



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

**TACROLIMUS TEDAVİSİ ALAN RENAL TRANSPLANT
HASTALARDA NFAT REGULATED GEN
EKSPRESYONUNUN SERUM TAKROLİMUS DÜZEYİNE
ve HASTALARIN KLİNİĞİNE OLAN ETKİLERİ**

**Dr. Ömer DOĞAN
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa BALAL**

ADANA 2021



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

**TACROLIMUS TEDAVİSİ ALAN RENAL TRANSPLANT
HASTALARDA NFAT REGULATED GEN
EKSPRESYONUNUN SERUM TAKROLİMUS DÜZEYİNE
ve HASTALARIN KLİNİĞİNE OLAN ETKİLERİ**

**Dr. Ömer DOĞAN
UZMANLIK TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mustafa BALAL**

ADANA 2021

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tezimi hazırlamam sırasında büyük katkılarından dolayı İç Hastalıkları Nefroloji Bilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Saime PAYDAŞ ve tez yöneticisi Prof. Dr. Mustafa BALAL'a, uzmanlık eğitimim sırasında bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım İç hastalıkları Ana Bilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Yol uzun, yolculuk meşakkatli demiştin babam. Senin yolculuğun meşakkatliydi. Bıraktığın yerden bana öğrettiklerinle, beni ben yapan her şeyimle devam edeceğimi bilmelisin. Seninle gurur duyuyorum baba.

Sen güzel annem. Hayatımın her anında karşılıksız, sonsuz sevgi ve sabrını benden esirgemeyen annem. Teşekkürlerimin en çoğu sanadır.

Ablaların en güzeli. Sabır taşım, dert ortağım, sırdaşım, yol arkadaşım, her zaman koluma girip hayata tutunmamı sağlayanım. Sana hayranlıkla bakmaya devam edeceğimi bilmelisin.

Hayatımın zor zamanında yanımda olan tatlı kıza da teşekkürlerimle...

Dr. Ömer DOĞAN

ÖZET

Takrolimus Tedavisi Alan Renal Transplant Hastalarda NFAT-Regulated Gen Ekspresyonunun Serum Takrolimus Düzeyine Ve Hastaların Kliniğine Olan Etkileri

Amaç: Bu çalışmada böbrek nakli hastalarında nakil böbrek reddinin engellenmesi için kullanılan immünsüpresif ilaçlardan birisi olan tacrolimusun kan düzeyi ile T hücre çekirdeklerindeki NFAT-regulated gen ekspresyonuna etkisi ve klinik yansımalarının araştırılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamıza Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Polikliniğinde takip edilen, herhangi bir şikâyeti olmayan, kontrollerine düzenli gelen ve Takrolimus kullanan 48 böbrek nakil alıcısı dâhil edildi. Hastalardan takrolimus son dozundan 12 saat sonraki *NFATC2* gen aktivasyonu ve tacrolimus kan düzeyi ölçüldü. Kan örnekleri alındıktan sonra hastaların kullandıkları dozda takrolimus aldıktan sonraki 3. saatte aynı ölçümler yapıldı. Kan düzeyleri ve gen aktivasyonları ve klinik bulgular arasındaki ilişkiler değerlendirildi.

Bulgular: *NFATC2*-Gen Aktivasyon 0. saat ve 3. saat değeri ile Takrolimus 0. saat ve 3. saat arasında istatistik olarak anlamlı bir korelasyon saptanmadı. Takrolimus 3. saat ile hemoglobin, HTC ve Triglicerit arasında istatistik olarak anlamlı bir korelasyon saptandı. İdrar protein/kreatinin ve idrar albümin/kreatinin ile Takrolimus 0. saat ile idrar protein/kreatinin ile takrolimus 3. saat arasında istatistik olarak anlamlı ters yönlü korelasyon saptandı.

Sonuç: *NFATC2* gen aktivasyonu takrolimus alımından 3 saat sonra artma eğiliminde olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, *NFATC2* gen aktivasyonunun 0. saat ve 3. saat değeri ile takrolimusun 0. saat ve 3. saat arasında istatistik olarak anlamlı bir korelasyon olmadığı gözlemlendi. Dolayısıyla hastaların takip edilmesinde *NFATC2*'nin takrolimus kan ilaç konsantrasyonuna bakılmasına üstünlüğü olmadığı düşünülebilir, ancak yüksek düzeyde aktivasyonun klinik sonuçları belli değildir.

Anahtar kelimeler: Böbrek nakli, Tacrolimus, NFAT-regulated gen ekspresyonu

ABSTRACT

Effects of NFAT-regulated Gene Expression On Serum Tacrolimus Level and Clinic of Patients In Renal Transplant Patients Receiving Tacrolimus Treatment

Objectives: In this study, it was aimed to investigate the effect and clinical implications of tacrolimus, one of the immunosuppressive drugs used to prevent transplant kidney rejection, on blood level and NFAT-regulated gene activation in T cell nuclei in kidney transplant patients.

Materials and methods: The study included 48 patients who had undergone kidney transplantation due to recent kidney disease at various times and who had no complaints and who had routine controls at the Nephrology Polyclinic of Çukurova University Medical Faculty, regardless of age and gender. NFAT gene expression was measured 3 hours and 12 hours after tacrolimus treatment in kidney transplant patients using tacrolimus, and clinical implications were evaluated by comparing with 12-hour tacrolimus blood level.

Results: There was no statistically significant correlation between *NFATC2*-Gene Activation 0. hour and 3. hour value and Tacrolimus 0. hour and 3. hour. A statistically significant correlation was found between tacrolimus 3 hour and hemoglobin, HTC and Triglyceride. A statistically significant reverse correlation was found between urinary protein/creatinine and urinary albumin/creatinine with Tacrolimus at 0 hour and urinary protein/creatinine with tacrolimus at 3 hour.

Conclusion: It was observed that *NFATC2* gene activation tended to increase 3 hours after tacrolimus ingestion but was not statistically significant, there was no statistically significant correlation between the 0. hour and 3. hour value of *NFATC2* gene activation and tacrolimus 0. hour and 3. hour. Therefore, it can be thought that *NFATC2* does not have any superiority over tacrolimus blood drug concentration in monitoring patients but clinic impression of the higher levels of gene activation is unknown.

Keywords: Kidney transplant, Tacrolimus, NFAT-regulated gene expression

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	I
ÖZET	II
ABSTRACT.....	III
İÇİNDEKİLER	IV
KISALTMALAR DİZİNİ.....	VI
ŞEKİLLER DİZİNİ	VIII
TABLolar DİZİNİ	IX
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kronik Böbrek Hastalığı.....	3
2.2. KBH’de Tedavi Seçenekleri	4
2.2.1. Renal Transplantasyon.....	4
2.3. Renal Transplantasyonda İmmünoloji	5
2.3.1. T Hücre Aktivasyonu.....	7
2.3.2. Transplantasyon İmmünolojisindeki Parametreler	14
2.3.2.1. Kan Grubu Antijenleri	14
2.3.2.2. Doku Grubu Antijenleri (HLA)	14
2.3.2.3. Panel Reaktif Antikorlar	15
2.3.2.4. Donör Spesifik Antikorlar	16
2.3.2.5. Cross-match Testleri	16
2.3.3. Klinik Pratik Uygulama	16
2.3.4. Rejeksiyon	17
2.3.4.1. Hiperakut Hücresel Rejeksiyon	18
2.3.4.2. Akut Hücresel Rejeksiyon	18

2.3.4.3. Kronik Hücresel Rejeksiyon	19
2.4. Renal Transplantasyonda İmmünsüpresif Tedavi.....	19
2.4.1. Kalsinörin İnhibitörleri	21
2.4.1.1. Tacrolimus	21
2.4.1.1.1. Farmakodinamik Özelliği	21
2.4.1.1.2. Farmakokinetik Özellikleri	23
3. GEREÇ ve YÖNTEM	28
3.1. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	28
3.2. Araştırmanın Evren ve Örneklemesi.....	28
3.3. Verilerin Toplanması	29
3.4. İstatistiksel Analiz.....	31
4. BULGULAR.....	32
4.1. Hastaların Genel Demografik ve Klinik Özellikleri	32
4.2. Hastaların Laboratuvar Sonuçlarının Değerlendirilmesi	35
5. TARTIŞMA	39
6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	44
7. KAYNAKLAR	45

KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin Aminotransferaz
ANCA	: Anti Nötrofilik Sitoplazmik Antikor
AP-1	: Activating Protein-1
ASH	: Antijen Sunan Hücre
AST	: Aspartat Aminotransferaz
AT 1	: Anjiyotensin 1
ATG	: Antitimosit Globulin
AZA	: Azotiyopürin
BTx	: Böbrek Transplantasyonu
BUN	: Kan Üre Nitrojeni
CCL2	: C-C Motif Ligand 2
CDC	: Kompleman Bağımlı Sitotoksiste
CNI	: Kalsinörin İnhibitörleri
cPRA	: Hesaplanmış Panel Reaktif Antikor
CREDIT	: Chronic Renal Disease In Turkey
CRP	: C-Reaktif Protein
CsA	: Siklosporin
CYP450	: Sitokrom p450
DSA	: Donör Spesifik Antikor
FCXM	: FlowSitometrik Cross Match
FKBP-12	: FK506 Bağlayıcı Protein-12
FSGS	: Fokal Segmental Glomeruloskleroz
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
HIV	: Human Immun Deficiency Virus
HLA	: Human Leucocyte Antigens
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
KDIGO	: Kidney Disease Improving Global Outcome
MAP	: Mitogen Activated Protein
MHC	: Majör Histokompatibilite Kompleksi
MMF	: Mikofenolat Mofetil

MPA	: Mikofenolat Sodyum
mTOR	: Mammalian Target of Rapamycin (Memeli Rapamisin Hedefi)
NFAT	: Nuclear Factor of Activated T Cells
NFATC2	: Nuclear Factor of Activated T Cells C2 Gen
NF-κB	: Nuclear Factor Kappa B
NK	: Naturel Killer
OKT3	: Muronomab-CD3
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PRA	: Panel Reaktif Antikor
RRT	: Renal Replasman Tedavisi
SDBH	: Son Dönem Böbrek Hastalığı
TCR	: T Hücre Reseptörü
TGF-B	: Transforming Growth Faktör-beta
TND	: Türk Nefroloji Derneği
TNFα	: Tümör Nekroz Faktör
UAE	: Üriner Albumin Ekskresyonu
UAKO	: Üriner Albumin/Kreatinin Oranı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No

Sayfa No

Şekil 1. Türkiye’de RRT gerektiren SDBH insidansı ve prevalansı.....	4
Şekil 2. MHC sınıf I, II, III’ün genetik ve protein düzenlenmesi.....	5
Şekil 3. MHC sınıf I ve sınıf II molekülleri ve antijen sunumu.....	6
Şekil 4. T hücre aktivasyonunun açıklanması ve immüsupresif ilaçların etki yerleri	8
Şekil 5. NFAT protein ailesi ve NFATs yapısı	9
Şekil 6. T yardımcı hücrelerde NFAT ve etkileşen ortak proteinlerin çeşitli kombinasyonları	13
Şekil 7. İmmüsupresif ilaçların etki mekanizmaları.....	20
Şekil 8. TKR etki mekanizmasının şematik gösterimi	22
Şekil 9. NFATC2 genindeki ifade artışları kat değişim	35



TABLÖLAR DİZİNİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Alıcının immünolojik riskinin belirlenmesi-panel reaktif antikor	17
Tablo 2. Alıcının immünolojik riskinin belirlenmesi-Donör spesifik antikor	17
Tablo 3. Verici ilişkili azalmış/gecikmiş greft fonksiyonu riskinin belirlenmesi	17
Tablo 4. Hastaların demografik verileri	32
Tablo 5. Hastaların demografik değişkenlerin dağılımı	32
Tablo 6. Tacrolimus doz dağılımı	33
Tablo 7. Hastaların kullandığı ilaçların dağılımı	34
Tablo 8. Tacrolimus kan konsantrasyonu ve <i>NFATC2</i> gen aktivasyonu.....	34
Tablo 9. Hastaların klinik sonuçlarının dağılımı	36
Tablo 10. Klinik korelasyon tablosu.....	36
Tablo 11. Demografik değişkenlerin ile gen aktivasyon sonuçlarının karşılaştırılması	38

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Kronik böbrek hastalığı (KBH) dünya genelinde yaygın bir halk sağlığı sorunudur. Kidney Disease Improving Global Outcome (KDIGO) derneği, KBH'yı üç aydan uzun süre mevcut olan böbrek yapısının veya fonksiyonunun bozukluğu olarak tanımlamıştır. KBH sık görülen, morbiditesi ve mortalitesi yüksek olan, yaşam kalitesini olumsuz etkileyen, erken tanı olasılığı düşük ancak zamanında fark edildiği zaman önlenabilen veya klinik progresyonu geciktirilebilen bir hastalıktır. KBH prevalansı, çeşitli çevresel, etnik, sosyoekonomik farklılıklar nedeniyle dünyanın farklı yerlerinde oldukça değişkenlik göstermektedir. 2010 yılında Türkiye'de yapılan CREDIT (A population-based survey of Chronic Renal Disease In Turkey) çalışmasında, Türk toplumunda KBH prevalansı %15,7 olarak bildirilmiştir.¹

KBH'nin en son evresi olan son dönem böbrek hastalığı (SDBH) gelişen hastalarda kaybedilen renal fonksiyonları yerine koymak için renal replasman tedavileri uygulanmaktadır. Hemodiyaliz, periton diyalizi ve böbrek nakli en uygun tedavi seçenekleri arasındadır. Günümüzde hasta yaşam kalitesi arttıran ve sağ kalımı açısından en uygun tedavi seçeneğini olarak böbrek nakli tercih edilmektedir. Başarılı bir böbrek nakli diyaliz tedavisine kıyasla yaşam kalitesini artırmakta ve mortalite riskini azaltmaktadır.²

İmmünsüpresif ilaçların keşfinden önce böbrek nakli yalnızca tek yumurta ikizlerinden yapılmaktaydı. Zamanla geliştirilen immünsüpressif ilaçların kullanıldığı kişiye özgü tedavi protokolleri ile birlikte, nakil sonrası hasta ve graft sağ kalımında anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

Günümüzde böbrek nakli sonrası kortikosteroid, kalsinörin inhibitörü (KNI) ve antimetabolitten oluşan tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Son dönemlerde, immünsüpressif ve antiproliferatif etkileri nedeniyle, mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitörleri kullanılmaya başlanmıştır. Buimmunsupresif ilaçlardan kalsinörin inhibitörü olan Tacrolimus; toprak mantarından elde edilmiş bir makrolid antibiyotiktir. Tacrolimus, FK Bağlayıcı protein'e bağlanır. Thücre çekirdeklerinde NFAT-regulated gen traslokasyonunu önleyerek kalsinörin fosfataz aktivasyonunu inhibe ederek TGF- β inhibisyonuna yol açmaktadır. Bu şekliyle immunsüpresif etkisini, etkili olduğu gen bölgesinde moleküler düzeyde gerçekleştirmektedir. Bu etkisiyle tacrolimus akut ve

kronik rejeksiyonu önlemede uzun yıllardır başarı ile kullanılmaktadır. Tacrolimus farmakodinamik olarak dar teröpatik aralığa sahiptir.³ Fazla dozda alınan tacrolimus; sık tekrarlayan ve fırsatçı enfeksiyonlar, sekonder maligniteler basta olmak üzere birçok olumsuz sonuçlara yol açabilirken, etkin dozda alınmayan tacrolimus nakil böbrek reddine neden olmaktadır. Hastaların alması gereken takrolimus dozu mevcut tedavi kılavuzlarına göre, alındıktan 12 saat sonra bakılan kan düzeyi ölçülerek düzenlenmektedir.

Bu çalışmada tacrolimus kullanan böbrek nakli hastalarında takrolimus tedavisinden 3 saat ve 12 saat sonraki *NFAT* gen ekspresyonu ölçülerek, 3ve 12 saatlik tacrolimus kan düzeyi ile karşılaştırarak bunun klinik yansımalarının araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Böbrek Hastalığı

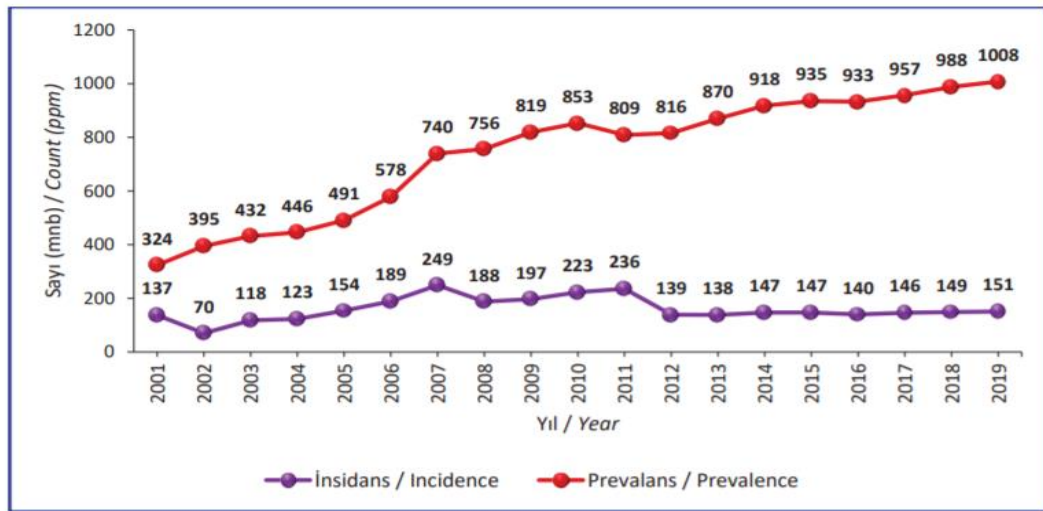
KBH tanımı altta yatan sebep ne olursa olsun üç ay veya daha fazla süre ile glomerüler filtrasyon hızı (GFR)'nin $60 \text{ mL/dak/1,73m}^2$ 'nin altında olması veya üç ay veya daha fazla süre ile GFR'den bağımsız olarak böbrekte objektif bir hasar belirteci olması olarak ifade edilmektedir. GFR, genellikle yıllar içinde giderek azalır ve bu azalma, altta yatan patolojiye göre büyük farklılık gösterir. Böbrek yetersizliği olan bir olguda; sebat eden azotemi (>3 ay), renal osteodistrofi belirti ve bulguları, uzun süreli üremik belirti ve bulgular, anemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi gibi metabolik bozukluklar, idrar sedimentinde silendirler ve radyolojik görüntülemelerde bilateral küçük böbrekler kronisite göstergeleridir.⁴

Kronik böbrek hastalığının başlangıç aşamasında sadece böbreğin fonksiyonel rezervinde azalma vardır. Böbreğin diğer fonksiyonları (ekskresyon, sentez ve regülatuar fonksiyonlar) bozulmadığı için klinik olarak belirlenmekte zorluk yaşanabilir. Hastalığın orta evrelerinde hastalar genellikle asemptomatiktir. Ancak; enfeksiyon, hipovolemi, obstrüksiyon veya nefrotoksik ilaç kullanımı gibi araya giren akut stres faktörleri hastayı hızla üremik tabloya dönüştürebilir. Geri dönüşümlü faktörlerin giderilmesi ile hasta çoğu zaman eski durumuna döner. İleri evreye ulaşmış böbrek yetmezliğinde, böbreğin ekskresyon, biyosentez ve regülatuar fonksiyonlarının büyük ölçüde bozulması ile klinik belirti ve bulgular (halsizlik, noktüri vb.) ortaya çıkmaya başlar. Son dönem böbrek yetersizliğinde, böbrek fonksiyonlarının ileri derecede kaybı sonucunda ise giderek artan azotemi ve her organ sistemi ile ilgili belirti ve bulgular ortaya çıkar. Son dönemde ortaya çıkan bu klinik hastalık tablosu, üremi olarak tanımlanır.⁵ GFR düşüş hızı 40 yaş üzerindekilerde normalde yıllık 1 mL/dk/1,73m^2 'dir.

