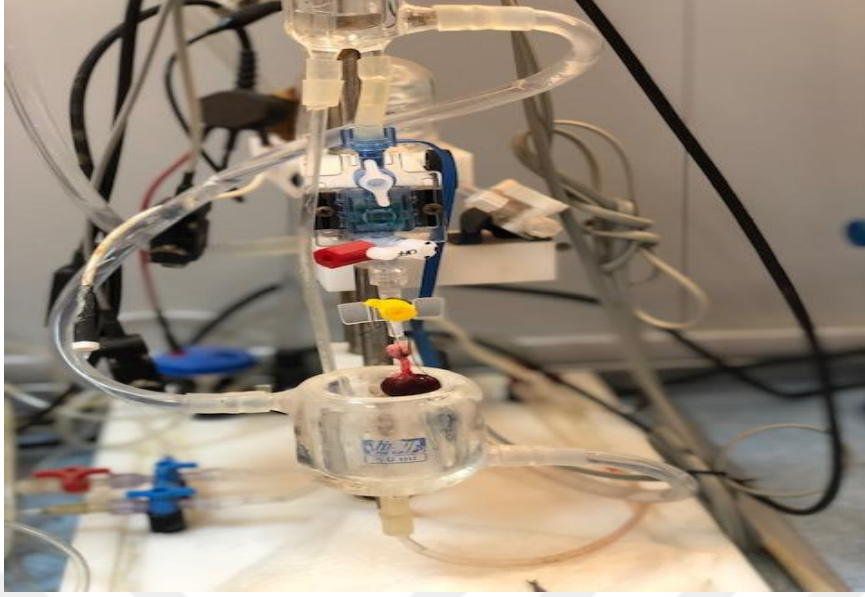
4.2.1. Farmakolojik incelemeler

Bu çalışmada, bütün rat gruplarına ilaç enjeksiyonlarından yedi gün sonra anestezi uygulandı. Bu işlem, 100 mg/kg ketamin ve 15 mg/kg ksilazin (IM) kombinasyonu ile gerçekleştirildi. Cerrahi prosedürler sırasında potansiyel olarak ortaya çıkabilecek bir koagülasyonu engellemek amacı ile ratlara 500 IU/kg heparin subkutan (s.c.) uygulandı. Daha sonra, ratların abdomen bölgesi açıldı ve karın ön duvarı geçilerek sol böbreğe ulaşıldı. Abdominal aort ve diğer damarlar kesilerek mekanik hasar oluşturmada böbrek izole edildi. Bunu takiben, izole edilen böbrekler buzlu Krebs solüsyonuna konuldu ve renal arterden kısa bir kanül ile kanüle edildi.

Böbrekler, Langendorff sistemi kullanılarak asıldı. Sabit bir sıcaklık olan 37 °C'de ısıtılan Krebs Henseleit solüsyonu, peristaltik pompa yardımıyla 11 ml/dakika akış hızında perfüze edildi. Renal basınç değişiklikleri, infüzyon kanülüne bağlı bir basınç transdüseri ve MP30 yazılım sistemi (Biopac systems) ile kaydedildi. Gruplar arasında perfüzyon basınçlarındaki değişiklikler karşılaştırıldı. Son olarak, her grupta böbrekler histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için ayrıldı.



Resim 2. Böbreğin kanülizasyonu



Resim 3. Langendorff düzeneğine asılmış rat böbreği

4.2.2. Biyokimyasal incelemeler

Anestezinin ardından, her bir denekten intrakardiyak yöntem ile 4 mililitre kan örneği alındı. Bu örnekler, plazmanın ayrıştırılabilmesi için 10 dakika süresince 4000 devir/dakika hızında santrifüj işlemine tabi tutuldu. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri'ne bağlı olan Merkez Biyokimya Laboratuvarında, alınan bu tüm örneklerin üre ve kreatinin konsantrasyonları ölçüldü.

Her bir grupta, böbrek dokusundan izole edilen örnekler üzerinde MDA düzeyleri belirlendi. Lipid peroksidasyonunun belirteci olan MDA'nın tespiti, TBA metodolojisi ile gerçekleştirildi. İlgili sonuçlar, doku bazında nmol/gram biriminde tanımlandı. MDA düzeylerinin ölçümü için kullanılan böbrek doku örnekleri, -80 °C derecede saklandı ve her bir denek için TCA ile buz sıcaklığında işlem gördü ve sonrasında homojenize edildi. Bu homojenizasyon süreci, 1 gram doku başına 1 mililitre %10'luk TCA ve ek olarak 8 mililitre %5'lük TCA kullanılarak, Ultra Turrax Homojenizatör cihazı ile gerçekleştirildi. Santrifüj işlemi, 1300 devir/dakika hızında 20 dakika süresince gerçekleştirildikten sonra, elde edilen süpernatant ile eş miktarda %0,67 TBA karıştırıldı ve bu karışım, 10 dakika boyunca 100°C'de ısıtıldı. Absorbsiyon spektrumu 480-600 nm aralığında kaydedildi. MDA ölçümü için kullanılan standard, 1,1,3,3-tetraetoksipropan, aynı koşullar altında işleme tabi

tutuldu. Sonuç olarak elde edilen MDA konsantrasyonları, 532 nm dalga boyunda, Jordan ve Scenkman tarafından belirtilen molarite katsayısı ($1,56 \times 10^5$) kullanılarak hesaplandı (110).

4.2.3. Histopatolojik incelemeler

Doku örnekleri, 48 saat süreyle %10'luk formalin solüsyonunda fiks edildi. Standart histolojik doku işleme sürecinin ardından, otomatik doku işleme cihazı (Thermo, Excelsior AS) kullanılarak dokular, parafin döküm cihazı (Thermo, Histostar) yardımıyla parafine gömüldü ve bloklandı. Bu bloklardan, mikrotom cihazı (Leica, RM2245) ile 4-5 mikrometre kalınlığında kesitler elde edildi. Bu kesitler, deparafinizasyon işlemi sonrası otomatik boyama cihazı (Shandon, Varistain Gemini) kullanılarak Hematoksilen-Eozin (H&E) ile ve otomatik histokimya cihazı (Ventana, Bench Mark special stain) kullanılarak Periodic Acid-Schiff (PAS) ile standart protokollere göre boyandı. Histopatolojik analiz için, hazırlanan örnekler ışık mikroskopu (Nikon, Eclipse 50i) ile incelendi.

Kesitlerin 10'ar dakikalık iki ksilen değişimi ile deparafinizasyon prosedüründen sonra, her biri 5 dakika, toplam 10 dk olmak üzere iki mutlak alkol değişiminde yeniden hidrate edildi. 2 dakika süreyle %95'lik alkol ve 2 dakika süreyle %70'lik alkol uygulanan kesitler distile suda kısa süre yıkandı. Ardından, Harris hematoksilen solüsyonunda 8 dakika boyandı. Akan musluk suyunda 5 dakika yıkandı, kesitler %1 asit alkolde 30 saniye farklılaştırıldı. 30 saniye boyunca %0,2 amonyaklı suda mavileştirildi, akan musluk suyunda 5 dakika yıkandı ve %95 alkolde durulandı. Eozin-floksin solüsyonunda 30 saniye süreyle boyandı ve %95'lik alkolle dehidrate edildi, her biri 5 dakika olmak üzere iki kez saf alkol değiştirildi. Her biri 5 dakika olmak üzere iki ksilen değişiminde temizlendi ve ksilen bazlı montaj ortamı ile monte edildi.

Böbrek hasarı şu şekilde sınıflandırılmıştır:

Evre 0: Değişiklik yok

Evre 1: Tubüler hücrelerin şişmesi, fırça kenarlarının kaybolması, tubüler yapıların üçte birini içeren nükleer kayıp gösteren nükleer yoğunlaşma

Evre 2: Evre 1'e ek olarak, tubüler yapıların üçte ikisine kadar değişen nükleer kayıp

Evre 3: Tubüler yapıların üçte ikisinden fazlasını etkileyen nükleer kaybı içeren değişiklikler

4.2.4. Western-Blotting incelemesi

4.2.4.1 Total protein ekstraksiyonu

Böbrek doku örnekleri, hayvandan alındıktan sonra distile su ile yıkandı, parafilmle sarıldı, işaretlendi ve total protein ekstraksiyonuna kadar -80°C'de muhafaza edildi. Dokuların homojenizasyonu için, öncelikle 1: 100 oranında HALT ve T-PER çözeltilerinden alınarak karıştırıldı. Buz üzerinde, -80°C'de saklanan böbrek dokularından 250-300 mg alındı ve üzerine hazırlanan T-PER ve HALT karışımından 1,5 ml eklendi. Daha sonra ultrasonik homojenizatör yardımıyla dokular homojenize edildi. Çıkarılan numuneler derhal buz üzerine yerleştirildi ve oluşan köpüklerin gitmesi amacıyla 15 dk beklendi. Elde edilen supernant çözeltileri yeni ependroflara aktarıldı ve daha sonrasında ise alikuatlanarak -80°C'de saklandı.

4.2.4.2 Total protein kuantifikasyonu

Bu işlem süreci için Thermo Pierce 660 nm Assay kiti kullanıldı. Tüm prosedürler kitin talimatlarına uygun olarak eksiksiz bir şekilde uygulandı. Kit içeriğinde bulunan 7 adet farklı konsantrasyona sahip BSA çözeltileri (125 µg/ml, 250 µg/ml, 500 µg/ml, 750 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2000 µg/ml) standart olarak kullanıldı. 2 mg/ml stok BSA (albümin standardı) solüsyonundan 10 ml hazırlandı. Hazırlama işlemi için T-PER ve HALT karışımı seyreltici olarak kullanıldı. Stok çözeltilerden **Tablo 3**'te belirtilen hacimler kullanılarak seri dilüsyon yapıldı ve standartlar oluşturuldu. Hem numunelerden hem de standartlardan 10 µl alınarak yeni ependroflara konuldu. Sonrasında, kit prosedürüne uygun bir biçimde, hem örnek materyallere hem de standartlara, 1:7,5 oranında Pierce 660 nm protein kuantifikasyon reaktifi ilave edildi. Bu işlem için, her bir numune veya standart için 20 µl Pierce 660 nm reaktif, 150 µl olarak kullanıldı. Reaktif eklemesinin ardından,

örnekler ve standartlar oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda, NanoDrop™ 2000/2000c Spektrofotometre cihazı kullanılarak standartların ve numunelerin 660 nm'deki absorpsiyon değerleri ölçüldü. Bilinen standartların konsantrasyonları kullanılarak numunelerdeki toplam protein miktarı hesaplandı.

Tablo 3. BSA standartlarının hazırlanması için kullanılan şema

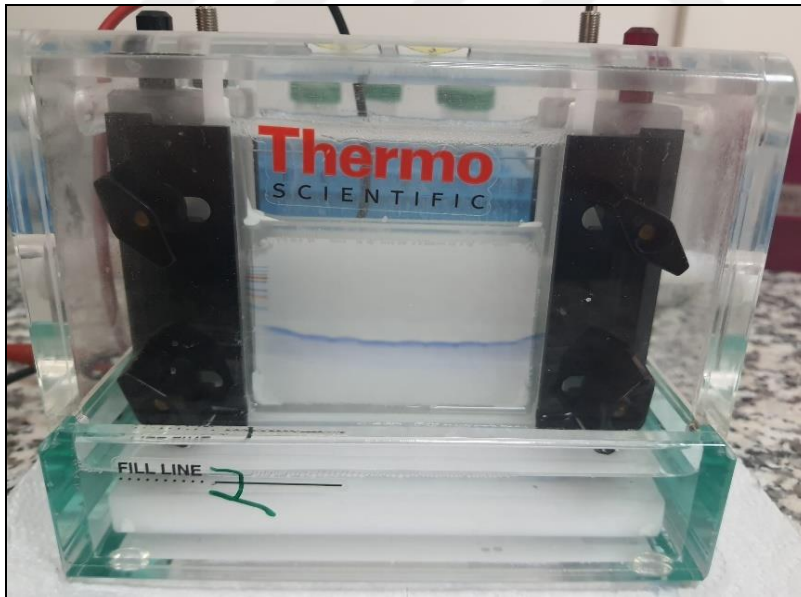
	Çözücü Hacmi	BSA'nın hacmi ve kaynağı	Final BSA konsantrasyonu
A	0 µl	stoktan 300µl	2000µl/ml
B	125µl	stoktan 375µl	1500µl/ml
C	325µl	stoktan 325µl	1000µl/ml
D	175µl	B'den 175µl	750µl/ml
E	325µl	C'den 325µl	500µl/ml
F	325µl	E'den 325µl	250µl/ml
G	325µl	F'den 325µl	125µl/ml
H	400µl	G'den 100µl	25µl/ml
I	400µl	0	0µl/ml

4.2.4.3 SDS-PAGE (Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel) elektroforezi

Bu prosedür için Thermo marka Owl Duo P8DS-1 cihazı kullanıldı (**Resim 4**). Hazırlanan %2'lik agaroz jel, herhangi bir sızıntıyı önlemek için kasetlerin tabanına yüklendi ve polimerize olması için 15 dk beklendi. Bu sırada %10'luk ayırıcı jel çözeltisi için tablodaki kimyasallar sırasıyla eklenerek hazırlandı (**Tablo 4**).

