

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İDRAR ALKALİNİZASYONUNUN KOLİSTİNE
BAĞLI NEFROTOKSİSİTEYİ ÖNLEMEDEKİ ETKİSİNİN
İNVİVO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Berfu KORUCU

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**ANKARA
2015**

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
İÇ HASTALIKLARI ANABİLİM DALI**

**RATLARDA İDRAR ALKALİNİZASYONUNUN KOLİSTİNE
BAĞLI NEFROTOKSİSİTEYİ ÖNLEMEDEKİ ETKİSİNİN
İNVİVO OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. Berfu KORUCU

**UZMANLIK TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Yunus ERDEM**

**ANKARA
2015**

TEŞEKKÜR

Tezimin, bir hipotezden, bilimsel bir çalışmaya dönüşmesinin her evresinde hem somut bağlamda katkı veren, hem de manen destek olup güven duygumu güçlendiren değerli hocam sayın Prof. Dr. Yunus ERDEM'e, şükran borçluyum. Bu itibarla öncelikli teşekkürlerimi saygıdeğer hocama sunmayı görev addediyorum.

Bununla birlikte, kalben ve cismen hep yanımda bulunarak en zor anlarımda bana güç veren değerli dostum Dr. Müfide OKAY'a; çalışmanın her aşamasında destek veren ve yardımlarını esirgemeyen Dr. Mustafa Tuğrul DEMİR'e; en önemli moral kaynağım olan ve gereksinim duyduğumda yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Serhat ÜNAL ve sayın Prof. Dr. Murat AKOVA'ya; fikrimi ilk paylaştığım insan ve ilk yol göstericim olan Uz. Dr. A. Çağkan İNKAYA'ya; emeği ve katkılarıyla birlikte aynı zamanda beni gönülden destekleyen Dr. Işık ÜNAL'a; bilimsel çalışma fikrini hep sevgiyle ve güler yüzle karşılayan sayın Prof. Dr. Figen KAYMAZ'a; emekleri ve ayırdıkları zaman için sayın Doç. Dr. Mert PEKCAN'a; yakın ilgileri ve verdikleri emek için sayın Doç. Dr. M. Alper ÇETİNKAYA'ya; bana inanan ve güvenen kıymetli hocam sayın Prof. Dr. Ş. Gül ÖZ'e; ne zaman kendilerine ihtiyacım olsa beni güler yüzle ve içtenlikle karşılayan sayın Prof. Dr. Ülver DERİCİ'ye; yaptığım bilimsel çalışmaya desteklerinden ötürü TÜRK HİPERTANSİYON VE BÖBREK HASTALIKLARI DERNEĞİ'ne; çalışma güncemi sabırla dinleyen ve moral kaynağım olan anneme-babama ve sevgili dostum E. Gamze SAĞKAN'a; çalışmamın başından sonuna dek manevi destek veren meslektaşlarıma ve bütün çalışma arkadaşlarıma yürekten teşekkür ediyorum...

Dr. Berfu KORUCU

Eylül 2015

ÖZET

Kolistin, dirençli hastane enfeksiyonlarında kullanılan yaşamsal önemi olan bir antibiyotiktir. Kolistinin en önemli, morbidite ve mortalite sebebi olan yan etkisi nefrotoksisitedir. Kolistin böbrek tübüllerine toksik etki gösterir ve akut tübüler nekroza neden olur. Kimyasal yapısı itibari ile kolistin zayıf asit özellik gösterir. Bu çalışmada, zayıf asit ilaçların toksisitesinde kullanılan idrar alkalinizasyonunun, kolistin nefrotoksisitesindeki koruyuculuğunun araştırılması hedeflendi. Sprague Dawley ratlar dört gruba ayrıldı. Ratlar çevresel olarak kontrollü ortamda barındırıldı (sıcaklık $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 saat aydınlık/karanlık siklusu). Grup I'e (kontrol); yedi gün, günde 2 defa 0,1 cc intramuskülersterildistile su enjekte edildi. Grup II'ye (kolistin grubu); günlük tartılarına göre 750000 IU/kg/gün, 12 saat ara ile intramusküler kolistin enjeksiyonu yapıldı. Grup III'ün (kolistin ve bikarbonat grubu); idrar pH düzeyini >7 yapana kadar, içme suyunun içinde, sodyum bikarbonat verildi. Günlük olarak mesane sıvazlama ile elde edilen idrar, dipstick ile pH ve dansite açısından tahlil edildi. Grup II ile aynı dozda intramusküler kolistin enjeksiyonu yapıldı. Grup IV (kolistin ve NaCl grubu)'nun, grup III'ün günlük dipstick idrar dansitesini yakalayacak şekilde hidrate edildikten sonra sonra aynı dozda kolistin uygulandı. Çalışma başında ve sonunda idrar örnekleri alındı, çalışma sonunda kardiyak ponksiyon ile kan alındıktan sonra, nekropsi yapılarak, böbrekler çıkarıldı. Serum üre değerinde sınırdan anlamlı fark gözükmeyle birlikte ($p=0,046$), histolojik değerlendirme ile karşılaştırıldığında klinik olarak korele bulunmadı. Serum kreatinin değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı ($p= 0,131$). Histolojik olarak 0 (normal) -5 (nekroz) skorlanan tübüler dejenerasyon ortalamalarına göre; Grup I skoru "0", Grup II skoru " $4,25\pm 0,89$ ", Grup III skoru " $2\pm 1,26$ ", Grup IV skoru " $1,5\pm 0,55$ " saptandı. Grup III ve Grup IV'te; nefrotoksik ajana karşı anlamlı koruma sağlandığı saptandı ($p<0,001$). Bikarbonat ve NaCl gruplarında kendi aralarında üstünlük saptanmadı ($p=0,601$). Gruplardan bağımsız olarak idrar dansiteleri ile tübüler dejenerasyon skorları arasında istatistiksel korelasyon saptandı. İdrar dansitesi ne kadar düşükse tübül skorunun o kadar düşük olduğu görüldü ($p=0.001$). Kolistin nefrotoksisitesinden korumada, idrar alkalinizasyonunun, NaCl ile hidrasyona üstünlüğü yoktur ve benzer şekilde etkindir. İdrar dansitesindeki düşüş ile tübüler koruma korelasyon göstermektedir.

Anahtar kelimeler: kolistin, nefrotoksisite, idrar alkalinizasyonu, hidrasyon, idrar dansitesi

ABSTRACT

Colistin is a vital antibiotic that is used in drug-resistant nosocomial infections. The most important side effect of this drug that causes severe morbidity and mortality is nephrotoxicity. Colistin is toxic to the tubules of the kidney and it causes acute tubular necrosis. Colistin is a weak acid. In this study, it is aimed to evaluate the possible protection of urine alkalisation that is used in toxicities of weak acids. Sprague Dawley rats were divided into four groups. Rats were kept in controlled environment (temperature $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ and 12 hours light/dark cycle). Group I (control) were injected 0,1 cc intramuscular distilled water twice a day for seven days. Group II (colistin group) were injected 750000 IU/kg/day of colistin, divided into two doses, twice a day for seven days. Group III (colistin and bicarbonate group) were injected same dose of colistin, after they reach urinary pH >7 by addition of bicarbonate in their drinking water. Urine of the rats collected by bladder stroking were checked for pH and density with dipstick each day. Group IV (colistin and NaCl group) were injected the same dose of colistin after reaching Group III's urine density by adding NaCl in their drinking water. Urine samples were collected before and after the study. After the study, blood samples were collected by cardiac puncture and necropsy was performed. Serum urea levels showed borderline statistical difference ($p=0,046$) but, it was not clinically correlated when compared histopathologically. Serum creatinine values showed no statistical difference ($p=0,131$). According to tubular degeneration average scores (scored 0: normal to 5: necrosis, histologically); Group I scored "0", Group II scored " $4,25\pm 0,89$ ", Group III scored " $2\pm 1,26$ ", and Group IV scored " $1,5\pm 0,55$ ". In Group III and Group IV, protection was achieved against nephrotoxic agent ($p<0,001$). Bicarbonate group was not superior to NaCl group ($p=0,601$). Urine densities and tubular degeneration scores were statistically correlated independent of the groups. The lower the urine density was, the lower the tubular score ($p=0,001$). Bicarbonate hydration is not superior to NaCl hydration, and both are effective similarly. Decrease in urine density is correlated with tubular protection.

Key words: colistin, nephrotoxicity, urine alkalisation, hydration, urine density

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	viii
ŞEKİLLER ve RESİMLER	x
TABLolar	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Kolistin	1
1.1.1. Genel Bilgiler	1
1.1.2. Kimyasal yapı	2
1.1.3. Etki mekanizması	2
1.1.4. Nefrotoksisite mekanizması	3
1.2. Akut Böbrek Hasarı	3
1.2.1. Tanım	3
1.2.2. RIFLE kriteri	4
1.2.3. AKIN kriteri	5
1.2.4. RIFLE ve AKIN için KDIGO modifikasyonu	5
1.3. Akut Tübüler Nekroz	6
1.3.1. Tanım	6
1.3.2. Morbidite ve mortalite	7
1.4. Zayıf Asitler – İyonlaşma Sabiti	7
1.5. Sodyum Bikarbonat	8
1.5.1. Genel Bilgiler	8
1.5.2. İdrar alkalinizasyonu	9
1.6. Kolistin Nefrotoksisitesinin Önlenmesi Amaçlı Yapılan Çalışmalar	10
2. AMAÇLAR VE RAT ÇALIŞMA MODELİ	11
3. GEREÇ VE YÖNTEM	12
3.1. Laboratuvar Koşulları, Çalışma Planı ve Materyalin Toplanması	12

3.2. Böbrek Preparatlarının Hazırlanması ve Histopatolojik İnceleme	14
3.3. Serum Üre ve Kreatinin Çalışması	15
3.4. Güç Analizi	15
3.5. İstatistiksel Analiz	16
3.6. Etik Kurul Onayı	16
4. BULGULAR	17
4.1. Serum üre ve kreatinin değerleri	17
4.2. Histopatolojik İnceleme	18
4.3. Üriner dansitenin tübüler dejenerasyon skoru ile ilişkisi	34
4.4. Üriner dansitenin serum biyokimyası ile ilişkisi	36
4.5. Grupların günlük idrar değerleri ve deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi	37
5. TARTIŞMA	39
6. KAYNAKLAR	42

SİMGELER VE KISALTMALAR

<	: küçüktür
>	: büyüktür
≤	: küçük eşittir
≥	: büyük eşittir
ABH	: akut böbrek hasarı
ADQI	: Acute Dialysis Quality Initiative
AKIN	: Acute Kidney Injury Network
ATN	: akut tübüler nekroz
Ca ⁺²	: kalsiyum
cc	: cubic centimetre
CMS	: kolistinmetansülfonat
CO ₂	: karbondioksit
dL	: desilitre
GFR	: glomerular filtration rate
gr	: gram
H ⁺	: proton
HCl	: hidroklorik asit
IM	: intramusküler
IU	: international units
IV	: intravenöz
K _a	: iyonlaşma sabiti
KDIGO	: Kidney Disease Improving Global Outcomes
kg	: kilogram
KIM-1	: Kidney Injury Molecule-1
LBP	: lipopolysaccharide binding protein
LPS	: lipopolysaccharide
mg	: miligram
Mg ⁺²	: magnezyum
mL	: mililitre
NAGase	: N-acetylglucosaminidase
NaHCO ₃	: sodyum bikarbonat

°C	: santigrat derece
OH ⁻	: hidroksit
RIFLE	: Risk, Injury, Failure, Loss, End stage kidney disease
SDBY	: son dönem böbrek yetmezliği
α	: alfa
γ	: gamma

ŞEKİLLER

Şekil 3.1.	Çalışma grupları	13
Şekil 4.2.	Ortalama idrar dansitesi ile tübüler dejenerasyon skorunun korelasyon grafiği	35
Şekil 4.3.	Ortalama dansiteye göre tüp hasarı skorunun dağılımı grafiği	36

RESİMLER

Resim 4.1.	Normal yapıda tübül epitel hücreleri. Renal korteks ×40 objektif H&E	18
Resim 4.2.	Normal yapıda tübül epitel hücreleri, renal korteks×40 objektif H&E	19
Resim 4.3.	Tübül lümeninde silendir, epitelde incelme, böbrek materyali ×40 objektif H&E	20
Resim 4.4.	Tübül lümenine dökülmüş epitelyum hücreleri, vakuolizasyon, böbrek materyali ×40 objektif H&E	21
Resim 4.5.	Vakuolizasyon, renal korteks. ×63 objektif H&E	22
Resim 4.6.	Tübül lümenine dökülmüş epitelyum hücreleri , nekroz , renal korteks ×40 objektif H&E	23
Resim 4.7.	Nekroz, renal korteks ×40 objektif H&E	24
Resim 4.8.	Nekroz, renal korteks ×20 objektif H&E	25
Resim 4.9.	Tübül epitelinin bazal membrandan ayrışması, renal korteks ×40 objektif H&E	26
Resim 4.10.	Tübül lümeninde bazofilik birikimler, silendir, böbrek kesiti ×40 objektif H&E	27
Resim 4.11.	Nekroz, böbrek kesiti ×20 objektif H&E	28
Resim 4.12.	Tübül epitelinde incelme, böbrek kesiti ×20 objektif H&E	29
Resim 4.13.	Tübül epitelinde vakuolizasyon, nekroz, böbrek kesiti ×40 objektif H&E	30
Resim 4.14.	Mikrograftta sağ alanda belirgin interstisyel ödem, böbrek biyopsi ×20 objektif H&E	31
Resim 4.15.	İnterstisyel lödem ,tübüller arasındaki mesafede artış, böbrek kesiti ×40 objektif H&E	32

Resim 4.16. Lümeninde piknotik çekirdekler ve eksudatif materyal izlenen tübüller,
böbrek biyopsi, ×40 objektif H&E 33

TABLÖLAR

Tablo 3.1. Tübüler dejenerasyon skorlama sistemi	15
Tablo 4.2. Serum üre ve kreatinin değerleri	17
Tablo 4.3. Tübüler dejenerasyon skor sonuçları	34
Tablo 4.4. Üriner dansite ile tübüler dejenerasyon skorunun gruplardan bağımsız karşılaştırılması	35
Tablo 4.5. Ortalama idrar dansitesi ve serum biyokimyası ilişkisi	36
Tablo 4.6. Çalışma bulguları, sonuçları ve istatistiksel analiz	38

1.GİRİŞ

1.1. Kolistin

1.1.1. Genel Bilgiler

Polimiksinler; ilk kez 1947 yılında, *Paenibacilluspolymyxa* bakterisinin “surfaktan” komponentinden izole edilen, bir grup antibiyotiktir. Polimiksin A-E olmak üzere beş çeşit olup, bunlardan polimiksin B ve polimiksin E (kolistin) klinik pratikte kullanılmaktadır. Kolistin; katyonik bir polipeptid antibiyotik olup, gram negatif bakterilerin hücre membranındakilipopolisakkarid ve fosfolipidlere bağlanır. Membranlipidlerinin fosfat grupları üzerindeki divalan katyonları kompetatif olarak uzaklaştırır, hücre mambran zedelenmesine yol açar, intraselüler komponentlerin akışına neden olur ve bakterisid etkinlik gösterir. (1,2,3)

Kolistin, 1949 yılında keşfedilmiş, ilk kez 1950’lerde Japonya ve Avrupa’da, 1959’da intravenöz (IV) formu ile Amerika Birleşik Devletleri’ndeantimikrobiyal olarak kullanıma girmiştir. O dönemde, gram negatif bakterilere karşı çok etkin olması ve aminoglikozidlere göre daha az toksik olması nedeni ile tercih edilmiştir. Ancak, 1980’li yılların başından itibaren, dünyanın pek çok ülkesinde yüksek nefrotoksisiteinsidansive alternatif pek çok yeni antibiyotiğin piyasaya çıkması nedeni ile terk edilmiştir (4).