Erken tanı ve doğru tedavi KBH hastalarının mortalite ve morbiditesini azaltması açısından önemlidir. KBH evrelendirmesi NKF/KDOQI ve KDIGO kılavuzlarında belirtilen kriterlere göre yapılmaktadır. Bu kılavuzlara göre belirlenen KBH evrelemesi Tablo 1'de gösterilmiştir. Evre 5 KBH son dönem böbrek yetmezliği kabul edilip Renal replasman tedavisi (RRT) gerektirmektedir.⁶

2.2. KBH’de Tedavi Seçenekleri

Kronik böbrek hastalığının tedavisine ne kadar erken başlarsa da, hastalığın ilerlemesinin yavaşlatılması amaçlansa da KBH hastalarının çoğunda SDBY gelişmektedir. K/DOQI Evre IV KBH ($GFR < 30 \text{ ml/dk/1.73 m}^2$) olan hastaların SDBY ve tedavi seçenekleri hakkında bilgilendirilmesini önermektedir. $GFR < 15 \text{ ml/dk/1.73 m}^2$ altına inince RRT hastasına klinik durumuna göre başlanabilir. Hastalarda başlangıç RRT seçimini hastanın yaşı, ailenin tercihi, hastanın merkeze uzaklığı, sosyal durumu, rezidüel böbrek fonksiyonu varlığı gibi faktörler etkilemektedir. Renal replasman tedavisinde periton diyalizi, hemodiyaliz, renal transplantasyon seçenekler arasındadır. TND 2019 raporuna göre renal replasman tedavisi gerektiren son dönem böbrek yetmezliği hastaların prevalans ve insidansı şekilde gösterilmiştir.¹



Şekil 1. Türkiye’de RRT gerektiren SDBH insidansı ve prevalansı

2.2.1. Renal Transplantasyon

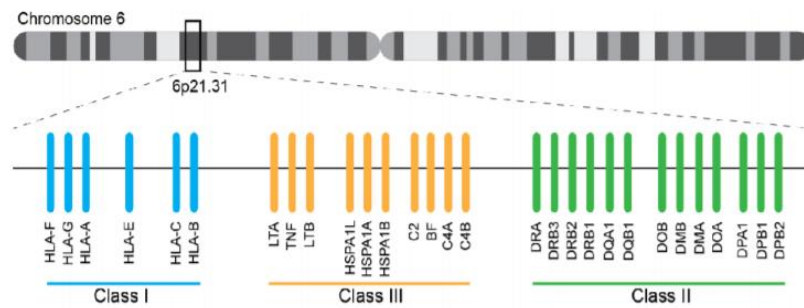
Renal transplantasyon hastalara daha rahat ve konforlu bir yaşam sunması nedeniyle renal replasman tedavileri arasında en önemli alternatifi oluşturmaktadır. Renal transplantasyonda, diyalizden farklı olarak böbrek fonksiyonları daha fazla orandayerine getirilmektedir. Renal transplantasyon, hastaya diğer diyaliz tedavilerinden daha iyi fizyolojik, sosyal ve fiziksel rehabilitasyon sağlar. Transplantasyon işlemi multidisipliner yaklaşım gerektirmektedir. Renal transplantasyon canlı verici veya kadavradan yapılmaktadır. Canlı donör akraba, eş

veya akraba dışı olabilmektedir. Transplantasyon sonrası bir yıllık greft ömrü, canlı vericiden gerçekleştirilen nakillerde %70-95, kadavradan gerçekleştirilen nakillerde %50-80 iken; beş yıllık greft ömrü, canlı vericiden gerçekleştirilen nakillerde %60-90, kadavradan gerçekleştirilen nakillerde %40-60'dır.^{7,8}

2.3. Renal Transplantasyonda İmmünoloji

Transplantasyonun genetik temelleri 20.yüzyılın ilk dönemlerinde atılmıştır. Verici ve alıcı arasındaki genetik uyum transplantasyon başarısını belirleyen en önemli etkindir.

Alıcının immün sistemi, verici hücrelerin yüzeyinde genetik olarak kodlanmış doku uyumluluk (histokompatibilite) antijenleri denilen belirli molekülleri tanır. Her türün farklı kromozomlarında yerleşen ve bu proteinleri kodlayan genlere “doku uyumluluk genleri” denir. Bunlar arasında ana doku uyumluluk kompleksi (majör histokompatibilite kompleksi kapsamında kodlanan MHC sınıf I ve sınıf II molekülleri vardır. MHC ilk defa lökositlerde tanımlandığı için insan lökosit antijenleri (HLA-human leucocyte antigens) de denir. HLA kompleksi 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşen çeşitli genleri içerir. Bu genlerin ürünleri hücre yüzeyinde eş baskın olarak belirlenir. Eş baskınlık, bunların tek kopya (heterozigot veya hemizigot) veya iki kopya (homozigot) halinde hücre yüzeyinde belirdikleri anlamına gelir.⁹

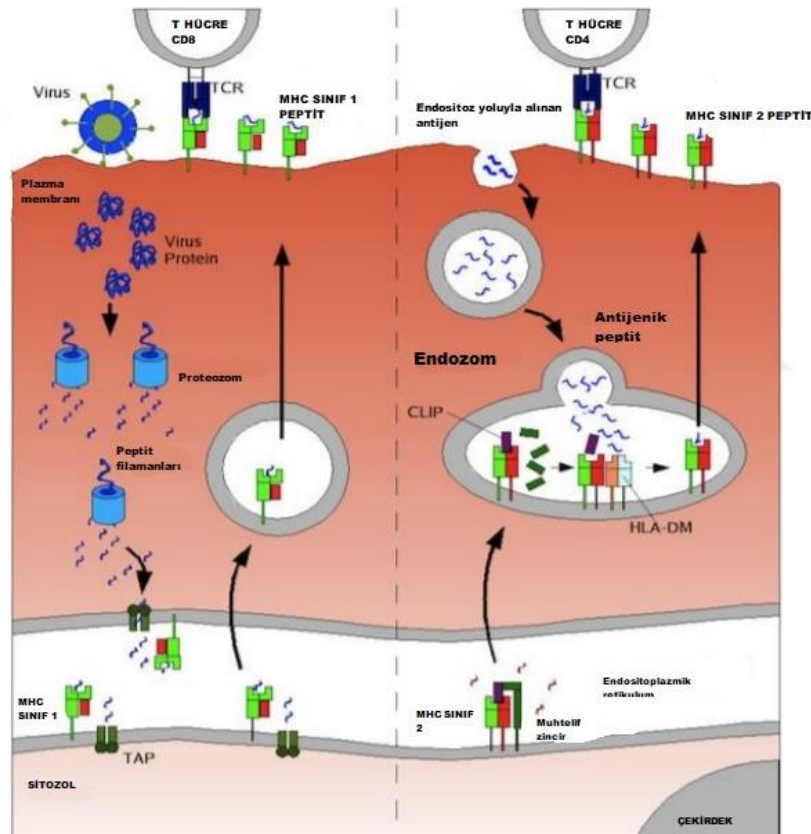


Şekil 2. MHC sınıf I, II, III'ün genetik ve protein düzenlenmesi. Kromozom 6'da lokalize HLA genleri şekilde gösterildiği gibi düzenlenmiştir.⁹

Sınıf I MHC molekülleri: Beta 2 mikroglobulin ile birlikte eksprese olan MHC sınıf I molekülleri tüm çekirdekli hücrelerin yüzeyinde bulunur. HLA-A,-B,-C olarak 3 genetik lokus ve her bir lokusta 100'den fazla allel ile yüksek düzeyde polimorfiktir. CD8+ T lenfositlerine antijen sunumu yapar. MHC sınıf I molekülleri, 8-9 aminoasitlik

bir peptide kovalent olmayan bağlarla bağlı $\alpha 1$ ve $\alpha 2$ zincirleri arasında oluk oluşturmak üzere katlanma yaparlar.

Sınıf II MHC molekülleri: Normal olarak sadece B lenfositler, dendritik hücreler ve makrofajlar gibi antijen sunumu yapan hücrelerin üzerinde bulunur. HLA-DR,-DP,-DQ olarak 3 alleli vardır. CD4+T lenfositlerine antijen sunarlar. İnflamasyon varlığında, normalde sınıf II MHC molekülleri eksprese etmeyen endotel hücreleri, deri epitel hücreleri, barsak epitel ve renal proksimal tubül hücreleri gibi bazı hücreler sınıf II moleküllerini sentezlemeye başlayabilir.



Şekil 3. MHC sınıf I ve sınıf II molekülleri ve antijen sunumu¹⁰

Alıcının immün sistemi, MHC sınıf I ve II molekülleri tarafından sunulan peptid antijenleri tanır. T hücreleri doku uyumluluk antijenlerini doğrudan ve dolaylı tanıma vasıtası ile saptayıp bunlara karşı etkin olabilir.

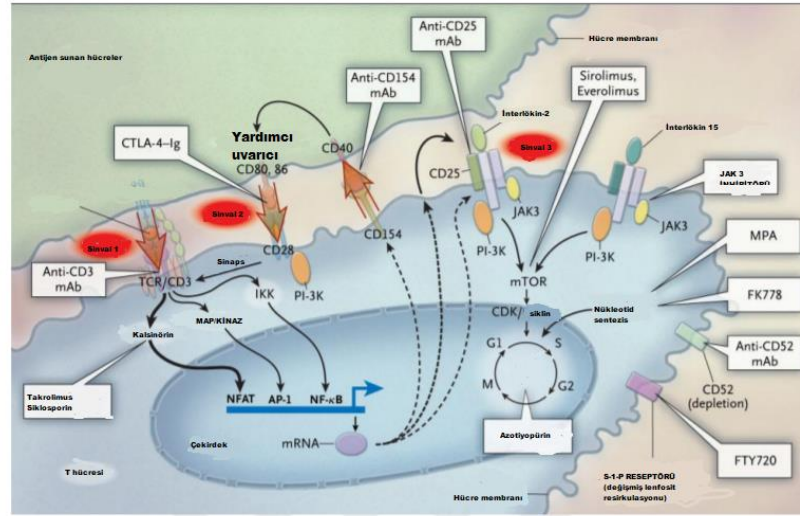
1. Doğrudan allo-antijen tanıma; Alıcının T hücrelerine vericinin antijen sunucu hücreleri (ASH) yoluyla antijen sunulur. Verici ve alıcı ortak MHC sınıf I moleküllerine

sahip ise, vericiye ait ASH'ler, doğrudan alıcı CD8+T lenfositlere antijen sunar. Bu yol özellikle akut rejeksiyon sürecinde önemli rol oynar.

2. Dolaylı allo-antijen tanımda; alıcı antijen sunucu hücreleri tarafından işlenen antijenler alıcı CD4+T lenfositlerine sunulur. Bu hücreler de geç duyarlılık reaksiyonlarını başlatıp hücrel ve humoral immun yanıtı uyararak hem kronik hem akut rejeksiyonda rol oynar.

2.3.1. T Hücre Aktivasyonu

Antijenin direkt olarak T hücre reseptörü (TCR)-CD3 kompleksine bağlanması yada ASH tarafından işlenmiş antijenin MHC molekülü ile TCR-CD3 kompleksine sunulması, T hücrelerinin aktif duruma geçebilmesi için gereken ilk sinyaldir(sinyal-1). Kostimülasyon (sinyal-2), ilk uyarıyı kuvvetlendiren 2.basamaktır. ASH ve T hücre yüzeyinde yer alan kostimulatuar molekül (örneğin T hücre yüzeyindeki CD28 ile ASH üzerindeki CD80 [B7- 1] ve CD86 [B7-2] molekülü, T hücre yüzeyindeki CD40L [CD154] ile ASH yüzeyindeki CD40, vb) arasındaki etkileşimin (sinyal-2) varlığı T hücrenin uyarılabilmesi için gereklidir. Antijenin T hücresi tarafından tanınması ve kostimülasyonun ardından T hücreleri tarafından başta IL-2 olmak üzere pek çok sitokin salgılanması gerekir. Bunun için T lenfosit membranına gelen uyarının önce sitoplazmaya sonra da sitoplazmik bir dizi reaksiyonun ardından sinyallerin hücrenin çekirdeğine iletilmesi gerekir (sinyal-3). Bu iki sinyal, T hücrenin sitoplazmasında kalsiyum-kalsinörin yolağı, MAP (mitogen activated protein) kinaz yolağı, NF-κB (nuclear factor kappa B) yolağı olmak üzere üç tane sinyal iletim yolağını aktive eder. Bu yolların aktivasyonu ile da IL-2, CD25, CD154 gibi sitokinlerin ve yüzey molekülünün sentezini sağlayan transkripsiyon faktörleri (sırasıyla NFAT [nuclear factor of activated T cells], AP-1 [activating protein-1] ve NF-κB) uyarılır. IL-2, IL-15 gibi sitokinler de hücre proliferasyonunu sağlayan m-TOR (mammalian target of rapamycin) yolağını aktive eder.¹¹ T hücre aktivasyonunun üç sinyal modeli ve immünsupresiflerin bu yollardaki etki yerleri Şekil 4'de gösterilmiştir.

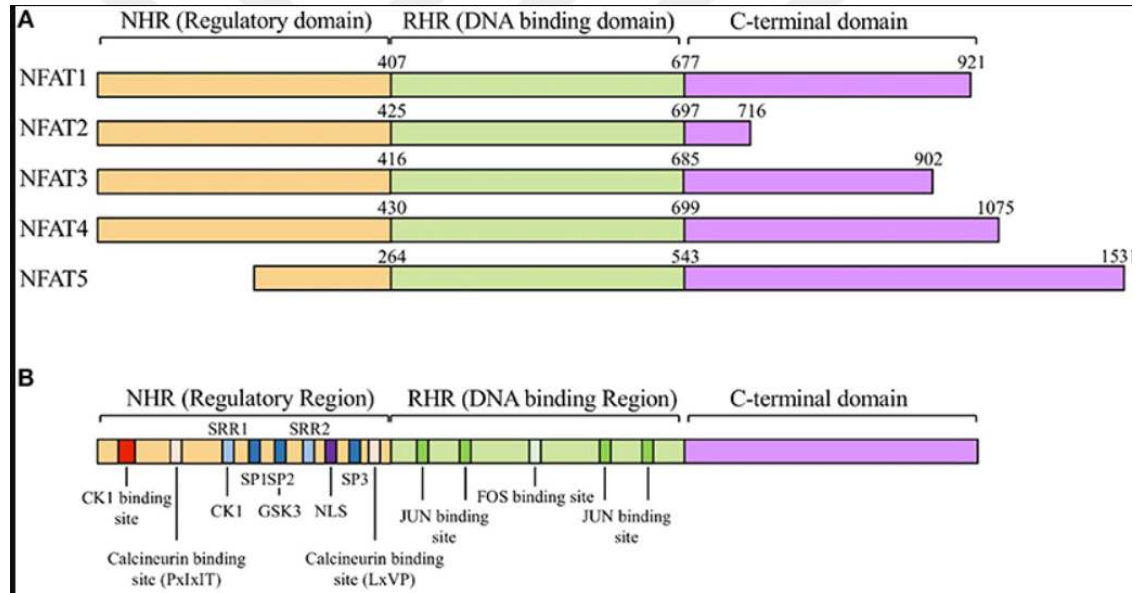


Şekil 4. T hücre aktivasyonunun açıklanması ve immünsupresif ilaçların etki yerleri¹²

Aktive edilmiş T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT), interleukin-2 (IL-2) ve IL-2 reseptörünün¹³⁻¹⁵ ekspresyonunu destekleyen, aktive T hücrelerinde tanımlanan bir transkripsiyon faktörleri ailesidir. T hücre reseptörünün (TCR) antijen ile ligasyonu: majör histo-uyumluluk kompleksi sınıf II (MHCII), ikincil haberciler inositol-1, 4, 5-trifosfat (IP3) ve diasilgliserol (DAG). IP3, endoplazmik retikulumda (ER) IP3 reseptörüne bağlanır ve Ca²⁺ + iyonlarını sitoplazmaya bırakır.^{16,17} Calmodulin, serbest Ca²⁺ + iyonlarını yakalar ve serin/treonin fosfataz kalsinörini aktive eder. Kalsinörin, NFAT’lerde çoklu serin kalıntıları defosforile ederek bunların çekirdeğe translokasyonunu inhibe eder.^{17,18} Dolayısı ile NFAT proteinleri, T hücre gelişimi, aktivasyonu ve farklılaşması ile ilgili genlerin ekspresyonunu düzenler.^{13,19-23}

NFAT ailesi beş proteinden oluşur: NFAT1 (NFATc2 veya NFATp), NFAT2 (NFATc1 veya NFATc), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATc3 veya NFATx) ve NFAT5 (TonEBP veya OREBP) (Şekil 1) NFAT1, normal insan T hücrelerinde yapısal olarak eksprese edilirken, NFAT2 aktivasyonla indüklenir.²⁵ NFAT1 ve NFAT2, NFAT’leri defosforile eden ve nükleer translokasyonunu destekleyen kalsinörin tarafından düzenlenir.²⁴ NFAT3, düşük kromatin erişilebilirliği ve promoterinin güçlendirici aktivitesi nedeniyle T hücrelerinde nadiren eksprese edilir.²⁶ NFAT4, uyarılmamış hücrelerde zayıf bir şekilde eksprese edilir ve ekspresyonu, aktivasyonla güçlendirilmez.²⁵ NFAT1 ve NFAT2, T hücrelerindeki yüksek ekspresyon seviyeleri nedeniyle en çok çalışılan NFAT ailesi üyeleridir. NFAT1 ve NFAT2, NFAT4’ün hedef sitokin promoterlerine bağlanma yeteneğini aşar.²⁷ NFAT5 hemen hemen tüm hücreler

tarafından ifade edilir ve ozmotik strese yanıt olarak aktive edilir.²⁸ Translokasyonlu NFAT proteinleri farklı transkripsiyon faktörleriyle (AP1, FOXP3 ve BATF gibi) etkileşir.^{29-31,113} Ortak proteinlere bağlı olarak, NFAT'ler ya bağışıklık tepkilerini artırabilir ya da bağışıklık toleransını indükleyebilir. NFAT'lerin en yaygın olarak bilinen ortak proteini olan AP1, NFAT'larla bir kompleks oluşturur ve çeşitli sitokinleri (IL-2, IL-4 ve IFN- γ gibi) ve diğer T hücresi aktivasyonu ile indüklenen proteinleri indükler.¹⁹ Uyarı olmadığı zaman lenfositler dinlenme halindedir. Ancak IL-2'nin reseptörü ile birleşmesinden sonra T lenfositleri hızlıca proliferere olmaya başlarlar. Sitokin salınımı, hücrel immünite dışında antikor sentezini uyarıp humoral immüniteye de katkıda bulunur. Bu antikorlar kompleman bağımlı yada antikora bağımlı hücrel sitotoksiste aracılığıyla graftı hasara uğratır.²⁶



Şekil 5. NFAT protein ailesi ve NFATs yapısı

NFAT'ler çeşitli moleküler etkileşimlerde yer aldıklarından, normal durumda translasyon sonrası modifikasyonlarla sıkı bir şekilde düzenlenirler.²⁴ Kazein kinaz 1 (CK1), glikojen sentaz kinaz 3 (GSK3), JUN N-terminal kinaz (JNK) ve p38 dahil olmak üzere birçok kinaz, NFAT proteinlerinin NHR alanında bulunan serin bakımından zengin motifleri fosforile eder ve onları inaktif halde tutar.³²⁻³⁵ Fosforilasyona ek olarak NFAT, küçük ubiquitin benzeri değiştirici (SUMO).³⁶⁻³⁸ tarafından protein asetilasyonu, proteolitik bölünme ve SUMOilasyon ile düzenlenebilir.

NFAT proteinlerinin T hücre aktivasyonunun düzenlenmesindeki önemli rolü göz önüne alındığında, NFAT sinyallemesini inhibe etmek için birkaç terapötik yaklaşım geliştirilmiştir. Siklosporin A (CsA) ve takrolimus (FK506) gibi kalsinörin inhibitörleri, atopik dermatit, romatoid artrit ve lupus nefriti dahil olmak üzere greft reddive otoimmün hastalıkları tedavi etmek için kullanılmıştır.³⁹⁻⁴⁴ NFAT'ları spesifik olarak hedefleyen diğer bazı inhibitörler (VIVIT peptidi, INCA-1, ST-1959 ve UR-1505 gibi) geliştirilmiş ve bunların otoimmün hastalıkları iyileştirme potansiyellerini araştırmak için uygun hayvan modellerinde analiz edilmesi gerekmektedir.⁴⁵⁻⁴⁸

NFAT T Hücre Alt Kümeleri: Th1, Th2, Th17, Treg ve Tfh

Th1: NFAT başlangıçta T hücrelerinin aktivasyonunda önemli roller oynadığı tespit edilmiş olsa da, NFAT proteinlerinin T yardımcı (Th) hücre farklılaşmasını farklı şekilde etkilediği de gösterilmiştir (Şekil 2).⁴⁹⁻⁵³ Her farklılaştırılmış T alt kümesi, kendi özel ana regülatör transkripsiyon faktörlerinin ve imza sitokinlerinin ekspresyonu ile karakterize edilir. Th1 hücreleri, hücre içi bakterilere ve virüs enfeksiyonlarına karşı temel efektör T hücreleridir.^{54,55} Th1 farklılaşması, TCR sinyallemesi ve IFN- γ ve IL-12 gibi sitokinleri hazırlayarak indüklenir.^{56,57} Antijen uyarımı ile birlikte, sitokin aracılı sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon 1 (STAT1) aktivatörü, Th1'in ana transkripsiyon faktörü olan T-bet'i (TBX21) etkinleştirir.^{58,59} NFAT2'nin bir izotipi olan NFAT2a ekspresyonu, Th1 ve Th2'de Th17 ve Treg'den daha yüksektir.⁶⁰ NFAT1, IFN-promoter bölgesine bağlanır.^{23,61} NFAT1 kaybı, azalmış IFN-üretimi ve artmış IL-4 üretimi ile Th2 hücre farklılaşmasına doğru hafif bir önyargıyı teşvik eder.^{50,51,56,62-64} Son çalışmalar, Ca²⁺ + yanıtının Th1'de daha yoğun ve kalıcı olduğunu ve NFAT nükleer lokalizasyonunun Th2'de Th1'e göre daha kısa olduğunu göstermiştir,⁶⁵ bu da NFAT1 ve/veya NFAT4'ün Th1 inflamasyonunun pozitif düzenleyicileri olduğunu düşündürmektedir.