Agaroz jel polimerize olduktan sonra, her kasete 4,13 ml ayırıcı jel karışımı konuldu ve jel yüzeylerinin hava ile doğrudan etkileşimini önlemek için, üzerlerine distile su eklendi. Jellerin iyice polimerize olması için 30 dakika bekletildi. Bu sırada 5 ml %5'luk yoğunlaştırıcı jel çözeltisi için tablodaki kimyasallar sırasıyla eklenerek karıştırıldı. Polimerizasyon işleminden sonra kurutma kâğıdı ile jelin üzerine verilen su uzaklaştırıldı. Her kasete 2,03 ml yoğunlaştırıcı jel, ayırıcı jelin üzerine pipetle eklendi. Bu prosedürün hemen ardından, 10x10 0,8 mm aralıklı on dişli bir tarak, yoğunlaştırıcı jel ve tarak arasında hava kabarcığı oluşmamasına özen gösterilerek

jelin üzerine yerleştirildi. Bu jelin polimerizasyonu için de 30 dakika süre beklendi. Bu sırada yaklaşık 40-50 µg arasında total protein içeren numuneler oda sıcaklığında çözdürüldü. Her bir numuneye, 1:1 oranında sample Laemmli buffer eklendi. Ardından, numuneler kaynar su banyosunda 5 dakika bekletildi. Bu işlemten sonra, numuneler 16000 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüj edilerek hazırlandı ve jel üzerine yüklenecek hale getirildi. Jel tankının iç çemberine uygun miktarda yürütme tamponu (running buffer) eklendi. Taraklar dikkatlice jellerden ayrıldı ve böylece jeller numune yüklenmesine hazır hale geldi. İki ayrı kasete, her birinin ilk kuyucuğuna 5 µl protein ladder eklendi. Geri kalan kuyucuklara ise 20 µl hazırlanan örnekten pipetlendi. Jel tankının dış çemberine yürütme tamponu eklendi. Elektroforez cihazının kapağı kapatılmadan önce anot ve katot uçlarının doğruluğu kontrol edildi. Birinci jel için 90 dk sabit 90 volt akımla ve ikinci jel için 40 dk sabit 110 volt akımla uygulanarak proteinlerin ayrışması işlemi gerçekleştirildi (**Resim 5 ve Resim 6**).



Resim 4. SDS-PAGE jel elektroforez sistemi

Tablo 4. Ayırıcı jelin içeriği (%10'luk)

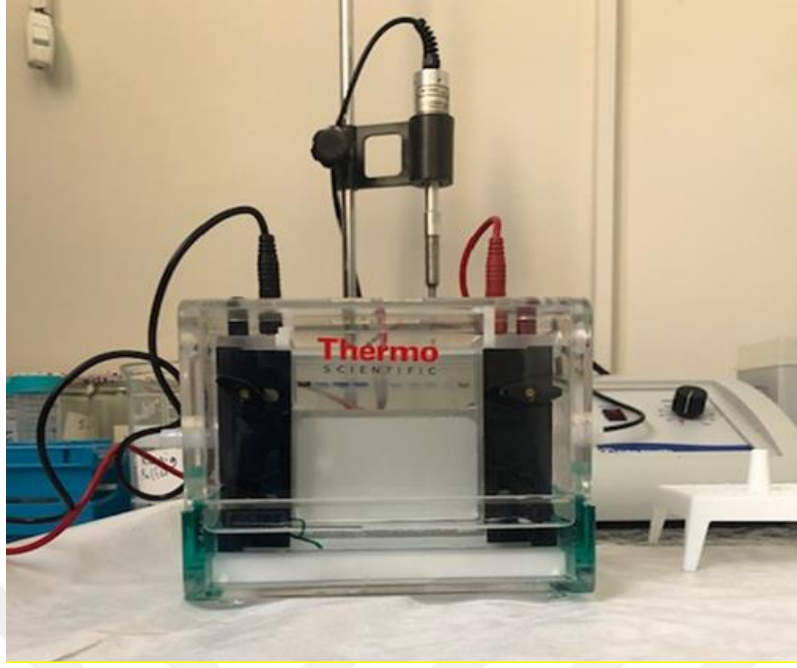
Ultrapür su	3,8 ml
Akrilamid: Bisakrilamid	3,4 ml
%10 SDS	0,1 ml
%10 APS	0,1 ml
1,5 M Tris HCl pH=8,8	2,6 ml
TEMED	0,01 ml

Tablo 5. Yoğunlaştırıcı jelin içeriği (%5'lik)

Ultrapür su	2,975 ml
Akrilamid: Bisakrilamid	0,67 ml
%10 SDS	0,05 ml
%10 APS	0,05 ml
1,5 M Tris HCl pH=8,8	1,25 ml
TEMED	0,005 ml



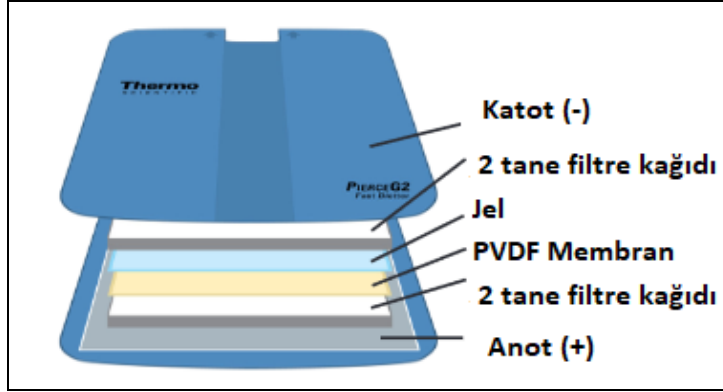
Resim 5. Elektroforez düzeneğine numunelerin yüklenmesi



Resim 6. Proteinlerin sabit akımla ayrıştırılması

4.2.4.4 Elektroblotlama işlemi

Bu işlem için Thermo G2 Fastblotter elektroblotlama sistemi kullanıldı ve her aşama bu cihazın manueline göre gerçekleştirildi (**Resim 7**). Öncelikle 7x8,5 cm boyutlarındaki 2 adet PVDF (Poliviniliden Florür) membranı metanol ile ıslatıldı. Daha sonra PVDF membranlar ve 8 adet filtre kâğıdının üzerine Thermo 1. Step Transfer buffer eklendi ve 5 dakika inkübe edildi. Bu sırada çalışması biten dikey elektroforez işleminden elde edilen kasetler sistemden dikkatlice çıkartıldı. Kaset camları dikkatlice ayrıldı ve jel membran aktarım bölümüne uygun hale getirildi. Fast blotter sisteminin kasetine, her jel için sırasıyla 2 adet filtre kâğıdı, PVDF membran, jel ve en son 2 filtre kağıdı sırasıyla üst üste yerleştirildi (**Resim 7**). Bu işlem sırasında hava kabarcığı oluşmaması için roller kullanıldı. Son olarak, kasetin alt kapağı (anot) ve üst kapağı (katot) kontrol edildikten sonra dikkatlice kapatılarak cihaza yerleştirildi. Fast blotter cihazında 7 dakika boyunca proteinlerin jelden membrana transferi gerçekleştirildi. Sürenin sonunda akım kesilerek membran çıkarıldı ve PVDF membranlar dikkatlice cam kaplara alındı. Aktarım işlemi sonucunda, önceden boyanmış Low Range Marker'ın membranda görülmesiyle transferin başarılı bir şekilde gerçekleştiği kanıtlandı.



Resim 7. Elektrobloklama sistemi

4.2.4.5 Bloklama işlemi

İlk olarak, membranlar, oda sıcaklığında, TBST tampon solüsyonunda 5 dakika süreyle bir çalkalayıcı cihazda yıkandılar. Ardından, 10 ml'lik bloklama tamponu kullanılarak bir saat boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcı cihaz üzerinde inkübasyona tabi tutuldular. Bloklama aşamasının ardından, üç kez 5 dakika boyunca çalkalayıcı üzerinde TBST tamponu ile yıkandı.

4.2.4.6 Antikorların inkübasyonu

Literatür taraması ve üretici firmanın önerileri doğrultusunda seyreltilen birincil antikorlar, her membran için **Tablo 6**'da belirtilen oranlarda 10 ml bloklama çözeltisi ile seyreltildi ve hazırlanan karışım membranların üzerine eklendi. +4⁰ C'de 20 saat boyunca çalkalayıcı üzerinde birincil antikorların membranlarda inkübasyonu gerçekleştirildi.

Ertesi gün membranlar 5 ml TBST çözeltisi ile oda sıcaklığında üçer kez 5 dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandıktan sonra, 1:10000 oranında 10 ml bloklama çözeltisi ile seyreltilen sekonder antikor çözeltisi ile oda sıcaklığında çalkalayıcı üzerinde 1 saat inkübe edildi. Son olarak, tekrar TBST tamponu ile oda sıcaklığında 3 defa beşer dakika çalkalayıcı üzerinde yıkandı.

Tablo 6. Antikorlar ve seyreltme oranları

Antikor	Seyreltme oranı
Actb (abcam #ab8227)	1.1000
RIP1 (abcam #ab106393)	1.1000
RIP3 (abcam #ab62344)	1.1000
CaMKII (invitrogen #PA5-22168)	1: 3000
CypD (invitrogen #PA3-022)	1.1000
Sekonder Antikor (abcam #6721)	1: 10000

4.2.4.7 Kemilüminesans görüntüleme

Bu yöntemin temel prensibi, kullanılan görüntüleme kitinde bulunan luminolün, sekonder antikorların ucuna yerleştirilmiş olan Horse Radish Peroxidase enzimi ile kimyasal tepkimeye girmesi ve oluşan 3-aminoftalatın ışımasının 428 nanometre dalga boyunda CCD kamera ile ölçülmesi esasına dayanır. Bu çalışmada Thermo ECL kit kullanıldı ve tüm işlemler kit prosedürüne göre gerçekleştirildi. Her bir membran için toplamda 7,5 ml ECL solüsyonu hazırlandı ve membranların üzerine eklendi. Ardından, oda sıcaklığında 5 dakika boyunca inkübe edildi. Bant görüntüleri Thermo Fisher CL 1000 iBright Western blotting görüntüleme sistemi kullanılarak elde edildi. Elde edilen görüntülerdeki protein bant yoğunlukları, IMAGE-J (National Institute of Health, Bethesda, ABD) Analysis Software programında analiz edildi. β -Aktin housekeeping proteinine göre veriler normalize edildi.