Son yirmi yılda, özellikle *Pseudomonasaeruginosa*, *Acinetobacterbaumannii*, ve *Klebsiellapneumoniae*’ yı kapsayan multi-ilaç dirençli organizmaların prevalansı, tüm dünyada, çok yüksek oranda artış göstermektedir (5).Bu ve bunun gibi çoklu antibiyotik direnci olan virulan gram negatif bakterilere yönelik yeni antibakteriyel ajanların yokluğu, klinisyenleri tekrar kolistin kullanımına yönlendirmiştir. Bu enfeksiyonlar ile mücadele etmek için, nadir, hatta çoğu zaman tek seçenek olan kolistin, ülkemiz ve dünya çapında yaygın kullanıma girmiştir.

İlacın kullanımını en ön planda kısıtlayan nefrotoksisite; 1970 yılından bu yana pek çok araştırmacının çeşitli vaka serilerinde %33 ila %61 oranında bildirilmiştir (6-13). Kritik hastalarda hayati önem taşıyan dirençli hastane enfeksiyonu tedavisinde, mevcut en önemli silah olan kolistin; bu yan etkisi ile ciddi morbidite ve mortalite sebebi olmakta, gerek renalreplasman tedavisi uygulama ile

ve gerek hastane/yoğun bakım yatış süresini uzatması ile ciddi maliyete neden olmaktadır.

1.1.2. Kimyasal yapı

Kolistin, α -amid bağı ile yağ asidi zincirine bağlı, katyoniksiklik bir dekapeptiddir. Moleküler ağırlığı 1750 daltondur. Kolistin molekülünün amino asid komponentleri; D-lösin, L-treonin, ve L- α - γ -diaminobütirik asitten oluşmaktadır. L- α - γ -diaminobütirik asit, yağ asidi rezidüsüne bağlıdır. pKa değeri ~10 olup, zayıf asit özellik göstermektedir.

Kolistinin iki formu bulunmaktadır; kolistin sülfat ve kolistinmetansülfonat (CMS; diğer isimleri ile; kolistimetat sodyum, pentasodyumkolistimetansulfonat). CMS; kolistinin, formaldehit ve sodyum bisülfat ile reaksiyonu sonucu, primer aminlerine sulfometil grubu eklenmesi ile oluşur. (14) CMS inaktif bir önilaç olup, *invivo* olarak, bakterisidal etkin form olan kolsitine dönüşür. (14,15). Kolistin sülfat; tablet ve şurup formu ile gastrointestinal dekontaminasyon için kullanılır. Hiçbir formun gastrointestinal emilimi söz konusu değildir. Kolistimetat sodyumun; parenteral formu, intravenöz, intramusküler uygulama ve flakon formu nebulizasyon ile uygulama için pazarda bulunmaktadır (4).

1.1.3. Etki mekanizması

Kolistinin antimikrobiyal etkisinin hedefi hücre membranıdır. Bakteri membranı ile başlangıçtaki etkileşim; anyonik bakteri membran lipopolisakkaridleri (LPS) ile katyonik polipeptid kolistin arasında olur. Kolistin, normalde negatif yüklü membran LPS'lerini stabilize eden kalsiyum (Ca^{+2}) ve magnezyumu (Mg^{+2}) uzaklaştırır ve dış membran yapısını bozar. Bu sürecin sonucu ise, hücre zarının geçirgenliğinin artması, hücre komponentlerinin dışarı sızması, nihayet hücrenin ölümü olmaktadır.

Direkt antibakteriyel etkinliğinin yanısıra, kolistin aynı zamanda potent bir anti-endotoksin aktivitesine sahiptir. Gram negatif bakterilerin endotoksini LPS moleküllerinin Lipid A porsiyonudur. Kolistin LPS'lere bağlanarak, nötralize eder. Ancak, bu etkinin, septik şok oluşumunu önlemede *invivo* yansıması net değildir,

çünkü LPS'ler hızlıca LPS-bağlayıcı proteinlere (LBP) bağlanır, bu kompleks de, hızlıca CD14 yüzey reseptörüne bağlanır ve etkisi sonlanır (4).

1.1.4. Nefrotoksisite mekanizması

Son yıllarda yapılan histokimyasal çalışmalarda; nefrotoksisite, kolistinin kimyasal yapısı ile ilişkilendirilmiştir. Kolistin molekülü, D-aminoasit ve yağ asidi komponentleri içermektedir (4). Gram negatif bakteri membranında gerçekleşen deterjan etkisi, böbrek tübül hücrelerinde de olmakta; tübül hücrelerinin katyon, anyon ve su geçirgenliği arttırmakta, nihayet, tübül hücresinde şişme, lizis ve apoptoz gerçekleşmektedir. Neticede kolitsin maruziyeti; renal fonksiyon kaybını, akut tübül nekroz ile gerçekleştirmektedir. (16)

1.2. Akut Böbrek Hasarı

1.2.1. Tanım

Akut böbrek hasarı (ABH); üre ve diğer nitrojenli artık ürünlerin retansiyonuna, ekstraselülervolüm ve elektrolitlerde regülasyon bozukluğuna neden olan, ani böbrek fonksiyon kaybıdır. ABH, artık yaygın olarak akut böbrek yetmezliği teriminin yerini almıştır. Bu tanım, organın yetmezliğine varmadan önceki, morbidite ve mortalite nedeni olan, geniş hastalık spektrumunu da içermektedir. Akut böbrek yetmezliği terimi ise, renal replasman tedavisi gerektiren ABH için kullanılmaktadır.

ABH için çok çeşitli fikir birliği tanımlamalar oluşturulmuştur. 2004'te, Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) grubu, "RIFLE" (Risk, Injury, Failure, Loss, End stage kidney disease) kriteri isimli, bir konsensus ve kanıta dayalı tedavi kılavuzu sunmuşlardır (16). Ardından, RIFLEkriterinin bir modifikasyonu, ADQI grubunu da içeren, Acute Kidney Injury Network (AKIN) tarafından sunulmuştur (18-20). En yakında da, RIFLE ve AKIN tanımlarını harmonize eden bir modifiye tanım, Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) tarafından yayınlanmıştır (21).

1.2.2. RIFLE kriteri

RIFLE'a göre ABH; serum kreatininde yedi gün içinde bazal değerine göre %50 artış olarak tanımlanır. RIFLE kriteri, beş farklı seviyede böbrek hasarını içermektedir. Bunlar; serum kreatinin artışı ve idrar çıkımı ölçümü ile tanımlanan; risk, hasar, yetmezlik ve iki nihai sonuç olan; böbrek fonksiyonunda kayıp ve son dönem böbrek yetmezliğidir (SDBY) (17).

RIFLE kriteri aşağıdaki gibidir:

Risk (Risk) : serum kreatinininde 1.5 kat artış veya glomerüler filtrasyon hızında (GFR) %25 azalma veya altı saat süresince idrar çıkımının saatte <0.5 mL/kg'dan az olması

Injury (Hasar) : serum kreatininde 2 kat artış veya glomerüler filtrasyon hızında (GFR) %50 azalma veya on iki saat süresince idrar çıkımının saatte <0.5 mL/kg'dan az olması

Failure (Yetmezlik) : serum kreatininde 3 kat artış veya glomerüler filtrasyon hızında (GFR) %75 azalma veya yirmi dört saat süresince idrar çıkımının saatte <0.3 mL/kg'dan az olması veya on iki saat boyunca anüri

Loss (Kayıp) : dört hafta veya daha fazla süre böbrek fonksiyonlarının tam kaybı (ör. Renal replasman tedavisi gereksinimi)

End stage kidney disease (Son dönem böbrek yetmezliği) : üç ay veya daha fazla süre böbrek fonksiyonlarının tam kaybı (ör. Renal replasman tedavisi gereksinimi)

RIFLE kriteri pek çok çalışmada prognoz ile korele bulunmuştur. Örnek olarak, on üç farklı çalışmanın sistematik bir meta-analizinde, RIFLE kriterlerini karşılayan hastaların basamaklı olarak mortalite için relatif riskli olduğu görülmüştür (22). ABH olmayan hastalar ile karşılaştırıldığında, "risk", "hasar" ve "kayıp" kriterlerini karşılayan hastaların rölatif mortalite risklerinde, sırasıyla 2.4 (CI 1.94-2.97), 4.15 (CI 3.14-5.48) ve 6.37 (CI 5.14-7.9) kat artış olduğu görülmüştür. RIFLE kriterindeki kreatinin artışına göre hesaplanan mortalite risk artışı, idrar çıkımına göre hesaplanan ile korele bulunmamıştır.

Diğer taraftan, GFR gibi serum kreatininin sabit değere ulaşmadığında, sınırlı ölçüm olanağı olan ve yetersiz değere sahip olan bir kriter, AKIN ve KDIGO klasifikasyon sistemlerine alınmamıştır.

1.2.3. AKIN kriteri

RIFLE kriterinin bir modifikasyonu, 2007’de AKIN tarafından geliştirilmiştir. AKIN tarafından ABH; 48 saat gibi kısa sürede bazal kreatinin değerinde ≥ 0.3 mg/dL yükseliş veya bazal değerine göre kreatininde %50 artış veya altı saat ya da daha uzun süre idrar çıkımının saatte <0.5 mL/kg olduğu durum olarak tanımlanmıştır. Son iki tanım, RIFLE’deki “risk” kategorisine uymaktadır. Kreatinindeki 0.3 mg/dL artış ise; serum kreatinin konsantrasyonudaki 0.3 ila 0.5 mg/dL kadar küçük bir artışın, %80 mortalite artışı ile ilişkilendirildiği epidemiyolojik datadan kaynaklanmaktadır (23). Tanıma 48 saat gibi bir sürenin eklenmesi ise, az miktarda olan kreatinin yükselişinin, 24 ila 48 saat içinde olmasının daha kötü sonuçlarla ilişkili olduğunu gösteren datadan kaynaklanmıştır (24,25). Bu süre RIFLE’da geçen yedi gün kriterine göre farklılık göstermektedir.

AKIN grubu, iki durumun altını çizmektedir. Birincisi, tanısal kriterlerin ancak volüm durumu stabilize olduktan sonra ortaya konması; ilincisi ise, oligüri bir kriter olarak kullanılacaksa, postrenal obstrüktif sebeplerin hızlıca değerlendirilmesi gerektiğidir.

AKIN grubu evreleme sistemi; RIFLE’in ilk üç kriteri ile karşılaştırılabilir. Ancak, RIFLE’da “kayıp” ve “SDBY” olarak tanımlanan son iki kriter, evre değil, netice olarak tanımlanmaktadır. AKIN gruba göre ABH evreleri aşağıdaki gibidir:

Evre I: serum kreatininde bazal değere göre 0.3 mg/dL veya %50 ve üzerinde artış

Evre II: serum kreatininde bazal değere göre %100 ve üzerinde artış

Evre III: serum kreatininde bazal değere göre %200 ve üzeri artış

AKIN grubunun RIFLE modifikasyonu, belirgin bir şekilde hastaların evrelemede değişiklik yaratmadığı gibi, hastane mortalitesi belirlemede de ek katkı sağlamamıştır (26).

1.2.4. RIFLE ve AKIN için KDIGO modifikasyonu

KDIGO, 2012’de, ABH için klinik kılavuz sunarken, AKIN evreleme sistemini korumuş, ancak ABH tanımını revize etmiştir (21). KDIGO klavuzunda; bazal değere göre 0.3 mg/dL’lik kreatinin yükselişi için zaman aralığı AKIN grupta

olduğu gibi 48 saat olarak korunmuş, ancak bazal değere göre kreatinindeki %50 artış için zaman aralığı RIFLE kriterinde belirtildiği gibi 7 gün olarak tanımlanmıştır.

KDIGO'ya göre ABH aşağıdaki durumlardan biri olarak tanımlanır:

- Serum kreatininde 48 saat içinde 0.3 mg/dL veya daha fazla artış
- Serum kreatininde 7 gün içinde olduğu bilinen veya tahmin edilen 1.5 katlık artış
- İdrar volümünün altı saat ya da daha fazla süre saatte <0.5mL/kg olması

KDIGO klavuzu da ocuk hastalar hariç olmak üzere, GFR'yi bir kriter olarak kullanmaz.

KDIGO klavuzunda ABH evrelemesi aşağıdaki gibidir:

Evre I: serum kreatininin bazal değerine göre 1.5 ila 1.9 kat artışı veya ≥ 0.3 mg/dL artışı veya 6 ila 12 saat idrar çıkımının saatte <0.5 mL/kg olması

Evre II: serum kreatininin bazal değerine göre 2 ila 2.9 kat artışı veya 12 saat veya daha uzun süre idrar çıkımının saatte <0.5 mL/kg olması

Evre III: serum kreatininin bazal değerine göre 3 kat artışı veya serum kreatininin ≥ 4 mg/dL'ye yükselmesi veya 24 saat veya daha uzun süre idrar çıkımının saatte <0.3mL/kg olması veya 12 saat veya daha uzun süren anüri

1.3. Akut Tübüler Nekroz

1.3.1. Tanım

Akut tübüler nekroz (ATN) , akut böbrek hasarının en sık renal nedeni olup, tüm akut böbrek hasarı nedenlerinde ise ikinci sırada gelmektedir. Akut böbrek hasarı, kan üre ve kreatininde akut elevasyon ile manifeste olan, günler ve haftalar içinde gelişen, ani böbrek fonksiyon bozukluğu olarak tanımlanır.

Akut böbrek hasarı üç gruba ayrılır: prerenal, renal (intrinsik) ve postrenal. Prerenal akut böbrek hasarı, normal fonksiyone böbreğin hipoperfüzyonu neticesini tanımlarken; postrenal böbrek hasarı yine başlangıçta normal fonksiyone böbrek varlığında üriner trakt obstrüksiyonunu tanımlar.

ATN'nin en sık nedeni uzamış hipoperfüzyon olmakla birlikte; ikinci en sok nedeni nefrotoksik ajanlardır. ATN'nin kliniği, iyi tanımlanmış  fazdan oluşur:

başlangıç, idame ve iyileşme. Başlangıç fazı serum üre ve kreatininde hızlı yükselme ile karakterizedir. İdame fazında, glomerüler filtrasyon hızında (GFR) ciddi bozulma mevcuttur, etyolojik faktöre göre genel olarak bir ila iki hafta kadar sürer. İyileşme fazında ise, tübüler fonksiyon geriye dönmeye başlar, tipik olarak poliürik bir yanıt oluşur. Bu safhada serum üre ve kreatininde düşme, hatta çoğu vakada bazal seviyeye inme gözlenir.

Toksik nedenlere bağlı ATN’de tübül hücre hasarı multifaktöriyel mekanizmalar ile gerçekleşir. Bunlar; direkt toksinin hücresel hasarı, intrarenal vazokonstriksiyon ve intratübüler obstrüksiyondur. Toksikite yapan ajana göre bu komponentlerin çeşitli kombinasyonları hasara neden olur.

1.3.2. Morbidite ve mortalite

Yoğun bakım ünitesinde izlenen ve hemodiyaliz ihtiyacı gösteren ATN vakalarında mortalite %40-60 arasında değişmektedir. (27-35)

Yoğun bakımda yatmayan hastalarda ve daha az ciddi düzeyde ATN olan hastalarda mortalite oranları daha düşük olup; %15-30 arasında bildirilmiştir. (36)

1.4. Zayıf Asitler – İyonlaşma Sabiti

Asitler, proton vericisi (donörü) olarak tanımlanan, yüksek konsantrasyonda proton (H^+) iyonu içeren sulu çözeltilerdir. Asit ve bazların, her birinin, suda çözündüklerinde iyonize oluşları farklıdır. Buna göre; zayıf – kuvvetli asit ya da zayıf – kuvvetli baz tanımı yapılır. Suda çözündüklerinde az miktarda iyonize olan asitler zayıf asitlerdir.

Fizyolojik pH’da pek çok ilaç kısmi çözünmüş halde bulunur. İyonizasyon (asit dissosiasyonu) sabiti, K_a ile ifade edilir ve çözüdüğü ortanca pH’ı ifade eder. İyonizasyon (disosiasyon) sabiti, negatif logaritmaları ile ifade edilir (pK_a). Asit ne kadar kuvvetli ise pK_a ’sı o kadar küçük; asit ne kadar zayıf ise, pK_a ’sı o kadar yüksektir. pK_a değeri ve ilacın total iyonize formu arasındaki ilişki Handerson-Hasselbalch denklemi ile belirlenir. $pH=pK_a$ olduğunda; ilacın iyonize ve non-iyonize formları eşittir.