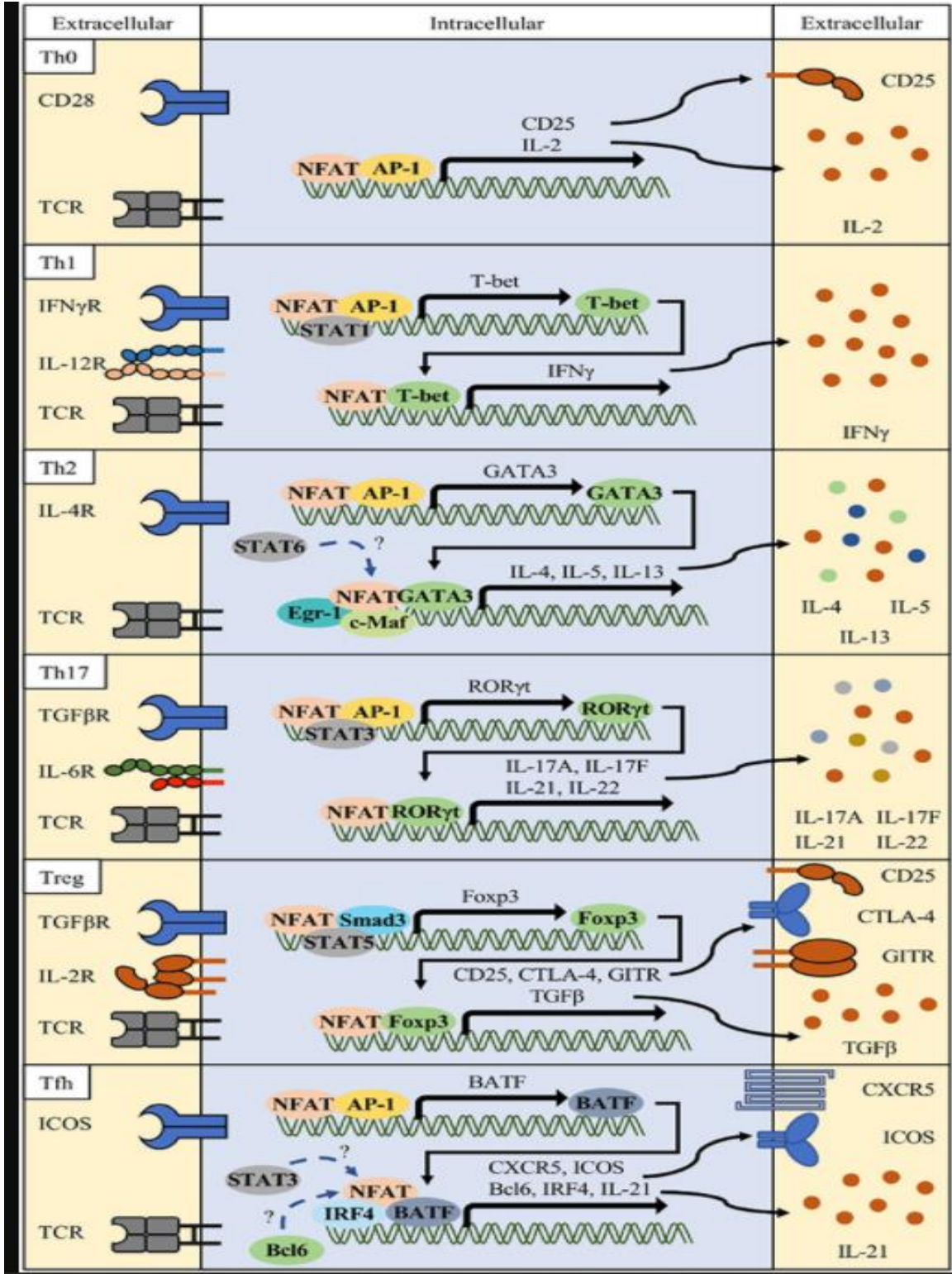
Th2: Buna karşılık, NFAT2 eksikliği olan fareler, IL-4 ve Th2 sitokinlerinin üretiminin bozulduğunu ve IgG1 ve IgE seviyelerinin azaldığını gösterir.⁵² Th2 hücreleri, parazit enfeksiyonlarına karşı mukozal bağışıklığı uyaran IL-4, IL-5 ve IL-13'ü eksprese eder.⁶⁶⁻⁶⁸ GATA3, STAT6, RBPJ κ , MAF, IRF4 ve JUNB gibi çeşitli transkripsiyon faktörleri, Th2 farklılaşması ve fonksiyonunda rol oynamıştır.^{22,69-73} GATA3, IL-4 ve IL-13 promoter bölgelerinde NFAT1 ile bir kromatin yumağı

oluşturur.⁷⁴ IRF4, IL-4 promoter aktivitesini artırmak için NFAT1 ve c-Maf ile sinerji oluşturur.^{22,52} Ubikitine özgü peptidaz 4 (USP4), NFAT aracılı IL-4 promoter aktivitesini arttırmak için IRF4 ve NFAT1 ile etkileşime girer.⁷⁵ RUNX3, NFAT2 ile fiziksel olarak etkileşime girer ve IL-4 üretimini baskılar.⁷⁶ NFAT1, CRTh2 promoterine GATA3 ile rekabetçi bir şekilde bağlanır ve IL-4, IL-5 ve IL-13 gibi Th2 sitokinlerinin üretimine aracılık eden CRTh2 ekspresyonunu negatif olarak düzenler.⁷⁷ Hayvanlarda yapılan deneysel bir çalışmada NFAT1 gen eksikliği Th2 düzeyini arttırarak JUNB/SATB1 aracılığı ile IL-4 sentezini arttırmıştır.^{63,64} Benzer şekilde farelerde NFAT1/4 eksikliği CD4 T hücrelerini TCR stimulasyon yolu ile fazla miktarda IL-4 üretimini sağlar. Bu da Th 2 üretimi IL-4'ten bağımsız olarak NFAT 1/4'un TCR üzerinden Th2 hücrelerden sitokin salınımını arttırdığını gösterir.⁵² Erken büyüme tepkisi proteini-1 (EGR1), ağırlıklı olarak Th2'de eksprese edilir ve NFAT1/2 ile birlikte I4 güçlendirici elemente bağlanır.⁷⁸ Th2 hücrelerinde IL-31 sitokin indüksiyonu, Ca²⁺ + aracılı NFAT1/2 aktivasyonunu gerektirir.⁷⁹ NFAT2 ve STAT6 sinerjik olarak IL31 promoter aktivitesini geliştirir. Bu çalışmalar, NFAT2'nin, NFAT1 veya NFAT4 ile olası karşılıklı ilişki ile Th2 inflamasyonunda olumlu düzenleyici roller oynadığını göstermektedir.

Th17: Th17 alt kümeleri, hücre dışı patojenlere karşı korumada ve otoimmün hastalıklarda inflamatuvar yanıtta önemli oyuncular.^{80,81} Th17 hücreleri tarafından üretilen IL17A, IL-17F, IL-21 ve IL-22'yi içeren sitokinler, nötrofil kümelenmesi gibi büyük doku reaksiyonunu indükler.⁸² NFAT, bu sitokinlerin indüksiyonunda da önemlidir. NFAT1 ve 2, doğrudan IL-17 promoter bölgesine bağlanır.⁸³⁻⁸⁶ Yapılan bir çalışmada CD4'e özgü NFAT1 ve NFAT2'den yoksun farelerde (DKO) IL-17 ekspresyonunda azalma olduğu saptanmış.⁸⁷ Deneysel bir kolit modelinde, NFAT1 eksikliği, mukozal T lenfositleri tarafından azaltılmış IL-6 ve IL-17 üretimi ile koruyucu etkiler göstermiştir.⁸⁸ Diğer bir çalışmada NFAT1 hiperaktivasyonu kalsinörinlerde artmış affiniteye yol açarken kalsinörin inhibitörlerinin etkisinin azalmasına yol açmaktadır. Bu nedenle NFAT1, IL-10 ve IL-17 lokuslarının distal bölgelerine bağlanarak IL-10 ve IL-17 sentezinde artışa yol açmaktadır.⁸⁵ NFAT1 hiperaktivasyonu, in vitro olarak IL-17 üretimini indüklemesine rağmen, fareler, artan IL-10 üretimi ve merkezi sinir sisteminde Treg hücrelerinin birikimi ile deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) indüksiyonuna daha dirençliydi. Tersine, CD4'e

özgü NFAT2 eksikliği olan fareler, Th17'nin ana transkripsiyon düzenleyicisi olan ROR γ t seviyelerinde azalma ve ayrıca IL-17A, IL-17F ve IL-21 üretiminde azalma gösterdi ve EAE'den korundu.⁸⁹ EAE modelinde NFAT1 eksikliği olan fareler de azalmış inflamatuvar yanıt göstermesine rağmen, temeldeki mekanizma NFAT2 eksikliği olan farelerdekinden farklıdır. CD4'e özgü NFAT1-eksik T hücreleri, IL-4 ve IL-10 ile birlikte IL-17 salgılar ve bu patojenik olmayan Th17 hücreleri hastalıklardan korunmaya katkıda bulunur.⁹⁰ Yukarıdaki gözlemler, hem NFAT1 hem de NFAT2'nin Th17 yanıtına katkıda bulunduğunu göstermektedir.





Şekil 6. T yardımcı hücrelerde NFAT ve etkileşen ortak proteinlerin çeşitli kombinasyonları. Her bir Th hücresinin farklılaşması, T hücre reseptörünün (TCR), kostimülatör reseptör sinyallerinin (örneğin CD28 veya ICOS) ve sitokin sinyallerini belirleyen spesifik soyun aktivasyonu ile başlatılır. Bu sinyaller, NFAT/AP-1 kompleksini, Th1 için T-bet, Th2 için GATA3, Th17 için ROR γ t ve foliküler yardımcı T (Tfh) hücreleri için BATF gibi soyla ilgili transkripsiyon faktörlerini ifade etmek üzere uyarmak için düzenlenir. Bu transkripsiyon faktörleri ile kombinasyon halinde, NFAT / partner protein kompleksleri, bunların soy farklılaşmasını ve fonksiyonel özelliklerini (yüzey reseptörleri ve sitokin üretimi) belirler.

2.3.2. Transplantasyon İmmünolojisindeki Parametreler

Transplantasyonda alıcı-verici arasındaki genetik ve immünolojik farklılıklar transplantasyonda en önemli sorunların başında gelmektedir. Nakilde başarı oranını yüksek tutabilmeyi sağlayabilmek için nakil öncesi bazı testlerin yapılması önemlidir;⁹¹

- 1) Kan Grubu Antijenleri
- 2) Doku Grubu Antijenleri
- 3) Panel Reaktif Antikor
- 4) Donör Spesifik Antikor
- 5) Cross-match testleri (Kompleman bağımlı sitotoksiste (CDC) ve Flow Sitometrik Cross Match (FCXM)).

2.3.2.1. Kan Grubu Antijenleri

ABO kan grubu antijenleri sadece eritrositler üzerinde eksprese olmaz aynı zamanda damar endotel hücrelerin üzerinde de eksprese olur. ABO uyumsuz nakillerde, A ve/ veya B antikorlarının varlığı hemagglütinasyona neden olarak hiperakut rejeksiyon gerçekleşmesine sebep olur. Organ nakillerinde alıcı-verici arasındaki ABO uyumu kan transfüzyonlarındaki kadar önemlidir. Rh faktörü ve diğer eritrosit antijenleri ise endotelyumda eksprese olmadığından ABO uyumu kadar önemli değildir.

2.3.2.2. Doku Grubu Antijenleri (HLA)

Transplantasyon öncesi alıcı ile vericinin uyumunu değerlendirmek için HLA-A, HLA-B ve HLA-DR tiplmesi yapılır. Böbrek naklinde uzun dönem sonuçlar halen doku uyum oranı ile paralellik göstermektedir. Her ne kadar yeni ve etkin immüsupresif ilaçlar pratik uygulamada kullanılmaya başlansa da doku uyumu en iyi nakil ile daha iyi sonuçlar alınmaktadır. Saptanan ve alıcıda olmayan her donör antijeni mismatch olarak adlandırılır ve total 2 adet A, 2 adet B, 2 adet DR olmak üzere 6 doku antijeni üzerinden mismatch sayısı belirlenir. Eğer alıcının serumunda kan transfüzyonları, gebelik veya daha önceki transplantasyondan kaynaklanan HLA antijenlerine karşı oluşmuş antikorlar varsa bu anti-HLA antikorları böbrek vericisinin antijenlerine spesifik ise buna donör spesifik antikorlar denir. Bu tür anti-HLA antikorlarının oluşması için kişinin kendine yabancı antijenlerle karşılaşmış olması

gerekir. Solid organ transplantasyonu öncesinde alıcıda 13 donör HLA antijenlerine karşı oluşmuş anti-HLA antikorlarının varlığı in vitro koşullarda tarama testleri ile gösterilebilir. HLA antijenleri bilinen kişilerin lenfositlerinden oluşan paneller kullanılarak gösterilebilen bu antikorlar, ‘panel reaktif antikorlar’ olarak tanımlanırlar Antijen-antikor etkileşimine bağlı olarak panelde saptanan antikor pozitiflik oranı PRA yüzdesi olarak ifade edilir.⁹²⁻⁹⁵

2.3.2.3. Panel Reaktif Antikorlar

PRA (Panel Reaktif Antikor) testi, organ nakli yapılacak olan hastanın hangi HLA antijenlerine karşı antikor oluşturup oluşturmadığının ve oluşan antikorların nicel ve nitel olarak sınıflandırılması ve PRA pozitiflik oranının belirlenmesi amacıyla yapılan bir testtir. PRA; gebelik, kan transfüzyonu ve geçirilmiş nakillerle oluşan vericinin antijenlerine karşı alıcıda olmuş antikorlara verilen genel addır. Sensitizasyon gelişmesi olarak tanımlanan PRA’nın oranının belirlenmesi böbrek transplantasyonundan akıl öncesi bakılması gereken önemli bir parametredir. Nakil olacak hastanın yüksek oranda PRA’ya sahip olması, böbrek nakli şansını düşüren ve nakil sırasında beklemeye sebep olan bir durumdur

cPRA (Hesaplanmış Panel Reaktif Antikor) kullanılmakta olan yöntemler ile PRA pozitiflik oranı, panel içinde bulunan antijen gruplarının sayısına ve paneldeki toplam antijen sayısına göre tespit edilmektedir. Bu test, ister antijen gruplarına göre isterse de tek tek belirli sayıdaki antijenlere göre olsun PRA pozitiflik oranı hesaplanırken her zaman panelde bulunan toplam antijen sayısı kullanılarak hesaplanmaktadır. Oysa panel içinde bulunan antijen miktarları toplumsal antijen profilini belirlemediği için hiçbir zaman gerçekçi bir PRA pozitiflik oranı elde edilememiş olur.

Organ nakli bekleyen hastalar, bekleme listesine alınırken bu gerçekçi olmayan PRA pozitifliğine göre sıralandığında da verici seçiminde zorluklarla karşılaşılması kaçınılmazdır.

Bu düşünce ile yola çıkılarak toplumsal antijen profili ve antijen frekansları hesaplanabilmekte ve bu hesaplama yöntemi ile daha gerçekçi bir hesaplanmış PRA (cPRA) pozitiflik oranı elde edilebilmektedir. Böylece, hesaplanmış PRA (cPRA) pozitiflik oranı ile organ nakli bekleme listesindeki pozitif antikoru bulunan hastalara uygun verici seçilmesi daha gerçekçi kriterlere göre yapılabilecektir.⁹⁶

2.3.2.4. Donör Spesifik Antikorlar

Donör Spesifik Antikorlar; alıcının serumunda vericinin antijenlerine karşı daha önceden oluşmuş anti-HLA antikorların varlığını gösterir. Nakil öncesinde daha önceden oluşmuş DSA'nın saptanması, antikor aracılı hiperakut rejeksiyonu öngörmek için gereklidir.

2.3.2.5. Cross-match Testleri

Cross-match, DSA belirlemek için kullanılan en temel immünolojik testtir. Vericinin lenfositleriyle alıcının serumu arasında bir reaksiyon oluşup oluşmadığının gözlendiği ve naklin başarısını artıran en önemli parametredir. Cross-match testi, CDC ve FCXM olarak iki farklı yöntemle yapılmaktadır. FCXM, CDC'ye göre daha hassas bulgular elde edilen bir testtir. T ve B lenfositlerin ayrılarak sınıf I ve sınıf II anti-HLA antikorlarının belirlenmesinde kullanılan FCXM testinin değerlendirilmesi, nakil sonrası rejeksiyon riskini azaltmaktadır.

Bu parametrelerdeki gelişmeler günümüzde böbrek allogreft sağ kalımını arttırsa da, allogreft rejeksiyonu nakil sonrası immün yanıtların bir sonucu olarak oluşur. Greft rejeksiyonu, etkili olan hücre tipleri ve ağırlıklı immün mekanizmalara göre; hücresel ve humoral rejeksiyon, reddin gerçekleşme süresi ve klinik seyrine göre ise; akut, kronik ve hiperakut rejeksiyon olarak sınıflandırılırlar.

Günümüzde nakil öncesi yapılan ve naklin başarısını öngörebilen immünolojik testler sayesinde nakilden sonraki dakikalar veya saatler içerisinde ortaya çıkan hiperakut rejeksiyonun görülme oranı azalmış olsa da, akut ve kronik rejeksiyon allogreft nakillerin önünde aşılması gereken önemli bir engel olarak durmaktadır.⁹⁷

2.3.3. Klinik Pratik Uygulama

İmmüsupresif tedavi alıcının immünolojik riski ve vericiye bağlı faktörler temel alınarak planlanır.