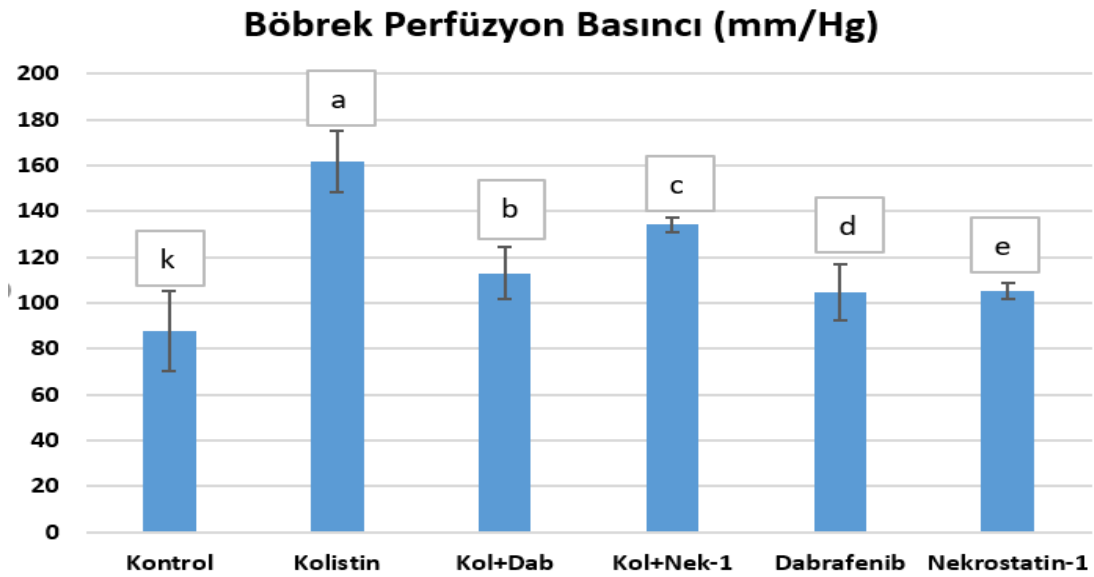
4.3. İstatistiksel analizler

Elde edilen veriler ortanca ve çeyreklerle ifade edildi. İstatistiksel analizler R programı kullanılarak yapıldı. Gruplar arasındaki farkı değerlendirmek için Kruskal-Wallis testi uygulandı. Kruskal-Wallis testinde p değeri <0.05 saptandığında, anlamlılığın hangi ikili gruplar arasından kaynaklandığını bulmak için post-hoc Dunn testi uygulandı. Tüm istatistiksel analizlerde, anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

5. BULGULAR

5.1. Farmakolojik bulgular

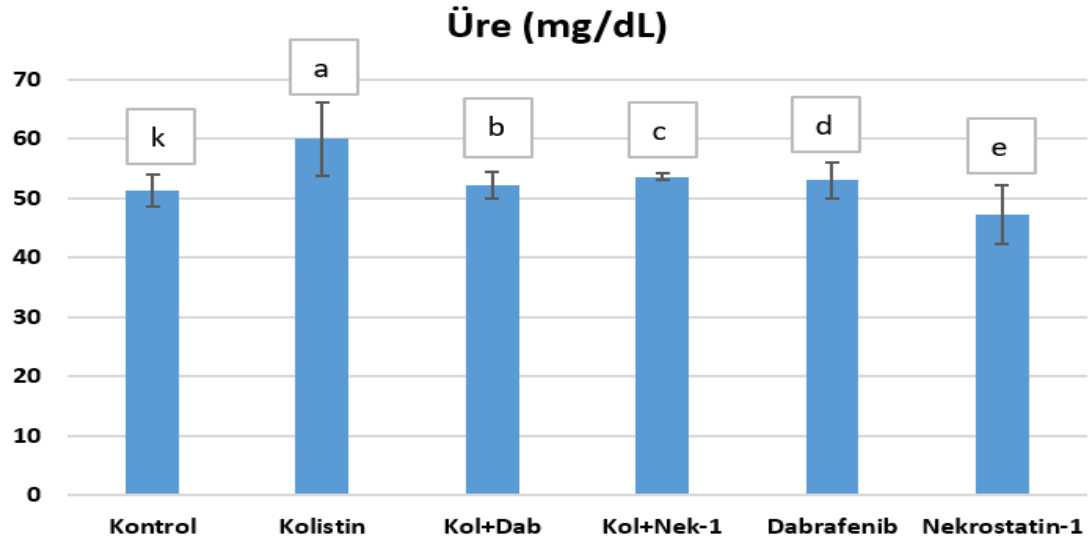
Langendorff sistemi ile perfüze edilen böbreklerde elde edilen böbrek perfüzyon basınç değerleri **Şekil 2**'de gösterilmiştir. Kolistin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ($p<0.05$), kolistin+dabrafenib ve kolistin+nekrostatin gruplarında ise kolistin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0.05$). kolistin+dabrafenib ve kolistin+nekrostatin grupları kendi aralarında kıyaslandığında, kolistin+dabrafenib grubunda böbrek perfüzyon basıncının kolistin+nekrostatin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha çok azaldığı görüldü ($p<0.05$). Tek başına dabrafenib ya da nekrostatin verilen gruplarda ise kontrol grubuna göre her iki parametrede de anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$).



Şekil 2. Bütün gruplarda perfüzyon basınç değişimleri (mm/Hg) (n=8) (k-a $p<0,05$, a-b $p<0,05$, a-c $p<0,05$, b-c $p<0,05$, k-d $p>0,05$, k-e $p>0,05$)

5.2. Biyokimyasal bulgular

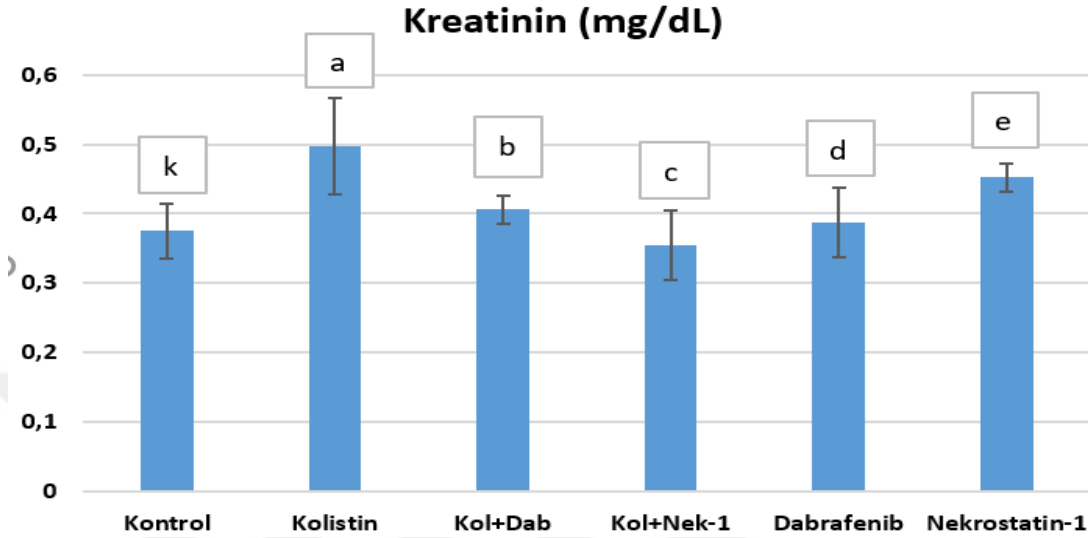
Serum üre düzeylerinde kolistin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ($p<0.05$), kolistin+dabrafenib grubunda ise kolistin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma olduğu görüldü ($p<0.05$). Kolistin+nekrostatin grubunu kolistin grubu ile kıyaslayınca bir azalmanın olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Kolistin grubunda artan üre düzeyinin kolistin+nekrostatin grubunda kolistin+dabrafenib grubuna göre daha fazla azaldığı, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$). Tek başına dabrafenib ya da nekrostatin verilen gruplarda ise kontrol grubuna göre her iki parametrede de anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Şekil 3).



Şekil 3. Bütün gruplarda üre düzeyi değişimi (mg/dL) (n=8) (k-a $p<0.05$, a-b $p<0.05$, a-c $p>0.05$, b-c $p>0.05$, k-d $p>0.05$, k-e $p>0.05$)

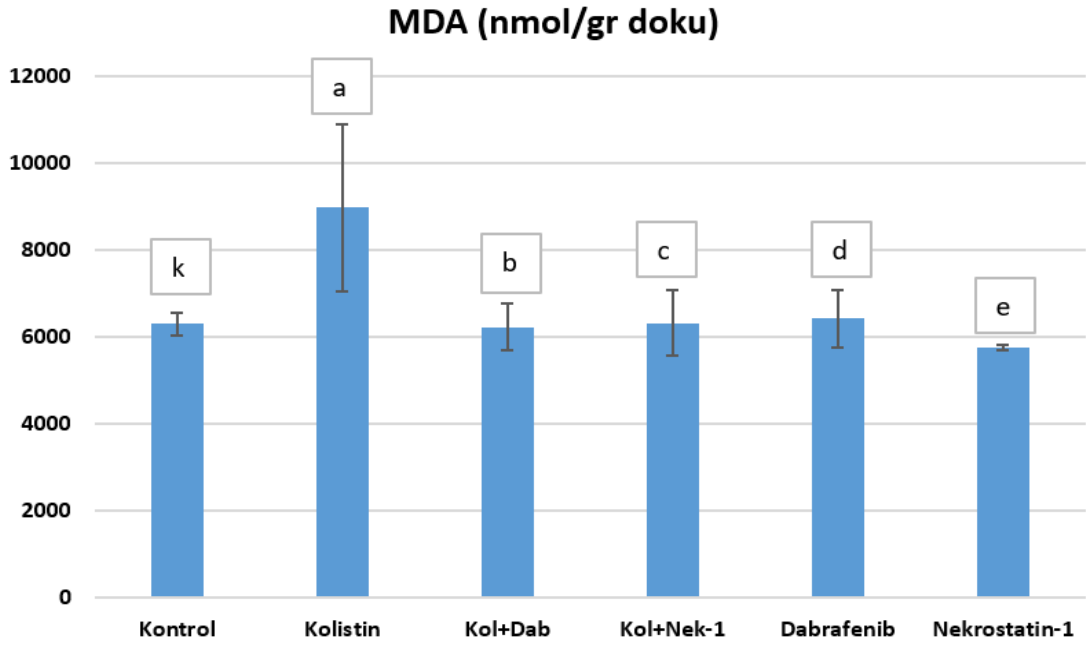
Serum kreatinin düzeyinde kolistin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış olduğu ($p<0.05$), kolistin+dabrafenib grubunda ise kolistin grubuna göre azalma görülürken bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı saptandı ($p>0.05$). kolistin+nekrostatin grubunu kolistin grubu ile kıyaslayınca istatistiksel olarak anlamlı bir azalmanın olduğu görüldü ($p>0.05$). Kolistin grubunda artan üre düzeyinin kolistin+nekrostatin grubunda kolistin+dabrafenib grubuna göre daha fazla azaldığı, ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü ($p>0.05$).

Tek başına dabrafenib ya da nekrostatin verilen gruplarda ise kontrol grubuna göre her iki parametrede de anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Şekil 4).