Hücre membranları, yağda çözünen maddelere ve iyonize forma göre non-iyonize forma daha geçirgendir. Renal tübüler lümeninden geriye diffüzyon, ilaç

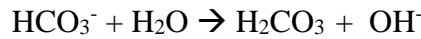
maksimal iyonize iken en düşüktür. Zayıf asit bir ilacın iyonizasyonu, alkali ortamda arttırılabildiğinden, idrar pH manipülasyonu ile renal ekskresyonu arttırılabilir. Asidik bir ilaç için; pH 7.4'e göre, pH 8'deki iyonizasyonu daha yüksektir. Bu nedenle bir zayıf asidin böbrekten atılımı, alkali idrarda daha fazla olmaktadır.

pKa, logaritmik bir fonksiyon olduğundan, teorik olarak, idrar pH'ındaki küçük bir oynama, özellikle pKa değeri kan pH'ına yakın olan ilaçların klirensinde, orantısız olarak çok daha büyük bir etki yaratabilir. Glomerüler filtrasyonun sabit kaldığı varsayılırsa, idrar pH'ındaki her bir birim değişiklik, klirensi on kat arttırılabilir. Bu özellikle kolistin gibi değişmeden tamamen idrardan atılan ilaçlar için önemlidir.

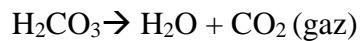
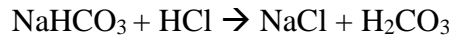
1.5. Sodyum Bikarbonat

1.5.1. Genel Bilgiler

Sodyum bikarbonat (sodyum hidrojen karbonat), formülü NaHCO₃ olan kimyasal bir maddedir. Doğada natürel mineral formda bulunur. Amfoterik bir moleküldür; hem asit hem alkali özellik gösterebilir. Sulu çözeltisi karbonik asit ve hidroksid iyonlarını oluşturması nedeni ile hafif alkalidir.



Sodyum bikarbonat ve bir asit maddenin reaksiyonundan, bir tuz ve karbonik asit meydana gelir. Karbonik asit de, hızla su ve karbon dioksit dekomprese olur. (ör: hidroklorik asit; HCl)



Organizmada asit-baz tamponlaması işinin büyük kısmı, tüm hücrelerde bulunan karbonik anhidraz enziminin fonksiyonu ile gerçekleşmektedir. Karbon dioksit ve suyu hızla reversibl olarak bikarbonat ve protonlara çevirir.

Sodyum bikarbonat, oral ve parenteral formlarda mevcut olup, klinikte çok çeşitli endikasyonlarla yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunlar; metabolik asidoz tedavisi, zayıf asit ilaçların intoksikasyon tedavisi, dispepsi tedavisi, nefrotoksik ajanların etkilerinin nötralize edilmesi, asit natürlü üriner taşların rekürrensini önlenmesi, tümör lizis sendromunda destek tedavisi olarak sıralanabilir.

1.5.2. İdrar alkalinizasyonu

Sodyum bikarbonat desteği ile nefroproteksiyon; intravenöz kontrast madde, yüksek doz metotreksat kullanımı gibi endikasyonlarda güvenle kullanılmaktadır. Alkalinizasyonun, oksijen radikali hasraından koruma potansiyeli nedeni ile, kontrast nefropatisini önlemede, bikarbonat infüzyonunun, yalnız salin infüzyonuna üstünlüğü pek çok randomize kontrollü çalışma ve meta-analizde değerlendirilmiştir. Bu çalışmaların pek çoğunda bikarbonat infüzyonu ile anlamlı olarak daha düşük oranda kontrast madde nefrotoksitesine rastlanmıştır (37-41).

Yine; zayıf asit ilaçlarla olan zehirlenmelerde, bu moleküllerin idrar eliminasyonunu arttırmak için idrar alkalinizasyonu kullanılmaktadır. Bu moleküller; 2,4-D-klorfenoksiasetik asit, klorpropamid, salisilatlar, diflunisal, florid, metotreksat, barbitüratlar (özellikle fenobarbital), sulfonamidler olarak sıralanabilir (41-46). Bununla birlikte; idrar alkalinizasyonu, ürik asit ve sistin taşlarını önlemek için de eskiden beri güvenle kullanılmaktadır (47-49).

Pek çok merkezde kabul gören bir protokol, bu ilaçlardan özellikle metotreksat için mevcuttur. Yüksek doz metotreksat kullanımında, ilacın böbrek tübülüslerinde presipite olarak, ditekt tübüler toksisite yaptığı bilinmektedir. Metotreksatın iki majör metaboliti asit pH'da çok az çözünmektedir. Buna dayanarak yapılan çalışmalarda, ilaç maruziyeti öncesi idrar pH'nın >7 ve üzeri tutulmasının tübüler toksisite insidansında belirgin azalma yaptığı gösterilmiş, onkoloji pratiğinde yaygın kullanıma girmiştir (50,51). Güvenli bir nefroproteksiyon protokolünün kolistin kullanımında da geliştirilmesi, önemli morbidite ve mortalite etkenini ortadan kaldırmanın temel taşı olacaktır.

1.6. Kolistin Nefrotoksisitesinin Önlenmesi Amaçlı Yapılan Çalışmalar

Son yıllarda yapılan hayvan çalışmalarında bu nefrotoksisitenin nasıl önlenebileceği araştırılmıştır. Kolistin maruziyetinin yarattığı doz bağımlı yan etkiözelliklerat çalışmalarında iyi tanımlanmış olup; toksisiteye önlem amaçlı megalin, astaksatin, vitamin E ve askorbik asit gibi moleküller çalışılmıştır (52-54).

Takahiro ve arkadaşları (52); kolistinin tübüler geri alımının, olasılıkla megalin isimli büyük membran endositik reseptörü tarafından gerçekleştiğini öngörmüşlerdir. Bu reseptörün diğer ligandlarını (sitokrom c, kolşisin vb.) kolistin ile uygulamanın kompetatif olarak, tübül geri alımını inhibe edebileceğinden yola çıkarak yaptıkları çalışmada; ratlarda daha azalbuminüri ve daha az idrarda NAG atılımı olduğunu göstermişlerdir.

Zohra Ghilissi ve arkadaşları (54); yine rat modelinde 300.000 ve 450.000 IU/kg/gün dozları ile oluşturdukları nefrotoksisite üzerinde, astaksantin ve E vitamininin antioksidan etkilerini araştırmışlardır. Düşük doz kolistin ile yalnız histopatolojik değişiklikler izlenmiş olup, antioksidanlardan tama yakın fayda sağlanabileceği saptanmış olup; yüksek doz verilen ratlarda oluşan histopatolojik değişikliklerde yalnız parsiyel düzelme sağlayabimışlerdir.

Yousef ve arkadaşları; rat modelinde kümülatif 36.5 mg/kg kolistin dozu ile oluşturulmuş nefrotoksisitenin, 200 mg/kg askorbik asit ile önemli seviyede azaltılabileceğini göstermiştir. Yine aynı yazarlar başka bir çalışmada melatonin kullanmanın da kolistin toksisitesini azaltacağını göstermişlerdir.

Bu çalışmalarda kullanılan maddeler klinik kullanımdan uzak olup, daha gerçekçi koruma yöntemleri ile ilgili çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

2. AMAÇLAR VE RAT ÇALIŞMA MODELİ

Kolistinin yeniden klinik kullanımda önem kazanması ile birlikte, araştırmacılar, son on yılda ilacın toksisite mekanizmaları ve önlenmesi üzerinde durmaktadırlar. Özellikle rat modelinde çalışmalar yoğunlaşmış olup, literatürde geniş veri tabanı mevcuttur. (55-58)

Bu çalışmada; rat modelinde idrar alkalinizasyonu ile, zayıf bir asit olan kolistinin idrardaki çözünürlüğünün artırılması ve nefrotoksitesinin önlenmesindeki etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Ratlarda kolistin plazma proteinlerine %55 oranında, insanlarda ise %15 oranında bağlanmaktadır (4). İnsanda normal böbrek fonksiyonu ile tercih edilen terapötik doz 150.000 IU/kg/gün olmakla beraber; rat modelinde benzer toksisite yaratmak için 300.000, 450.000 IU/kg/gün (55) ve 750.000 IU/kg/gün dozları kullanılmıştır (56). Rat modelinde nefrotoksisite saptanmasında, beşeri olarak kullanılan serum kreatininin kullanımının sınırlı olmasından ötürü, çalışmalarda öncelikli olarak; histopatoloji, idrar ve serum örneklerinden saptanan duyarlı proteinlerden yararlanılmaktadır. Bu proteinlerden en yaygın kullanılanlar; idrar n-asetilglukozaminidaz (NAGase) ve serum kidney injury molecule-1 (KIM-1)'dir (55-59).

Rodentlerde farklı endikasyonlar ile idrar alkalinizasyonu endikasyonu mevcuttur. En yaygın kullanım alanı ürik asit taşı önlenmesidir (57). Ayrıca literatürde ratlarda sodyum bikarbonat ile idrar alkalinizasyonu; kontrast nefropatisi, doksorubisin toksisitesi, laktik asidoz tedavisi amacı ile de kullanılmıştır (58,59). Bu çalışmada; benzer bir model, kolistin nefrotoksitesini önlemek için kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Laboratuvar Koşulları, Çalışma Planı ve Materyalin Toplanması

Sprague Dawley ratlar; Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleleri Laboratuvarı'ndan sağlandı. Ratlar çevresel olarak kontrollü ortamda barındırıldı (sıcaklık $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 saat aydınlık/karanlık siklusu). Hayvanlar, dört gruba ayrılarak, her grup standartlara uygun ayrı kafeslerde tutuldu. Tüm ratların serbest su ve yiyecek erişiminde olması sağlandı. Besin olarak, hijyenik, standartlara uygun tam besin içerikli laboratuvar yemi kullanıldı.

Çalışmada kullanılacak kolistin preparatı "Colimycin 150 mg I.M./I.V. flakon" ; 6 cc sterildistile su ile çözülerek hazırlandı. Flakon içeriğinde 4.500.000 IU kolistine eşdeğer kolistimetat sodyum mevcut olup, serumda kendiliğinden aktif form kolistine dönüşmektedir.

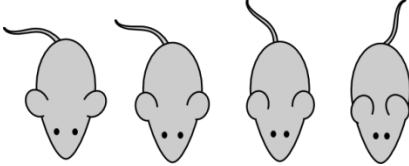
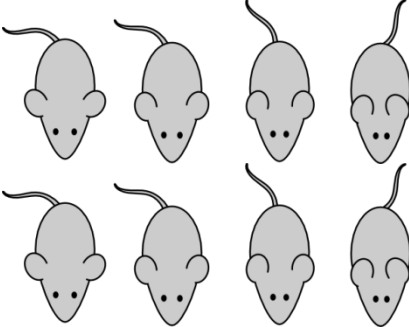
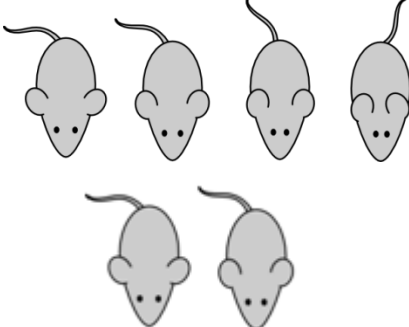
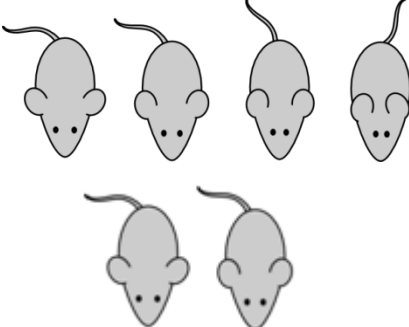
Grup I'e (kontrol); günde 2 defa 0,1 cc intramuskülersterildistile su enjekte edildi.

Grup II'ye (kolistin grubu); günlük tartılarına göre 750000 IU/kg/gün, 12 saat ara ile iki bölünmüş dozda intramusküler kolistin enjeksiyonu (hayvanın her 100 gr tartısı için; 0,05 cc/100 mg/ doz çözelti intramusküler) yapıldı. Bu doz; rat üzerinde kolistin nefrotoksisitesi ile ilgili yapılan çalışmalarda kullanılan en yüksek tolere edilebilir dozdur. (4,5)

Grup III'ün (kolistin ve bikarbonat grubu); idrar pH düzeyini >7 yapana kadar, rat için bilinen toksik dozların altında kalan seviyeler göz önüne alınarak (rat için akut oral sodyum bikarbonat LD50:4000 mg/kg) içme suyunun içinde, sodyum bikarbonat verildi. İçme suyunun sodyum bikarbonat derişimi daha önce ratlarda idrar alkalinizasyonu için başarı ile kullanılmış olan dozda belirlenmiştir(6). Bu doz; 0.15 mol/L (12,6 mg/L) olup; ratların günlük su ihtiyacı (30 - 50 cc) göz önüne alınınca toplamda maksimum 630 mg/gün sodyum bikarbonata eşittir. Günlük olarak mesane sıvazlama ile elde edilen idrar, Roche Combur 10 Test ® marka dipstickile hayvan başında pH ve dansite açısından tahlil edildi. İdrar pH'mı alkali yapıp; uygun sodyum bikarbonat derişimi yakalandı ve idame ettirildi. Bu gruptaki hayvanlara, idrar pH'ı > 7 olduktan sonra, günlük tartılarına göre Grup II ile aynı dozda intramusküler kolistin enjeksiyonu yapıldı. Hayvanların ayrıca günlük idrar dansitesi

ölçüldü, sodyum bikarbonat tüketimine sekonder hidrasyonlarını yaklaşık iki kat arttırdıkları ve idrar dansitelerini 1005-1010 civarına düşürdükleri gözlemlendi.

Grup IV (kolistin ve NaCl grubu)'nun, grup III'ün günlük dipstick idrar dansitesini yakalayacak şekilde hidrate olması hedeflendi. Bu amaçla içme sularına NaCl eklendi. Başlangıç olarak 12,6 mg/L NaCl kullanıldı, idrar dansiteleri 1005-1010 arası olacak şekilde günlük doz ayarlaması yapıldı. Ratların idrar dansiteleri hedefe ulaştıktan sonra günlük tartılarına göre Grup II ve Grup III ile aynı dozda günde iki defa intramusküler kolistin uygulandı. (Şekil 3.1)

Grup I (n=4)	Grup II (n=8)
	
“Kontrol grubu”	“Kolistin grubu”
<i>7 gün, 12 saat aralık ile intramusküler distile su enjeksiyonu.</i>	<i>7 gün, 12 saat aralık ile intramusküler 750.000 IU/kg/gün kolistin enjeksiyonu.</i>
Grup III (n=6)	Grup IV (n=6)
	
“Kolistin ve bikarbonat grubu”	“Kolistin ve NaCl grubu”
<i>İdrar pH> 7 olduktan sonra; 7 gün, 12 saat aralık ile intramusküler 750.000 IU/kg/gün kolistin enjeksiyonu.</i>	<i>İdrar dansiteleri grup II'ye benzer (1005-1010) olduktan sonra; 7 gün, 12 saat aralık ile intramusküler 750.000 IU/kg/gün kolistin enjeksiyonu.</i>

Şekil. 3.1.Çalışma grupları

Tüm ratlerin idrar pH'ları ve dansiteleri günlük olarak değerlendirilip, grup III'ün idrarının idame sodyum bikarbonat verilerek sürekli alkali tutulması, grup IV'ün de grup III ile benzer dansitede tutulması hedeflendi. Tüm ratların günlük su tüketimleri ölçülü suluk yardımı ile takip edildi.