Tablo 1. Alıcının immünolojik riskinin belirlenmesi-panel reaktif antikor

İmmünolojik durum	Panel reaktif antikor (PRA)
Düşük risk	% 0-20
Orta risk	% 20-80
Yüksek risk	% >80

Tablo 2. Alıcının immünolojik riskinin belirlenmesi-Donör spesifik antikor

İmmünolojik durum	Donör spesifik antikor (DSA)
Düşük risk	-
Orta risk	+ (MFI <2000)
Yüksek risk	+ (MFI 2000-5000)

Tablo 3. Verici ilişkili azalmış/gecikmiş greft fonksiyonu riskinin belirlenmesi

Yaş (yıl) >60
Azalmış glomerüler filtrasyon hızı (ml/dk) <80
Uzamış soğuk iskemi zamanı
Akut böbrek hasarı

2.3.4. Rejeksiyon

Böbrek nakli sonrasında gerek direkt gerekse indirekt yolla oluşan allo antijenlerin tanınması sonrasında gelişen durum rejeksiyon oluşumudur. Bu durum aktive T lenfositlerin, monositlerin, makrofajların, naturel killer hücrelerin, B lenfositlerin aktif rol oynadığı doku hasarı ve organ kaybı ile neticelenen bir tablodur. Olayın şiddeti immünolojik yanıtın tipine göre değişiklik göstermektedir.⁹⁸

Antikor aracılı rejeksiyon, transplantasyon sonrası günler içinde hatta haftalar içinde ortaya çıkar. Temel olarak inflamasyona bağlı greft zedelenmesiyle sonuçlanır. Alıcıdaki antikorların ana hedefi, vericideki peritübüler ve glomerüler kapillerin endoteliumlarının üzerinde beliren HLA antijenleridir. Aynı zamanda anjiotensin II tip I (AT1) reseptör antikorları, kortikosteroid dirençli hipertansiyonlu alıcılarda vasküler rejeksiyondan sorumlu olsa da patolojik rolü açıklanmamıştır. Endotelial hücre yıkımı çeşitli molekülerin ortaya çıkmasına sebep olur. Bu moleküller, platelet agregasyonunu, sitokin ve kemokinlerin aktivitelerini ve salınmalarını başlatan von Willebrand faktör ve P-selektin molekülleridir. Sitokinlerden IL-1a, IL-8 ve kemokinlerden CCL2 (C-C motif ligand 2), glomerülerde lökosit birikimiyle glomerüler hasara, peritubuler kapillerin genişlemesine ve kemoatraklardan C3a ve C5a salınımına neden olur. C4d, klasik kompleman yolağı belirteçidir, sıklıkla peritübüler kapillerde bulunur ve antikor aracılı rejeksiyonla ilişkili kompleman aktivasyonu için belirteçtir. C5b, membran atak

kompleksini (C5b-C9) tetikleyerek lokalize olduğu bölgede endotelial nekrozis ve apoptoza neden olur.⁹⁹

2.3.4.1. Hiperakut Hücresel Rejeksiyon

Transplantasyon öncesi var olan yüksek DSA nedeniyle transplantasyon sonrası dakikalar içinde (bazen bir kaç gün içinde) graft kaybı gelişir. Pretransplantasyon cross-match testlerinin benimsenmesinden sonra günümüzde çok nadir görülmektedir. Histopatolojisi, ciddi endotelial ve arteriyal hasarın göstergeleri olarak arterit (sıklıkla transmural), interstisyel ödem ve neredeyse tüm vakalarda graft nefrektomi gerektiren ciddi kortikal nekroz ile karakterizedir. Çoğunlukla önceden transplantasyon hikayesi olan veya gebelik sayısı fazla olan hastalarda görülmesi, sensitizasyonunun ve önceden oluşmuş antikorların rolünü göstermiştir.

2.3.4.2. Akut Hücresel Rejeksiyon

Akut hücresel rejeksiyonun patogeneğinde hem CD8, hem de CD4 hücreler görev alır. Alıcının T hücrelerinin greftteki (vericiye ait) antijenleri (alloantijenleri) tanımları ile reaksiyon başlar. Tanıma T hücrelerinin greftte bulunan antijen sunan hücrelerdeki donör MHC molekülleri ile karşılaşması ile olur.

CD8 hücreler, klas I HLA antijenlerini tanıır ve matürsitotoksik T hücrelerine dönüşür. Sonrasında IFN γ üretimi olur, granzim ve perforin yolları ile direkt sitotoksik etkiler başlar. CD4 hücreler klas II HLA antijenlerini tanıır ve TH1 ve TH2'ye dönüşür. Sonrasında IFN γ , IL2, TNF α , IL4, IL5, IL10 üretimi başlar. Ayrıca B hücreleri ve eozinofillerin uyarılması da bu yol ile başlar.

T hücreler tarafından üretilen inflamatuvar sitokinler epitel hücrelerini aktive ederler ki bu da, daha fazla T hücrelerini o bölgeye çeker. Aktivasyon sonucunda T hücreler, natural killer (NK) hücreler ve monositler grefte infiltre olmaya başlarlar. İnfiltrasyon direkt interstisyuma, tübüllere, damar endotelinin altına kadar olabilir, sonuçta interstisyel inflamasyon, tübülit ve vaskulit tabloları ortaya çıkar. Mononükleer hücrelerin (lenfosit ve monositlerin) şişmiş olan arter endotelinin altına infiltre olduğu durumlarda arterit-vaskulit komponenti de vardır ve akut hücre aracılı vasküler rejeksiyon olarak adlandırılır.¹⁰⁰

2.3.4.3. Kronik Hücresel Rejeksiyon

Nakil sonrasında ‘de novo’ DSA oluşumu neticesi gelişir. 1 yıldan sonra yavaş fakat progresif seyirli greftdisfonksiyonuna neden olur. Tedaviye dirençlidir.

2.4. Renal Transplantasyonda İmmünsüpresif Tedavi

Transplantasyon sonrası akut rejeksiyon gelişimini önlemek, uzun dönemde graft sağkalımını arttırmak için immünsüpresif ilaçlara gereksinim duyulmaktadır.

Renal transplantasyon sonrası kullanılan immünsüpresif ilaçlar:

1. Kortikosteroidler (prednizolon, prednizon ve metil prednizolon)
2. Anti-proliferatif İlaçlar (azotiopürin, mikofenolat mofetil ve mikofenolat sodyum)
3. Kalsinörin inhibitörleri (siklosporin A, takrolimus)
4. mTOR inhibitörleri (sirolimus, everolimus)
5. Poliklonal antikorlar (anti-lenfosit globulin, anti-timosit globulin)
6. Monoklonal antikorlar (muromonab-CD3 (OKT3), basiliksimab, daklizumab)

İmmünsüpresif tedavi amacını 2 alt grupta toplamak gerekirse;

1-İndüksiyon tedavisi

2-İdame tedavisi

İmmünsüpresif ilaçlar, antijenin tanınmasından başlayarak, hücre proliferasyonu ve sitokin salınımına kadar uzanan, immünoregülatuvar sistemin değişik aşamalarında etki göstermektedir. Bu etki mekanizmaları Şekil 7’de gösterilmektedir.

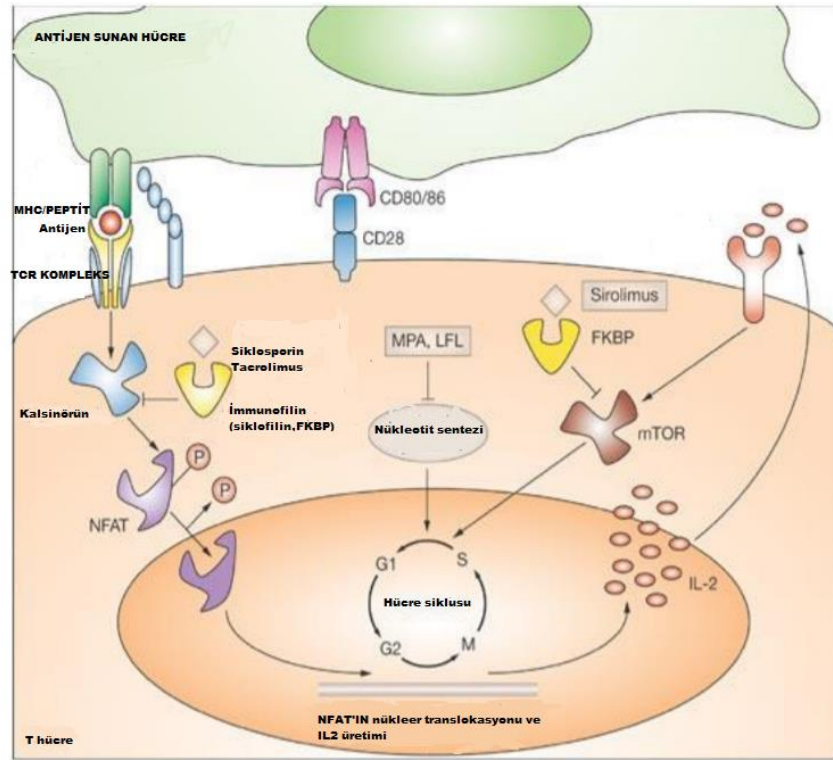
İndüksiyon tedavisi:

Allograft rejeksiyonunu önlemek amacıyla, böbrek naklinden hemen önce, nakil sırasında veya hemen sonra uygulanan immünsüpresif tedavidir. Böbrek transplantasyon hastalarında nefrotoksik etkili kalsinörin inhibitörleri ile erken tedaviden kaçınmak ve böylece iskemi reperfüzyon hasarından kurtulmaya yardımcı olmak amacıyla veya rejeksiyon riski yüksek hastalarda başlangıçtaki immünsüpresif tedaviyi güçlendirmek, akut rejeksiyon ataklarından korunmak amacıyla uygulanan profilaktik bir tedavidir. Bu amaçla kullanılan başlıca ajanlar glukokortikoidler, antitimosit globulin (ATG), anti lenfosit globulin, fare anti-CD3 monoklonal antikoru

(muromonab-CD3/OKT3), anti IL-2 reseptör monoklonal antikorları (basiliximab, daclizumab).

İdame tedavi:

Kortikosteroidler, tacrolimus, siklosporin, azotiyopürin (AZA), mikofenolat mofetil (MMF), everolimus, sirolimus, mikofenolat sodyum (MPA) kullanılmaktadır.



Şekil 7. İmmünespresif ilaçların etki mekanizmaları¹⁰¹

İmmünespresif ilaçlar ya immün yanıtı uyaran ana hücre olan lenfositlerin aktivasyonunu ya da DNA sentezini bloke ederek lenfosit proliferasyonunun önüne geçerek veya değişik mekanizmalar ile lenfolizise yol açarak immünespresyon oluştururlar. Hem sinerjistik etki sağlamaları amacıyla, hem de daha düşük dozda kullanılarak doza bağlı yan etkilerinin azaltılması amacıyla immünespresifler kombinasyon halinde kullanılır. En çok tercih edilen rejim bir kalsinörin inhibitörü, bir antimetabolit ve steroidden oluşan üçlü kombinasyon tedavisidir.

2.4.1. Kalsinörin İnhibitörleri

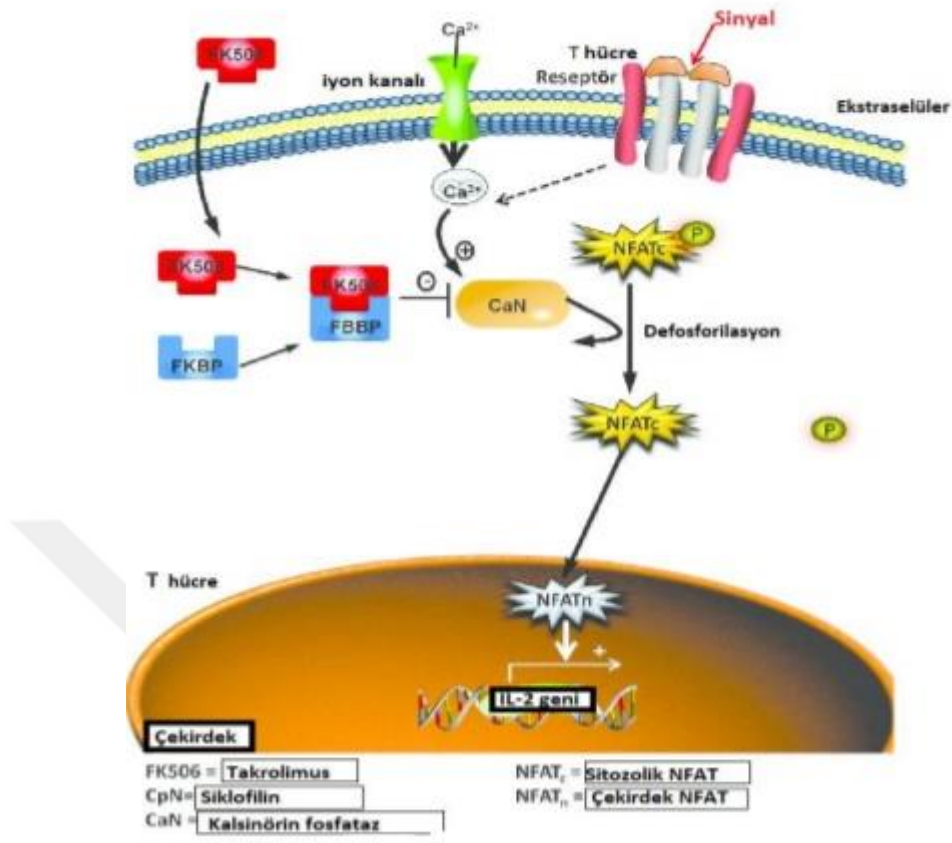
Kalsinörin, kalsiyum ve kalmadulin bağımlı serin/treonin protein fosfataz enzimidir. Sitoplazmada inaktif halde bulunan “aktif T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT)” proteinin defosforilasyonunu gerçekleştirerek aktifleşmesini sağlar. Aktifleşen NFAT proteini, hücre çekirdeğine girerek IL-2 gen transkripsiyonunu aktive eder ve IL-2 üretimini artırır. Artan IL-2, T lenfositlerin aktivitesini ve proliferasyonunu artırarak immün yanıt oluşumunu gerçekleştirir. Siklosporin ve takrolimus, transplant alıcılarında bu mekanizma ile immünsüpresif etki sağlamaktadır.

2.4.1.1. Tacrolimus

1984 yılında ‘*Streptomyces tsukubaensis*’ adlı toprak mantarından elde edilen takrolimus, molekül ağırlığı 804 Dalton olan makrolid grubu bir ilaçtır. Oral veya parenteral kullanımı mevcuttur. Ancak oral kullanımında biyoyararlanımı değişkenlik gösterdiği için, günde birden çok oral alım ile istenen kan düzeyine ulaşılabilir. Kullanım sırasında rutin kan değeri takibi yapılması gerekmektedir. Yarılanma ömrü ortalama 40 saat iken bu değer böbrek transplantasyonlu erişkin hastalarda ortalama 15,6 saattir (Wallemacq ve Verbeeck, 2001). Takrolimusun terapötik ilaç düzeyi 5-20 ng/ml’dir.

2.4.1.1.1. Farmakodinamik Özelliği

Hücre sitoplazmasında takrolimus bağlayan spesifik bir reseptör olan, FK506 bağlayıcı protein-12 (FKBP-12)’ye bağlanır. Bu bağlanma sonucunda kalsinörin ile etkileşime girerek fosfataz aktivitesini bloke ederler. Aktive T lenfosit nükleer faktörünün (nuclear factor of activated T lymphocytes, NFAT) çekirdeğe taşınması için kalsinörin katal izlediği defosforilasyon gereklidir. NFAT sırasıyla IL-2, prototipik T hücre büyüme ve farklılaşma faktörlerinin yer aldığı birçok sitokin genini indükler. Sonuç olarak IL-2 başta olmak üzere sitokin üretiminde, IL-2’nin stimüle ettiği T hücre proliferasyonunda belirgin azalma sağlanır. Ayrıca sitotoksik T lenfosit oluşumunun potent inhibitörü olan TGF- β ekspresyonu uyarılmış olur.



Şekil 8. TKR etki mekanizmasının şematik gösterimi

Takrolimus, reseptörüyle birlikte oluşturduğu kompleksin kalsinörine daha yüksek afinite göstermesi nedeniyle siklosporinden daha potenttir.¹⁰⁴ Pek çok klinik çalışmada da takrolimusun siklosporinden daha az akut rejeksiyon ve allograft kaybı oranlarına sahip olduğunun gösterilmesi üzerine günümüzde daha çok tercih edilen kalsinörin inhibitörü olmuştur.^{102,103}

Kalsinörin inhibitörlerinin ortaya çıkışı böbrek transplant hastalarında akut rejeksiyon epizodlarında çarpıcı bir azalmaya ve bu sayede erken graft yaşam süresinde iyileşmeye yol açmıştır.

Yan etki olarak diyabet gelişme oranlarının daha yüksek bildirilmesine rağmen, takrolimus CsA'ya kıyasla hastalar tarafında daha iyi tolere edilir. Hırşutizm, diş eti hiperplazisi, alopesi, nörolojik bozukluklar, uyku düzeninde bozukluk, hipertansiyon, hiperlipidemi, gastrointestinal yakınmalar (diyare, dispepsi, bulantı, kusma), elektrolit anomalileri, anemi CNI'lerinin sık görülen yan etkileridir.^{104,105-108} Böbrek nakli alıcılarında yapılan çalışmalar da, takrolimus ve CsA'nın akut ve kronik

nefrotoksitesinin benzer olduğunu göstermektedir. Takrolimusun nadiren hipertrofik kardiyomiyopati ve ciddi nötropeniye neden olduğu bildirilmesine karşın CsA ile bu yan etkiler hiç bildirilmemiştir.^{109,110}

2.4.1.1.2. Farmakokinetik Özellikleri

Emilim: Takrolimus oral alımı takiben sindirim sisteminde hızla absorbe olmakta, kandaki pik plazma konsantrasyonuna yaklaşık 1-3 saatte ulaşmaktadır. Takrolimus'un barsaklardan hızlıca absorbe edilmesine rağmen oral biyoyararlanımının %20-25 aralığında olduğu tespit edilmiştir.¹¹¹ Takrolimusun emilim hızı ve derecesi açken en fazladır. Yiyeceklerle birlikte alımı, takrolimus'un emilimin hızını ve miktarını azaltmaktadır.¹¹²

Dağılımı: Takrolimus temel olarak alfa-1-asit glikoproteine yüksek oranda (yaklaşık %99) ve daha az miktarda da serum albuminine, bağlanmaktadır.¹¹³ Plazmadaki takrolimus'un %99'u proteine bağlanmış durumda bulunmaktadır, sistemik dolaşımda takrolimus'un eritrositlere güçlü olarak bağlanması, tam kan konsantrasyonu/plazma konsantrasyonu dağılım oranının yaklaşık 20:1 olması ile sonuçlanmaktadır, bu nedenle terapötik ilaç düzeyi izleminde tam kan takrolimus konsantrasyonu ölçülmektedir.¹¹⁴ Sistemik dolaşıma giren takrolimus'un, eritrositlere bağlanmayan kısmı ise lenfositlere girerek immunosüpresif etkisini göstermektedir.¹¹⁵

Metabolizması: Takrolimus temel olarak, karaciğerde sitokrom P450 (CYP450), enzim sistemi tarafından metabolize edilmektedir.¹¹¹ Sitokrom P450 3A4 ve 3A5 takrolimus metabolizmasında görev alan primer enzimlerdir.¹¹⁶

Eliminasyonu: Takrolimusun %1'inden daha düşük bir oranı idrarla ve feçesle değişme uğramadan atılır, bu durum Takrolimus'un eliminasyon öncesi tama yakın metabolize olduğunu göstermektedir. Takrolimus'un metabolitlerinin %95'i safra yolu ile uzaklaştırılmaktadır.¹¹⁷ CYP3A4 ve CYP3A5 enzimlerinin yanı sıra P-glikoprotein de farklı takrolimus düzeylerine neden olmaktadır.¹¹⁸ P-glikoproteinler, ince barsak enterositlerinin viluslarında bulunmaktadır ve absorbe edilmiş takrolimus intestinal lümene pompalayarak, intrasellüler ilaç konsantrasyonunu düşürmektedirler.¹¹⁹ P-glikoprotein fonksiyonu, kendi aktivitesini inhibe eden ya da indükleyen ajanlarla birlikte kullanıldığında değişmektedir.¹²⁰ Yapılan araştırmalarda, ince barsaklardaki P-

glikoprotein ekspresyonunun, bireyler arası 2 ile 8 kat arası farklılık gösterdiği tespit edilmiştir.¹²¹

Metabolizma İnhibisyonu: Takrolimus metabolizmasının inhibisyonuna neden olan aşağıdaki moleküller, takrolimus kan düzeylerinde artışa ve buna bağlı olarak, nefrotoksisite, nörotoksisite gibi istenmeyen etkilerin ortaya çıkmasına neden olmaktadır.¹²² Bu durumda takrolimus dozunun azaltılması gerekmektedir. Ketokonazol, flukonazol, itrakonazol, vorikonazol, klotrimazol gibi antifungal ajanlar,¹²³ eritromisin, klaritromisin gibi antibiyotikler,¹²⁴ Human Immunodeficiency Virus (HIV) proteaz inhibitörleri (örn: ritonavir, nelfinavir, sakinavir), Hepatit C Virus (HCV) proteaz inhibitörleri (örn. telaprevir, boseprevir),¹²⁵ diltiazem, verapamil, nifedipin, nikardipin, gibi kalsiyum kanal blokerleri,¹²² omeprazol, gibi ilaçlar ile güçlü veya zayıf etkileşim göstermekte ve metabolizma inhibisyonuna neden olabilmektedir. Greyfurt suyunun da metabolizma inhibisyonu ile kan konsantrasyonu seviyelerini artırdığı bildirilmiştir.¹²⁶

Takrolimus kan düzeyi artışına yol açan diğer olası etkileşimler: Takrolimus'un, kendisi gibi yaygın biçimde plazma proteinlerine bağlanma affinitesi yüksek olan ilaçlar (örn. non-steroid anti-enflamatuvar ilaçlar (NSAİİ), oral antikoagülanlar ya da oral antidiyabetikler) ile etkileşimi olası olup kan ilaç konsantrasyonunda artışa neden olmaktadır. Metoklopramid, simetidin gibi prokinetik ilaçlar ve magnezyum-alüminyum-hidroksit gibi absorpsiyonu azaltabilen antiasit ajanlar, potansiyel etkileşimler ile kan ilaç konsantrasyonunu azaltmaktadır.¹²⁷

Metabolizma İndüksiyonu: CYP3A enzimlerinin indüksiyonu, takrolimus eliminasyonunun hızlanmasına, oral biyoyararlanımının azalmasına neden olmaktadır. Böylece ilaç etkililiği azalmakta ve daha yüksek ilaç dozlarına ihtiyaç duyulmaktadır.¹²² Kortikosteroidler, takrolimus metabolizmasında yer alan hem CYP3A hem de P-glikoprotein aktivitesini indüklemektedir, bu nedenle yüksek steroid dozlarına çıkılması durumunda daha yüksek takrolimus dozu ihtiyacı ortaya çıkmaktadır.¹²⁸ Akut rejeksiyonu önlemek için uygulanan yüksek doz prednizolon veya metilprednizolonun, takrolimus kan konsantrasyonunu artırma veya azaltma potansiyeli söz konusu olabilmektedir.