Şekil 4. Bütün gruplarda kreatinin düzeyi değişimi (mg/dL) (n=8) (k-a $p<0.05$, a-b $p<0.05$, a-c $p>0.05$, b-c $p>0.05$, k-d $p>0.05$, k-e $p>0.05$)

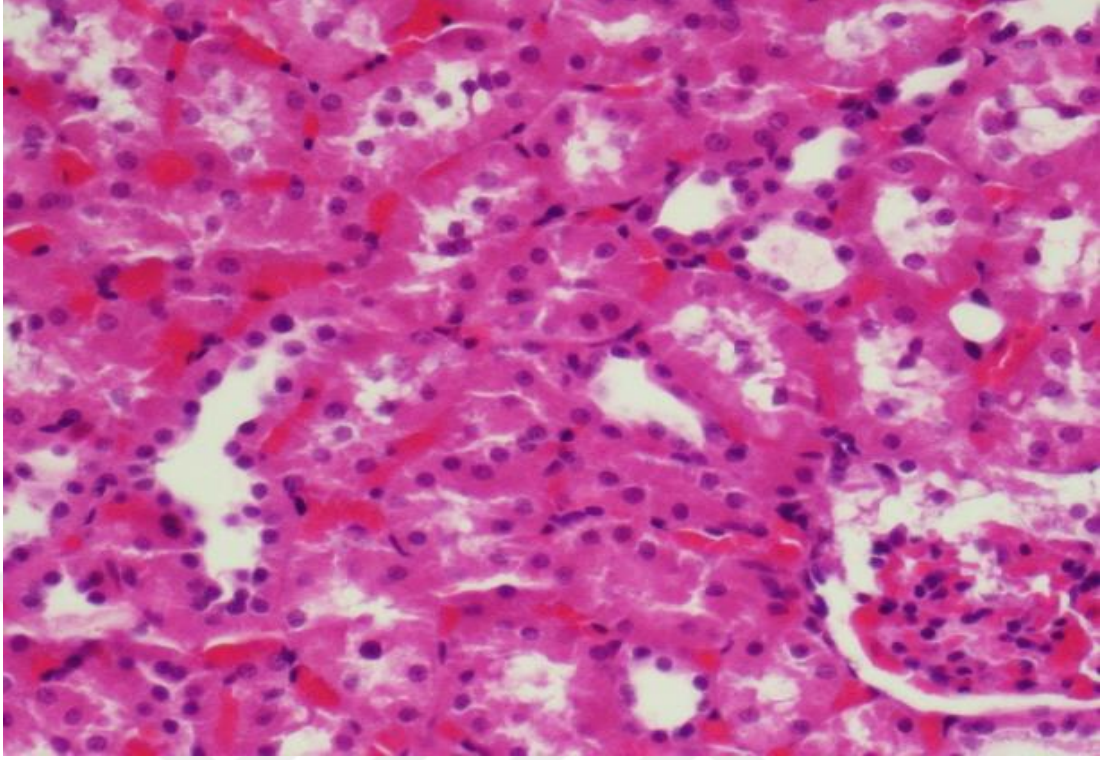
Lipid peroksidasyonun son ürünü olan ve böbrek dokularında ölçülen MDA sonuçları incelendiğinde ise; doku MDA düzeylerinin kolistin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttığı ($p<0.05$), kolistin+dabrafenib ve kolistin+nekrostatin gruplarında ise kolistin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde azaldığı görüldü ($p<0.05$). Kolistin grubuna göre dabrafenib ve nekrostatin uygulaması ile azalan bu MDA düzeyleri kıyaslandığında, kolistin+dabrafenib grubunda kolistin+nekrostatin grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha çok azaldığı görüldü ($p<0.05$). Tek başına dabrafenib ya da nekrostatin verilen gruplarda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0.05$) (Şekil 5).



Şekil 5. Bütün gruplarda MDA düzeyi değişimi (mg/dL) (n=8) (k-a $p<0,05$, a-b $p<0,05$, a-c $p>0,05$, b-c $p>0,05$, k-d $p>0,05$, k-e $p>0,05$)

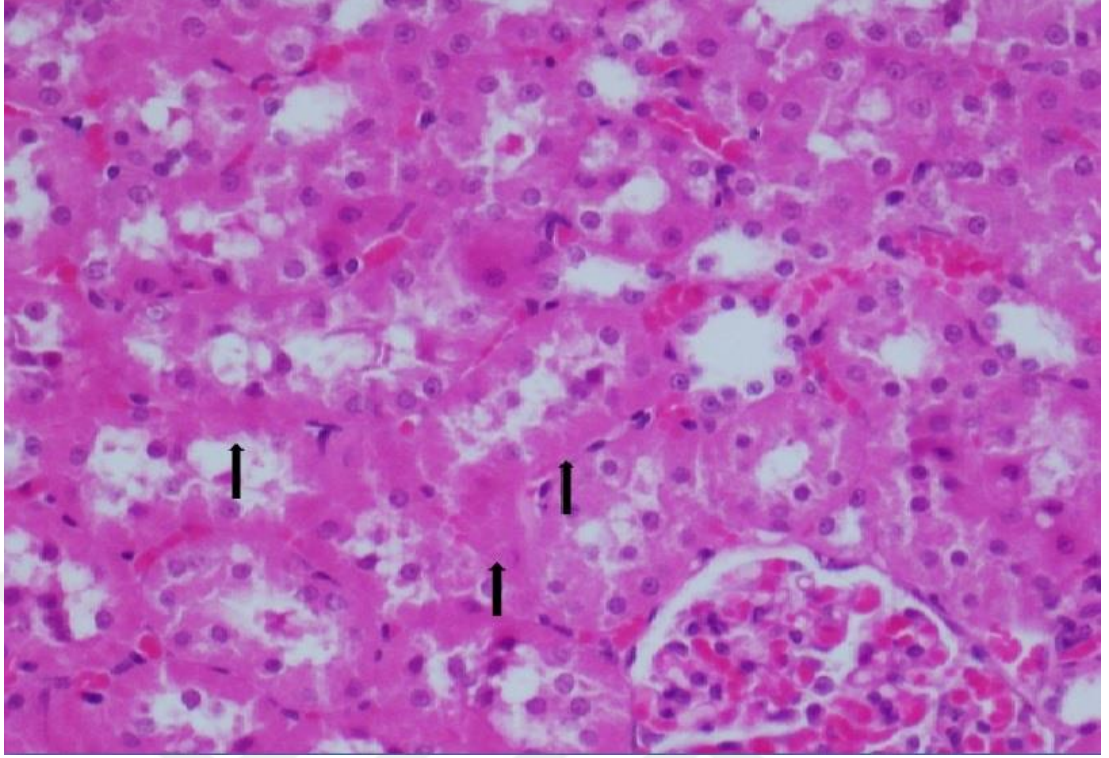
5.3. Histopatolojik bulgular

Kontrol grubuna ait yapılan incelemede, normal histolojik yapılar gözlemlendi. Glomerül yapısı, proksimal ve distal tubüllerin histolojik açıdan normal ve fırçamsı kenar yapıları korunmuş olan grade 0 yapısına sahip böbrek dokusu görüldü (**Resim 8**).



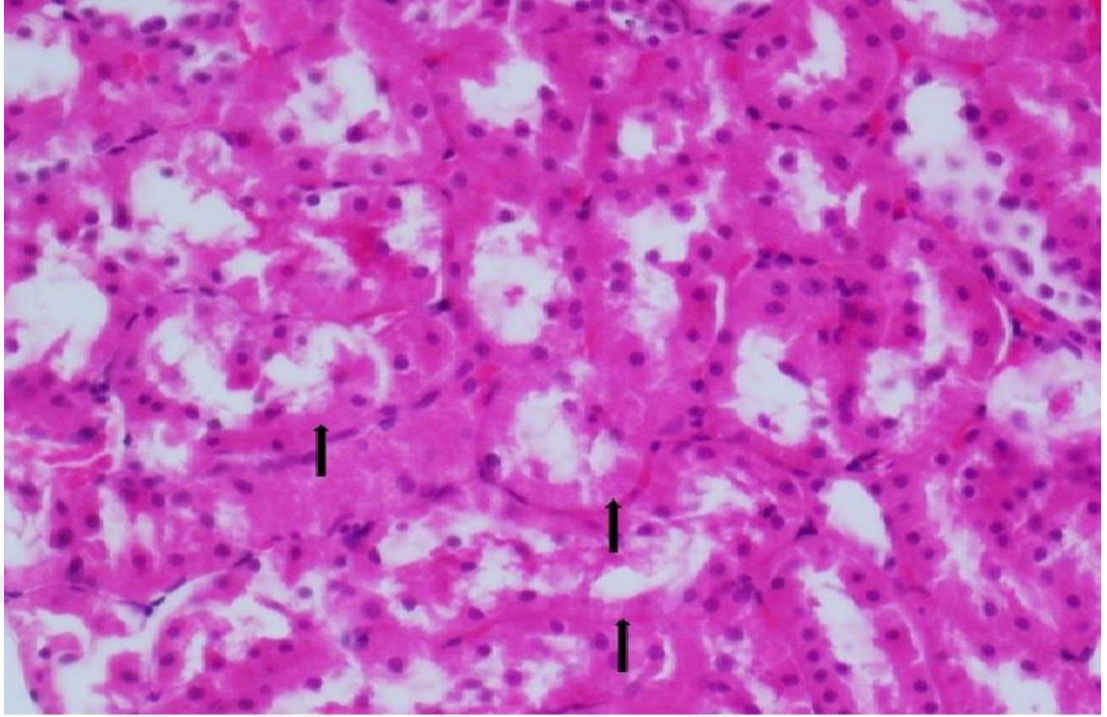
Resim 8. Kontrol grubu. Korunmuş fırçasmsı kenar içeren böbrek (H&E, 400X)

Kolistin gurubunda yapılan incelemede böbrekte bütünlüğünün bozulduğu görüldü. Tubül epitellerinde fırçasmsı kenar kaybı ve yer yer kalınlaşma, tubül epitel hücresi nükleuslarında belirgin rejeneratif değişiklikler, hücresel şişme ve çok sayıda nükleus kaybı ile karakterize prenekrotik değişikliklere sahip grade 2 böbrek yapısı izlendi (**Resim 9**).

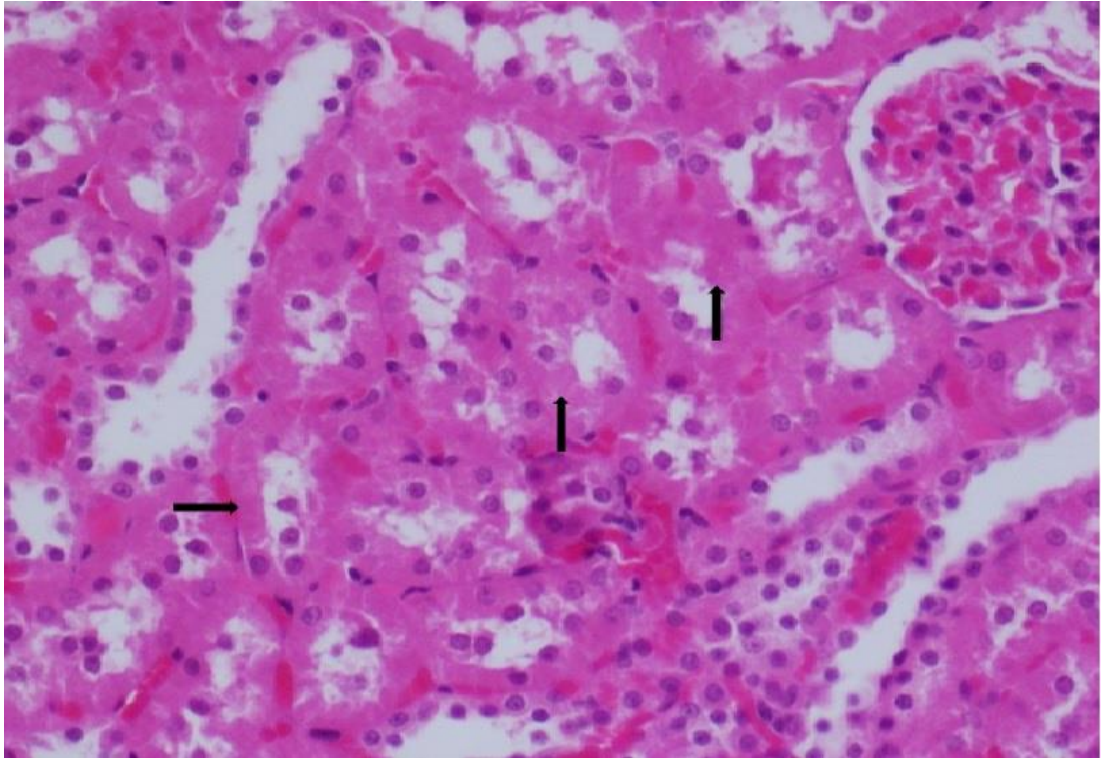


Resim 9. Kolistin grubu. Çok sayıda nükleus kaybı (oklar) içeren böbrek (H&E, 400X)

Kolistin+dabrafenib ile kolistin+nekrostatin gruplarında yapılan incelemelerde, her iki grupta da kolistine bağlı olarak bozulan bütünlüğün dabrafenib ve nekrostatin uygulamaları ile korunduğu görüldü. Gruplarda, hafif eozinofilik dejenerasyon, tubül epitellerinde hafif hidropik dejenerasyon ve hafif tubüler dilatasyon ve kolistin grubuna göre tubüllerde azalan fırçamsı kenar kaybı, azalan miktarda nükleus kaybı, korunan epitelyum hücreleri ve tubüler organizasyon bulunan grade 1 değişiklikler içeren böbrek dokusu izlendi (**Resim 10 ve 11**).