Yedi günlük kolistin enjeksiyonunu tamamlayan (14 doz) hayvanlara, uzman veteriner hekim eşliğinde, inhaler sevofluran uygulanarak, tam anestezi sağlandı. Kalp ponksiyonu ile kan örnekleme yapıldı. Serum örnekleri 3000 devir/dakika, 10 dakika santrifüj edilerek; süpernatantları +4°C' de maksimum 24 saat olacak şekilde muhafaza edildi.

Ratların idrar ve serum örneklerinin bir kısmı ileride olası çalışmalarda kullanılmak üzere -80°C'de muhafaza edildi.

3.2. Böbrek Preparatlarının Hazırlanması ve Histopatolojik İnceleme

Ötenazi sonrası histopatolojik inceleme yapılmak üzere deney hayvanlarının böbrekleri çıkartıldı, uygun taze kesiler yapılarak, %10 luk tamponlu formaline aktarıldı. Formalinde 48 saat süre ile tespit edildi. Doku takibi sonrası örnekler parafine gömüldü. 3 mikrometre kalınlığında kesitler alındı. Kesitler deparafinize edildi. Hematoksilen eosin boyama uygulandı. Böbrek kesitleri ışık mikroskobu (Leica DM 6000B trinokuler upright araştırma mikroskobu) ile incelendi. DC 490 renkli digital kamera ile görüntüler elde edildi. Tübüler dejenerasyon; Tübüler dejenerasyon Tablo-A'daki skorlama sistemi kullanılarak 0 ila 5 arasında derecelendirildi. Bu skorlama için Keirstead ve arkadaşlarının daha önce kolistin nefrotoksisitesini araştıran rat çalışmasında önerdikleri sınırlar referans alındı (57).

Tablo 3.1.Tübüler dejenerasyon skorlama sistemi, *Keirstead ve ark.*

Skor	Tübüler Dejenerasyon Derecesi	Histolojik Bulgular
0	Normal	Normal yapıda böbrek tübül epitel hücreleri
1	Minimal	Parlak eozinofilik sitoplazma, piknotik nükleus içeren hücreler
2	Hafif	Tübül lümenine dökülmüş hücreler ve protein silendirler, piknotik nükleus içeren hücreler
3	Orta	Piknotik nükleusu olan, 2-3 dejenere hücreden oluşan kümeler ve protein silendirler
4	İlımlı	Dejenere hücrelerin oluşturduğu büyük kümeler ve kordonlar, kromatinin tamamen kaybı, birçok tübülün etkilendiği hasar
5	Belirgin- Ağır	Tübüllerin çoğu dejenere hücre kordonları tarafından etkilenmiş ya da bütün tübüllerde dejenerasyon

3.3.Serum Üre ve Kreatinin Çalışması

Uygun koşullarda muhafaza edilen serum örneklerinden, kreatinin ve üre değeri, 24 saat içinde; Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Merkez Laboratuvarı'nda çalışıldı. Üre ve kreatinin ölçümü için Erba Mannheim® marka enstrümanlar ve yine Erba Mannheim Crea 275 ve Urea 275® reaktifleri kullanıldı.

3.4.Güç Analizi

Bu çalışmada, grup içi varyasyon katsayılarının yaklaşık %10 olduğu, çalışma parametrelerinde iki grup arasındaki en az %20'lik bir farkın (örneğin kreatinin için 0.02mg/dL'lik bir fark) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde gösterilmesinin hedeflendiği düzende, %90 güç, %5 tip-1 hata ile her grupta en az 6 ratın sonuçlarının analize alınması gerektiği hesaplandı. Her grupta 6, kontrol grubunda 4, toplam 22; olası kayıplar göz önüne alınarak toplam 24 ratın çalışmada kullanılması hedeflendi.

3.5. İstatistiksel Analiz

Çalışmanın sayısal verileri ortalama ve standart sapma; kategorik veriler, frekans ve yüzde ile gösterildi. Çalışma grupları arasında yapılan istatistiksel karşılaştırmalarda ikiden fazla bağımsız grup arası analizler Kruskal-Wallis, iki grup arasındaki analizler ise Mann-Whitney U ile gerçekleştirildi. Post-hoc analizler için Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Çalışmanın analizlerinin anlamlılık sınırı 0,05 olarak kabul edildi.

3.6. Etik Kurul Onayı

Çalışmaya ait etik kurul onayı; 10.03.2015 tarihli Hacettepe Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurul toplantısından, 2015/23-02 karar numarası ile alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1.Serum üre ve kreatinin değerleri

Yedi günlük çalışma sonunda histopatolojik değerlendirmeye ek olarak hayvanların kardiyak ponksiyonu ile elde edilen kan örneklerinden, serum üre ve kreatinin değerleri çalışıldı. Üre ve kreatinin değerleri Tablo4.2’de sunulmuştur.

Tablo4.2.Serum üre ve kreatinin değerleri

	Rat	Üre (mg/dL)	Üre Ort±SS*	Pdeğeri	Kreatinin (mg/dL)	Kre atinin Ort±SS	Pdeğeri
Grup I	1	48,40	40,55±6,24	<i>0,046</i>	0,72	0,68±0,08	<i>0,131</i>
	2	42,00			0,76		
	3	33,70			0,62		
	4	38,10			0,60		
Grup II	1	40,10	62,11±42,69		0,64	0,68±0,33	
	2	41,60			0,54		
	3	48,70			0,55		
	4	48,00			0,53		
	5	166,80			1,50		
	6	45,00			0,53		
	7	47,60			0,56		
	8	59,10			0,62		
Grup III	1	45,40	62,3±16,28		0,57	0,56±0,08	
	2	41,70			0,68		
	3	77,70			0,55		
	4	79,60			0,58		
	5	58,90		0,54			
	6	70,50		0,42			
Grup IV	1	42,50	120,94±54,17	0,43	1,06±0,65		
	2	42,40		1,52			
	3	165,60		0,77			
	4	144,60		2,15			
	5	164,60		0,92			
	6	87,40		0,57			

Grup I (kontrol grubu)

Grup II (Kolistin grubu)

Grup III (Kolistin ve bikarbonat grubu)

Grup IV (Kolistin ve NaCl grubu)

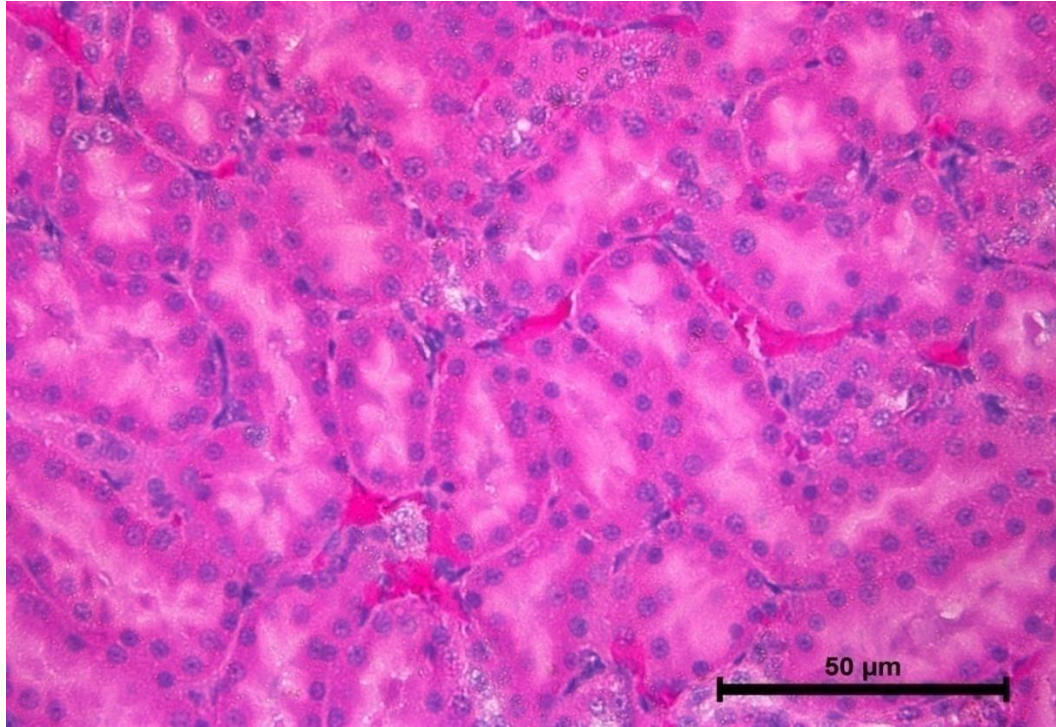
*Ort±SS: ortalama ve standart sapma

Gruplar arası kreatinin değerleri anlamlı farklılık oluşturmazken, üre değerinde sınırdaki farklılık saptanmıştır. Ancak, üre sonuçları tübüler hasar skoru ile karşılaştırıldığında klinik korelasyon göstermemektedir. Ağır tübül hasarı gösteren Grup II'ün üre değerleri, hafif hasar tespit edilen Grup III ve IV'e göre düşük olarak saptanmıştır.

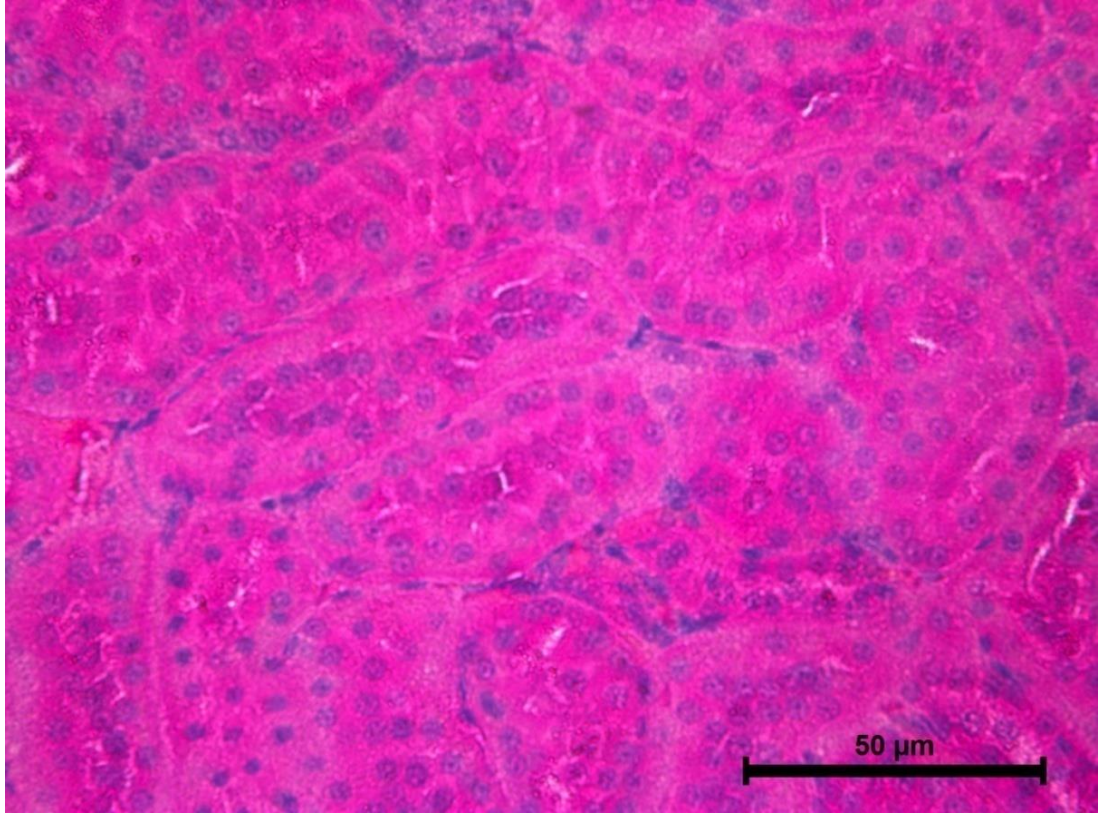
4.2. Histopatolojik İnceleme

24 ratın çıkarılan böbreklerinden hazırlanan örnekler ışık mikroskopi ile değerlendirildi. Tübüler dejenerasyon Tablo 3.1'deki skorlama sistemi kullanılarak 0 ila 5 arasında derecelendirildi.

4 rattan oluşan 1. gruba ait böbrek materyalinde normal yapıda tübülepitel hücreleri izlenirken; vakuolizasyon, silendir, nekroz intersitisyel ödem veya infiltrasyon gözlenmedi. 4 biyopsi "0.derece" olarak skorlandı (random iki farklı preparat örneğinden; Resim 4.1,4.2).