Kan Takrolimus Düzeyinin Önemi: Takrolimus, renal transplantasyon sonrasında akut rejeksiyonu önlemede kullanılan güçlü bir immunsupresandır. Ancak

dar bir terapötik aralığa sahip olması ve istenmeyen etkilere neden olması nedeniyle, ilacın hedef terapötik konsantrasyonlarda tutulması greft ve hasta sağ kalımı için oldukça önemlidir.¹²⁹ Takrolimus'un subterapötik konsantrasyonlarda kalması rejeksiyona neden olurken, yüksek konsantrasyonlarda olması, nefrotoksisite, diabetes mellitus, artmış enfeksiyon riski gibi ciddi yan etkilere neden olmaktadır.¹³⁰ Bu terapötik aralıklar, "Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) Clinical Practice Guideline of Kidney Transplant Recipients" kılavuzunda da belirtildiği şekilde belirlenmektedir (Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work, 2009). Takrolimus ilaç düzeyi, özellikle rejeksiyon gelişme ihtimalinin yüksek olduğu operasyon sonrasındaki ilk günlerde oldukça önemlidir.¹³¹ Takrolimus kullanan böbrek nakil hastalarında yapılan bir çalışmada, takrolimus kan düzeyleri 5ng/ml'nin altında olan, subterapötik düzeyde kalan hastalarda rejeksiyon oranlarının %30 olduğu ve toksisite görülmediği rapor edilirken, 10 ng/ml'nin üzerindeki hastalarda ise rejeksiyon oranlarının sadece %3 olduğunu ancak toksisite riskinin %45 olduğu belirtilmektedir.¹²⁹ Takrolimus ilaç düzeyi izlemi, ilaç dozlarının bireyselleştirilmesine büyük ölçüde yardımcı olsa da deneme yanılma temeline dayanmakta, tek başına yetersiz kalmakta ve birçok hastada ilacın hedef kan düzeylerine ulaşmasını geciktirmektedir.¹²⁹ İlaç, kararlı düzeye ulaşıncaya kadar hasta, yüksek veya düşük dozda takrolimusa maruz kalmakta ve bunun sonucunda da istenmeyen komplikasyonlar görülmektedir.¹³² Son yıllarda özellikle immunosüpresif ilaçların farmakogenetiği üzerine yapılan çalışmalar oldukça önem kazanmıştır. Böylece, genetik temelli doz belirlenmesi ile çok daha hızlı bir şekilde hedef kan konsantrasyonlarına ulaşılırken ortaya çıkabilecek komplikasyonların önüne geçilebilecektir.

Kan Takrolimus Düzeyini Etkileyen Faktörler: Takrolimus kullanan hastalarda görülen bireylerarası farklılıklar yapılan birçok çalışmada açıklanmaya çalışılmıştır.¹²² CYP3A enzimleri ve P-glikoprotein dışında takrolimus düzeylerini etkileyen çeşitli faktörler olduğu tespit edilmiştir. Takrolimus farmakokinetiğine etki ederek, immunosüpresan etkide çeşitliliğe neden olan faktörler aşağıda özetlenmiştir.

Takrolimus İlaç Düzeyini Etkileyen Genetik Olmayan Faktörler:

Cinsiyet: Klinik çalışmalarda cinsiyetin, takrolimus farmakokinetik profilinde değişime neden olmadığı tespit edilmiştir.¹³³

Etnik köken: Araştırmalar, beyaz ırk ile karşılaştırıldığında Afrika kökenli Amerikalıların, daha yüksek takrolimus dozlarına ihtiyaç duyduklarını göstermiştir. Benzer şekilde, biyoyararlanımın da Afrika kökenli hastalarda daha düşük olduğu gözlenmiştir.¹³³ Etnik gruplar arasındaki bu farklılığın ırklar arasındaki CYP3A ve/veya P-glikoprotein aktivitesi ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.¹³⁴

Yaş: Geriatrik hastalarda takrolimus farmakokinetiğinde değişim olmadığı düşünülmese de, pediyatrik hastalar terapötik takrolimus kan konsantrasyonlarına ulaşmak için yetişkinlerden 2-4 kat yüksek takrolimus dozlarına ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüksek doz ihtiyacının, CYP3A enzimlerindeki farklılıklardan ileri geldiği düşünülmektedir bunun yanı sıra P-glikoprotein farklılıkları, barsak uzunluğu, hepatik kan akışı da doz ihtiyacını değiştiren diğer faktörler arasında sayılmaktadır.^{135,136}

Renal fonksiyon: Takrolimus farmakokinetik özellikleri renal fonksiyonlar tarafından etkilenmemektedir. Transplantasyon öncesi renal disfonksiyonu olan hastalar ile sağlıklı gönüllülerde yapılan çalışmalarda, takrolimus klirensin benzer olduğu tespit edilmiştir.¹³⁷

Hepatik fonksiyon: Karaciğer fonksiyonları normal olan kişilerle karşılaştırıldığında, karaciğer fonksiyon bozukluğu bulunan hastalarda takrolimus konsantrasyonlarının daha yüksek, plazma yarılanma ömrünün daha uzun ve klirens seviyelerinin daha düşük olma potansiyeli bulunmaktadır.¹¹²

Kortikosteroid dozu: Takrolimus ile tedavide yer alan steroidler, CYP3A izoenzimlerini indükleyerek takrolimus eliminasyonunu arttırabilmektedirler. Ancak, bir çalışmada uygulanan steroid dozu ile ihtiyaç duyulan takrolimus dozu arasında bir korelasyon olduğu gösterilirken, bir başka çalışmada takrolimus ile steroid kullanımının takrolimus farmakokinetiği üzerine bir etkisi olmadığını gösterilmiştir.¹²⁸

Diyare: Takrolimus kullanan hastalarda akut ve kronik diyare dönemlerinde kan takrolimus düzeylerinde artış olduğu gösterilmiştir.¹³⁸ Bu durum, açlık ve artmış absorpsiyon ve artmış intestinal permeabilite veya azalmış hepatik kan akışı ve azalmış hepatik metabolizma ile açıklanabilir.¹³⁹ Enterite neden olan viral enfeksiyonlar, enterositlerde CYP3A enzim aktivitesini düşürebilir ve takrolimus düzeylerinde artışa neden olabilirler.¹⁴⁰ Ayrıca, gastrointestinal kanalda CYP3A çeşitli yerlerde değişen

miktarlarda bulunmaktadır, gastrointestinal geçiş süresinin değişmesi takrolimus biyoyararlanımını değiştirebilmektedir.¹⁴¹

Transplantasyon sonrası geçen süre: Trasnplanstayon sonrasında erken dönem ile kıyaslandığında, zamanla hastanın terapötik düzeylere ulaşmak için ihtiyaç duyduğu takrolimus dozunun azaldığı gösterilmiştir.¹⁴² Bu durum temel olarak, artan takrolimus biyoyararlanımı ve azalan takrolimus klirensi ile ilişkilendirilmektedir.¹⁴³



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmada böbrek nakli hastalarında nakil böbrek reddinin engellenmesi için kullanılan immunsüpresif ilaçlardan birisi olan tacrolimusun kan düzeyi ile T hücre çekirdeklerindeki NFAT-regulated gen ekspresyonuna etkisi ve klinik yansımalarının araştırılması amaçlandı.

Çalışmanın etik kurul onayı, Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından; 04.09.2019 tarihinde 41 sayılı karar ile alınmıştır.

3.1. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Dahiliye Nefroloji Bilim Dalı ve Tıbbi Genetik ABD tarafından Ocak 2020-Haziran 2020 tarihleri arasında yürütüldü.

3.2. Araştırmanın Evren ve Örneklemesi

Çalışma evrenini, tedavi gören böbrek nakli olmuş hastalar oluşturmaktadır. Çalışma örnekleme, araştırma tarihleri arasında polikliniğe başvuran böbrek nakli olmuş, ayaktan tedavi gören 48 hasta alınması planlanmıştır. Araştırma kapsamında 48 hastaya da başarıyla ulaşılmıştır. Bu hastalar immunsüpresif tedavi olarak tacrolimus rejimi içeren immunsüpresif kullanan hastalardı. Tacrolimus ilaç alımı miktarına göre son 6 ayda stabil dozda tacrolimus alan 48 kişilik hasta planlandı. Hastaların sabah tacrolimus içmeden önceki bazal ilaç seviyesi ile birlikte NFAT gen ekspresyonu ile tacrolimus içtikten sonraki 3. saat kan ilaç düzeyiyle birlikte NFAT gen ekspresyonuna bakılmıştır. Aynı gün sabah en az 12 saatlik açlık sonrası rutin hemogram, glukoz, BUN, kreatinin, ürik asit, ALP, AST, ALT, total protein, albumin, sodyum, potasyum, magnezyum, sedimentasyon, D vitamini, parathormon, total kolesterol, trigliserit, yüksek dansiteli kolesterol, düşük dansiteli kolesterol, spot idrarda protein/kreatinin, glomeruler filtrasyon hızı, kalsiyum, fosfor, CRP düzeyleri ölçülmüştür. NFAT gen ekspresyonu ile hastaların kullandıkları ilaç dozu, serum düzeyi ve hematolojik ve biyokimyasal tetkikler arasındaki ilişkisi değerlendirilmesi planlanmıştır.

Araştırma kapsamına alınma kriterleri;

- Böbrek nakli olan,

- 12 aydır immunosupresif tedavi alan,
- 18 yaş üzeri olan,
- İletişim güçlüğü olmayan,
- Yeni ilaç eklenmesi veya doz ayarlanması yapılmamış olmak
- Nefroloji polikliniğinde ayaktan tedavi gören,
- Araştırmaya katılmaya onam veren gönüllü hastalar
- Aktif infeksiyon, kalp yetersizliği veya hepatik fonksiyon bozukluğu olmaması.

3.3. Verilerin Toplanması

Hasta grubundan alınan kan ve idrar örneklerinden tam kan sayımı, rutin biyokimya, spot idrarda proteinüri çalışıldı. Ayrıca hastalardan NFAT gen ekspresyonunun çalışılması için sitratlı tüplere 2 cc kan alındı ve proje önerisinde hedeflenen NFAT genine yönelik dizaynı yapılan primer-problarla ekspresyon profillemesi aşağıdaki protokole uygun şekilde gerçekleştirildi.

- A) Dokudan RNA İzolasyon Protokolü
- B) RNA İzolasyonu :
- C) *ZymoQuick*-RNA Miniprep Plus Kit(R1058) kullanılmıştır.
- D) Tam Kandan RNA izolasyonu
- E) 200 µl DNA / RNA Shield TM (2X konsantre) doğrudan her 200
- F) µl taze / donmuş kan numunesine eklendi.
- G) 2. Her 400 µl reaktif / kan karışımı için 8 µl Proteinaz K eklendi ve vortekslendi. 30 dakika oda sıcaklığında (20-30 ° C) inkübe edildi.
- H) 3. Eşit hacimde izopropanol (1: 1) eklendi ve vortekslendi.
- İ) 4. Karışım bir Zymo-Spin TM IIICG Column3'e (yeşil) aktarıldı. 1 dk 14000 g de santrifüj edilerek yeni bir toplama tüpüne aktarıldı.
- J) 5. DNase I aktivitesi
- K) (D1) Kolonu 400 µl RNA Yıkama Tamponu eklendi ve santrifüjleyin. 1 dk 14000 g de santrifüj edildi.
- L) (D2) Nükleaz içermeyen bir tüpte 5 µl DNaz I (1 U / µl) *, 75 µl DNA Sindirim Tamponu eklendi
- M) vortekslendi. Karışımı doğrudan kolona eklendi.
- N) (D3) Kolon oda sıcaklığında (20-30 ° C) 15 dakika inkübe edildi.

- O) 6. Kolona 400 µl RNA Hazırlama Tamponu eklendi ve 1 dk 14000 g de santrifüj edildi.
- P) 7. Kolona 700 µl RNA Yıkama Tamponu eklendi ve 1 dk 14000 g de santrifüj edildi.
- Q) 8. 400 µl RNA Yıkama Tamponu eklendi ve 2dk 14000 g de santrifüj edildi.
- R) 9. 1,5 ml ependorf tüpe kolon aktarılarak 50 µl DNaz / RNaz İçermeyen moleküler Su eklendi
- S) ve 1 dk 14000 g de santrifüj edildi.
- T) RNA Kantitasyonu: Rna ölçümleri ThermoMultiscan Gocihazı ile yapıldı.
- U) cDNA Sentezi için: OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit (G236)
- V) Kitin içerisinde bulunan bütün bileşenler yazılan hacimde karıştırıldı ve üzerine 5 ul RNA eklendi. Toplam hacim 20 ul olacak şekilde moleküler su ile tamamlandı.

Component	Volume
5X RT Buffer	4 µl
dNTP	1 µl
Primers	1 µl
OneScript® Plus RTase	1 µl
Total RNA or poly(A) + mRNA	5 µl

- W) 55 C derecede 15 dakika ve 85 C derecede 5 dakike toplam 20 dk süresinde cDNA lar elde edilerek -20 ye kaldırıldı.
- X) Real Time PCR basamağı:
- Y) Çalışma ABI 7500 sisteminde yapılmıştır.
- Z) QPCR Master Mix için Promega A6001 kullanılmıştır.

Component	Volume
GoTaq® qPCR Master Mix (2X)	10 µl
Forward Primer (20X)	1 µl
Reverse Primer (20X)	1 µl
Cdna	3 ul
Moleküler Su	5 ul

Step	Cycles	Temperature	Time
GoTaq® Hot Start Polymerase activation	1	95°C	2 minutes
Denaturation	40	95°C	15 seconds
Annealing and extension	40	60°C	1 minutes

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 23.0 paket programı kullanıldı. Kategorik ölçümler sayı ve yüzde olarak, sürekli ölçümlerde ortalama ve standart sapma (gerekli yerlerde ortanca ve minimum- maksimum) olarak özetlendi. Kategorik değişkenlerin karşılaştırılmasında Ki Kare test ya da Fisher test istatistiği kullanıldı. Gruplar arasında sürekli ölçümlerin karşılaştırılmasında dağılımlar kontrol edildi, değişkenler parametrik dağılım göstermediğinden Mann Whitney U testi kullanıldı. Değişkenler arasındaki korelasyon Spearman'ın korelasyon katsayısı ile belirlendi. Korelasyon katsayısı değerlendirmesi $r \geq 0.91$ ise değişkenler arasında yüksek korelasyon var; $0.90 \leq r \geq 0.71$ ise değişkenler arasındaki korelasyon iyi; $0.70 \leq r \geq 0.51$ ise değişkenler arasındaki korelasyon orta düzeyde; $0.50 \leq r \geq 0.31$ ise değişkenler arasındaki korelasyon düşük; $r \leq 0.3$ ise değişkenler arasındaki korelasyon yok olarak yorumlanmaktadır. 3. saat ve 12.saat ölçümlerinin karşılaştırılmasında Wilcoxon testi kullanıldı. Tüm testlerde istatistiksel önem düzeyi 0.05 olarak alındı.

4. BULGULAR

4.1. Hastaların Genel Demografik ve Klinik Özellikleri

Çalışmaya katılan hastaların genel demografik ve klinik özellikleri Tablo 4 ve Tablo 5’de gösterilmiştir. Çalışmaya katılan hastalar rutin kontrolüne gelmiş, herhangi bir şikayeti olmayan stabil renal transplant alıcılarıdır (n=48).

Çalışmaya katılan 48 hastanın 14 (%29.8) kadın, 34 (%70.2) erkek idi. Tüm hastaların yaşları 40,5±12,9 (ort.±SD) yıl, vücut ağırlıkları 72,1±14,3 (ort.±SD) kg, vücut kitle indeksleri 25,0±3,79 (ort.±SD), transplantasyon sonrası süreleri 7,6±5,5 (ort.±SD) yıldır.

Tablo 4. Hastaların demografik verileri

	N	Mean±SD	Median	Min-Max
Yaş	48	40,5±12,9	39	19-70
Boy	48	168,6±9,3	169,5	150-188
Kilo	48	72,1±14,3	71,5	49-98
BMI	48	25,0±3,7	24,3	16,7-33,8
TX süresi yıl	48	7,6±5,5	6,0	1-19

Transplant alıcıları SDBY sebeplerine göre, HT (%33.3), DM (%2.1), HT+DM (%6.3), glomerulonefrit (%12.5), nefrolitiazis/nefrokalosinozis (%8,3), vezikoüreteral reflü (%6,3), diğer nedenler (%24,9) ve etiyolojisi bilinmeyenler (%6,3) olarak ayrılmaktadır. Hastaların renal transplant vericilerinin canlı - akraba 32 (%66,7), canlı - akraba dışı 8 (%16,7), kadavra 8 (16,7) idi. Komorbid hastalıklar; HT 34 (%70,8), DM 6 (%12,5), ASKH 10 (%20,8) idi.

Tablo 5. Hastaların demografik değişkenlerin dağılımı

	n	%
Cinsiyet		
Erkek	34	70,8
Kadın	14	29,2
Böbrek Yetmezliği Nedeni		
1: Hipertansiyon	16	33,3
Ht+ DM	3	6,3
Ht+ Glomerulonefrit	2	4,2
2: Dm	1	2,1
3: Nefrolitiazis/Nefrokalsinozis	4	8,3
4: Glomerulonefrit	6	12,5
5: İga Nefropatisi	1	2,1
6: Polikistik Böbrek	2	4,2

Tablo 5'in devamı

7: SLE	1	2,1
8: Veziköüretal Reflü	3	6,3
9: Soliter Böbrek	4	8,3
10: Tekrarlayan İye	1	2,1
11: Hidroüreteronefroz	1	2,1
0: Bilinmiyor	3	6,3
Kadavra/Canlı Donör		
Canlı- Akraba	32	66,7
Canlı- Akraba Dışı	8	16,7
Kadavra	8	16,7
Ek Hastalık (Dm)		
Yok	42	87,5
Var	6	12,5
Ek Hastalık (ASKH)		
Yok	38	79,2
Var	10	20,8
Ek Hastalıklar (HT)		
Yok	14	29,2
Var	34	70,8

Hastaların kullanmış olduğu takrolimus doz dağılımı Tablo 6'da belirtilmiştir.

Tablo 6. Tacrolimus doz dağılımı

Tacrolimus dozu ng/ml	n	%
1,0	3	6,3
1,5	8	16,7
2,0	7	14,6
2,5	9	18,8
3,0	8	16,7
4,0	6	12,5
4,5	1	2,1
5,0	2	4,2
6,0	1	2,1
8,0	1	2,1
12,0	1	2,1
18,0	1	2,1

Hastaların kullanmış oldukları ilaç dağılımı Tablo 7'de gösterilmiştir. Hastaların kullanmış oldukları immünsüpresif ilaç kombinasyonu tacrolimus + mikofenolik asit + metilprednizolon 20 (%60.4), tacrolimus + metilprednizolon + azotiyopürin 12 (%25), tacrolimus + metilprednizolon 4 (%8,3), tacrolimus + metilprednizolon + siklosporin 1 (%2.1), tacrolimus + metilprednizolon + evorilimus 1 (%2.1), tacrolimus + mikofenolik asit 1 (%2.1) şeklindeydi. Hastaların diğer antihipertansif 16 (%33.3), ACEi/ARB+diğer antihipertansif 6 (%12.5), ACEi/ARB 2 (%4.2), ACEi/ARB + diğer antihipertansif +

statin 2 (4.2), diğer antihipertansif + allopürinol 2 (%4.2), ACEi/ARB + diğer antihipertansif + statin + allopürinol 1 (%2.1) kullanmaktaydı.