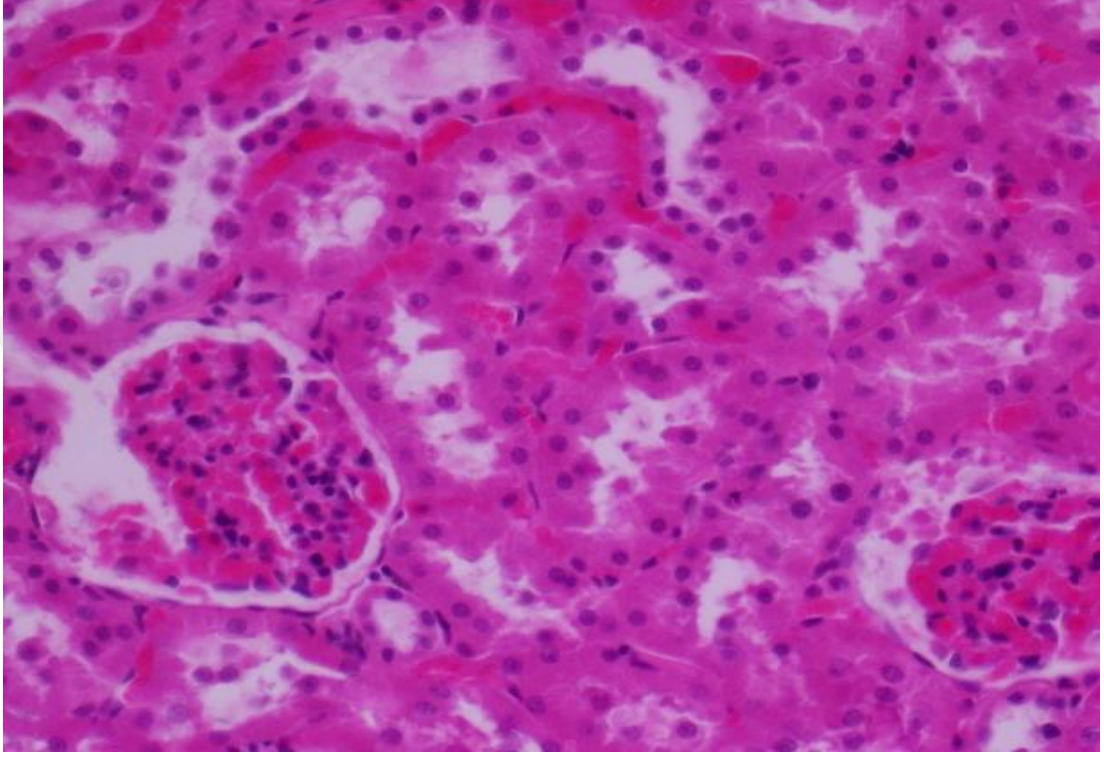


Resim 10. Kolistin+nekrostatin grubu. Hafif tubüler dilatasyon ve az sayıda nükleus kaybı (oklar) içeren böbrek (H&E, 400X)

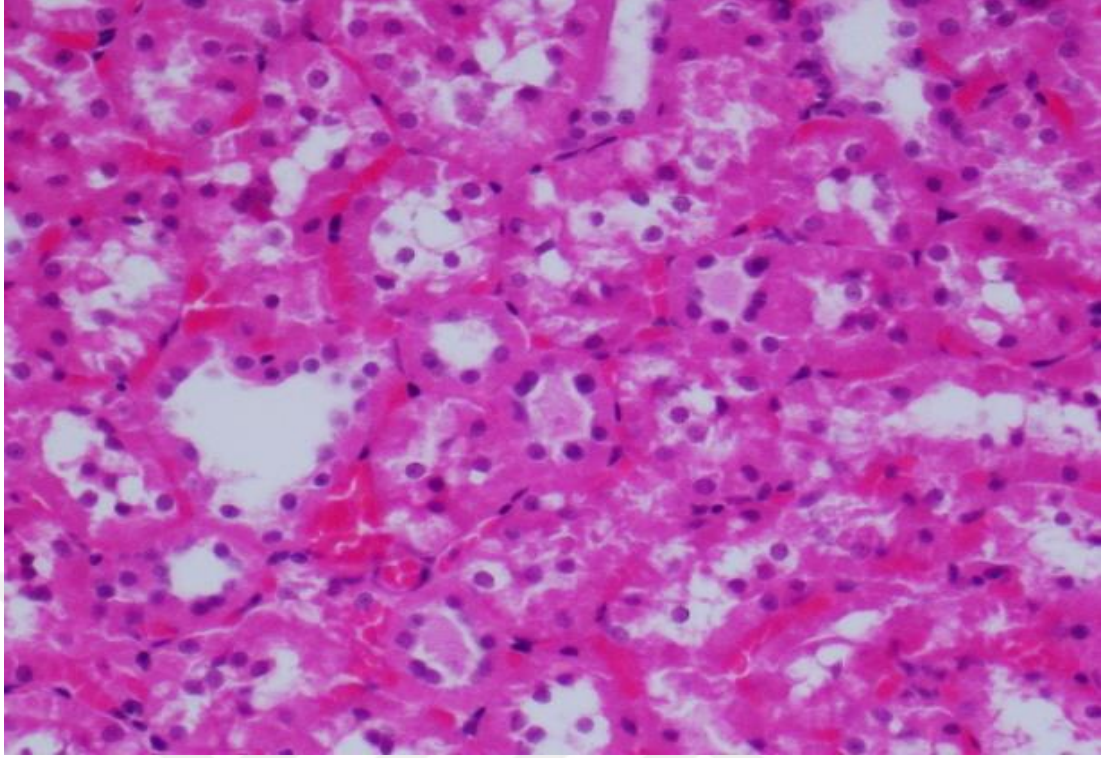


Resim 11. Kolistin+dabrafenib grubu. Hafif tubüler dilatasyon ve az sayıda nükleus kaybı (oklar) içeren böbrek (H&E, 400X)

Dabrafenib ve nekrostatin gruplarında yapılan incelemelerde ise, glomerüler yapının, tubüler formasyonun ve tubüler epitel hücrelerinin korunduğu, bu ajanların böbrek dokusunda herhangi bir değişiklik yapmadığı gözlemlendi (**Resim 12 ve 13**).



Resim 12. Nekrostatin grubu. Grade 0 ile karakterize korunmuş böbrek dokusu (H&E, 400X)

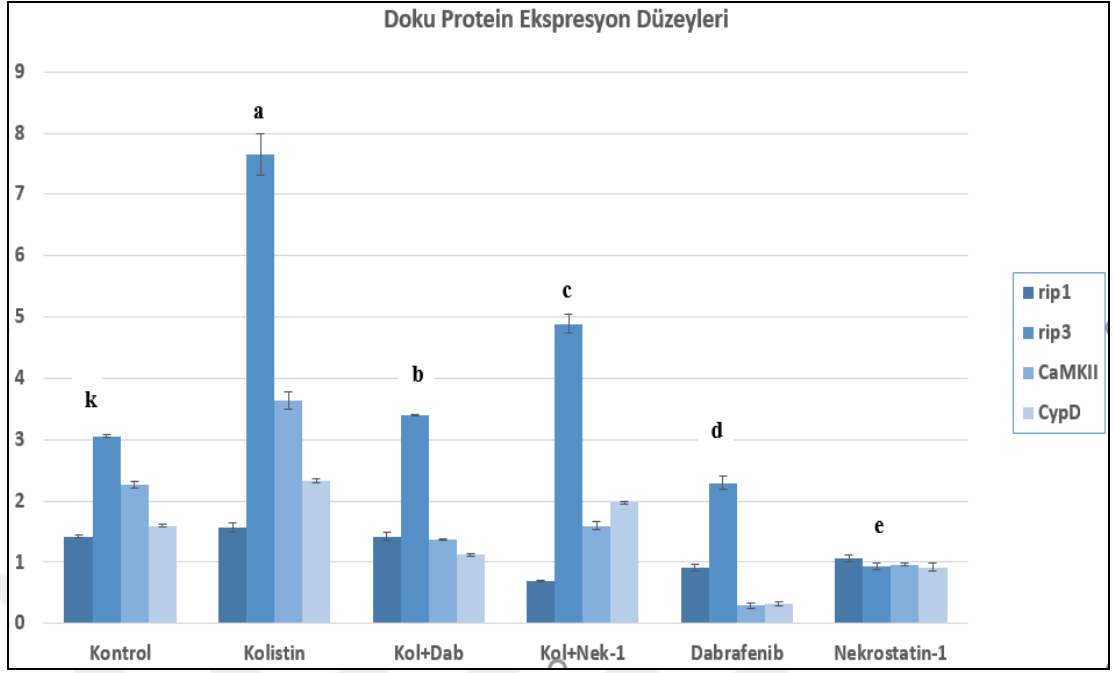


Resim 13. Dabrafenib grubu. Grade 0 ile karakterize korunmuş böbrek dokusu (H&E, 400X)

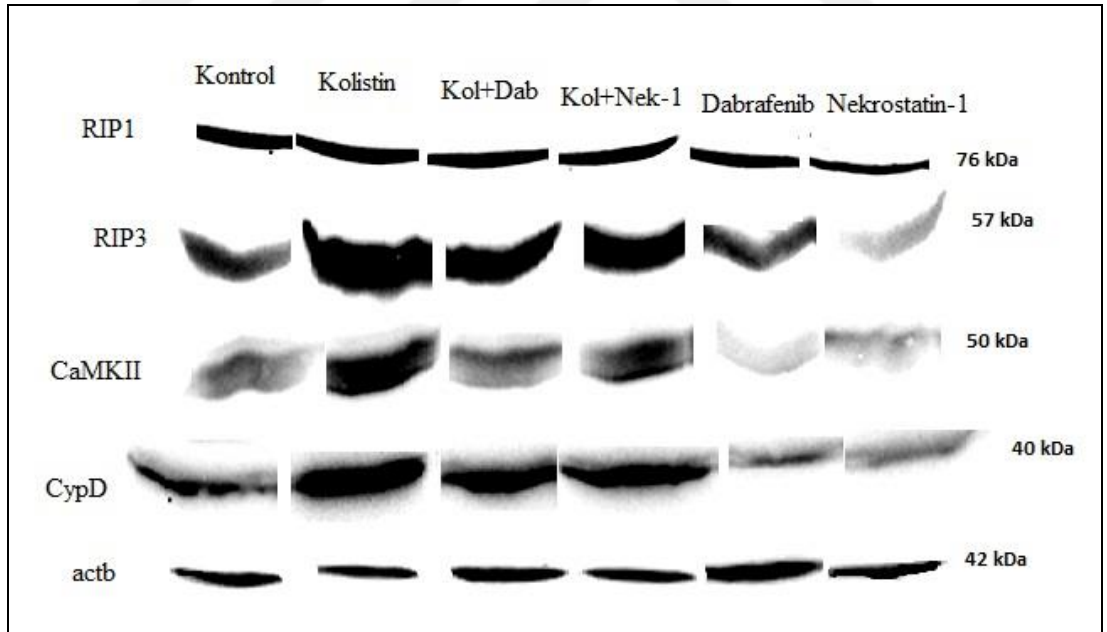
5.4. Western Blotting Bulguları

Kolistin grubunda kontrol grubuna göre RIP1, RIP3, CaMKII ve CypD proteinlerinin ekspresyon düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde arttığı görüldü ($p<0,05$). Kolistin+dabrafenib ve kolistin+nekrostatin gruplarında ise bu proteinlerin ekspresyonunun, kolistin grubuna göre anlamlı olarak azaldığı görüldü ($p<0,05$) (Şekil 6, 7).