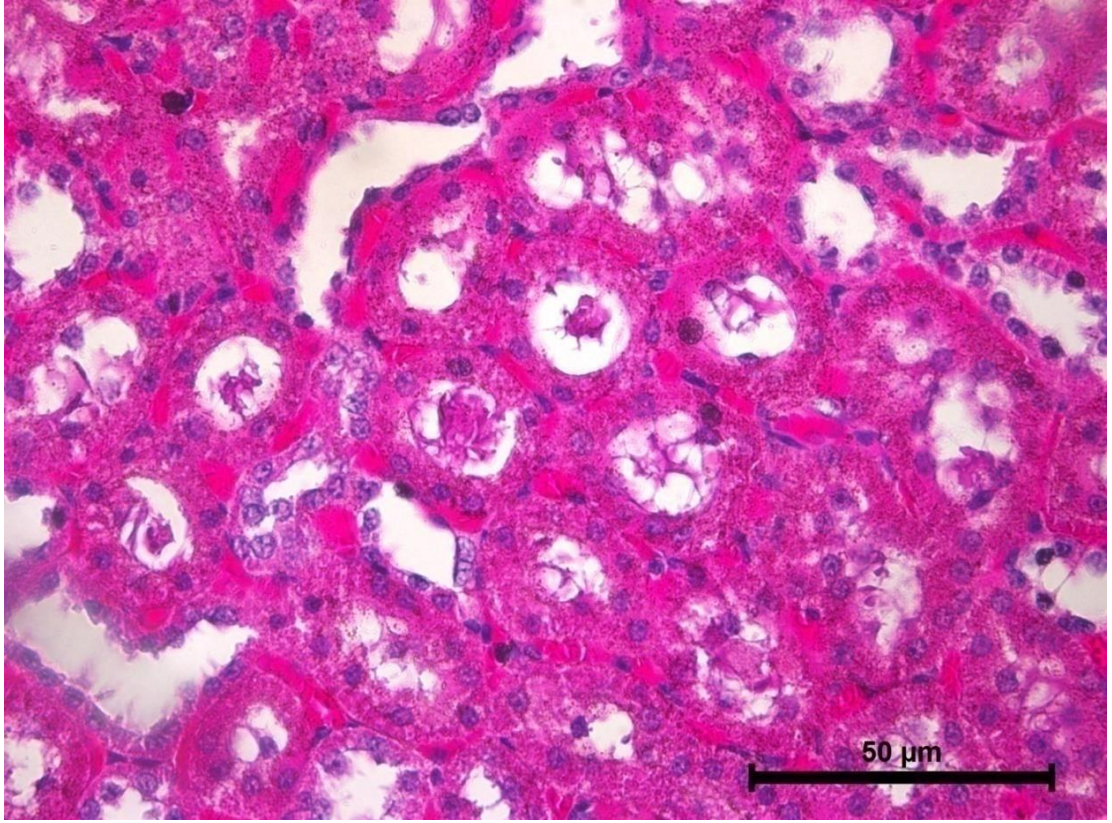


Resim 4.1.Normal yapıda tübülepitel hücreleri. Renal korteks ×40 objektif H&E

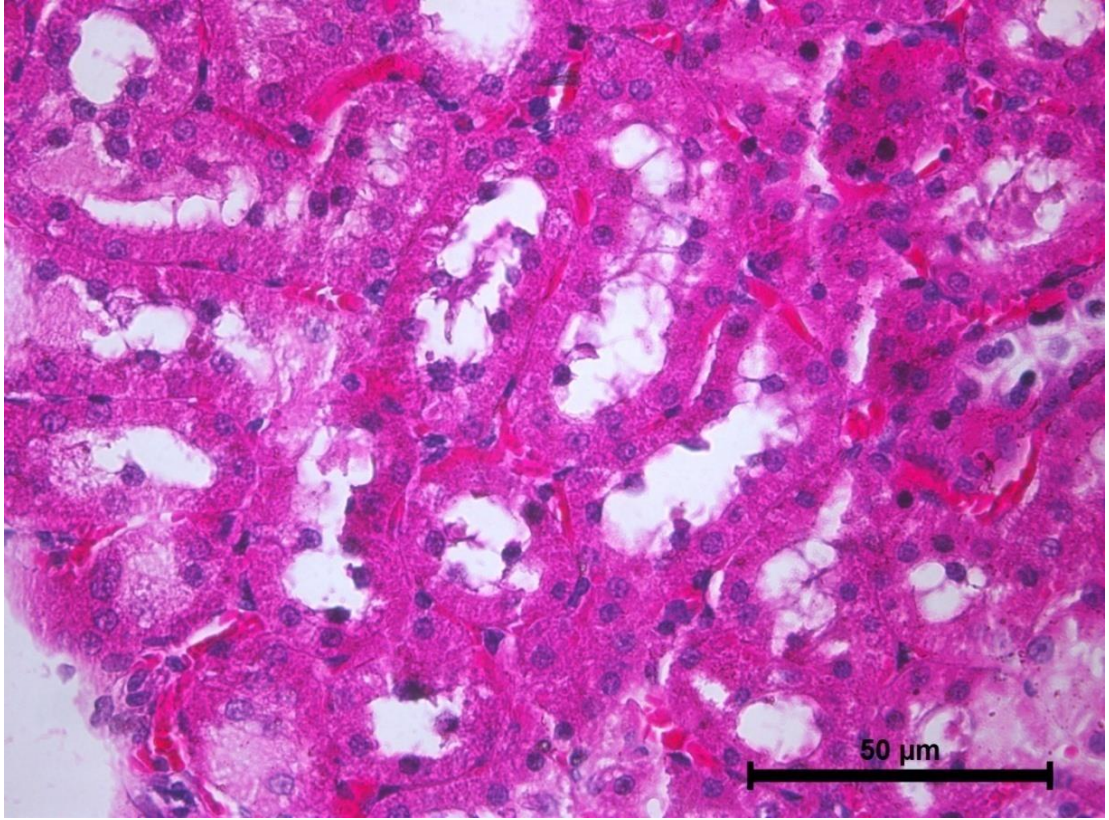


Resim 4.2.Normal yapıda tübülepitel hücreleri,renal korteks×40 objektif H&E

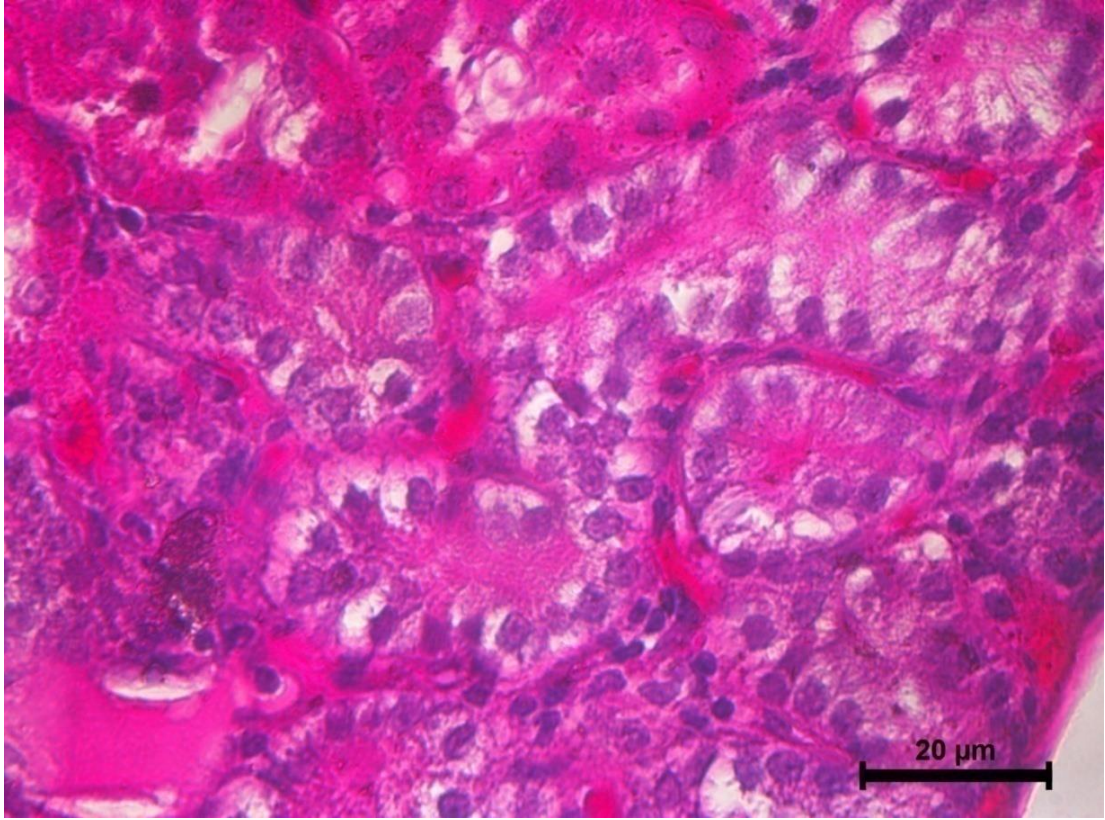
2. gruba ait 8 biyopsi materyalinde orta- ağır (3-5 derece) arasında değişen oranlarda tübülerdejenerasyon izlendi.Lümene dökülmüş tübülepitel hücreleri,yer yer epitelde incelme, tübül lümenlerinde genişleme, vakuolizasyon, silendir varlığı, damarlarda konjesyon bulguları, yer yer tübülepitelinde bazal membrandan ayrışma, nekroz , piknotiknükleuslar , interstisyel ödem izlendi (Resim4.3-9).



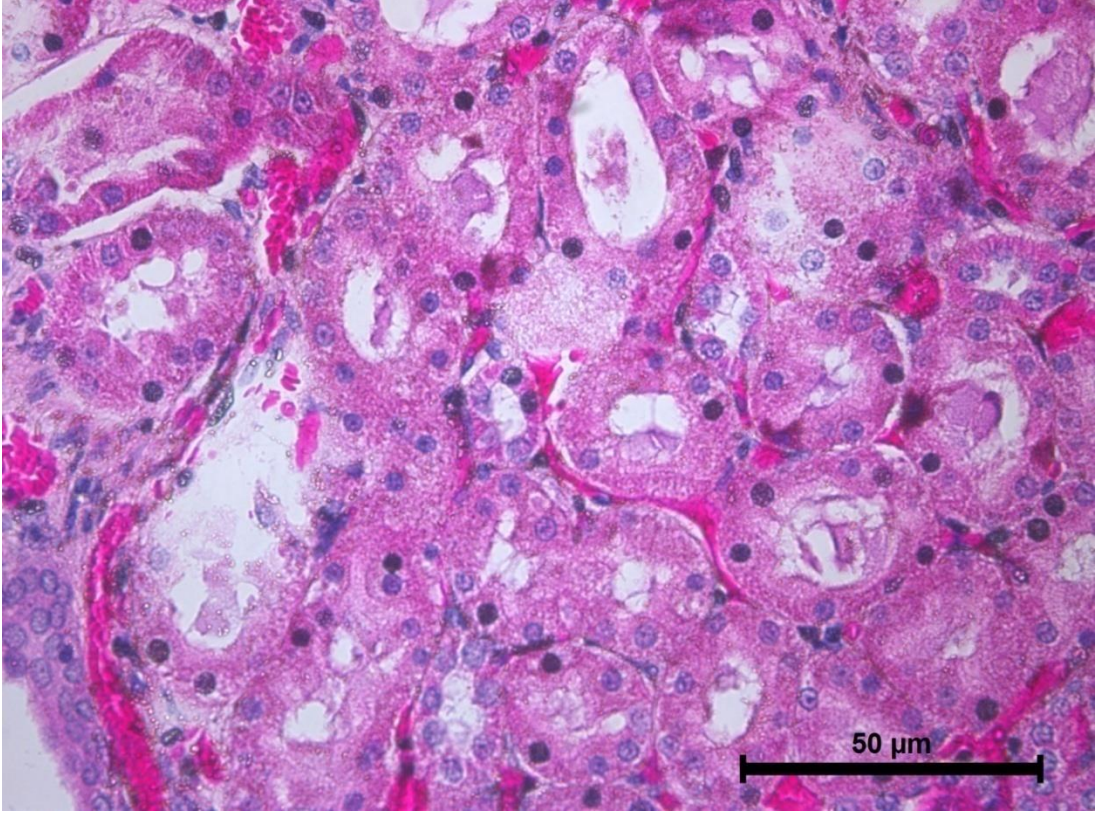
Resim4.3. Tübül lümeninde silendir, epitelde incelme, böbrek materyali $\times 40$ objektif H&E



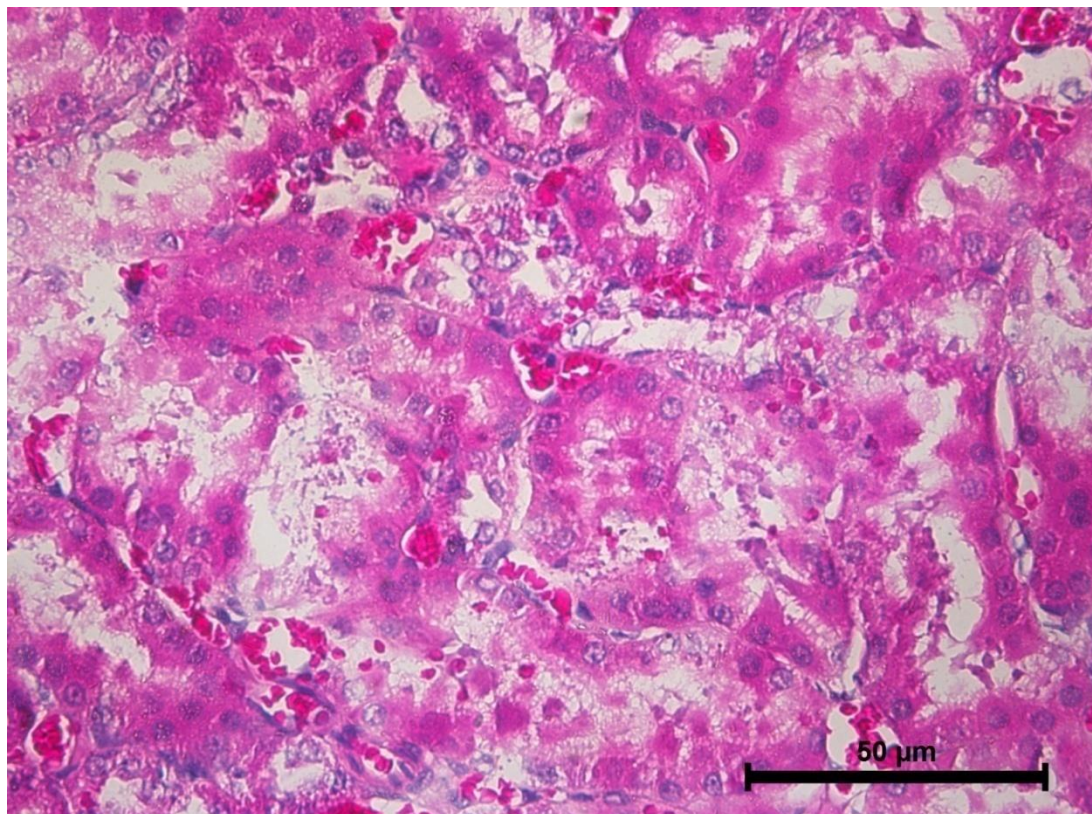
Resim 4.4.Tübül lümenine dökülmüş epitelyum hücreleri, vakuolizasyon, böbrek materyali $\times 40$ objektif H&E



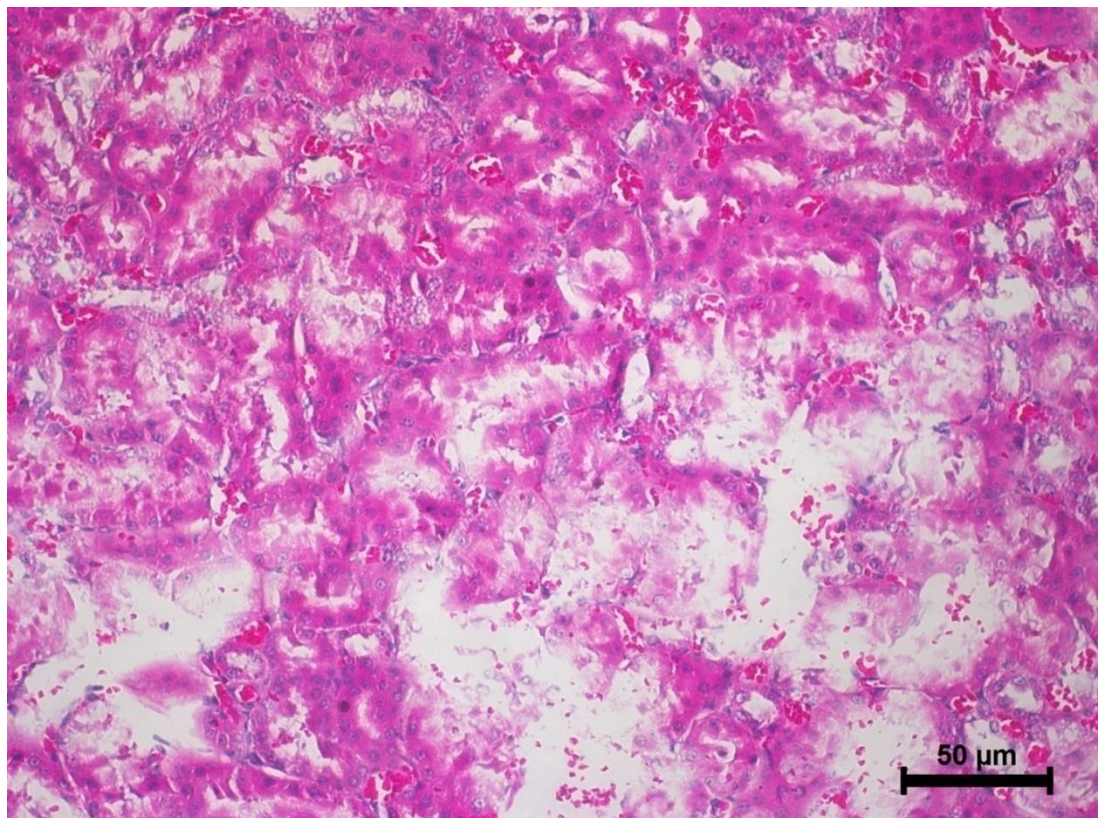
Resim4.5. Vakuolizasyon, renal korteks. $\times 63$ objektif H&E