Tablo 7. Hastaların kullandığı ilaçların dağılımı

	n	%
Kullanılan İlaçlar(is)		
Tacrolimus+Mikofenolik Asit+Metilprednizolon	30	62,5
Tacrolimus+Metilprednizolon	4	8,3
Tacrolimus+Metilprednizolon+Azotiyopürin	12	25,0
Tacrolimus+Metilprednizolon+Evorilimus	1	2,1
Tacrolimus+Mikofenolik asit	1	2,1
Kullanılan İlaçlar(diğer)		
Yok	19	39,6
1	2	4,2
1+2	6	12,5
1+2+3	2	4,2
1+2+3+4	1	2,1
2	16	33,3
2+ 4	2	4,2

1: ACE/ARB, 2: Diğer antihipertansifler, 3: Statin grubu, 4: Allopürinol

Hastaların takrolimus kan konsantrasyonu ve *NFATC2* gen aktivasyonu tablo 4. 5 te gösterilmiştir. Hastaların son takrolimus dozunu aldıktan 12 saat sonra bakılan kan ilaç konsantrasyonu $5,64 \pm 1,9$ (ort. $\pm$ SD) , takrolimus alımından 3 saat sonra bakılan kan ilaç konsantrasyonu $8,88 \pm 3,0$ (ort. $\pm$ SD) idi. Hastaların son takrolimus dozunu aldıktan 12 saat sonraki *NFATC2* gen aktivasyonu $11,8 \pm 6,5$, takrolimus alımından 3 saat sonra ki *NFATC2* gen aktivasyonu $16,1 \pm 9,5$ idi. Takrolimus ilaç alımına bağlı kan ilaç konsantrasyonun artma eğilimi gösteriyorken, *NFATC2* gen aktivasyonu da artış eğilimi göstermekteydi.

Tablo 8. Takrolimus kan konsantrasyonu ve *NFATC2* gen aktivasyonu

	N	Mean $\pm$ SD	Median	Min-Max	p
Takrolimus 0. Saat	48	$5,64 \pm 1,9$	5,65	1,6-9,5	0,001
Takrolimus 3. Saat	48	$8,88 \pm 3,0$	8,35	3,8-18,2	
<i>NFATC2</i> Gen Aktivasyonu 0. Saat	48	$11,8 \pm 6,5$	10,2	4,08-42,2	0,011
<i>NFATC2</i> Gen Aktivasyonu 3. Saat	48	$16,1 \pm 9,5$	13,7	4-41,5	

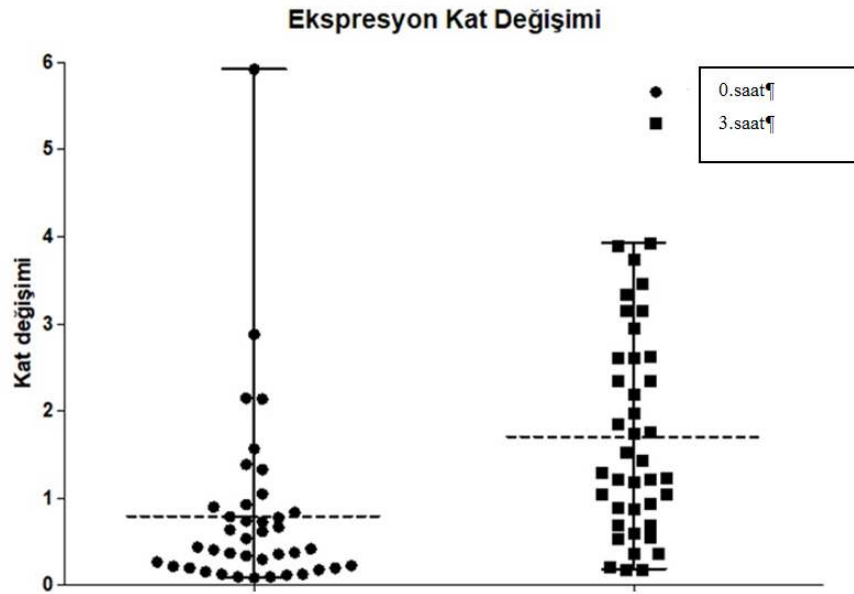
p: Wilcoxon testi

NFATC2 genine yönelik dizaynı yapılan primer-problar ve belirlenen house-keeping genlere yönelik ekspresyon profillemesi yapılmıştır. Hastalardan alınan taze periferik kan örnekleri toplandıktan sonra ilgili protokole uygun biçimde RNA

izolasyonu gerçekleştirilmiş olup örneklerin tamamından yeterli konsantrasyon ve DNA kontaminasyonu olmaksızın RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

NFATC2 genlerinin ekspresyonlarında meydana gelen değişimler Windows Excel programına Ct verilerinin girişi yapılarak hesaplanmış olup, istatistiksel değerlendirmeler de Gene Globe Data Analysis Center (Qiagen) çevrim içi analiz programıyla gerçekleştirilmiştir. Çalışmada iki örneğe ait ekspresyon verisi tespit edilememiş olup çalışma dışı bırakılmıştır. Son takrolimus dozunu aldıktan 12 saat sonra ile karşılaştırmalı yapılan $2^{-\Delta\Delta Ct}$ analizi ile takrolimus alımından 3 saat sonra ilgili genin ekspresyon seviyesindeki kat değişimleri hesaplanmış, kat değişimleri 6'nın üzerinde çıkan örnekler dışlanarak Şekil'de sunulmuştur. *NFATC2* gen ekspresyonu takrolimus alımından 3 saat sonra artma eğiliminde olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görülmektedir.

Şekil 9'da *NFATC2* genindeki ifade artışları kat değişim (Fold Exchange) olarak sunulmuştur.



Şekil 9. *NFATC2* genindeki ifade artışları kat değişim

4.2. Hastaların Laboratuvar Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tüm hastaların, örneklerin alındığı gün bakılan parametrik sonuçlar, hastane bilgi sisteminde incelenmiştir. Tüm bu parametrelerin grup içi ortalama değerleri Tablo 9'da verilmiştir.

Tablo 9. Hastaların klinik sonuçlarının dağılımı

	N	Mean±SD	Median	Min-Max
Glukoz (mg/dL)	48	95,7±20,1	90,5	72-194
BUN (mg/dL)	48	19,5±10,2	17,5	9,2-73,3
Kreatinin (mg/dL)	48	1,32±0,7	1,12	0,65-4,98
Ürikasit (mg/dl)	48	6,97±1,6	6,8	3,7-10,6
Total Protein (g/L)	48	70,9±5,7	71,9	57,0-87,1
Albümin (g/L)	48	41,8±3,3	42,4	32,3-48,0
Kalsiyum (mg\dl)	48	9,6±0,5	9,5	8,4-10,8
Fosfor (mg\dl)	48	3,22±0,8	3,16	1,6-5,5
AST (U/L)	48	18,0±4,5	18	6-30
ALT (U/L)	48	18,7±8,1	16	7-37
ALP (U/L)	37	75,9±24,6	77	33-140
NA (mmol/L)	48	140,5±3,1	141	129-145
K (mmol/L)	48	4,3±0,4	4,3	3,5-5,4
MG (mg\dl)	45	1,8±0,2	1,8	1,23-2,29
Sedimentasyon (saat)	42	16,2±18,8	10,5	2-101
Hemoglobin (g/dL)	48	13,8±2,1	13,8	8,6-18,4
HCT (%)	48	40,7±6,1	40,5	27,2-54,6
WBC (10 ³ /μL)	48	7985,4±2272,3	7300	3000-13100
PLT (10 ³ /μL)	48	220458,3±75545,4	218500	83000-458000
25OHD (ng/mL)	47	14,3±9,5	11,4	4-55
PTH (pg/ml)	42	129,4±79,9	115,3	3,9-317,2
CRP (mg/L)	47	6,6±11,2	3,9	1,2-77,4
TSH (mIU/L)	48	2,36±1,5	2,11	0,8-8,0
T. Kolesterol (mg\dl)	47	205,8±46,6	210	104-307
LDL (mg\dl)	47	125,4±35,7	131	48,4-190,8
HDL (mg\dl)	47	48,7±11,4	47	32-84
Trigliserit (mg\dl)	47	157,3±72,4	150	41-329
İdrar Protein/Kreatinin (mg/g)	46	429,7±587,9	203	52-3454
İdrar Albümin/Kreatinin (mg/g)	44	826,9±1337,4	160	1-6363
GFR(CKD-EPI) (mL/dk/1,7m2)	48	72,6±22,9	73	12-109

Hastaların son takrolimus dozunu aldıktan 12 saat sonra bakılan kan ilaç konsantrasyonu, takrolimus alımından 3 saat sonra bakılan kan ilaç konsantrasyonu ve *NFATC2* gen aktivasyonunun klinik korelasyonu Tablo 10’de belirtilmiştir.

Tablo 10. Klinik korelasyon tablosu

		NFATC2 Gen Aktivasyonu 0. saat	NFATC2 Gen Aktivasyonu 3. saat	Takrolimus 0. saat	Takrolimus 3. saat
Yaş	r	0,17	-0,11	0,02	0,03
	p	0,233	0,448	0,991	0,845
BMİ	r	0,39*	-0,03	0,12	0,02
	p	0,006	0,850	0,426	0,871
TX_süresi yıl	r	0,09	0,12	-0,60*	-0,32*
	p	0,537	0,421	0,0001	0,029
Glukoz (mg\dl)	r	-0,05	-0,17	-0,10	-0,13
	p	0,713	0,242	0,478	0,380

Tablo 10'un devamı

BUN (mg\dl)	r	0,18	-0,12	-0,28	-0,11
	p	0,211	0,409	0,056	0,460
Kreatinin (mg\dl)	r	0,22	-0,03	-0,12	0,12
	p	0,129	0,828	0,415	0,408
Ürikasit (mg\dl)	r	0,33*	0,03	0,09	0,27
	p	0,023	0,859	0,561	0,059
Total Protein (g/L)	r	0,11	0,04	-0,04	-0,09
	p	0,455	0,768	0,764	0,522
Albümin (g/L)	r	0,03	0,12	0,21	0,28
	p	0,831	0,411	0,148	0,051
Kalsiyum (mg\dl)	r	0,15	-0,01	0,04	0,27
	p	0,310	0,943	0,792	0,068
Fosfor (mg\dl)	r	0,01	0,19	-0,15	-0,35*
	p	0,921	0,193	0,307	0,016
AST (U/L)	r	-0,07	-0,01	0,05	0,08
	p	0,628	0,971	0,738	0,605
ALT (U/L)	r	0,01	0,01	0,13	0,23
	p	0,981	0,926	0,383	0,108
ALP (U/L)	r	-0,12	-0,24	0,33*	0,18
	p	0,475	0,152	0,044	0,278
Na (mmol/L)	r	-0,06	0,17	0,06	0,08
	p	0,692	0,236	0,681	0,571
K (mmol/L)	r	-0,01	-0,04	0,01	-0,09
	p	0,991	0,811	0,952	0,549
Mg (mg\dl)	r	0,02	-0,11	-0,22	-0,23
	p	0,916	0,456	0,150	0,122
Sedimentasyon (saat)	r	0,15	-0,25	-0,06	-0,26
	p	0,349	0,103	0,718	0,102
Hemoglobin (g/dL)	r	-0,10	0,11	0,16	0,41*
	p	0,503	0,453	0,269	0,004
HCT (%)	r	-0,16	0,10	0,15	0,40*
	p	0,289	0,498	0,306	0,004
WBC (10 ³ /µL)	r	0,36*	0,34*	-0,14	-0,08
	p	0,012	0,020	0,351	0,609
PLT (10 ³ /µL)	r	0,01	0,05	-0,07	-0,20
	p	0,920	0,738	0,654	0,164
25OHD (ng/mL)	r	-0,22	-0,25	-0,07	-0,02
	p	0,133	0,083	0,650	0,884
PTH (pg/ml)	r	0,10	-0,03	-0,03	0,13
	p	0,520	0,856	0,830	0,421
CRP (mg/L)	r	0,39*	-0,04	-0,14	-0,20
	p	0,006	0,807	0,343	0,181
TSH (mIU/L)	r	0,19	0,27	-0,14	-0,13
	p	0,184	0,066	0,329	0,388
T. Kolesterol (mg\dl)	r	0,26	0,17	-0,07	-0,01
	p	0,078	0,251	0,650	0,990
LDL (mg\dl)	r	0,25	0,07	-0,11	-0,05
	p	0,093	0,651	0,447	0,752
HDL (mg\dl)	r	0,11	0,36*	-0,11	-0,27
	p	0,448	0,013	0,448	0,064
Trigliserit (mg\dl)	r	0,30*	0,14	0,11	0,32*
	p	0,040	0,337	0,463	0,028
İdrar Protein / Kreatinin (mg/g)	r	0,03	-0,21	-0,37*	-0,44*
	p	0,842	0,154	0,012	0,002

Tablo 10'un devamı

İdrar Albümin /	r	-0,184	0,007	-0,51*	-0,24
Kreatinin (mg/g)	p	0,233	0,966	0,0001	0,114
GFR(CKD-EPI)	r	-0,24	0,07	0,18	0,00
(mL/dk/1,7m2)	p	0,096	0,647	0,218	0,995

Gen aktivasyonları ile demografik değişkenlerin karşılaştırdığımızda; takrolimus 3.saat ile cinsiyet arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Erkek hastaların, kadınlara göre 3. saat kandaki takrolimus oranının istatistik anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Tablo 11. Demografik değişkenlerin ile gen aktivasyon sonuçlarının karşılaştırılması

	Takrolimus 0. saat	Takrolimus 3. saat	NFATC2 Gen Aktivasyonu 0. saat	NFATC2 Gen Aktivasyonu 3. Saat
Cinsiyet				
Erkek	5,5(1,6-9,5)	9,1(3,8-18,2)	10,2(4,6-42,2)	13,6(4,0-36,9)
Kadın	5,9(2,4-7,5)	7,4(4,6-10,4)	10,2(4,1-26,6)	14,7(5,5-41,5)
<i>P</i>	<i>0,692</i>	<i>0,034</i>	<i>0,944</i>	<i>0,971</i>
Kadavra/Canlı Donör				
Canlı- Akraba	5,5(1,6-9,5)	8,1(3,8-18,2)	11,3(4,1-42,2)	14,7(4,0-41,5)
Canlı- Akraba Dışı	6,5(5,0-8,9)	9,4(4,6-12,4)	9,7(5,1-15,3)	12,6(5,7-16,8)
Kadavra	1,7910	3,6174	4,162145	11,508010
<i>P</i>	<i>0,231</i>	<i>0,940</i>	<i>0,568</i>	<i>0,345</i>
Ek Hastalık (DM)				
Yok	5,6(1,6-9,5)	8,1(3,8-18,2)	11,3(4,1-42,2)	14,0(4,0-41,5)
Var	6,6(3,9-8,9)	9,4(4,6-12,6)	8,8(4,6-10,3)	7,3(5,7-15,8)
<i>P</i>	<i>0,211</i>	<i>0,844</i>	<i>0,140</i>	<i>0,043</i>
Ek Hastalık (ASKH)				
Yok	5,6(1,6-9,1)	8,4(3,8-18,2)	9,9(4,1-42,2)	13,9(4,0-41,5)
Var	6,1(3,9-9,5)	8,3(7,1-16,0)	11,6(4,6-21,1)	13,6(8,3-26,4)
<i>P</i>	<i>0,137</i>	<i>0,375</i>	<i>0,999</i>	<i>0,515</i>
Ek Hastalıklar (HT)				
Yok	5,1(2,4-9,1)	7,6(4,6-18,2)	11,1(4,1-42,2)	13,7(5,5-34,7)
Var	5,7(1,6-9,5)	8,4(3,8-16,0)	10,2(4,6-21,1)	13,9(4,0-41,5)
<i>P</i>	<i>0,672</i>	<i>0,788</i>	<i>0,097</i>	<i>0,816</i>

5. TARTIŞMA

Günümüzde böbrek nakli sonrası kortikosteroid, kalsinörin inhibitörü ve antimetabolitten oluşan tedavi protokolleri uygulanmaktadır. Bu immunsupresif ilaçlardan kalsinörin inhibitörü olan Tacrolimus; toprak mantarından elde edilmiş bir makrolid antibiyotiktir. Tacrolimus, FK Bağlayıcı protein'e bağlanır. T hücre çekirdeklerinde NFAT traslokasyonunu önleyerek kalsinörin fosfataz aktivasyonunu inhibe etmekte ve TGF- β inhibisyonuna yol açmaktadır. NFAT translokasyonunu önlerken negatif feedback sonucu *NFATC2* gen aktivasyonunda artışa neden olmaktadır. *NFATC2* gen aktivasyonundaki artış IL-10 ve IL-17 sitokinlerin salınımına neden olur. Salınan IL-10 immünmodulator etkisiyle nakil böbreğin rejeksiyon riskini azaltabilir. Eğer gen aktivasyonundaki artış devam edecek olursa IL-17'de meydana gelen artış IL-10'un önüne geçerek nötrofil aktivasyonuna neden olabilir dolayısı ile rejeksiyona neden olabilir. Bu şekliyle immunsüpresif etkisini, etkili olduğu gen bölgesinde moleküler düzeyde gerçekleştirmektedir. Bu etkisiyle tacrolimus akut ve kronik rejeksiyonu önlemede uzun yıllardır başarı ile kullanılmaktadır. Tacrolimus farmakodinamik olarak dar teröpatik aralığa sahiptir. Fazla dozda alınan tacrolimus; sık tekrarlayan ve fırsatçı enfeksiyonlar, sekonder maligniteler basta olmak üzere birçok olumsuz sonuçlara yol açabilirken, etkin dozda alınmayan tacrolimus; nakil böbrek reddine neden olmaktadır. Bu çalışmada tacrolimus kullanan böbrek nakli hastalarında tacrolimus tedavisinden 3 saat ve 12 saat sonraki NFAT gen ekspresyonu ölçülerek, 12 saatlik tacrolimus kan düzeyi ile karşılaştırarak bunun klinik yansımalarının araştırılması amaçladık.

Türk Nefroloji Derneği'nin 2019 kayıt sistemine göre böbrek transplantasyonu yapılan hastaların %45,94'ü 20-44 yaş arasında, %40,6'sı 45-64 arasında olup, bizim çalışmamızda hastaların ortalama yaşı $40,5 \pm 12,9$ saptanmıştır. Cinsiyet dağılımına bakıldığında bu kayıt sisteminde böbrek transplantasyonu yapılan popülasyonun %64,4'ü erkek, %35,6'sı kadın olup bizim çalışmamızda hastaların %70,8'i erkek, %29,2'si kadın idi. Genel anlamda çalışmadaki hastaların yaş ve cinsiyetlerinin TND verileri ile uyumlu olduğu saptandı.

Böbrek transplantasyonu yapılan hastaların primer hastalıkları incelendiğinde Türk Nefroloji Derneğinin 2019 yılı raporunda böbrek transplantasyonu yapılan

hastaların etyolojik nedenlere göre dağılımı birinci sırada DM %20.94, ikinci sırada glomerulonefrit %20.35 sonra sırayla hipertansiyon %18.48, etyolojisi bilinmeyen %16.49, polikistik böbrek %5.96 şeklindedir. Bizim çalışmamızda etyolojik nedenlerde ise birinci sırada hipertansiyon %33.3, ikinci sırada glomerulonefrit %12.5, üçüncü sırada ürolojik nedenler %18.8 şeklinde sıralanmıştır. Çalışmamızda etyolojik nedenlerin kısmen farklı olduğu görülmüştür. Hipertansiyonun birinci sırada olması yanıltıcı olabilir. Hipertansiyon SDBH etyolojisinde rol oynarken hipertansiyonun sıklıkla SDBH'ye sekonder olduğu görülmektedir. Genelde bu hastalar erken dönemde tanı almayan başta glomerulonefritler olmak üzere başka bir hastalığa bağlı SDBH geliştirmiş olup, artık bu aşamada hipertansiyonun sekonder olarak geliştiği tahmin edilebilir.

Donör kaynağı açısından vericiler incelendiğinde çalışmamızda böbrek nakillerinin %83.4'nün canlı vericilerden, %16.7'sinin kadavra vericilerden yapıldığı görülmektedir. Bu sonuçlar 2019 TND kayıt sistemi verileri ile uyumludur. 2019 yılı kayıt sistemi verilerine göre 2019 yılında Türkiye'de yapılan böbrek nakillerinin %79.39'u canlı vericilerden, %20.61'i kadavra vericilerden yapılmıştır.¹ Sonuçlar yurt dışı veriler ile karşılaştırıldığında Türkiye'de kadavradan yapılan nakil oranlarının çok düşük olduğu ve dünya ortalamasının oldukça altında kaldığı görülmektedir. Global Observatory on Donation and Transplantation (GODT) verilerine bakıldığında 2019 yılında yapılan 89823 böbrek naklinin %64'i kadavra vericiden, %36'si canlı vericiden yapılmıştır. Ülkemizde canlı vericilerin ön planda olması akraba ilişkileri ve kan bağından kaynaklandığı düşünülebilir.

