

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**TAKROLİMUS KULLANAN BÖBREK NAKİL
HASTALARINDA CYP2C8, CYP3A5 VE ABCB1 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN NAKİL SONRASI BÖBREK
FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ**

Dr. Zühal KALTUŞ

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR

2021

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TAKROLİMUS KULLANAN BÖBREK NAKİL
HASTALARINDA CYP2C8, CYP3A5 VE ABCB1 GEN
POLİMORFİZMLERİNİN NAKİL SONRASI BÖBREK
FONKSİYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Dr. Zühal KALTUŞ

Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Engin YILDIRIM

ESKİŞEHİR

2021

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.

ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

Dr. Zühal KALTUŞ' a ait "Takrolimus kullanan böbrek nakil hastalarında CYP2C8, CYP3A5 ve ABCB1 gen polimorfizmlerinin nakil sonrası böbrek fonksiyonu üzerine etkisi" adlı çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 02.04.2021

Jüri Başkanı Prof. Dr. Engin YILDIRIM
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Fatma Sultan KILIÇ
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Üye Prof. Dr. Kevser EROL
Bahçeşehir Üniversitesi
Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun

.....Tarih veSayılı Kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ

Dekan

TEŞEKKÜR

Tıbbi Farmakoloji AbD’da yapmış olduğum uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren değerli bölüm hocalarıma, farmakogenetik alanında bana çalışma fırsatı veren ve tezimin hazırlanması sırasındaki emek ve katkılarından dolayı tez danışman hocam Prof. Dr Engin YILDIRIM’a, tezime katkılarından dolayı Prof. Dr Garip ŞAHİN’e ve birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Beni yetiştirip büyüten, tüm eğitim hayatımda sonsuz destekleriyle yanımda olup bana yol gösteren canım annem ve babama, destekleriyle her daim benimle olan kardeşlerime sonsuz teşekkürler. Hayat arkadaşım aynı zamanda gurur duyduğum meslektaşım Dr Mehmet Kaltuş’ a benimle birlikte bu yolda yürüdüğü ve her daim yanımda olduğu için teşekkürler. Biricik kızım, kıymetlim Aslı Serra’ma bana yaşattığı tüm güzel duygular için teşekkür ediyorum.

ÖZET

Kaltuş Z, Takrolimus kullanan böbrek nakil hastalarında CYP2C8, CYP3A5 ve ABCB1 gen polimorfizmlerinin nakil sonrası böbrek fonksiyonu üzerine etkisi, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2021. Takrolimus (TAC, FK-506) böbrek nakil hastalarında organ reddini önlemek için yaygın olarak kullanılan bir kalsinörin inhibitörüdür(CNI). TAC, bireyler arası doz değişkenliği ile karakterize, terapötik indeksi dar olan ve nefrotoksik etkileri bulunan immünsupresif ajandır. Kalsinörin inhibitörü toksisitesi, renal fonksiyon bozukluğu, serum kreatinin değerlerinin artışı ile karakterizedir. TAC'ın metabolizmasında CYP450 (CYP3A5) enzim sistemi ve transportunda p-glikoprotein (ABCB1) görev almaktadır. CYP2C8 enzimi ise organ reddi ve toksisiteye karşı koruyucu rol oynar. Bu genlerdeki çeşitlilik, ilaca bağlı böbrek yetmezliği gelişme riskini de etkileyebilmektedir. Çalışmamızda TAC kullanan böbrek nakil hastalarında CYP2C8, CYP3A5, ABCB1 polimorfizmlerinin kan TAC düzeyine ve böbrek fonksiyonu üzerine etkisini araştırdık. Çalışmaya 18-65 yaş arası TAC kullanan böbrek nakil hastaları dahil edildi. Genetiplateme sonucunda CYP3A5 (6986A>G), ABCB (13435C>T) ve CYP2C8 (A1196G) polimorfizmleri için alel sıklıkları, nakil sonrası 3. 6. ve 12. aylarda günlük TAC dozu, kan düzeyi ve böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek amacıyla kreatinin, GFR (glomerül filtrasyon hızı) ve idrarda protein/kreatinin düzeyleri tespit edildi. 12. ayda CYP2C8 (*1*3+*3*3) gruplarının ortanca kreatinin değeri CYP2C8*1*1 grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulundu ($p<0,05^*$). CYP2C8 (*3*3+*1*3) gruplarının zamanla kreatinin değerlerindeki yükselme CYP2C8*1*1 grubuna göre anlamlı derecede fazla bulundu ($p<0.05^*$). CYP3A5 alel grupları arasında günlük TAC dozunda anlamlı fark ($p<0.001^*$) olup, böbrek fonksiyonu açısından fark olmadığı tespit edildi. ABCB1 alel gruplarında ilaç doz, kan konsantrasyonu ve böbrek fonksiyonu açısından anlamlı bir fark tespit edilmedi. Sonuç olarak, CYP2C8 polimorfizminin nakil sonrası 1 yıllık sürede böbrek fonksiyonunu etkilediği, ABCB1 polimorfizminin ise etkisi olmadığı tespit edildi. CYP3A5 polimorfizminin ise ilaç dozuna etkisinin olduğu ancak böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için daha fazla sayıda hastaya ihtiyaç olduğu tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Takrolimus, böbrek fonksiyonu, CYP3A5, ABCB1, CYP2C8.