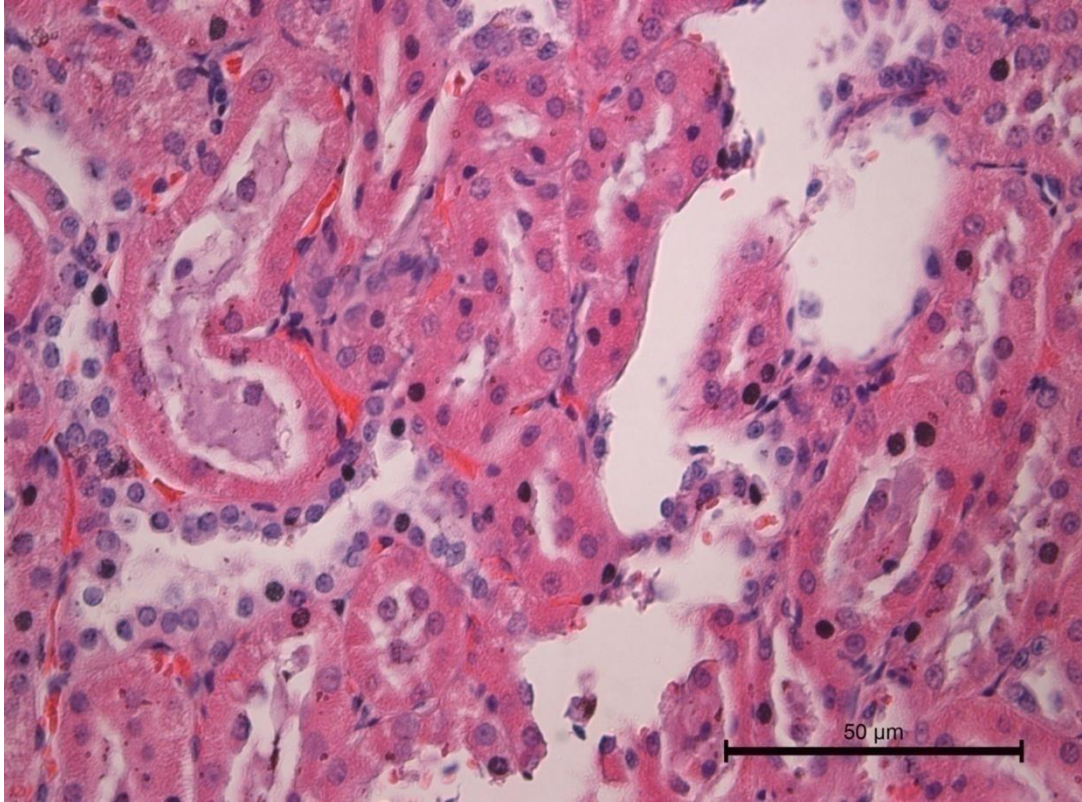
Resim 4.6.Tübül lümenine dökülmüş epitelyum hücreleri , nekroz , renal korteks ×40 objektif H&E



Resim 4.7.Nekroz, renal korteks $\times 40$ objektif H&E

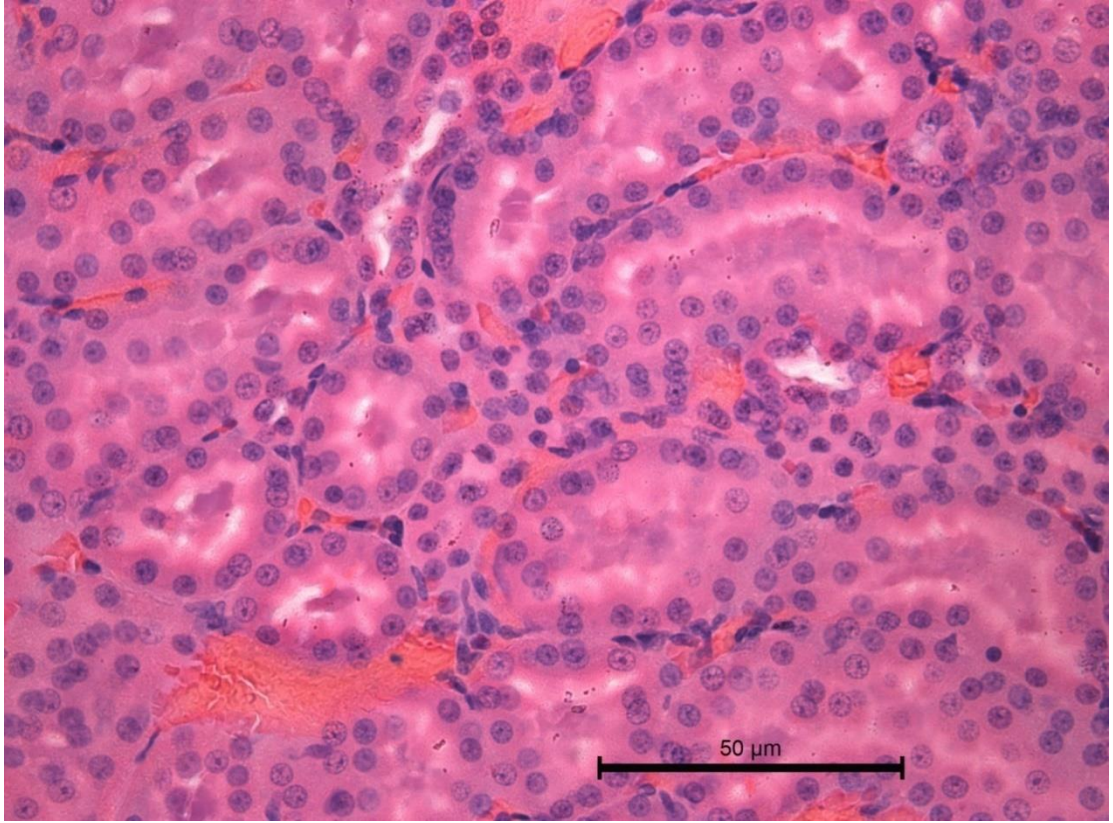


Resim 4.8. Nekroz, renal korteks $\times 20$ objektif H&E

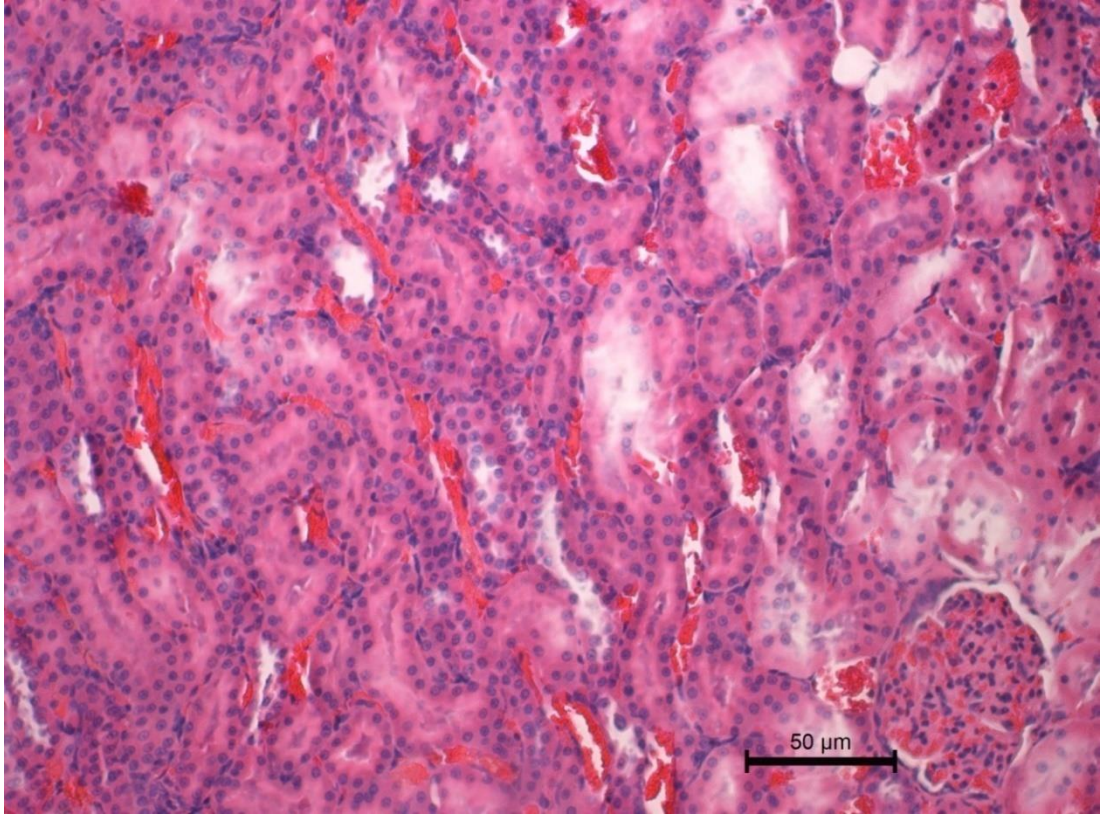


Resim4.9.Tübülepitelinin bazal membrandan ayrışması, renal korteks ×40 objektif H&E

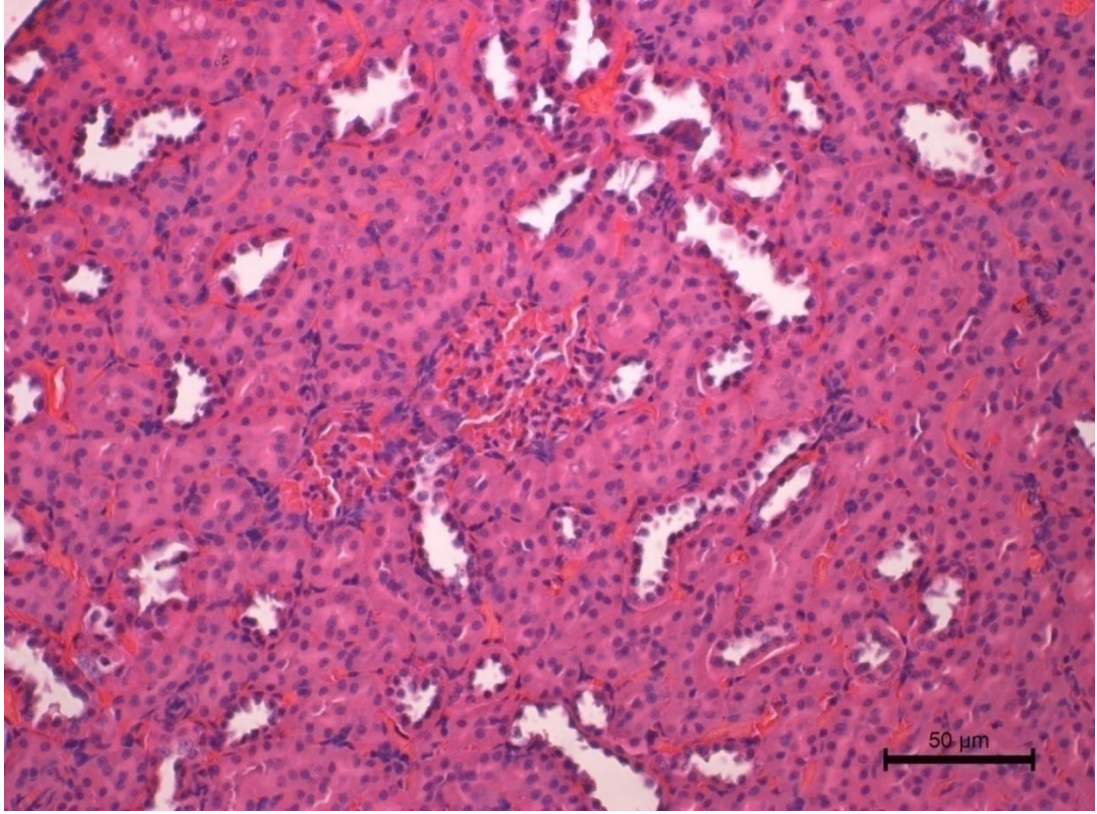
3. gruptaki 6 adet ratın böbrek materyalinde hafif- ılımlı artmış (1-4 derece)tübülerdejenerasyon izlendi. Daha az tübülün etkilendiği, epitel hücrelerinde dökülme, epitelde incelme, bazal membrandan ayrılma, eozinofili, tübül lümenlerinde daha soluk bazofilik boyanan birikimler, daha az sayıda silendir varlığı,vakuolizasyon ve nekroz (altı ratın ikisinde olmak üzere) saptandı. (Resim4.10-13)



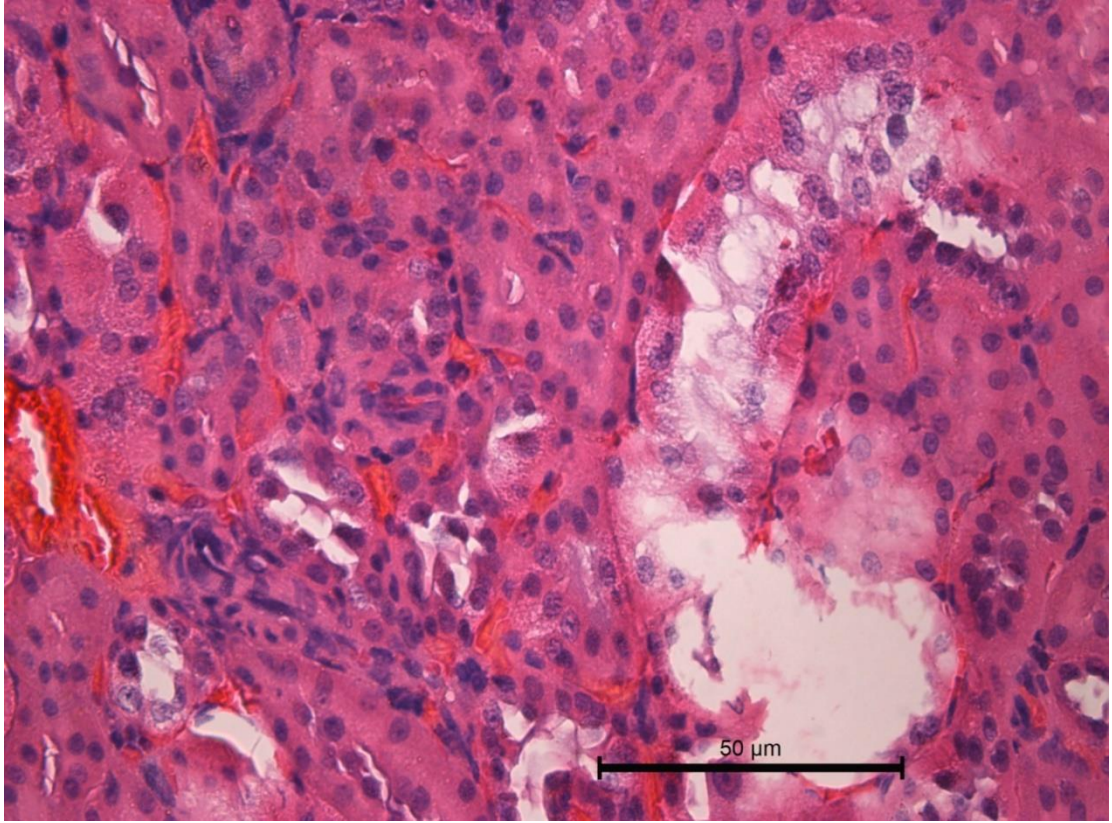
Resim 4.10. Tübüllümeninde bazofilik birikimler, silendir, böbrek kesiti $\times 40$ objektif H&E