Kolistin+dabrafenib ve kolistin+nekrostatin grupları karşılaştırıldığında ise, dabrafenib uygulanmasının incelenen RIP3, CaMKII ve CypD ekspresyon düzeylerini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla azalttığı görüldü ($p<0,05$). Buna karşılık nekrostatin-1'in RIP1 inhibitörü olmasından dolayı nekrostatin-1 uygulamasının RIP1 ekspresyon düzeylerini, kolistin+nekrostatin grubunda beklenildiği üzere anlamlı bir şekilde daha fazla azalttığı görüldü ($p<0,05$). Tek başına dabrafenib ya da nekrostatin-1 verilen gruplarda ise kontrol grubuna göre anlamlı bir farklılık görülmedi ($p>0,05$) (Şekil 6, 7).



Şekil 6. Gruplara göre doku protein ekspresyon düzeyleri (n=8) (k-a $p<0,05$, a-b $p<0,05$, a-c $p<0,05$, b-c $p<0,05$, k-d $p>0,05$, k-e $p>0,05$)



Şekil 7. Bütün gruplarda çalışılan proteinlere ait Western Blot bant görüntüleri

6. TARTIŞMA

Polimiksin E (kolistin); katyonik bir polipeptid yapılı bakterisidal etkisi olan bir antibiyotiktir. Kolistin, Gram-negatif bakterilerin hücre zarındaki lipopolisakkarit ve fosfolipid yapılarına eğilimi olan bir moleküldür. Hücre zarının lipid bileşenlerinde bulunan fosfat gruplarına divalent katyonlarla rekabet ederek hücre zarının bozulmasına ve sonuç olarak intrasellüler bileşenlerin ekstrasellüler ortama akışına neden olur (1-3). 1980'lerin başından itibaren, kolistin kullanımı, yüksek nefrotoksisite insidansı ve alternatif yeni antibiyotik moleküllerinin geliştirilmesiyle birlikte çeşitli ülkelerde azalmıştır. Kolistin ile ilişkili nefrotoksisite riski, ilacın klinik kullanımını önemli ölçüde sınırlayan bir faktör olmuş ve 1970'lerden bu yana çeşitli vaka serilerinde yoğun bir şekilde rapor edilmiştir (4-7). Kritik durumdaki hastaların yönetiminde, özellikle dirençli hastane kaynaklı enfeksiyonların tedavisinde önemli bir rol oynayan kolistin, nefrotoksisite riski nedeniyle ciddi morbidite ve mortaliteye, renal replasman terapilerinin gerekliliğine ve hastane veya yoğun bakım birimindeki kalış sürelerinin uzamasına ve ekonomik yüklerin artmasına sebep olmaktadır (8-9).

Kolistinin nefrotoksik etkilerine karşı değişik koruyucu ajanlar araştırılmıştır. Örneğin 2011 yılında yapılan bir çalışmada Sprague-Dawley türü erkek ratlarda 7 gün boyunca verilen 5 mg/kg melatoninin koruyucu etkinliği araştırılmış ve melatonin verilen grupta kolistin ile oluşan hasarın önemli miktarda gerilediği görülmüştür (10). N-acetylcysteine (NAC) ajanının nefroprotektif etkisinin incelendiği bir başka çalışmada ise, apoptik hücrelerin oranında önemli bir düşüş olduğu görülürken oluşan böbrek hasarının da gerilediği görülmüştür (111). 2018 yılında yapılan başka bir çalışmada ise, Vitamin E ve Vitamin C'nin koruyucu etkisi çalışılmıştır. Bu çalışmada toplamda 100 mg/kg vitamin kombinasyonu verilen grupta, MDA seviyelerinde önemli ölçüde bir düşüş görüşürken, oluşan tübüler nekroz alanında da önemli bir gerileme görülmüştür (112).

Böbrek hastalığının patofizyolojisinde, özellikle tübül epitel hücrelerinin ölümü kritik bir rol oynamaktadır. Son 15 yılda yapılan çalışmalar, regüle edilmiş bir nekroz şekli olan nekroptozun, akut tübüler nekroz, nefron kaybı ve uyarlanmamış

renal fibrojenezis üzerinde merkezi bir patofizyolojik rolü olduğunu göstermiştir. Apoptozdan farklı olarak, immünojenik olmayan bir süreç olan nekroptoz, hücrel içerik ve sitokinlerin salınmasına yol açarak komşu dokuda inflamatuvar bir yanıtı tetikler. Bu nekroinflamatuvar ortam şiddetli organ disfonksiyonuna ve böbrekte kalıcı doku hasarına neden olabilir (99). Kolistin uygulaması ile gelişen nefrotoksik yan etkilerin oluşmasındaki en önemli pay artan ROS seviyeleri ve oksidatif stresdir. Özellikle bu mekanizmalar aracılığı ile böbrekte apoptotik ve nekroptotik süreçlerin indüklendiği gösterilmiştir. Örneğin, 2016 yılında Triasto ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, nekroptoz inhibitörlerinden nekrostatin-1'in koruyucu etkinliği incelenmiştir. Sisplatin ile oluşturulan nefrotoksositeye karşı protektif olarak kullanılan nekrostatin-1'in önemli bir nefroprotektif etkisi olduğu hem in vitro hem de in vivo çalışmalar ile gösterilmiştir. Bu doğrultuda, akut böbrek hasarında nekroptotik yolların önemli bir rolünün olduğu varsayılmaktadır (113).

Nekroptoz, hücre ölümünün programlanmış bir formu olan ve hücre içi içeriklerin ve sitokinlerin salınmasına neden olarak inflamatuvar bir yanıt tetikleyen bir süreçtir. Nekroptotik sinyal yolları ile ilgili birçok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmalarda, TNFR veya Fas ligand aktivasyonu ile indüklenen ve kaspazlardan bağımsız olarak gerçekleşen bir programlanmış nekroz sürecidir. Yapılan çalışmalarda, nekroptozun RIP1-RIP3-MLKL ve RIP3-CaMKII-mPTP olmak üzere iki ayrı sinyal yolağı üzerinden gerçekleştiği belirtilmiştir. RIP1'in fosforilasyonunun RIP1-RIP3-MLKL kompleksinin oluşumunu engellediği, RIP3 ve MLKL'nin fosforlanmasıyla nekrozom kompleksinin oluştuğu gösterilmiştir. Ayrıca, ROS ve oksidatif stresin etkisiyle aktive olan ikinci yolakta, CaMKII'nin RIP3 ile etkileşerek mitokondriyal membran geçirgenliğini artıran mPTP'nin aktive olduğu ve nekrozun başladığı bildirilmiştir (114).

Oluşan nekroptotik hasarın, nekroptoz mekanizmasındaki enzimlerin inhibisyonu ile azaldığını gösteren ve özellikle RIP1 enzim inhibisyonu ile ilgili yapılan pek çok çalışma bulunmaktadır. RIP1 enzim inhibitörü olan nekrostatin-1 molekülünün etkileri kalp, beyin ve omurilik, akciğer, karaciğer ve böbrek gibi birçok dokuda hem in vivo hem in vitro olarak incelenmiş ve koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (115-118). RIP3 enziminin her iki yolakta da bulunduğu ve bu nedenle RIP3 enziminin inhibisyonunun önemli olduğu, özellikle nekroptozun ikinci yolağının

aydınlatılmasıyla ortaya çıkmıştır. 2020 yılında yapılan bir çalışmada, dabrafenib'in renal iskemi reperfüzyon hasarı üzerine koruyucu etkileri incelenmiş olup, bu ajanın böbrek fonksiyonunu iyileştirdiği ve aynı zamanda histolojik hasar, inflamasyon, hücre ölümü ve nekroptoz ile ilişkili proteinlerin ekspresyonunu azalttığı görülmüştür (119).

Yapılan bu çalışmada literatür ile uyumlu şekilde, kolistin grubunda oluşan nekroptoz ile RIP1, RIP3, CaMKII ve CypD proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı görülmüştür (113). Ayrıca çalışmamızda yine literatür ile uyumlu şekilde, kolistin uygulaması ile böbrek fonksiyonlarda bozulma; kontrol grubuna göre anlamlı şekilde artan renal perfüzyon basıncı hızı ile görülmüştür (119). Literatürde hem kolistin uygulanması hem de I/R hasarı ile lipid peroksidasyonunun son ürünü olan MDA düzeylerinin artışı ile nefrotoksisitenin olduğu gözlenmiştir (112). Yapılan bu çalışmada da benzer şekilde MDA seviyelerinin, kolistin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir şekilde arttığı görüldü.

Daha önce yapılan çalışmalarda kolistine bağlı olarak böbrekte bütünlüğün bozulduğu gözlenmiştir (10). Çalışmamızda yaptığımız histopatolojik incelemede de tübül epitellerinde fırçamsı kenar kaybı ve yer yer kalınlaşma, tübül epitel hücresi nükleuslarında belirgin rejeneratif değişiklikler, hücresel şişme ve çok sayıda nükleus kaybı ile karakterize prenekrotik değişikliklere sahip grade 2 böbrek yapısı izlendi.

Dabrafenib'in, karaciğer, beyin ve böbrek dokularında RIP3 inhibisyonu üzerinden nekroptozu karşı koruyucu etkisinin in vivo olarak incelendiği sınırlı sayıda çalışma bulunmaktadır. Örneğin, Li ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, B-Raf inhibitörü dabrafenib'in RIP3 enzimini seçici olarak inhibe edebildiği ve karaciğerde asetaminofene bağlı toksisiteye karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (120). Aynı şekilde, başka bir çalışmada dabrafenib'in iskemik beyin hasarına karşı koruyucu etkisi incelenmiş ve farelerde infarkt lezyon alanını anlamlı şekilde azalttığı gözlenmiştir. Bir diğer çalışmada ise renal iskemi/reperfüzyon hasarı ile ilişkili RIP1, RIP3 ve MLKL proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin dabrafenib uygulanmasıyla anlamlı derecede azaldığı bildirilmiştir (121).

Yaptığımız bu çalışmada da literatür ile uyumlu şekilde, kolistin grubunda oluşan nekroptoz ile artan RIP1, RIP3, CaMKII ve CypD proteinlerinin ekspresyon seviyelerinin dabrafenib ve nekrostatin-1 uygulaması ile anlamlı bir şekilde azaldığı görülmüştür. Dabrafenib ve nekrostatin-1 grupları karşılaştırıldığında ise, dabrafenib uygulanması ile RIP3, CaMKII ve CypD ekspresyon seviyelerinin istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla azaldığı buna karşılık Nekrostatin-1 uygulanması ile RIP1 ekspresyon seviyesinin daha fazla azaldığı gözlenmiştir. Literatür ile uyumlu olarak nekrostatin-1'in RIP1 enzim inhibitörü olması nedeniyle nekrostatin-1 ile RIP1 ekspresyon seviyesindeki azalma dabrafenib'e göre daha fazla olmuştur (17).

Çalışmamızda, lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA seviyelerinin kolistin grubunda anlamlı şekilde arttığı, kolistin+dabrafenib ve kolistin+nekrostatin-1 gruplarında ise anlamlı şekilde azaldığı tespit edilmiştir. İki grup arasında karşılaştırma yapıldığında, nekrostatin-1 uygulamasının MDA seviyelerini daha fazla azalttığı istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. RIP1 ve nekroptoz inhibisyonu ile ilişkili yapılan birçok çalışmada da nekrostatin-1'nin MDA seviyelerini azalttığı bildirilmiştir. Ayrıca, I/R hasarı ile yüksek MDA seviyelerinin RIP3 delesyonu ile normal seviyelere düşürülebildiği bir çalışmada gösterilmiştir. Bu nedenle, dabrafenib gibi bir RIP3 inhibitörü uygulamasının MDA düzeylerini düşürme açısından literatürle uyumlu olduğu, ancak nekrostatin-1 uygulamasının lipid peroksidasyonunu daha fazla azaltıcı etkisinin olduğu gözlenmektedir (112).