ABSTRACT

Kaltuş Z. Effect of CYP3A5, CYP2C8, and ABCB1 Polymorphisms on Renal Function in Kidney Transplant Recipients Receiving TAC, Eskisehir Osmangazi University Faculty of Medicine, Speciality Thesis in Department of medical pharmacology, Eskisehir, 2021. Tacrolimus (TAC, FK-506) is a calcineurin inhibitor and commonly used as an immunosuppressive agent for the prevention organ rejection in organ transplant patients. TAC is an immunosuppressive agent with narrow therapeutic index and nephrotoxic effects, characterized by interindividual dose variability. Calcineurin inhibitor toxicity (CNIT) is characterized by renal dysfunction and increased serum creatinine values. TAC is metabolized by the CYP450 (CYP3A5) enzyme system and transported by P-glycoprotein (ABCB1). CYP2C8 enzyme plays a protective role against organ rejection and toxicity. Diversity in these genes can also affect the risk of developing drug-induced kidney failure. In our study, we investigated the effect of CYP3A5, ABCB1 and CYP2C8 polymorphisms on blood TAC level and kidney function in renal transplant patients using TAC. Kidney transplant patients aged 18-65 years using TAC were included in the study. Genotyping Allele frequencies for CYP3A5 (6986A> G), ABCB1 (13435C> T) and CYP2C8 (A1196G) polymorphisms, daily TAC dose at 3, 6, and 12 months post-transplant, blood level and to evaluate kidney function creatinine, GFR, and urine protein/creatinine levels were determined. Median creatinine value of CYP2C8 (*1*3+**3*3) groups were significantly higher than CYP2C8*1*1 group at 12 month (p: 0,021*). The increase in creatinine value of CYP2C8 (*3*3+*1*3) groups were significantly higher than the CYP2C8*1*1 group (p:0.036*). Although the daily TAC dose was different in CYP3A5 allele groups there was no significant difference in kidney functions. There was no significant difference in drug dose, blood level and renal function between ABCB1 allele groups. As a result, it was determined that CYP2C8 gene polymorphism affects kidney function within 1 year after transplantation, but ABCB1 gene polymorphism has no effect. CYP3A5 gene polymorphism effect TAC dose, but more patients are needed to evaluate renal function.

Key Words: Tacrolimus, kidney function, CYP3A5, ABCB1, CYP2C8.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Kronik Böbrek Yetmezliği	4
2.2. Böbrek Nakli	6
2.3. Böbrek Naklinde İmmünsupresif Tedavi	9
2.4. Kalsinörin inhibitörleri ve Takrolimus	14
2.4.1. Kalsinörin İnhibitörleri	14
2.4.2. Kalsinörin İnhibitörleri ve P450 Enzim Sistemi	15
2.4.3. Takrolimus (FK506)	17
2.4.4. Takrolimusun Yan Etkileri	18
2.5. Greft Fonksiyonu	18
2.6. CNI Nefrotoksitesitesi	19
2.6.1. İşlevsel Nefrotoksitesite	20