Resim 4.11. Nekroz, böbrek kesiti $\times 20$ objektif H&E

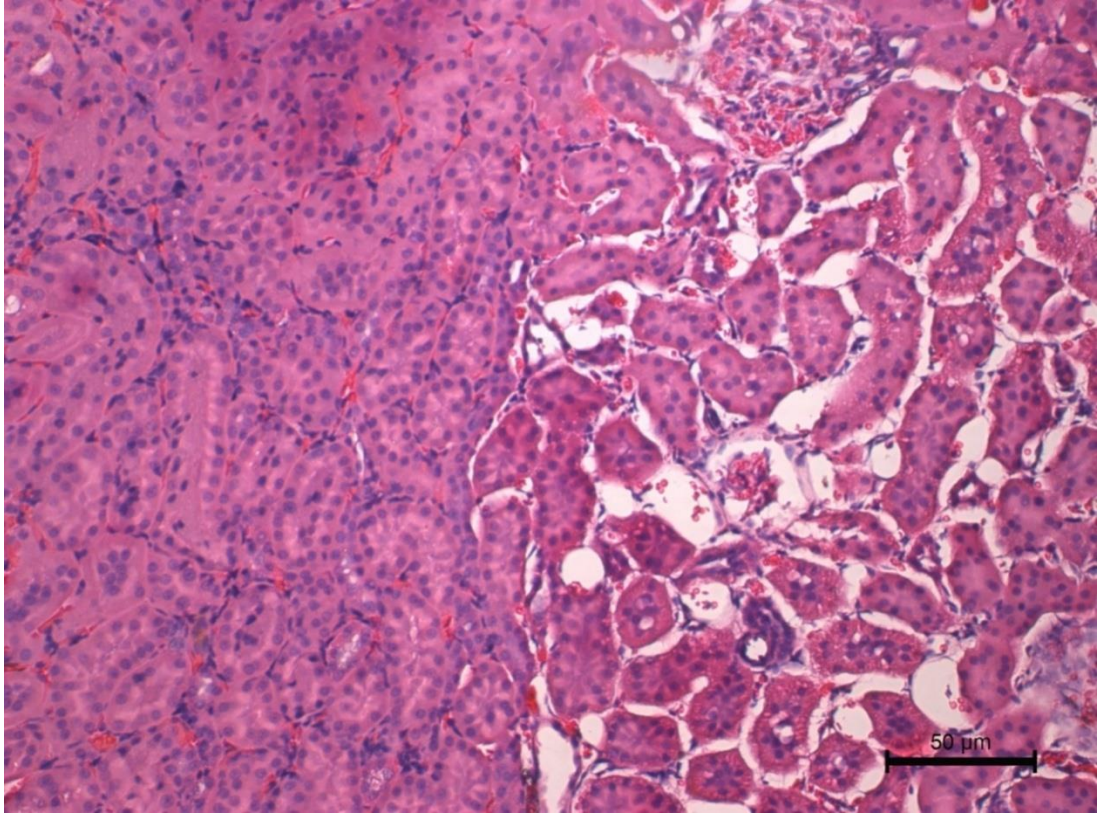


Resim 4.12.Tübülepitelinde incelme, böbrek kesiti $\times 20$ objektif H&E

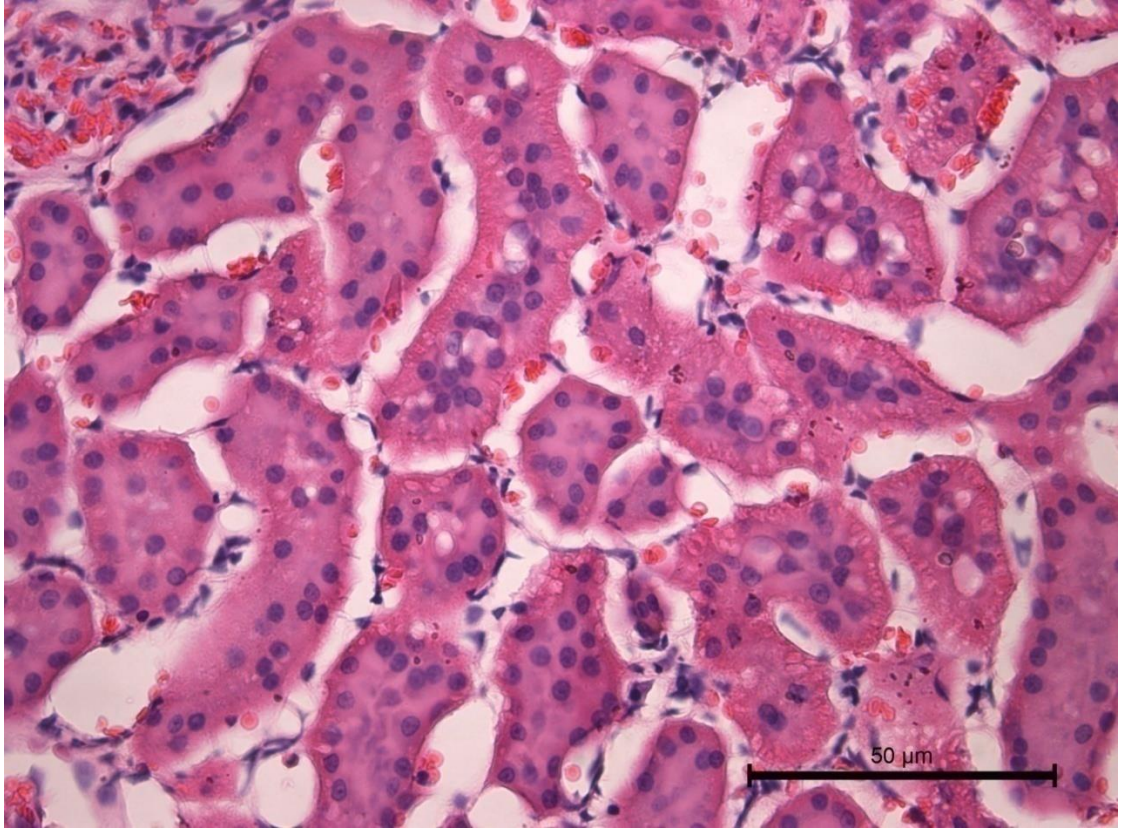


Resim 4.13.Tübülepitelindevakuolizasyon, nekroz, böbrek kesiti $\times 40$ objektif H&E

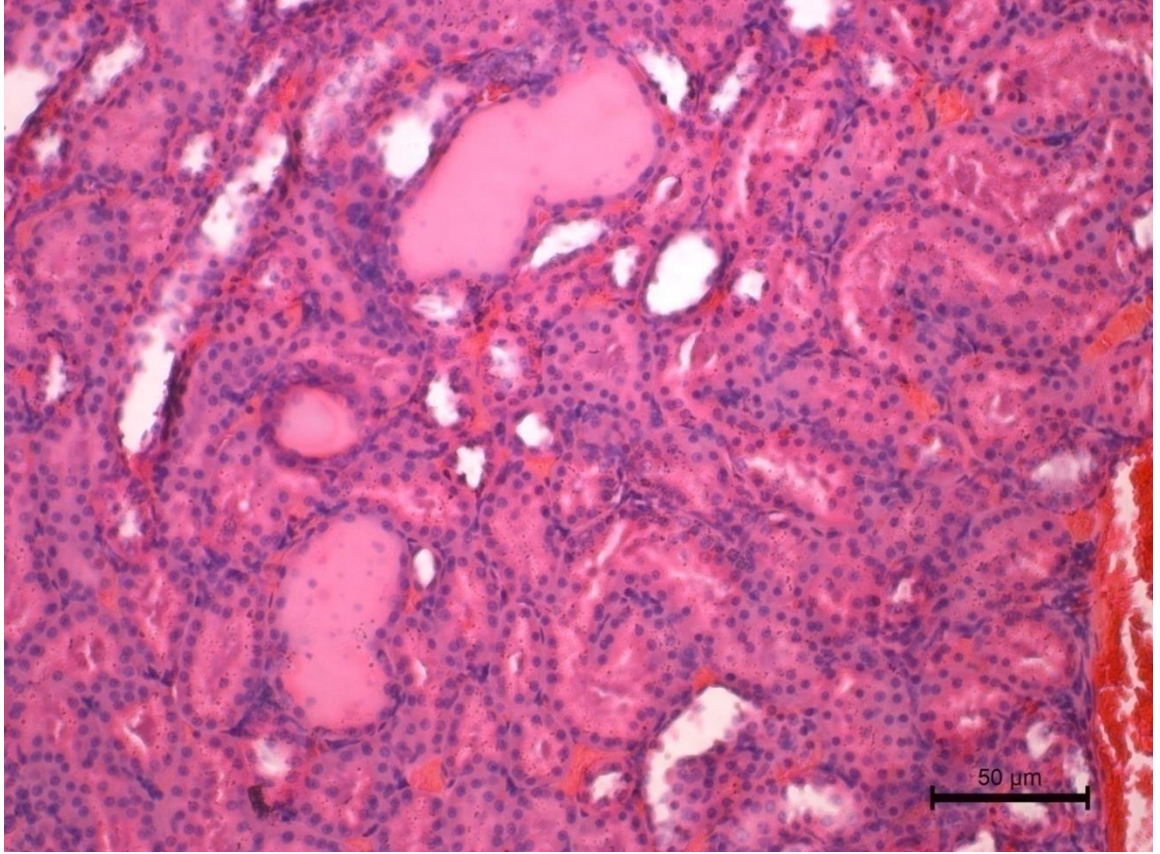
4.gruba ait 6 ratın böbrek materyalinde az sayıda tübüldilatasyon, dilate olan tübüllerin bazılarının epitel hücreleri arasında ayrışma, hafif eozinofiliktübül epitelyum hücreleri, bazı alanlarda interstisyel ödem izlendi. Tübülepitelinin yer yer inceldiği ve bazı tübüllerin lümeninde dökülmüş hücrelere ait piknotik çekirdekler ve eksudatif materyal izlendi.(Resim: 14-16)



Resim 4.14. Mikrograftta sağ alanda belirgin interstisyel ödem, böbrek biyopsi $\times 20$ objektif H&E



Resim 4.15. İnterstisyelödem ,tübüller arasındaki mesafede artış, böbrek kesiti $\times 40$ objektif H&E



Resim 4.16.Lümeninde piknotik çekirdekler ve eksudatif materyal izlenen tübüller, böbrek biyopsi, $\times 40$ objektif H&E

Grupların tübüler dejenerasyon skorlaması aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.
(Tablo 4.3)

Tablo4.3.Tübüler dejeneraston skor sonuçları

GRUPLAR	RAT	TÜBÜLER DEJENERASYON SKORU	Ort±SS*	<i>p</i>
Grup I	1	0	0	<0,001
	2	0		
	3	0		
	4	0		
Grup II	1	3	4,25±0,89	
	2	5		
	3	4		
	4	3		
	5	5		
	6	4		
	7	5		
	8	5		
Grup III	1	4	2±1,26	
	2	1		
	3	3		
	4	2		
	5	1		
	6	1		
Grup IV	1	1	1,5±0,55	
	2	1		
	3	2		
	4	1		
	5	2		
	6	2		

I: Grup I (kontrol grubu)

II: Grup II (Kolistin grubu)

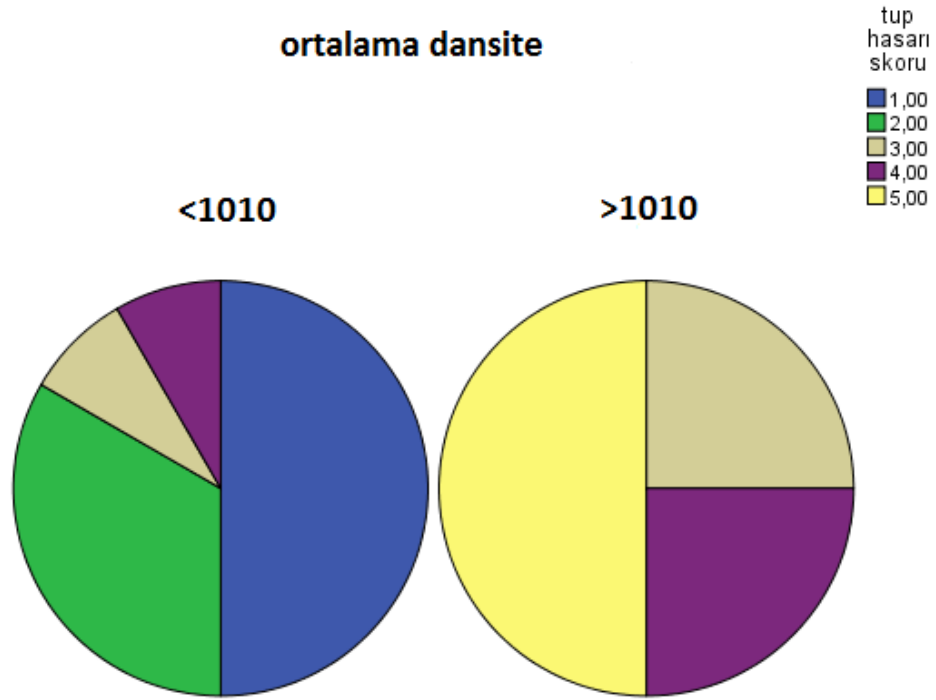
III: Grup III (Kolistin ve bikarbonat grubu)

IV: Grup IV (Kolistin ve NaCl grubu)

*Ort±SS: ortalama ve standart sapma

4.3. Üriner dansitenin tübüler dejenerasyon skoru ile ilişkisi

Günlük ölçülen üriner dansite ile tübüler dejenerasyon skorunun gruplardan bağımsız karşılaştırılması Tablo 4.4'te gösterilmiştir. Üriner dansite ölçümü <1010 olan ratlarda tübüler dejenerasyon yoğunlukta 1 – 2 olarak skorlanırken, dansitesi >1010 olan ratlarda tübüler dejenerasyon yoğunlukta 3-4-5 olarak skorlanmıştır. Bu ilişki istatistiksel olarak korelasyon göstermektedir ($p=0,001$). Yine ortalama idrar dansitesi ile tübüler dejenerasyon skoru korelasyonu, grafik olarak, Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Ortalama dansiteye göre tüp skoru dağılımı geafiği Şekil4.3'te gösterilmiş olup; dansitesi düşük grubun skorlarının daha iyi olduğu gözlenmektedir.



Şekil 4.3. Ortalama dansiteye göre tüp hasarı skorunun dağılımı grafiği

4.4.Üriner dansitenin serum biyokimyası ile ilişkisi

Yedi günlük ortalama dansitenin, kreatinin ve üre değerleri ile anlamlı korelasyonu saptanmadı (sırası ile $p=0,593$ ve $0,172$) (Tablo4.5).

Tablo4.5. Ortalama idrar dansitesi ve serum biyokimyası ilişkisi

Ortalama dansite	kreatinin (mg/dL)		üre (mg/dL)
	r	-0,127	-0,327
	p	0,593	0,172

4.5.Grupların günlük idrar değerleri ve deney sonuçlarının istatistiksel değerlendirmesi (Tablo-6)

Gruplar arası farklılıklar; günlük idrar pH değerleri, günlük idrar dansite ölçümleri, serum kreatinin ve üre değerleri ve tübüler dejenerasyon skorları açısından değerlendirildi. 7 günlük idrar pH'ı açısından, gruplar arası farklılık istatistiksel olarak anlamlı bulundu.Grup I, II ve IV'ün günlük idrar pH değerleri <7 iken; Grup III pH değeri >8 olarak belirlendi. Grupların günlük idrar dansite ölçümlerinin de gruplar arası anlamlı farklılık gösterdiği saptandı. Grup I ve Grup II'nin günlük idrar dansiteleri >1010; Grup III ve IV'ün idrar dansiteleri <1010 olarak seyretti.