NFATC2 gen ekspresyonu takrolimus alımından 3 saat sonra artma eğiliminde olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, *NFATC2* gen aktivasyonunun 0.saat ve 3.saat değeri ile takrolimusun 0.saat ve 3.saat arasında istatistik olarak anlamlı bir korelasyon olmadığı gözlemlendi. Bu duruma takrolimus ilaç alımından 12 saat geçmesine rağmen, takrolimusun kan ilaç konsantrasyonunun devam etmesi ve azalan kan ilaç konsantrasyonuna rağmen *NFATC2* gen ekspresyonunun halen devam ediyor olması neden olabilir. İstatistiksel olarak korelasyon gösterebilmemiz için en az 24 saat takrolimus alımı olmaksızın geçen süre sonrasında kan konsantrasyonları ile gen aktivasyonlarının korelasyonu sağlanabilir. İlaçsız geçen süre immünreaksiyonu

başlatabilir ve transplante edilen böbreğin rejeksiyonuna neden olabilir. Bu nedenle böyle bir çalışma protokolü yapılmamıştır.

Çalışmalar *NFATC2* mRNA'nın esas olarak dalak ve periferik kan lenfositleri gibi periferik lenfoid dokularda ifade olduğunu ve *NFATC4* mRNA'nın timusta yüksek seviyelerde ifade olduğunu göstermiştir; bu bulgular T-hücre gelişiminde *NFATC2* ve *NFATC4*'ün önemli rolünü göstermektedir.^{144,145} *NFATC2* geni, T-hücre reseptörlerine tepki olarak fosforilasyona neden olan ve daha sonra gen transkriptlerinin modülasyonunda rol oynadığı çekirdeğe aktarılan sitoplazmik bileşen NFATC2'yi kodlar.¹⁴⁶ Son çalışmalar NFATC2'nin düzenleyici T hücrelerinin gelişimi ve işlevi üzerinde büyük bir etkisi olduğunu ve mevcut antijene bağlı olarak bağışıklık yanıtını inflamatuvar ya da anti-iflamatuvar yönde düzenlendiğini göstermektedir.^{147,148} Ayrıca, NFATC2 NFATc1 ve NFATc3¹⁴⁹ gibi diğer NFAT aile üyelerinin transkripsiyon baskılayarak B-hücre reseptör stimülasyon için enerji durumunu korumak için seçici bir rol oynadığı bulunmuştur. Buna ek olarak, *NFATC2* mRNA'nın CsA'ya bağımlı bir mekanizma ile aktive T ve NK hücrelerinde aktivasyonunu sağlamıştır.¹⁵⁰ Zijie Wang ve arkadaşları NFATC2/4 ve böbrek nakli sonrası akut ret arasındaki ilişkiyi araştırmak için çalışma tasarlamışlar ve bulgulara dayanarak, öncelikle *NFATC2* ve *NFATC4* genlerinin böbrek nakli sonrası rejeksiyon atakları sırasında T hücrelerinin aktivasyonunda rol oynadığını varsaymışlardır. Bu çalışmada, böbrek nakli sonrası rejeksiyon ile ilişkili *NFATC2* ve *NFATC4* genlerinin SNP'lerini tanımlamak için NGS kullanılmış. Bulguların, *NFATC2* geninde bulunan SNP rs2426295'in böbrek nakli yapılan hastalarda transplantasyon sonrası rejeksiyon ataklarının ortaya çıkmasıyla anlamlı bir korelasyon olduğunu göstermişlerdir.

Çalışmamızda *NFATC2* gen aktivasyonu diğer hastalara oranla 4 kat artış gösteren 2 hasta saptadık. Bu hastaların böbrek fonksiyonları ve idrar proteinleri normal sınırlara yakındı. Ancak bu yüksekliğin daha sonraki dönemlerde rejeksiyon için bir risk oluşturup oluşturmadığını bilmiyoruz ve bu hastaların daha yakın takibinin uygun olacağı düşüncesindeyiz. Literatürde *NFATC2* gen aktivasyonun hangi değer üzerinde Th17 lenfoist aktivasyonu yolu ile rejeksiyona neden olabileceği hakkında bir bilgi bulunmamaktadır.

Çalışmamızda beş hastamızda *NFATC2* gen ekspresyonundaki artış 1 kat, altı hastamızda 2 kat üzerindeydi. Hastaların gen ekspresyonlarındaki artış ile GFR ve idrar protein/kreatinin değerleri arasında bir ilişki saptamadık.

Çalışmamızda WBC, CRP ile *NFATC2*-Gen Aktivasyon 0.saat ve 3.saat arasında istatistik olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. Yüksek WBC değeri *NFATC2*-Gen aktivasyon değeri ile ilişkili olabileceği gibi, inflamasyon, enfeksiyon, metilprednizolon gibi diğer nedenlerin sonucu olabileceği de dikkate alınmalıdır.

İdrar protein/kreatinin ve idrar albümin/kreatinin ile Takrolimus 0.saat ve 3.saat arasında istatistik olarak anlamlı ters yönlü korelasyon saptanmıştır. Takrolimus kan ilaç konsantrasyonu azaldıkça idrar protein/kreatinin ve idrar albümin/kreatinin değerleri artmıştır. Bu durum yetersiz immünsüpresif ilaç kullanımı ile ilişkilendirilebilir. Ancak aynı ilişkili *NFTAC2* gen ekspresyonu ile saptayamadık. Hastalarımızda aşikar enfeksiyon, malignensi ya da otoimmün hastalık kliniği mevcut değildi. Ancak gözden kaçırdığımız altta yatan inflamasyon göstergesi olabileceği gibi 0.saatteki baskılanmamış *NFATC2* gen ekspresyonunun inflamasyon sitokinleri arttırması nedeniyle olabilir. Ancak sitokin düzeylerine bakmamış olmamız nedeniyle durum tam açıklanamamaktadır.

Gen aktivasyonları ile demografik değişkenlerin karşılaştırdığımızda; takrolimus 3.saat ile cinsiyet arasında istatistik olarak anlamlı bir farklılık saptanmıştır. Erkek hastaların, kadınlara göre 3.saat kandaki takrolimus oranının istatistik anlamlı olarak daha yüksek olduğu saptanmıştır. Klinik çalışmalarda cinsiyetin, takrolimus farmakokinetik profilinde değişime neden olmadığı tespit edilmiştir.¹³³ Bu bulguyu açıklayamamaktayız.

ALP ile Takrolimus arasında istatistik olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır ve bu bulguyu açıklamakta güçlük çekmekteyiz.

HDL ile *NFATC2*-Gen Aktivasyon 3.saat arasında istatistik olarak anlamlı bir korelasyon saptanmıştır. *NFATC2* gen ekspresyonundaki artış Th17 hücrelerinin ana transkripsiyonel düzenleyicisi olan RAR ilişkili reseptör gamanın aktivitesindeki artış sonucu lipojenik ve kolesterojenik yolların aktive olması sonucu olduğu düşünülmektedir.¹⁵¹

Tacrolimusun 12 saatinde HDL ve WBC arasında ve tacrolimusun 3. saatinde ürik asit, WBC, CRP ile *NFAT2* arasında önemli korelasyon inflamasyonla ilişkili olabilir.

NFATC2 gen aktivasyonunun 48 stabil renal transplant hastasında takrolimus alımından 3 saat sonra artma eğiliminde olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, *NFATC2* gen aktivasyonunun 0. saat ve 3. saat değeri ile takrolimusun 0. saat ve 3. saat arasında istatistik olarak anlamlı bir korelasyon olmadığı gözlemlendi. Dolayısıyla hastaların takip edilmesinde *NFATC2*'nin takrolimus kan ilaç konsantrasyonuna bakılmasına üstünlüğü olmadığı düşünülebilir, ancak yüksek düzeyde aktivasyonun klinik sonuçları belli değildir. Eş zamanlı sitokin düzeylerini ölçmediğimiz için ayrıntılı yorum yapamıyoruz.

Takrolimusun 0. saat ve 3. saat ile idrar albümin ve idrar kreatinin oranı ve transplantasyon süresi arasında önemli ilişki olması beklenen bir bulgudur.

6. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

1. *NFATC2* gen ekspresyonu takrolimus alımından 3 saat sonra artma eğiliminde olduğu ancak istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, *NFATC2* gen aktivasyonunun 0.saat ve 3.saat değeri ile takrolimusun 0.saat ve 3.saat arasında
2. Artmış *NFATC2 gen* aktivasyonu Th17 lenfosit üzerinden nötrofilleri aktive ederek rejeksiyona neden olabilir.
3. Akut veya kronik rejeksiyonu önlemede *NFATC2* gen aktivasyonunda artış klinik açıdan önemli olabilir. Ancak hangi değerin üzerinde Th 17 lenfosit yolağının aktive olduğu bilinmemektedir. 4 kat artış olan 2 olgumuzda bu yönde bir bulgu yoktu. Hasta sayımızın az olması çalışmamızda hipotezimizi destekleyecek bulguların elde edilmesinde en önemli kısıtlayıcı faktördür.

7. KAYNAKLAR

1. **Erek E, Süleymanlar G, Serdengeçti K.** TND Registry grubu, Türk Nefroloji Derneği Kayıt sistemi Raporları, **2019**:1-6.
2. **Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, ve ark.** Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med.* **1999**; 341(23):1725-30.
3. **Pirsch JD, Miller J, Deierhoi MH, Vincenti F, Filo RS.** A comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine for immunosuppression after cadaveric renal transplantation. *Transplantation*, **1997**; 63(7):977-983.
4. **National Kidney Foundation.** K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*, **2002**; 39:1-26.
5. **Akoğlu E, Süleymanlar G.** *Kronik böbrek yetersizliği.* Temel İç Hastalıkları: Güneş Kitapevi; **1996**:769-76.
6. **Kdigo CKD.** Work Group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*, **2013**; 3.1:1-150.
7. **Malho A, Malheiro J, Fonseca I, Martins LS, Pedroso S, Almeida M, et al.** Advantages of kidney transplant precocity in graft long-term survival. *Transplant Proc*, **2012**; 44(8):2344-7.
8. **Erek E, Süleymanlar G, Serdengeçti K.** TND Registry grubu, Türk Nefroloji Derneği Kayıt sistemi Raporları, **2019**:49.
9. **Doan T, Melvold R, Viselli S, Waltenbaugh C.** Lippincott's Illustrated Reviews: *Immunology* **2014**; 66:260
10. London e-Science Centre
11. **Halloran PF.** Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* **2004**; 351(26):2715-2729.
12. **Sayegh MH, Chandraker A.** Transplantation Immunobiology. In: Taal MW, Chertow GM Marsden PA, Skorecki K, Yu AS, Brenner BM, eds. Brenner & Rector's The Kidney. 9th ed. Philadelphia: Elsevier Inc.; **2012**:2468-2494.
13. **Shaw JP, Utz PJ, Durand DB, Toole JJ, Emmel EA, Crabtree GR.** Erken T hücre aktivasyon genlerinin bir putatif regülatör belirlenmesi. *Bilim*, **1988**; 241:202-5.

14. **Chen L, Rao A, Harrison SC.** Transkripsiyon faktörü meclisleri ile sinyal entegrasyonu: IL-2 organizatörü NF-AT1 ve AP-1 etkileşimleri. *Soğuk Bahar Harb Symp Quant Biol.* **1999;** 64:527-31.
15. **Henderson DJ, Naya I, Bundick RV, Smith GM, Schmidt JA.** FK-506, siklosporin A ve rapamisinin IL-2 üretimi üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması. *İmmünoloji* **1991;** 73:316-21.
16. **Hogan PG, Lewis RS, Rao A.** Lenfositlerde kalsiyum sinyalmoleküler temeli: STIM ve ORAI. *Annu Rev Immunol.* **2010;** 28:491-533.
17. **Feske S.** Lenfosit aktivasyonu ve hastalık kalsiyum sinyalizasyon. *Nat Rev Immunol.* **2007;** 7:690-702.
18. **Hogan PG, Chen L, Nardone J, Rao A.** Kalsiyum tarafından transkripsiyonel düzenleme, kalsinörin, ve NFAT. *Genler Dev.* **2003;** 17:2205-32.
19. **Macián F, López-Rodríguez C, Rao A.** Ortaklar transkripsiyon: NFAT ve AP-1. *Oncogene,* **2001;** 20:2476-89.
20. **Jain J, McCaffrey PG, Valge-Archer VE, Rao A.** Aktif T hücrelerinin nükleer faktör Fos ve Haziran *Doğa,* **1992;** 356:801.
21. **Avni O, Lee D, Macian F, Szabo SJ, Glimcher LH, Rao A.** T(H) hücre farklılaşması sitokin genlerinin histon asetilasyonunda dinamik değişiklikler eşlik eder. *Nat Immunol.* **2002;** 3:643-51.
22. **Rengarajan J, Mowen KA, McBride KD, Smith ED, Singh H, Glimcher LH.** İnterferon düzenleyici faktör 4 (IRF4) interlökin 4 gen ekspresyonunu modüle etmek için NFATc2 ile etkileşime girerek. *J Exp Med.* **2002;** 195:1003-12.
23. **Lee DU, Avni O, Chen L, Rao A.** Genom dizisi karşılaştırması ile ortaya çıkan interferon-gama (IFN-gamma) lokusun distal arttırıcısı. *J Biol Kimya.* **2004;** 279:4802-10.
24. **Macian F.** NFAT proteinleri: T-hücre gelişimi ve fonksiyonunun temel düzenleyicileri. *Nat Rev Immunol.* **2005;** 5:472-84.
25. **Lyakh L, Ghosh P, Pirinç NR.** Normal insan T hücrelerinde NFAT-aile proteinlerinin ekspresyonu. *Mol Hücre Biol.* **1997;** 17:2475-84.
26. **Kaminuma O, Kitamura N, Nishito Y, Nemoto S, Tatsumi H, Mori A, ve ark.** T-Box Transkripsiyon Faktörü TBX5 Eksikliği Nedeniyle NFAT3 Downregulation T Hücrelerinde Sitokin Ekspresyonu için çok önemlidir. *J Immunol.* **2018;** 200:92-100.
27. **Timmerman LA, Healy JI, Ho SN, Chen L, Goodnow CC, Crabtree GR.** Redundant expression but selective utilization of nuclear factor of activated T cells family members. *J Immunol.* **1997;** 159:2735-40.

28. **Trama J, Lu Q, Hawley RG, Ho SN.** The NFAT-related protein NFATL1 (TonEBP/NFAT5) is induced upon T cell activation in a calcineurin-dependent manner. *J Immunol.* **2000**; 165:4884-94.
29. **Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al.** FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* **2006**; 126:375-87.
30. **Bettelli E, Dastrange M, Oukka M.** Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2005**; 102:5138-43.
31. **Vaeth M, Eckstein M, Shaw PJ, Kozhaya L, Yang J, Berberich-Siebelt F, et al.** Store-Operated Ca(2+) Entry in Follicular T cells controls humoral immune responses and autoimmunity. *Immunity* **2016**; 44:1350-64.
32. **Beals CR, Sheridan CM, Turck CW, Gardner P, Crabtree GR.** Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3. *Science* **1997**; 275:1930-4.
33. **Chow CW, Rincón M, Cavanagh J, Dickens M, Davis RJ.** Nuclear accumulation of NFAT4 opposed by the JNK signal transduction pathway. *Science* **1997**; 278:1638-41.
34. **Okamura H, Garcia-Rodriguez C, Martinson H, Qin J, Virshup DM, Rao A.** A conserved docking motif for CK1 binding controls the nuclear localization of NFAT1. *Mol Cell Biol* **2004**; 24:4184-95.
35. **Yang TT, Xiong Q, Enslen H, Davis RJ, Chow CW.** Phosphorylation of NFATc4 by p38 mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* **2002**; 22:3892-904.
36. **Kim JH, Kim K, Youn BU, Jin HM, Kim JY, Moon JB, et al.** RANKL induces NFATc1 acetylation and stability via histone acetyltransferases during osteoclast differentiation. *Biochem J.* **2011**; 436:253-62.
37. **Wu W, Misra RS, Russell JQ, Flavell RA, Rincón M, Budd RC.** Proteolytic regulation of nuclear factor of activated T (NFAT) c2 cells and NFAT activity by caspase-3. *J Biol Chem.* **2006**; 281:10682-90.
38. **Nayak A, Glöckner-Pagel J, Vaeth M, Schumann JE, Buttmann M, Bopp T, et al.** Sumoylation of the transcription factor NFATc1 leads to its subnuclear relocalization and interleukin-2 repression by histone deacetylase. *J Biol Chem.* **2009**; 284:10935-46.
39. **Takahashi N, Fujibayashi T, Kida D, Hirano Y, Kato T, Kato D, et al.** Concomitant methotrexate and tacrolimus augment the clinical response to abatacept in patients with rheumatoid arthritis with a prior history of biological DMARD use. *Rheumatol Int.* **2015**; 35:1707-16.
40. **Yeh H, Markmann JF.** Transplantation: Are calcineurin inhibitors safer than mTOR inhibitors? *Nat Rev Nephrol.* **2013**; 9:11-3.

41. **Hirai T, Ikeda K, Fujishiro M, Tsushima H, Hayakawa K, Suzuki S, et al.** The effectiveness of new triple combination therapy using synthetic disease-modifying anti-rheumatic drugs with different pharmacological function against rheumatoid arthritis: the verification by an *in vitro* and clinical study. *Clin Rheumatol*. **2017**; 36:51-58.
42. **Mok CC.** Calcineurin inhibitors in systemic lupus erythematosus. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. **2017**; 31:429-38.
43. **Wells G, Hagenauer D, Shea B, Suarez-Almazor ME, Welch VA, Tugwell P, et al.** Cyclosporine for rheumatoid arthritis. *Cochrane Database Syst Rev*. **2000**; 10-83.
44. **Hanifin JM, Ling MR, Langley R, Breneman D, Rafal E.** Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: part I, efficacy. *J Am Acad Dermatol*. **2001**; 44(1):28-38.
45. **Yu H, van Berkel TJ, Biessen EA.** Therapeutic potential of VIVIT, a selective peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells, in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Drug Rev* **2007**; 25:175-87.
46. **Roehrl MH, Kang S, Aramburu J, Wagner G, Rao A, Hogan PG.** Selective inhibition of calcineurin-NFAT signaling by blocking protein-protein interaction with small organic molecules. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2004**; 101:7554-9.
47. **Lindstedt R, Ruggiero V, D' Alessio V, Manganello S, Petronzelli F, Stasi MA, et al.** The immunosuppressor st1959, a 3,5-diaryl-s-triazole derivative, inhibits T cell activation by reducing NFAT nuclear residency. *Int J Immunopathol Pharmacol*. **2009**; 22:29-42.
48. **Bailón E, Román J, Ramis I, Michelena P, Balsa D, Merlos M, et al.** The new salicylate derivative UR-1505 modulates the Th2/humoral response in a dextran sodium sulphate model of colitis that resembles ulcerative colitis. *J Pharmacol Sci*. **2009**; 109:315-8.
49. **Hodge MR, Ranger AM, Charles de la Brousse F, Hoey T, Grusby MJ, Glimcher LH.** Hyperproliferation and dysregulation of IL-4 expression in NF-ATp-deficient mice. *Immunity* **1996**; 4:397-405.
50. **Kiani A, Viola JP, Lichtman AH, Rao A.** Down-regulation of IL-4 gene transcription and control of Th2 cell differentiation by a mechanism involving NFAT1. *Immunity* **1997**; 7:849-60.
51. **Ranger AM, Oukka M, Rengarajan J, Glimcher LH.** Inhibitory function of two NFAT family members in lymphoid homeostasis and Th2 development. *Immunity* **1998**; 9:627-35.
52. **Rengarajan J, Tang B, Glimcher LH.** NFATc2 and NFATc3 regulate T(H)2 differentiation and modulate TCR-responsiveness of naive T(H) cells. *Nat Immunol*. **2002**; 3:48-54.
53. **Bopp T, Palmethofer A, Serfling E, Heib V, Schmitt S, Richter C, et al.** NFATc2 and NFATc3 transcription factors play a crucial role in suppression of CD4+ T lymphocytes by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med*. **2005**; 201:181-7.