Çalışmamızda yaptığımız histopatolojik incelemede, literatürde olduğu gibi dabrafenib uygulanmasının nekrostatin-1 grubu ile benzer şekilde dokuda oluşan dejenerasyonu gerilettiği görülmüştür (113). Bu da hem dabrafenib'in hem nekrostatin-1'in kolistin oluşturduğu renal doku hasarı üzerinde önemli derecede benzer koruyucu etkileri olduğunu göstermektedir.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, kolistine bağlı nefrotoksisite üzerinde lipid peroksidasyonu, artan oksidatif stres ve nekroptoz gibi mekanizmaların rolünün olduğu ve bu patolojik değişikliklerin dabrafenib etkisiyle hafifletilerek nefrotoksisitenin azaltılabileceği görülmüştür. Dabrafenib, hâlihazırda melanom tedavisinde BRAF enzim inhibitörü olarak kullanıldığı için, ileride yapılacak çalışmalar nekroptozu karşı koruyucu etkisini daha geniş çapta inceleyerek, kolistin kullanımına bağlı nefrotoksik yan etkilerin azaltılması ve farklı nedenlerle oluşan nekroptozun önlenmesi için yeni terapötik yaklaşımlar ve tedavide yeni ilaç kombinasyonlarının kullanılmasına olanak sağlayacaktır.

8. KAYNAKLAR

1. Kucers A, Crowe S, Grayson ML, Hoy JF. The use of antibiotics, 5th, Heinemann, London 1997, p: 899.
2. Evans ME, Feola DJ, Rapp RP. Polymyxin B sulfate and colistin: old antibiotics for emerging multi resistant gram-negative bacteria. *Ann Pharmacother.* 1999;33:960.
3. Li J, Turnidge J, Milne R, et al. In vitro pharmacodynamic properties of colistin and colistin methanesulfonate against *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:781.
4. Falagas EM, Kasiakou KS. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis.* 2005;40:1333-41.
5. Tuon FF, Rigatto MH, Lopes CK, Kamei LK, Rocha JL, Zavascki AP. Risk factors for acute kidney injury in patients treated with polymyxin B or colistin methanesulfonate sodium. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43:349–52.
6. Akajagbor DS, Wilson SL, Shere-Wolfe KD, Dakum P, Charurat ME, Gilliam BL. Higher incidence of acute kidney injury with intravenous colistimethate sodium compared with polymyxin B in critically ill patients at a tertiary care medical center. *Clin Infect Dis.* 2013;57:1300-3.
7. Kubin CJ, Ellman TM, Phadke V, Haynes LJ, Calfee DP, Yin MT. Incidence and predictors of acute kidney injury associated with intravenous polymyxin B therapy. *J Infect.* 2012;65:80-7.
8. Collins JM, Haynes K, Gallagher JC. Emergent renal dysfunction with colistin pharmacotherapy. *Pharmacotherapy.* 2013;33:812-6.
9. Deryke CA, Crawford AJ, Uddin N, Wallace MR. Colistin dosing and nephrotoxicity in a large community teaching hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54:4503-5.
10. Yousef JM, Chen G, Hill PA, Nation RL, Li J. Melatonin attenuates colistin induced nephrotoxicity in rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55:4044-9.

11. Yousef JM, Chen G, Hill PA, Nation RL, Li J. Ascorbic acid protects against the nephrotoxicity and apoptosis caused by colistin and affects its pharmacokinetics. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:452-9.
12. Ghilissi Z, Hakim A, Sila A, et al. Evaluation of efficacy of natural astaxanthin and vitamin E in prevention of colistin-induced nephrotoxicity in the rat model. *Environ Toxicol Pharmacol.* 2014;37:960-6.
13. Galluzzi L, Kepp O, Chan F, Kroemer G. Necroptosis: Mechanisms and relevance to disease. *Ann Rev Pathol Dis.* 2017;12(1):103-130.
14. Degterev A, Linkermann A. Generation of small molecules to interfere with regulated necrosis. *Cell Mol Life Sci.* 2016;73(11-12):2251-2267.
15. Li JX, Feng JM, Wang Y, Li XH, Chen XX, Su Y. The B-RafV600E inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. *Cell Death Dis.* 2014;5(6):1-11.
16. Gupta K, Phan N, Wang Q, Liu B. Necroptosis in cardiovascular disease - a new therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;118(3):26-35.
17. Degterev A, Huang Z, Boyce M. Chemical inhibitor of nonapoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol.* 2005;1(2):112-119.
18. Zhang T, Zhang Y, Cui, M. CaMKII is a RIP3 substrate mediating ischemia-and oxidative stress-induced myocardial necroptosis. *Nat Med.* 2016;22(2):175-182.
19. Luedde M, Lutz M, Carter N, Sosna J, Jacoby C, Vucur M. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodeling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2014;103:206-216.
20. Cruz SA, Qin Z, Stewart AFR, Chen HH. Dabrafenib, an inhibitor of RIP3 kinase-dependent necroptosis, reduces ischemic brain injury. *Neural Regen Res.* 2018;13(2): 252-6.
21. Sümer Ş, Dikici N. Kolistin. *Yoğun Bakım Derg.* 2010;9(4):182-7.
22. Öncül O. Kolistin: Endikasyon ve klinik kullanımı. *ANKEM Derg.* 2012;26(2):12-18.
23. Hancock REW, Falla T, Brown MH. Cationic bactericidal peptides. *Adv Microb Physiol.* 1995;37:135-175.

24. Kleinkauf H, Dohren H von. Peptide antibiotics, B-lactams and related compounds. *Crit Rev Biotechnol*. 1998;8:1-32.
25. Perlman D. Bodansky M. Biosynthesis of peptide antibiotics. *Annu Rew Biochem*. 1971;40:449-464.
26. Inderlied CB, Lancero MG, Young LS. Bacteriostatic and bactericidal in-vitro activity of meropenem againsts clinical isolates, including *Mycobacterium avium* complex. *J Antimicrob Chemother*. 1989;24:85-99.
27. Hall LMC, Livermore DM, Gur D, et al. OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) B-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:1637-44.
28. Martin AR. Antibacterial antibiotics. In: Delgado JN, Remeks WA, eds. *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. 10. ed. Lippincott, Raven; 1998, p:253-325.
29. Giamarellos-Bourboulis EJ, Grecka P, Giamarellou H. In vitro interaction of DX-8739, a new carbapenem, meropenem and imipenem with amikacin multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother*. 1996;38:287-291.
30. Colistin. In: O'Neil MJ, Smith A, Haeckelman PE, Obenchain JR, Gallipeau JAR, D'Arecca MA, eds. *An Encyclopedia of Chemical, Drugs and Biologicals*. 13. ed. Merck and Co, Inc. Whitehouse Station, NJ; 2001, p:433-434.
31. Ware M. Colistin sulphomethate sodium. In: *British Pharmacopea*. London: 1968, p:182-183.
32. Schwartz BS, Warren MR, Barkley FA, et al. Microbiological and pharmacological studies of colistin sulphate and sodium colistin methanesulfonate. *Antibiot Annu*. 1960;7:41-60.
33. Li J, Nation LR, Turnidge DJ, et al. Colistin: The re-emerging antibiotic for multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 2006;6:589-601.
34. Falagas ME, Kopterides P. Old antibiotics for infections in critically ill patients. *Curr Opin Crit Care*. 2007;13:592-7.
35. Giamarellou H. Multidrug-resistant gram-negative bacteria: how to treat and for how long. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:50-4.

36. Lim LM, Ly N, Anderson D, et al. Resurgence of colistin: a review of resistance, toxicity, pharmacodynamics and dosing. *Pharmacotherapy*. 2010;30:1279-91.
37. Hancock RE, Chapple DS. Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43(6):1317-23.
38. Peterson AA, Hancock RE, McGroarty EJ. Binding of polycationic antibiotics and polyamines to lipopolysaccharides of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*. 1985;164(3):1256-61.
39. Zhang L, Dhillon P, Yan H, Farmer S, Hancock RE. Interactions of bacterial cationic peptide antibiotics with outer and cytoplasmic membranes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(12):3317-21.
40. Gough M, Hancock REW, Kelly NM. Antiendotoxin activity of cationic peptide antimicrobial agents. *Infect Immun*. 1996;64:4922-4927.
41. Couet W, Grégoire N, Marchand S, Mimoz O. Colistin pharmacokinetics: the fog is lifting. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(1):30-9.
42. Plachouras D, Karvanen M, Friberg LE, et al. Population pharmacokinetic analysis of colistin methanesulfonate and colistin after intravenous administration in critically ill patients with infections caused by gram-negative bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(8):3430-6.
43. Falagas ME, Bliziotis IA, Tam VH. Intraventricular or intrathecal use of polymyxins in patients with gram-negative meningitis: a systemic review of available evidence. *Int J Antimicrob Agents*. 2007;29(1):9-25.
44. Falagas ME, Kasiakou SK, Michalopoulos A. Treatment of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* pneumonia, *J Cyst Fibros*. 2005;4(2):149-50.
45. Kwa AL, Loh C, Low JG, Kurup A, Tam VH. Nebulized colistin in the treatment of pneumonia due to multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Infect Dis*. 2005;41(5):754-7.
46. Keith S. Kaye, Donald Kaye. Polymyxins (Polymyxin B and Colistin), Chapter 32. In: Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Churchill Livingstone Elsevier, United States; 2010, p:469.

47. Michalopoulos AS, Falagas ME. Colistin: recent data on pharmacodynamics properties and clinical efficacy in critically ill patients. *Ann Intensive Care*. 2011;1(1):30.
48. Kayacan ÇB. Ed: Kayacan ÇB. Antimikrobiyal ilaçların farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri, Bölüm III, Enfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi. Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul; 2008, s:262-263.
49. Timurkaynak F, Can F, Azap OK, Demirbilek M, Arslan H, Karaman SO. In vitro activities of nontraditional antimicrobials alone or in combination against multidrug-resistant strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* isolated from intensive care units. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(3):224-8.
50. Volkow-Fernandez P, Rodriguez CF, Cornejo-Juarez P. Intravesical colistin irrigation to treat multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* urinary tract infection: a case report. *J Med Case Rep*. 2012;6(1):426.
51. Bergogne-Berezin E, Joly-Guillou ML. Hospital infection with *Acinetobacter* spp.: An increasing problem. *J Hosp Infect*. 1991;18(suppl A):250-55.
52. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50:4114-4.
53. Michalopoulos A, Papadakis E. Inhaled anti-infective agents: emphasis on colistin. *Infection*. 2010;38:81-8.
54. Michalopoulos A, Fotakis D, Vitzili S. Aerosolized colistin as adjunctive treatment of ventilator-associated pneumonia due to multidrug-resistant gram negative bacteria: a prospective study. *R Med*. 2008;102(3):407-12.
55. Kofteridis DP, Alexopoulou C, Valachis A, et al. Aerosolized plus intravenous colistin versus intravenous colistin alone for the treatment of ventilator-associated pneumonia: a matched case-control study. *J Infect Dis*. 2010;51(11):1238-44.
56. Korbila IP, Michalopoulos A, Rafailidis P. Inhaled colistin as adjunctive therapy to intravenous colistin for the treatment of microbiologically documented

- ventilator-associated pneumonia: a comparative cohort study. *C Microbiol Infect.* 2010;16(8):1230-6.
57. Tunkel AR, Hartman BJ, Kaplan SL, et al. Practice guidelines for the management of bacterial meningitis. *Clin Infect Dis.* 2004;39:1267-84.
58. Rodriguez Guardado A, Blanco A, Asensi V, et al. Multidrug-resistant acinetobacter meningitis in neurosurgical patients with intraventricular catheters: assessment of different treatments. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61:908-13.
59. Katragkou A, Roilides E. Successful treatment of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* central nervous system infections with colistin. *J Clin Microbiol.* 2005;43:4916-7.
60. Falagas ME, Kasiakou SK, Tsiodras SK, et al. The use of intravenous and aerosolized polymyxins for the treatment of infections in critically ill patients: a review of the recent literature. *Clin Med Res.* 2006;4:138-46.
61. Hoeprich PD. The polymyxins. *Med Clin North America* 1970;54:1257-1265.
62. Falagas ME, Fragoulis KN, Kasiakou SK, et al. Nephrotoxicity of intravenous colistin: a prospective evaluation. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;26(6):504-7.
63. Falagas ME, Rizos M, Bliziotis IA, et al. Toxicity after prolonged (more than four weeks) administration of intravenous colistin. *BMC Infect Dis.* 2005;5(1):1.
64. Pogue JM, Lee J, Marchaim D, et al. Incidence of and risk factors for colistin-associated nephrotoxicity in a large academic health system. *Clin Infect Dis.* 2011;53(9):879-84.
65. Yahav D, Farbman L, Leibovici L, Paul M. Colistin: new lessons on an old antibiotic. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(1):18-29.
66. McLaren G, Spelman D. Colistin, an overview. UpToDate Online. <https://www.uptodate.com/contents/polymyxins-an-overview>. Erişim tarihi: 18.3.2016.
67. Koch-Weser J, Sidel VW, Federman EB, et al. Adverse effects of sodium colistimethate. Manifestations and specific reaction rates during 317 courses of therapy. *Ann Intern Med.* 1970;72:857.
68. Beringer P. The clinical use of colistin in patients with cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med.* 2001;7:434.