Tablo 4.6. Çalışma bulguları, sonuçları ve istatistiksel analiz

	I	II	III	IV	I,II,III ve IV	II, III ve IV	III ve IV	II ve III	II ve IV
	Ort±SS*	Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>	<i>p</i>
1. gün idrar pH	6,5±0,58	7±0,53	8,08±0,74	6,33±0,41	0,003	0,002	0,005	0,011	0,021
2. gün idrar pH	6,88±0,63	6,38±0,44	8,67±0,26	6,58±0,49	0,002	0,002	0,003	0,001	0,406
3. gün idrar pH	7,13±0,48	6,63±0,35	8,58±0,49	6,83±0,26	0,001	0,001	0,003	0,002	0,248
4. gün idrar pH	6,5±0,58	6,19±0,26	8,83±0,26	6,5±0,45	0,002	0,001	0,003	0,001	0,157
5. gün idrar pH	6,63±0,63	6,5±0,38	8,83±0,26	6,67±0,41	0,003	0,002	0,003	0,001	0,406
6. gün idrar pH	6,38±0,25	6,5±0,46	8,58±0,38	6,33±0,26	0,003	0,002	0,003	0,002	0,489
7. gün idrar pH	6,63±0,25	6,56±0,42	8,5±0,45	6,33±0,41	0,002	0,002	0,003	0,002	0,305
1. gün idrar dansitesi	1018,75±6,29	1016,88±3,72	1008,33±2,58	1012,5±2,74	0,005	0,003	0,030	0,003	0,039
2. gün idrar dansitesi	1017,5±5	1019,38±6,23	1007,5±2,74	1007,5±2,74	0,004	0,007	0,999	0,009	0,009
3. gün idrar dansitesi	1013,75±4,79	1019,38±4,17	1007,5±4,18	1006,67±2,58	0,001	0,001	0,847	0,003	0,002
4. gün idrar dansitesi	1016,25±4,79	1023,13±2,59	1006,67±2,58	1008,33±4,08	<0,001	0,001	0,465	0,001	0,001
5. gün idrar dansitesi	1017,5±5	1020±4,63	1007,5±2,74	1008,33±4,08	0,001	0,001	0,789	0,002	0,003
6. gün idrar dansitesi	1015±0	1017,5±5,35	1005±0	1006,67±2,58	<0,001	0,001	0,138	0,001	0,003
7. gün idrar dansitesi	1018,75±2,5	1014,38±4,17	1007,5±2,74	1005,83±2,04	0,001	0,002	0,241	0,008	0,002
kreatinin (mg/dL)	0,68±0,08	0,68±0,33	0,56±0,08	1,06±0,65	0,131	0,202	0,092	0,897	0,155
üre (mg/dL)	40,55±6,24	62,11±42,69	62,3±16,28	120,94±54,17	0,046	0,148	0,068	0,302	0,143
TDS**	0	4,25±0,89	2±1,26	1,5±0,55	<0,001	0,002	0,601	0,008	0,002

I: Grup I (kontrol grubu)

II: Grup II (Kolistin grubu)

III: Grup III (Kolistin ve bikarbonat grubu)

IV: Grup IV (Kolistin ve NaCl grubu)

*Ort±SS: ortalama ve standart sapma; **TDS: tübüler dejenerasyon skoru

5.TARTIŞMA

Kolistin, günümüzde, yaygın antibiyotik direnci gösteren mikroorganizmaların neden olduğu hayati önem taşıyan enfeksiyonların tedavisinde çok önemli yer tutmaktadır. Bu tedavinin en önemli yan etkisi olan böbrek toksisitesi ise ciddi morbidite ve mortalite yaratmaktadır. Kolistine bağlı gelişen böbrek tübül toksisitesinin önlenmesini hedef alan bu çalışmada; öncelikle ilacın kimyasal yapısının zayıf asit özellikte olması ile, idrar pH değişikliklerinin bu ilacın tübül hasarını önlemedeki etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Sodyum bikarbonat desteği ile nefroproteksiyon; intravenöz kontrast madde, yüksek doz metotreksat uygulaması gibi endikasyonlarda güvenle kullanılmaktadır. Yine;2,4-D klorfenoksiasetik asit, klorpropamid, salisilatlar, diflunisal, florid, metotreksat, barbitüratlar (özellikle fenobarbital), sulfonamidler gibi zayıf asit ilaçlarla olan zehirlenmelerde, bu moleküllerin idrardaki çözünürlüğünü arttırmak için idrar alkalinizasyonu kullanılmaktadır (43-47). Bununla birlikte; idrar alkalinizasyonu, ürik asit ve sistin taşlarını önlemek için de eskiden beri güvenle kullanılmaktadır (48-50).

Kolistin nefrotoksitesinin önlenmesi amacı ile pek çok çalışma yapılmıştır.Kolistin maruziyetinin yarattığı doz bağımlı yan etkiözelliklerat çalışmalarında iyi tanımlanmış olup; toksisiteye önlem amaçlı megalin, astaksatin, vitamin E ve askorbik asit gibi moleküller çalışılmıştır (53-55).Bu çalışmada ilk kez, kolistinin kimyasal yapısından faydalanarak, idrar alkalinizasyonunun koruyuculuğu araştırılmıştır.

Bu çalışmada, dört grup oluşturulmuştur. Kontrol grubuna yalnız salin injeksiyonu yapılmış, diğer gruplar ile eşit koşullar ile izlenmiştir. Grup II'ye herhangi bir koruma verilmeksizin, rat birim ağırlığına göre hesaplanan kolistin yedi gün uygulanmıştır. Grup II'nin yedi gün boyunca idrar pH'ı asidik ve idrar dansitesi yüksek(>1010) seyretmiştir. Grup III, yine birim ağırlığa eşit miktarda kolistin enjeksiyonu almış olup; yedi gün boyunca idrar pH'ının alkali olması sağlanmıştır. Bu grubun idrar dansitesi yedi gün boyunca yüksek seyretmiştir. Grup IV'ün, aynı kolistin maruziyeti ile birlikte, yedi gün boyunca idrar pH'ı asidik, idrar dansitesi düşük (<1010) olarak seyretmiştir.

Çalışma sonunda toplanan serumdan çalışılan kreatinin değerleri açısından gruplar arası anlamlı fark saptanmamıştır. Serumlardan çalışılan üre değerlerinde sınırdan anlamlı fark gösterilmiş ancak, bu fark oluşan tübüler hasar ile korele bulunmamıştır. Tübül hasarı en az olan Grup IV'ün ortalama üre değeri yüksek iken, tübül hasarı çok yüksek olan Grup II ve tübül hasarı minimal olan Grup III'te ortalama üre değeri daha düşük olarak saptanmıştır. Bu bulgular, serum biyokimyasal belirteçlerinin, erken dönem akut tübüler nekrozda, hasar ile korele artış göstermeyebileceği ile açıklanabilir.

Çalışma sonunda incelenen böbrek materyali, Tablo-1'de gösterilen skorlama sistemi ile, tübüler dejenerasyon açısından değerlendirilmiştir. Grup I'in böbrek histolojik incelemesinde herhangi bir hasar saptanmamıştır. Bu şekilde, hayvanların barınma koşullarının ve stres faktörünün etkileri dışlanmıştır. Grup II'nin değerlendirilmesinde tüm hayvanların böbrek materyalinde yoğun hasar, nekroz ve yüksek tübüler dejenerasyon skoru saptanmıştır. Grup III ve Grup IV'ün tübül hasarının minimal, tübüler dejenerasyon skorlarının ise belirgin düşük olduğu saptanmıştır. Bu son iki grup skorları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır. Grup II, III ve IV birlikte değerlendirildiğinde tübül hasarları arasında, Grup II'de anlamlı yüksek olmak üzere, istatistiksel olarak anlamlı fark mevcuttur (Tablo-6). Hem standart NaCl'li hidrasyon , hem de bikarbonatlı hidrasyon grubunda anlamlı koruma sağlanmıştır.

Bulgular ışığında, idrar pH'ından bağımsız olarak, idrar dansitesi ölçümüne göre ratların tübül skorları incelenmiştir. İdrar dansitesi deki düşüş ile tübüler koruma arasında istatistiksel olarak korelasyon mevcuttur. Gruplardan bağımsız olarak, ortalama üriner dansite ne kadar düşükse, tübül skorunun da o kadar düşük olduğu saptanmıştır. Beklendiği gibi, bu korelasyon, gruplar arası fark göstermeyen üre ve kreatinin için geçerli olmamıştır.

Sonuç olarak; aynı doz kolistin enjeksiyonu yapılarak herhangi bir koruma almayan grupta yoğun tübüler dejenerasyon ve nekroz gözlenirken, bikarbonatlı ve NaCl'li hidrasyon alan gruplarda belirgin korunma sağlandığı görülmektedir. İdrar alkalinizasyonunun, bikarbonat ya da salin ile hidrasyona üstünlüğü yoktur. Bilindiği gibi, kolistin tedavisi gören pek çok hasta, ciddi kardiyopulmoner komorbiditeleri olan, yoğun bakım ünitesinde izlenen ve/veya şok tablosunda olup, masif sıvı

tedavisine uygun popülasyon değildir. Bu bulgular eşliğinde, tübüler dansiteyi düşüren, kolistinin tübül konsantrasyonunu azaltabilecek başka çalışmalar hedeflenebilir. Örneğin; diüretik kullanımı, zorlu diürez, özellikle hidrasyona uygun olmayan popülasyon için umut verici olabilir. Bu bağlamda, daha fazla hayvan ve insan çalışmasına ihtiyaç vardır.

6. 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 ultiresistant 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 M, Kasiakou S. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis* 2005;40:1333–1341
5. Biswas S, Brunel J, Dubus J, et al. Colistin: an update on the antibiotic of the 21st century. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2012;10 (8):917–934.
6. Akajagbor DS, Wilson SL, Shere-Wolfe KD, Dakum P, Charurat ME, Gilliam BL. Higher incidence of acute kidney injury with intravenous colistin methate sodium compared with polymyxin B in critically ill patients at a tertiary care medical center. *Clin Infect Dis* 2013;57:1300–3.
7. 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.
8. 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;53:879–84.
9. Garonzik SM, Li J, Thamlikitkul V, et al. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:3284–94.
10. 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.
11. Kwon J-A, Lee JE, Huh W, et al. Predictors of acute kidney injury associated with intravenous colistin treatment. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:473–7.
12. 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.

13. Collins JM, Haynes K, Gallagher JC. Emergent renal dysfunction with colistin pharmacotherapy. *Pharmacotherapy* 2013;33:812–6.
14. Bergen PJ, Li J, Rayner CR, Nation RL. Colistinmethanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50(6), 1953–1958(2006).
15. Bergen PJ, Li J, Nation RL. Dosing of colistin-backtobasic PK/PD. *Curr. Opin. Pharmacol.* 11(5), 464–469(2011).
16. Falagas M, Kasiakou S. Toxicity of polymyxins: a systematic review of the evidence from old and recent studies. *Crit Care.* 2006;10 (1):R27.
17. Bellomo R, Ronco C, Kellum JA. 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:R204.
18. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care* 2007; 11: R31.
19. Levin A, Warnock DG, Mehta RL. Improving outcomes from acute kidney injury: report of an initiative. *Am J Kidney Dis* 2007; 50:1
20. Molitoris BA, Levin A, Warnock DG. Improving outcomes from acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2007; 18:1992.
21. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl* 2012; 2:8
22. Ricci Z, Cruz D, Ronco C. The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: A systematic review. *Kidney Int* 2008; 73:538.
23. Chertow GM, Burdick E, Honour M. Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16:3365.
24. 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.
25. Levy MM, Macias WL, Vincent JL. Early changes in organ function predict eventual survival in severe sepsis. *Crit Care Med* 2005; 33:2194.
26. 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.
27. Schiff H. Renal recovery from acute tubular necrosis requiring renal replacement therapy: a prospective study in critically ill patients. *Nephrol Dial Transplant* 2006; 21:1248.

28. Uchino S, Kellum JA, Bellomo R, et al. Acute renal failure in critically ill patients: a multinational, multicenter study. *JAMA* 2005; 294:813.
29. Turney JH, Marshall DH, Brownjohn AM, et al. The evolution of acute renal failure, 1956-1988. *Q J Med* 1990; 74:83.
30. Barton IK, Hilton PJ, Taub NA, et al. Acute renal failure treated by haemofiltration: factors affecting outcome. *Q J Med* 1993; 86:81.
31. McCarthy JT. Prognosis of patients with acute renal failure in the intensive-care unit: a tale of two eras. *Mayo ClinProc* 1996; 71:117.
32. Schrier RW, Wang W. Acute renal failure and sepsis. *N Engl J Med* 2004; 351:159.
33. Bagshaw SM, Laupland KB, Doig CJ, et al. Prognosis for long-term survival and renal recovery in critically ill patients with severe acute renal failure: a population-based study. *CritCare* 2005; 9:R700.
34. de Mendonça A, Vincent JL, Suter PM, et al. Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *IntensiveCareMed* 2000; 26:915.
35. Metnitz PG, Krenn CG, Steltzer H, et al. Effect of acute renal failure requiring renal replacement therapy on outcome in critically ill patients. *CritCareMed* 2002; 30:2051.
36. Coca SG, Peixoto AJ, Garg AX, et al. The prognostic importance of a small acute decrement in kidney function in hospitalized patients: a systematic review and meta-analysis. *Am J KidneyDis* 2007; 50:712.
37. Merten GJ, Burgess WP, Gray LV, et al. Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate: a randomized controlled trial. *JAMA* 2004; 291:2328.
38. Briguori C, Airolidi F, D'Andrea D, et al. Renal Insufficiency Following Contrast Media Administration Trial (REMEDIAL): a randomized comparison of 3 preventive strategies. *Circulation* 2007; 115:1211.
39. Recio-Mayoral A, Chaparro M, Prado B, et al. The reno-protective effect of hydration with sodium bicarbonate plus N-acetylcysteine in patients undergoing emergency percutaneous coronary intervention: the RENO Study. *J AmCollCardiol* 2007; 49:1283.
40. Ozcan EE, Guneri S, Akdeniz B, et al. Sodium bicarbonate, N-acetylcysteine, and saline for prevention of radiocontrast-induced nephropathy. A comparison of 3 regimens for protecting contrast-induced nephropathy in patients undergoing coronary procedures. A single-center prospective controlled trial. *AmHeart J* 2007; 154:539.

41. Hoste EA, De Waele JJ, Gevaert SA, et al. Sodium bicarbonate for prevention of contrast-induced acute kidney injury: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant* 2010; 25:747.
42. Bloomer HA. A critical evaluation of diuresis in the treatment of barbiturate intoxication. *J LabClinMed* 1966; 67:898.
43. Henry JA. Specific problems of drug intoxication. *Br J Anaesth* 1986; 58:223.
44. Proudfoot AT, Krenzelok EP, Vale JA. Position Paper on urine alkalization. *J ToxicolClinToxicol* 2004; 42:1.
45. Garrettson LK, Geller RJ. Acid and alkaline diuresis. When are they of value in the treatment of poisoning? *Drug Saf* 1990; 5:220.
46. Frenia ML, Schauben JL, Wears RL, et al. Multiple-dose activated charcoal compared to urinary alkalization for the enhancement of phenobarbital elimination. *J ToxicolClinToxicol* 1996; 34:169.
47. Pak CY, Sakhaee K, Fuller C. Successful management of uric acid nephrolithiasis with potassium citrate. *KidneyInt* 1986; 30:422.
48. Trinchieri A, Esposito N, Castelnuovo C. Dissolution of radiolucent renal stones by oral alkalization with potassium citrate/potassium bicarbonate. *ArchItalUrolAndrol* 2009; 81:188.
49. Palacin M, Goodyer P, et al. Cystinuria. In: *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease*, 8th ed, Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (Eds), McGraw-Hill, New York 2001. p.4909.
50. Widemann BC, Adamson PC. Understanding and managing methotrexate nephrotoxicity. *Oncologist* 2006; 11:694.
51. Chu E, Allegra CJ. Antifolates. In: *Cancer Chemotherapy and Biotherapy*, 2nd, Chabner B, Longo D (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia 1996. p.130.
52. Suzuki T, Yamaguchi H, Ogura J et al. Megalin contributes to kidney accumulation and nephrotoxicity of colistin. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Dec;57(12):6319-24
53. Ghilissi Z, Hakim A, Sila A, et al, Evaluation of efficacy of natural astaxanthin and vitamin E in prevention of colistin-induced nephrotoxicity in therat model. *EnvironToxicolPharmacol*. 2014 May; 37(3):960-6
54. Yousef JM, Chen G, Hill PA, et al , Melatonin attenuates colistin-induced nephrotoxicity in rats. *AntimicrobAgentsChemother*. 2011 Sep;55(9):4044-9
55. Ghilissi Z, Hakim A, Mnif H, et al, Evaluation of colistin nephrotoxicity administered at different doses in therat model. *Ren Fail*. 2013 Sep;35(8):1130-5

56. Keirstead ND, Wagoner MP, Bentley P, et al, Early prediction of polymyxin-induced nephrotoxicity with next-generation urinary kidney injury biomarkers, *ToxicolSci.* 2014 Feb;137(2):278-91
57. The MerckVeterinary Manual, Topic: Urolithiasis in Small Animals, October 2013
58. FrancoValenza, Marta Pizzocri, ValentinaSalice, et al, Sodium Bicarbonate Treatment during Transient or Sustained Lactic Acidemia in Normoxic and Normotensive Rats. 2012; 7(9): e46035.
59. W. Patrick Burgess and Phillip J. Walker, Mechanisms of Contrast-Induced Nephropathy Reduction for Saline (NaCl) and Sodium Bicarbonate (NaHCO₃), *BiomedResInt.* 2014; 2014: 510385