2.6.2. Akut Toksisite	21
2.6.3. Kronik Nefrotoksisitesi	24
2.7. Gen Polimorfizmi Farmakokinetik ve Farmakodinamiğe Etkisi	26
2.7.1. CYP3A5 Polimorfizminin Böbrek Fonksiyonu Üzerine Etkisi	26
2.7.2. ABCB1 polimorfizminin böbrek fonksiyonu üzerine etkisi	30
2.7.3. CYP2C8 polimorfizminin böbrek fonksiyonu üzerine etkisi	34
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	36
3.1. Olgular	36
3.2. Kullanılan Cihazlar	37
3.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri	37
3.4. Genotipleme	38
3.4.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu	38
3.4.2. PCR	39
3.4.3. Agaroz Jelin Hazırlanması	42
3.4.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi	42
3.4.5. RFLP	42
3.4.6. Genotipleme Sonucunda Hastaların Alel Sınıflarına Göre Gruplandırılması	44
3.5. İmmüsupresif İlaçların Kan Düzeylerinin Saptanması	45
3.6. Hastalara Ait Laboratuvar ve Poliklinik Verileri ve Değerlendirilmesi	45
3.6.1. Laboratuvar Tetkikleri ve Değerlendirilmesi	45

3.6.2. Hastalara Ait Demografik ve Klinik Veriler	45
3.6.3. Böbrek Fonksiyon Değerlendirilmesi	46
3.7. İstatistiksel Yöntemler	46
3.8. Etik Kurul Onayı	46
4. BULGULAR	47
4.1. Genel Özellikler	47
4.2. Hasta Gruplarının CYP3A5 (6986A>G), CYP2C8 (A1196G), ABCB1 (3435C>T) Gen Polimorfizmlerinin Genotip ve Alel Sıklığı	48
4.3. CYP2C8*3 (A1196G) Polimorfizmi için bulgular	50
4.4. CYP3A5 (6986A>G) Polimorfizmi İçin Bulgular	55
4.5. ABCB1 (3435C>T) Polimorfizmi İçin Bulgular	59
4.6. Hastaların Böbrek Fonksiyonu ile TAC Doz-Konsantrasyon İlişkisinin Değerlendirilmesi	63
4.7. Hastaların Nakil Sonrası 1 Yıllık Süreçte GFR Aralıklarına Göre Sınıflandırılması	64
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	78
KAYNAKLAR	80

SİMGELER VE KISALTMALAR

AA	Araşidonik asid
ABCB1	ATP bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi
ACE	Anjiotensin dönüştürücü enzim
ACR	Albümin kreatinin oranı
ALA	Anti lenfosit antikor
ALG	Anti lenfosit globulin
AT1	Anjiotensin II tip 1
ATG	Anti-timosit globulin
AZA	Azatioprin
BCRP	Meme kanseri rezistans proteini
BUN	Blood Urea Nitrogen
CKD-EPI	Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
CNI	Kalsinörin inhibitörü
CNIT	Kalsinörin inhibitörü toksisitesi
COX	Siklooksijenaz
CSA	Siklosporin
CYP	Sitokrom
DHET	Dihidroksieikosatrienoik asitlere
DM	Diyabetes mellitus
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DSA	Donör Spesifik Antikorlar
EET	Epoksiyeikosatrienoik asitlere
Egfr	Tahmini Glomerul filtrasyon hızı
EMT	Epitelyal mezenkimal geçişi
ESRD	Son dönem böbrek hastalığı
FDA	U.S. Food and Drug Administration
FKBP12	FK506 bağlayıcı protein 12

GFH	Glomerül filtrasyon hızı
GFR	Glomerül filtrasyon oranı
GGF	Gecikmiş greft fonksiyonu
HD	Hemodiyaliz
HLA	İnsan Lokosit antijen
HT	Hipertansiyon
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
İMPDH	İnozinmonofosfat dehidrojenaz
IV	İntravenöz
IVIG	İntravenöz immuglobulin
KAH	Kroner arter hastalığı
KBH	Kronik böbrek hastalığı
KBY	Kronik böbrek yetmezliği
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
MDR	Çoklu ilaç direnci
MTX	Metotreksat
NFAT	Aktive T hücrelerinin nükleer faktörü
NO	Nitrik oksit
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PD	Periton diyalizi
P-GLP	p- glikoprotein
PK	Farmakokinetik
PO	Per oral
PRA	Panel reaktif antikor
RAS	Renin anjiotensin sistemi
RFLP	Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi
SDBY	Son dönem böbrek yetmezliği
SNP	Single nucleotide polymorphism

TAC	Takrolimus
TİDİ	Terapötik ilaç izlemi
TMA	Trombotik mikroanjiopati
USRDS	Birleşik Devletler Renal Data Sistemi
UV	Ultraviyole
6-MP	6 Merkaptopürin