69. Tamma PD, Newland JG, Pannaraj PS, et al. The use of intravenous colistin among children in the United States: results from a multicenter, case series. *Pediatr Infect Dis J*. 2013;32:17-22.
70. Tan CH, Li J, Nation RL. Activity of colistin against heteroresistant *Acinetobacter baumannii* and emergence of resistance in an in vitro pharmacokinetic/pharmacodynamic model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3413-5.
71. Cunningham S1, Prasad A, Collyer L, Carr S, Lynn IB, Wallis C. Bronchoconstriction following nebulised colistin in cystic fibrosis. *Arch Dis Child*. 2001;84:432-433.
72. Falagas ME, Siempos II, Rafailidis PI, et al. Inhaled colistin as monotherapy for multidrug-resistant gram (-) nosocomial pneumonia: a case series. *Respir Med*. 2009;103(5):707-13.
73. Rattanaumpawan P, Lorsutthitham J, Ungprasert P, et al. Randomized controlled trial of nebulized colistimethate sodium as adjunctive therapy of ventilator-associated pneumonia caused by gram-negative bacteria. *J Anti Chem*. 2010;65(12):2645-9.
74. Şentürk A. Tigesiklinin tek başına ve kolistin sülfat, sülbaktam ve levofloksasin ile kombinasyon halinde *Acinetobacter baumannii* suşları üzerine antibiyotik sonrası etkisinin araştırılması. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2011, İstanbul (Danışman: Berna ÖZBEK ÇELİK).
75. Özer EP. Yenidoğan ve çocuk yoğun bakım ünitelerinde kolistin (colistimethate) kullanımı. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, 2015, Eskişehir (Danışman: Prof. Dr. A. Neslihan TEKİN).
76. Falagas ME, Kasiakou SK. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care*. 2006;10(1):R27.
77. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA, Mehta RL, Palevsky P and Acute Dialysis Quality Initiative Workgroup. Acute renal failure-definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. *Crit Care*. 2004;8(4):R204-12.

78. Lewis JR, Lewis SA. Colistin interactions with the mammalian urothelium. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004;286:C913-22.
79. Hartzell JD, Neff R, Ake J, et al. Nephrotoxicity associated with intravenous colistin (colistimethate sodium) treatment at a tertiary care medical center. *Clin Infect Dis*. 2009;48:1724-8.
80. Lassnigg A, Schmidlin D, Mouhieddine M. Minimal changes in serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study. *J Am Soc Nephrol*. 2005;15:1597.
81. Falagas M, Kasiakou S. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40:1333-41.
82. Levy MM, Macias WL, Vincent JL. Early changes in organ function predict eventual survival in severe sepsis. *Crit Care Med*. 2005;33:2194.
83. Okusa MD, Knicely D. Etiology and diagnosis of prerenal disease and acute tubular necrosis in acute kidney injury in adults. UpToDate Online. <https://medilib.ir/uptodate/show/7216>. Erişim tarihi: 21.05.2023.
84. Bagshaw SM, George C, Bellomo R. ANZICS Database Management Committee. A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2008;23:1569.
85. Schiffl H. Renal recovery from acute tubular necrosis requiring renal replacement therapy: a prospective study in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21:1248.
86. Kumazawa J, Yagisawa M. The history of antibiotics: the Japanese story. *J Infect Chemother*. 2002; (8-2):125-133.
87. Levin AS, Barone AA, Penço, et al. Intravenous colistin as therapy for nosocomial infections caused by multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Infect Dis*. 1999;28(5):1008.
88. Gai Z, Samodelov SL, Kullak-Ublick GA, Visentin M. Molecular mechanisms of colistin-induced nephrotoxicity. *Molecules*. 2019;24(3).
89. Nilsson A, Goodwin RJA, Swales JG, et al. Investigating nephrotoxicity of polymyxin derivatives by mapping renal distribution using mass spectrometry imaging. *Chem Res Toxicol*. 2015;28(9):1823-30.

90. Ordooei Javan A, Shokouhi S, Sahraei Z. A review on colistin nephrotoxicity. *European J Clin Pharmacol*. 2015;71(7):801-10.
91. Linkermann A, Chen G, Dong G, Kunzendorf U, Krautwald S, Dong Z. Regulated cell death in AKI. *J American Soc Nephrol*. 2014;25(12):2689-701.
92. Jafari F, Elyasi S. Prevention of colistin induced nephrotoxicity: a review of preclinical and clinical data. *Expert Rev Clin Pharmacol*. 2021;14(9):1113-31.
93. Dai C, Li J, Tang S, Li J, Xiao X. Colistin-induced nephrotoxicity in mice involves the mitochondrial, death receptor, and endoplasmic reticulum pathways. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(7):4075-85.
94. Long NP, Oh JH, Park SM, et al. Delineation of the molecular mechanisms underlying colistin-mediated toxicity using metabolomic and transcriptomic analyses. *Toxicol App Pharmacol*. 2022;439:115928.
95. Priante G, Giancesello L, Ceol M, Del Prete D, Anglani F. Cell death in the kidney. *Inter J Mol Sci*. 2019;20(14).
96. Choi ME, Price DR, Ryter SW, Choi AMK. Necroptosis: A crucial pathogenic mediator of human disease. *JCI Insight*. 2019;4:e128834-37.
97. Zhou W, Yuan J. Necroptosis in health and diseases. *Semin Cell Dev Biol*. 2014;35:14-23.
98. Zhu P, Hu S, Jin Q, Li D, Tian F, Toan S. Ripk3 promotes ER stress-induced necroptosis in cardiac IR injury: A mechanism involving calcium overload/XO/ROS/mPTP pathway. *Redox Biol*. 2010;16(3):157-68.
99. Kolbrink B, von Samson-Himmelstjerna FA, Murphy JM, Krautwald S. Role of necroptosis in kidney health and disease. *Nat Rev Nephrol*. 2023;19:23-4.
100. Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M, Chan FKM. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 2009;137(6):1112-23.
101. Degterev A, Hitomi J, Gemscheid M, Ch'en IL, Korkina O, Teng X, Yuan J. Identification of RIP1 kinase as a specific cellular target of necrostatins. *Nat Chem Biol*. 2008;4(5):313-21.
102. Pasparakis M, Vandenabeele P. Necroptosis and its role in inflammation. *Nature*. 2015;517(7534):311-20.

- 103.** Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*. 2001;104(4):487-501.
- 104.** FDA approval for Dabrafenib. National Cancer Institute 2013. <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/drugs/fda-dab>. Erişim tarihi: 12.05.2023.
- 105.** Holderfield M, Deuker MM, McCormick F, McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(7):455-67.
- 106.** Gibney GT, Zager JS. Clinical development of dabrafenib in BRAF mutant melanoma and other malignancies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(7):893-9.
- 107.** Hauschild A, Grob JJ, Demidov LV, Jouary T, Gutzmer R, Millward M. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet*. 2012;380(9839):358-65.
- 108.** Weiss SA, Pavlick AC. Dabrafenib for the treatment of melanoma. *Expert Opin Orphan Drugs*. 2015;3(9):1075-84.
- 109.** Li JX, Feng, JM, Wang Y, Li XH, Chen XX, Su Y. The B-RafV600E inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. *Cell Death Dis*. 2014;5(6):1-11.
- 110.** Pompella A, Maellaro E, Casini AF, Ferrali M, Ciccoli L, Comporti M. Measurement of lipid peroxidation in vivo: A comparison of different procedures. *Lipids*. 1987;22(3):206-11.
- 111.** Ozyilmaz E, Ebinc FA, Derici U, et al. Could nephrotoxicity due to colistin be ameliorated with the use of N-acetylcysteine?. *Int Care Med*. 2011;37(1):141-6.
- 112.** Ghilissi Z, Hakim A, Mnif H, et al. Combined use of vitamins E and C improve nephrotoxicity induced by colistin in rats. *Saudi J Kidney Dis Transpl*. 2018;29(3):545.
- 113.** Tristão VR, Pessoa EA, Nakamichi R, et al. Synergistic effect of apoptosis and necroptosis inhibitors in cisplatin-induced nephrotoxicity. *Apoptosis*. 2016;21(1):51-9.
- 114.** Zhe-Wei S, Li-Sha G, Yue-Chun L. The role of necroptosis in cardiovascular disease. *Front Pharmacol*. 2018; 9(7):1-9.

115. Luedde M, Lutz M, Carter N, Sosna J, Jacoby C, Vucur M. RIP3, a kinase promoting necroptotic cell death, mediates adverse remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2014;103:206-216.
116. Martens S, Hofmans S, Declercq W, Augustyns K, Vandenabeele P. Inhibitors Targeting RIPK1/RIPK3: Old and New Drugs. *Trends Pharmacol Sci.* 2020;41(3):209-224.
117. Qinli Z, Meiqing L, Xia J, Li X, Weili G, Xiuliang J. Necrostatin-1 inhibits the degeneration of neural cells induced by aluminum exposure. *Restor Neurol Neurosci.* 2013;31(5):543-555.
118. Lin J, Li H, Yang M, Ren J, Huang Z, Han F, et al. A role of RIP3-mediated macrophage necrosis in atherosclerosis development. *Cell Rep.* 2013;3:200-210.
119. Liu S, Chen S, Wang S, Yu Q. Protective effect of dabrafenib on renal ischemia-reperfusion injury in vivo and in vitro. *Bio Biophys Res Commun.* 2020;522(2):395-401.
120. Li JX, Feng JM, Wang Y, Li XH, Chen XX, Su Y. The B-RafV600E inhibitor dabrafenib selectively inhibits RIP3 and alleviates acetaminophen-induced liver injury. *Cell Death Dis.* 2014;5(6):1-11.
121. Meijles DN, Cull JJ, Cooper STE, Markou T, Hardyman MA, Fuller SJ. The anti-cancer drug dabrafenib is not cardiotoxic and inhibits cardiac remodelling and fibrosis in a murine model of hypertension. *Clin Sci.* 2021;135(14):1631-47.

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı		Soyadı	
Doğum Yeri		Doğum Tarihi	
Uyruğu		Tel	
E-posta			

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora/Uzmanlık		
Tıpta Uzmanlık		
Lisans		
Lise		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1		
2		
3		
4		
5		
6		

Yabancı Dil Sınav Notu:	YDS:	YÖKDİL:
-------------------------	------	---------

10. EKLER

10.1. Etik Kurul Kararı

10.2. Orijinallik Raporu

Tez - Doktora

ORIJINALLIK RAPORU

% **16**

BENZERLİK ENDEKSİ

% **15**

İNTERNET KAYNAKLARI

% **3**

YAYINLAR

% **3**

ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1

acikerisim.dicle.edu.tr

İnternet Kaynağı

% **8**

2

acikbilim.yok.gov.tr

İnternet Kaynağı

% **4**

3

www.ankemdernegi.org.tr

İnternet Kaynağı

% **1**

4

9lib.net

İnternet Kaynağı

<% **1**

5

dergipark.org.tr

İnternet Kaynağı

<% **1**

6

YAVUZKIR, Şeyda, AKYOL, Alpaslan and KULOĞLU, Tuncay. "Doksorubisin ve Siklofosfamid Uygulanmasının Sıçan Over Dokularında Meydana Getirdiği Değişiklikler Üzerine Vitamin D' nin Etkileri", Fırat Üniversitesi, 2015.

Yayın

<% **1**

7

www.jove.com

İnternet Kaynağı

<% **1**