54. **Khader SA, Cooper AM.** IL-23 and IL-17 in tuberculosis. *Cytokine* **2008**; 41:79-83.
55. **Ramshaw IA, Ramsay AJ, Karupiah G, Rolph MS, Mahalingam S, Ruby JC.** Cytokines and immunity to viral infections. *Immunol Rev.* **1997**; 159:119-35.
56. **Kiani A, García-Cózar FJ, Habermann I, Laforsch S, Aebischer T, Ehninger G, et al.** Regulation of interferon-gamma gene expression by nuclear factor of activated T cells. *Blood*, **2001**; 98:1480-8.
57. **Schoenborn JR, Wilson CB.** Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol.* **2007**; 96:41-101.
58. **Szabo SJ, Sullivan BM, Stemann C, Satoskar AR, Sleckman BP, Glimcher LH.** Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells. *Science* **2002**; 295:338-42.
59. **Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, et al.** T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4+ T cells. *Nat Immunol.* **2002**; 3:549-57.
60. **Hock M, Vaeth M, Rudolf R, Patra AK, Pham DA, Muhammad K, et al.** NFATc1 induction in peripheral T and B lymphocytes. *J Immunol.* **2013**; 190:2345-53.
61. **Agarwal S, Avni O, Rao A.** Cell-type-restricted binding of the transcription factor NFAT to a distal IL-4 enhancer *in vivo*. *Immunity*, **2000**; 12:643-52.
62. **Erb KJ, Twardzik T, Palmetshofer A, Wohlleben G, Tatsch U, Serfling E.** Mice deficient in nuclear factor of activated T-cell transcription factor c2 mount increased Th2 responses after infection with *Nippostrongylus brasiliensis* and decreased Th1 responses after mycobacterial infection. *Infect Immun.* **2003**; 71:6641-7.
63. **Fonseca BP, Olsen PC, Coelho LP, Ferreira TP, Souza HS, Martins MA, et al.** NFAT1 transcription factor regulates pulmonary allergic inflammation and airway responsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **2009**; 40:66-75.
64. **Son JS, Chae CS, Hwang JS, Park ZY, Im SH.** Enhanced chromatin accessibility and recruitment of JUNB mediate the sustained IL-4 expression in NFAT1 deficient T helper 2 cells. *PLoS ONE* **2011**; 6:220-42.
65. **Izsepi E, Himer L, Szilagyi O, Hajdu P, Panyi G, Laszlo G, et al.** Membrane microdomain organization, calcium signal, and NFAT activation as an important axis in polarized Th cell function. *Cytometry A* **2013**; 83:185-96.
66. **Tepper RI, Levinson DA, Stanger BZ, Campos-Torres J, Abbas AK, Leder P.** IL-4 induces allergic-like inflammatory disease and alters T cell development in transgenic mice. *Cell* **1990**; 62:457-67.

67. Ricci M, Matucci A, Rossi O. IL-4 as a key factor influencing the development of allergen-specific Th2-like cells in atopic individuals. *J Invest Allergol Clin Immunol*, **1997**; 7:144-50.
68. Perrigoue JG, Zaph C, Guild K, Du Y, Artis D. IL-31-IL-31R interactions limit the magnitude of Th2 cytokine-dependent immunity and inflammation following intestinal helminth infection. *J Immunol*. **2009**; 182:6088-94.
69. Agarwal S, Rao A. Modulation of chromatin structure regulates cytokine gene expression during T cell differentiation. *Immunity*, **1998**; 9:765-75.
70. Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigen-presenting cells. *Cell*, **2004**; 117:515-26.
71. Zheng W, Flavell RA. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell*, **1997**; 89:587-96.
72. Li B, Tournier C, Davis RJ, Flavell RA. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *EMBO J*. **1999**; 18:420-32.
73. Lohoff M, Mittrücker HW, Pechtl S, Bischof S, Sommer F, Kock S, et al. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA*. **2002**; 99:11808-12.
74. Yao X, Zha W, Song W, He H, Huang M, Jazrawi E, et al. Coordinated regulation of IL-4 and IL-13 expression in human T cells: 3C analysis for DNA looping. *Biochem Biophys Res Commun*. **2012**; 417:996-1001.
75. Guo Z, Xu P, Ge S, Zhang C, Zheng X, Xu J, et al. Ubiquitin specific peptidase 4 stabilizes interferon regulatory factor protein and promotes its function to facilitate interleukin-4 expression in T helper type 2 cells. *Int J Mol Med*. **2017**; 40:979-86.
76. Lee SH, Jeong HM, Choi JM, Cho YC, Kim TS, Lee KY, et al. Runx3 inhibits IL-4 production in T cells via physical interaction with NFAT. *Biochem Biophys Res Commun*. **2009**; 381:214-7.
77. MacLean Scott E, Solomon LA, Davidson C, Storie J, Palikhe NS, Cameron L. Activation of Th2 cells downregulates CRTh2 through an NFAT1 mediated mechanism. *PLoS ONE*, **2018**; 13:156.
78. Lohoff M, Giaisi M, Köhler R, Casper B, Krammer PH, Li-Weber M. Early growth response protein-1 (Egr-1) is preferentially expressed in T helper type 2 (Th2) cells and is involved in acute transcription of the Th2 cytokine interleukin-4. *J Biol Chem*. **2010**; 285:1643-52.
79. Park K, Park JH, Yang WJ, Lee JJ, Song MJ, Kim HP. Transcriptional activation of the IL31 gene by NFAT and STAT6. *J Leukoc Biol*. **2012**; 91:245-57.

80. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* **2009**; 27:485-517.
81. Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature*, **2010**; 467:967-71.
82. Kolls JK, Lindén A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity*, **2004**; 21:467-76.
83. Gomez-Rodriguez J, Sahu N, Handon R, Davidson TS, Anderson SM, Kirby MR, et al. Differential expression of interleukin-17A and-17F is coupled to T cell receptor signaling via inducible T cell kinase. *Immunity*, **2009**; 31:587-97.
84. Hermann-Kleiter N, Meisel M, Fresser F, Thuille N, Müller M, Roth L, et al. Nuclear orphan receptor NR2F6 directly antagonizes NFAT and RORgamma binding to the Il17a promoter. *J Autoimmun.* **2012**; 39:428-40.
85. Ghosh S, Koralov SB, Stevanovic I, Sundrud MS, Sasaki Y, Rajewsky K, et al. Hyperactivation of nuclear factor of activated T cells 1 (NFAT1) in T cells attenuates severity of murine autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2010**; 107:15169-74.
86. Hermann-Kleiter N, Baier G. Orphan nuclear receptor NR2F6 acts as an essential gatekeeper of Th17 CD4+ T cell effector functions. *Cell Commun Signal.* **2014**; 12:38.
87. Vaeth M, Schliesser U, Müller G, Reissig S, Satoh K, Tuettenberg A, et al. Dependence on nuclear factor of activated T-cells (NFAT) levels discriminates conventional T cells from Foxp3+ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* **2012**; 109:16258-63.
88. Weigmann B, Lehr HA, Yancopoulos G, Valenzuela D, Murphy A, Stevens S, et al. The transcription factor NFATc2 controls IL-6-dependent T cell activation in experimental colitis. *J Exp Med.* **2008**; 205:2099-110.
89. Reppert S, Zinser E, Holzinger C, Sandrock L, Koch S, Finotto S. NFATc1 deficiency in T cells protects mice from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* **2015**; 45:1426-40.
90. Dietz L, Frommer F, Vogel AL, Vaeth M, Serfling E, Waisman A, et al. NFAT1 deficit and NFAT2 deficit attenuate EAE via different mechanisms. *Eur J Immunol.* **2015**; 45:1377-89.
91. Aubert V, Venetz JP, Panteleo G, Pascual M. low levels of human leukocyte antigen donorspecific antibodies detected by solid phase assay before transplantation are frequently clinically irrelevant. *Hum immunol*, **2009**; 70:580-583.
92. Hata Y, Cecka JM, Takemoto S, et al. Effects of changes in the criteria for nationally shared kidney transplants for HLA-matched patients. *Transplantation*, **1998**; 65:208-212.

93. **Leffell MS, Zachary AA.** The national impact of the 1995 changes to the UNOS renal allocation system. United Network for Organ Sharing. *Clin Transplant*, **1999**; 13:287-295.
94. **Morris PJ, Johnson RJ, Fuggle SV, et al.** Analysis of factors that affect outcome of primary cadaveric renal transplantation in the UK. HLA Task Force of the Kidney Advisory Group of the United Kingdom Transplant Support Service Authority (UKTSSA). *Lancet*, **1999**; 354:1147-152.
95. **Liu, Z, Colovai, AI, Tugulea, S, et al.** Indirect recognition of donor HLA-DR peptides in organ allograft rejection. *J Clin Invest*, **1996**; 98:1150.
96. **Hourmand M, Cespron-Gautier A, Terasaki PI, Mizutani K, Moreau A, Meurette A, et al.** Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. *J Am Soc Nephrol*, **2005**; 16:2804-2812.
97. **Lachmann N, Terasaki PI, Butte K, Liefeldt L, Kahl A, Reinke P et al.** Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex post transplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts. *Transplantation*, **2009**; 87:1505-1513.
98. **Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH.** Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol*. **1998**; 10(5):525-31.
99. **Honger G, Hopfer H, Arnold ML, Spriewald BM, Schaub S, Amico P.** Pre transplant IgG subclasses of donor-specific human leukocyte antigen antibodies and development of antibodymediated rejection. *Transplantation*, **2011**; 92:41-47.
100. **Panigrahi A, Gupta N, Siddiqui JA, Margoob A, Bhowmik D, Guleria S et al.** Posttransplant development of MICA and anti-HLA antibodies is associated with acute rejection episodes and renal allograft loss. *Hum immunol* **2007**; 68:362-367.
101. **Samaniego M, Becker BN, Djamali A.** Nature Clinical Practice Nephrology **2006**; 2: 688-699.
102. **Halloran PF.** Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med*. **2004**; 351(26):2715-29.
103. **Van Sandwijk MS, Bemelman FJ, Ten Berge IJM.** Immunosuppressive drugs after solid organ transplantation. *Neth J Med*. **2013**; 71(6):281-289.
104. **Transplantasyon Nefrolojisi Pratik Uygulama Önerileri.** Türk Nefroloji Derneği **2016**.
105. **Wagner M, Earley AK, Webster AC, Schmid CH, Balk EM, Uhlig K.** Mycophenolic acid versus azathioprine as primary immunosuppression for kidney transplant recipients. *Cochrane Database Syst Rev*, **2015**; 12:46.

106. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Fürstenberg A, Yang CL, Roeschel T, et al. The calcineurin inhibitor tacrolimus activates the renal sodium chloride cotransporter to cause hypertension. *Nat Med*, **2011**; 17(10):1304-9.
107. Randomised trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporin in prevention of liver allograft rejection. European FK506 Multicentre Liver Study Group. *Lancet*, **1994**; 344(8920):423-8.
108. Landewe RB, Goei The HS, van Rijthoven AW, Rietveld JR, Breedveld FC, Dijkmans BA. Cyclosporine in common clinical practice: an estimation of the benefit/risk ratio in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, **1994**; 21(9):1631-6.
109. Atkison, P, Joubert G, Barron A, Grant D, Paradis K, Seidman E et al. Hypertrophic cardiomyopathy associated with tacrolimus in paediatric transplant patients. *Lancet*, **1995**; 345(8954):894-6.
110. De Rycke A, Dierickx D, Kuypers DR. Tacrolimus-induced neutropenia in renal transplant recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*, **2011**; 6(3):62 690-4.
111. Iwasak K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet*, **2007**; 22(5):328-335.
112. Bekersky I, Dressler D, Mekki QA. Effect of low- and high-fat meals on tacrolimus absorption following 5 mg single oral doses to healthy human subjects. *J Clin Pharmacol*, **2001**; 41(2):176-182.
113. Nagase K, Iwasaki K, Nozaki K, Noda K. Distribution and protein binding of FK506, a potent immunosuppressive macrolide lactone, in human blood and its uptake by erythrocytes. *J Pharm Pharmacol*, **1994**; 46(2):113-117.
114. Tang JT, Andrews LM, Van Gelder T, Shi YY, Van Schaik RH, Wang LL, Hesselink DA. Pharmacogenetic aspects of the use of tacrolimus in renal transplantation: recent developments and ethnic considerations. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, **2016**; 12(5):555-565.
115. Kapturczak MH, Meier-Kriesche HU, Kaplan B. Pharmacology of calcineurin antagonists. *Transplant Proc*, **2004**; 36(2):25-32.
116. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, Thummel KE. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos*, **2006**; 34(5):836-847.
117. Moller A, Iwasaki K, Kawamura A, Teramura Y, Shiraga T, Hata T, Schafer A, Undre NA. The disposition of ¹⁴C-labeled tacrolimus after intravenous and oral administration in healthy human subjects. *Drug Metab Dispos*, **1999**; 27(6):633-636.
118. Hebert MF. Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, **1997**; 27(2-3):201-214.

119. Wacher VJ, Silverman Ja, Zhang Y, Benet LZ. Role of P-glycoprotein and cytochrome P450 3A in limiting oral absorption of peptides and peptidomimetics. *J Pharm Sci*, **1998**; 87(11):1322-1330.
120. Yigitaslan S, Erol K, Cengelli C. The Effect of P-Glycoprotein Inhibition and Activation on the Absorption and Serum Levels of Cyclosporine and Tacrolimus in Rats. *Adv Clin Exp Med*, **2016**; 25(2):237-242.
121. Lown KS, Mayo RR, Leichtman AB, Hsiao HL, Turgeon DK, Schmiedlinren P, Brown MB, Guo W, Rossi SJ, Benet LZ, Watkins PB. Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine. *Clin Pharmacol Ther*, **1997**; 62(3):248-260.
122. Christians U, Jacobsen W, Benet LZ, Lampen A. Mechanisms of clinically relevant drug interactions associated with tacrolimus. *Clin Pharmacokinet*, **2002**; 41(11):813-851.
123. Albengres E, Le Louet H, Tillement JP. Systemic antifungal agents. Drug interactions of clinical significance. *Drug Saf*, **1998**; 18(2):83-97.
124. Wallemacq PE, Verbeeck RK. Comparative clinical pharmacokinetics of tacrolimus in paediatric and adult patients. *Clin Pharmacokinet*, **2001**; 40(4):283-295.
125. Harbell J, Terrault NA, Stock P. Solid organ transplants in HIV-infected patients. *Curr HIV/AIDS Rep*, **2013**; 10(3):217-225.
126. Edwards DJ, Fitzsimmons ME, Schuetz EG, Yasuda K, Ducharme MP, Warbasse LH, Woster PM, Schuetz JD, Watkins P. 6',7'- Dihydroxybergamottin in grapefruit juice and Seville orange juice: effects on 146 cyclosporine disposition, enterocyte CYP3A4, and P-glycoprotein. *Clin Pharmacol Ther*, **1999**; 65(3):237-244.
127. Mignat C. Clinically significant drug interactions with new immunosuppressive agents. *Drug Saf*, **1997**; 16(4):267-278.
128. Anglicheau D, Flamant M, Schlageter MH, Martinez F, Cassinat B, Beaune P, Legendre C, Thervet E. Pharmacokinetic interaction between corticosteroids and tacrolimus after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant*, **2003**; 18(11):2409-2414.
129. Oellerich M, Armstrong VW, Schutz E, Shaw LM. Therapeutic drug monitoring of cyclosporine and tacrolimus. Update on Lake Louise Consensus Conference on cyclosporin and tacrolimus. *Clin Biochem*, **1998**; 31(5):309-316.
130. Fredericks S, Holt DW, Macphee IA. The pharmacogenetics of immunosuppression for organ transplantation: a route to individualization of drug administration. *Am J Pharmacogenomics*, **2003**; 3(5):291-301.
131. Tavira B, Coto E, Diaz-Corte C, Alvarez V, Lopez-Larrea C, Ortega F. A search for new CYP3A4 variants as determinants of tacrolimus dose requirements in renal-transplanted patients. *Pharmacogenet Genomics*, **2013**; 23(8):445-448.

132. Macphee IA, Fredericks S, Tai T, Syrris P, Carter ND, Johnston A, Goldberg L, Holt DW. The influence of pharmacogenetics on the time to achieve target tacrolimus concentrations after kidney transplantation. *Am J Transplant*, **2004**; 4(6):914-919.
133. Fitzsimmons WE, Bekersky I, Dressler D, Raye K, Hodosh E, Mekki Q. Demographic considerations in tacrolimus pharmacokinetics. *Transplant Proc*, **1998**; 30(4):1359-1364.
134. Felipe CR, Garcia C, Moreira S, Olsen N, Silva HT, Pestana OM. Choosing the right dose of new immunosuppressive drugs for new populations: importance of pharmacokinetic studies. *Transplant Proc*, **2001**; 33(1-2):1095-1096.
135. Mediaromid SV, Colonna JO, Shaked A, Vargas J, Ament ME, Busuttill RW. Differences in oral FK506 dose requirements between adult and pediatric liver transplant patients. *Transplantation*, **1993**; 55(6):1328-1332.
136. Przepiorka D, Blamble D, Hilsenbeck S, Danielson M, Krance R, Chan KW. Tacrolimus clearance is age-dependent within the pediatric population. *Bone Marrow Transplant*, **2000**; 26(6):601-605.
137. Hesselink Da, Ngyuen H, Wabbijn M, Gregoor PJ, Steyerberg EW, Van Riemsdijk IC, Weimar W, Van Gelder T. Tacrolimus dose requirement in renal transplant recipients is significantly higher when used in combination with corticosteroids. *Br J Clin Pharmacol*, **2003**; 56(3):327-330.
138. Staatz CE, Tett SE. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of tacrolimus in solid organ transplantation. *Clin Pharmacokinet*, **2004**; 43(10):623-653.
139. Zylber-Katz E, Granot E. Abrupt increase of tacrolimus blood levels during an episode of Shigella infection in a child after liver transplantation. *Ther Drug Monit*, **2001**; 23(6):647-649.
140. Asano T, Nishimoto K, Hayakawa M. Increased tacrolimus trough levels in association with severe diarrhea, a case report. *Transplant Proc*, **2004**; 36(7):2096-2097.
141. Berengue JI, Lopez-Espinosa JA, Ortega-Lopez J, Sanchez-Sanchez L, Castilla-Valdes P, Asensio-Llorente M, Margarit-Creixell C. Two- to three-fold increase in blood tacrolimus (FK506) le, **2003**.
142. Dashti-Khavidaki S, Ghaffari S, Gohari M, Khatami Mr, Zahiri Z. Tacrolimus Dose Requirement in Iranian Kidney Transplant Recipients within the First Three Weeks after Transplantation. *Int J Organ Transplant Med*, **2016**; 7(3):167-171.
143. Pou L, Brunet M, Andres I, Rodamilans M, Lopez R, Corbella J. Influence of posttransplant time on dose and concentration of tacrolimus in liver transplant patients. *Transpl Int*, **1998**; 11(1):270-271.

- 144. Masuda ES, Naito Y, Tokumitsu H, Campbell D, Saito F, Hannum C, et al.** NFATx, a novel member of the nuclear factor of activated T cells family that is expressed predominantly in the thymus. *Mol Cell Biol*, **1995**; 15(5):2697-2706.
- 145. Aramburu J, Azzoni L, Rao A, Perussia B.** Activation and expression of the nuclear factors of activated T cells, NFATp and NFATc, in human natural killer cells: regulation upon CD16 ligand binding. *J Exp Med*, **1995**; 182(3):801-810.
- 146. Rao A, Luo C, Hogan PG.** Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol*, **1997**; 15:707-747.
- 147. Xanthoudakis S, Viola JP, Shaw KT, Luo C, Wallace JD, Bozza PT et al.** An enhanced immune response in mice lacking the transcription factor NFAT1. *Science*, **1996**; 272(5263):892-895.
- 148. Karwot R, Ubel C, Bopp T, Schmitt E, Finotto S.** Increased immunosuppressive function of CD4(+) CD25(+) Foxp3(+) GITR+T regulatory cells from NFATc2((-/-)) mice controls allergen-induced experimental asthma. *Immunobiology* **2012**; 217(9):905-911.
- 149. Bonami RH, Wolfle WT, Thomas JW, Kendall PL.** NFATc2 (NFAT1) assists BCR-mediated anergy in anti-insulin B cells. *Mol Immunol*, **2014**; 62(2):321-328.
- 150. Northrop JP, Ho SN, Chen L, Thomas DJ, Timmerman LA, Nolan GP et al.** NF-AT components define a family of transcription factors targeted in T-cell activation. *Nature*, **1994**; 369(6480):497-502.
- 151.** Current Opinion in Immunology **2017**; 46:121-12.