ŞEKİLLER	Sayfa
2.1. Türkiye’de 2000-2010 yılları arasında SDBY insidansı	6
2.2. TAC metabolizmasında CYP enzimlerinin dağılımı	16
4.1. CYP2C8(A1196G) RFLP sonrası UV ışık altında görüntüsü	40
4.2. CYP3A5 RFLP sonrası UV ışık altında görüntüsü	49
4.3. ABCB1 RFLP sonrası UV ışık altında görüntüsü	50
4.4. CYP2C8 alel gruplarının aylara göre ortanca kreatinin değerleri	54
4.5. CYP2C8 alel gruplarının aylara göre ortanca GFR değerleri	54
4.6. CYP2C8 (*1*1) ve CYP2C8 (*1*3+*3*3) gruplarının 1 yıllık (A): kreatinin ve (B): GFR değerlerindeki değişimlerinin kıyaslanması.	55
4.7. CYP3A5 alel gruplarının aylara göre ortanca kreatinin değerleri.	58
4.8. CYP3A5 alel gruplarının aylara göre ortanca GFR değerleri	59
4.9. CYP3A5 (*1*3) ve CYP3A5*3*3 alel gruplarının 1 yıllık (A): GFR ve (B): kreatinin değerlerindeki değişimlerinin (Δ) kıyaslanması	59
4.10. ABCB1 alel gruplarının (CC, CT ve TT) aylara göre ortanca GFR değerleri.	62
4.11. ABCB1 alel gruplarının (CC, CT ve TT) aylara göre ortanca kreatinin değerleri	63
4.12. ABCB1 (CC), (CT) ve (TT) alel gruplarının 1 yıllık (A): GFR ve (B): kreatinin değerlerindeki değişimlerinin (Δ) kıyaslanması	63

TABLÖLAR

	Sayfa
2.1. Kronik böbrek hastalığı kriterleri	5
2.2. GFH Kategorisi	5
2.3. Böbrek nakli hasta sağkalımını etkileyen faktörler	8
2.4. İmmüsupresif ilaçların tarihsel gelişimi	9
2.5. İmmüsupresif ilaçlar	12
2.6. İmmüsupresif ilaçların yan etkileri	13
2.7. CNI nefrotoksitesisi	20
2.8. ABCB1 nükleotit ve amimoasid değişimleri	31
4.1. Hastaların demografik özellikleri	47
4.2. Genotipleme sonucunda CYP3A5 (6986A>G), CYP2C8*3 (A1196G) ve ABCB1 3435C>T alel sıklıkları	49
4.3. CYP2C8 (A1196G) alel gruplarının laboratuvar verileri	52
4.4. CYP3A5 alel gruplarının laboratuvar verileri	57
4.5. ABCB1 alel gruplarının laboratuvar verileri	61
4.6. GFR C/D (konsantrasyon/doz) oranlarının karşılaştırılması	64
4.7. Alel gruplarının GFR aralıklarına göre zamanla dağılımı	65

1. GİRİŞ

Takrolimus (TAC) 1990'ların ortalarında, solid organ nakli sonrası akut rejeksiyonu önleyen güçlü bir immünosüpresif ajan olarak geliştirilmiştir. Böbrek naklinin, böbrek yetmezliği için en uygun tedavi olduğu ve diyaliz tedavisine kıyasla yaşam kalitesinde ve ölüm oranlarında iyileşme gösterdiği gözlenmiştir. TAC, günümüzde böbrek nakli sonrasında kullanılan en önemli ajanlardan biri haline gelmiştir. Bununla birlikte, bu maddenin klinik kullanımı, değişken farmakokinetiği, dar terapötik indeksi ve nefrotoksisite başta olmak üzere birçok yan etkisi nedeniyle karmaşıktır (1, 2). Kalsinörin sitoplazmik Aktive T hücrelerinin nükleer faktörü (NFAT)' i defosforile eder ve NFAT'ın nükleusa translokasyonu gerçekleşir ve T hücre aktivasyonu ve IL-2 üretimi gerçekleşir. TAC, FK506 bağlayıcı protein 12'ye (FKBP12) bağlanarak, kalsinörin fosfataz aktivitesini inhibe eder ve NFAT'ın bozulmuş translokasyonu nedeniyle IL-2'nin transkripsiyonunu baskılar (3). TAC vücutta karaciğer ve ince barsakta sitokrom (CYP) P450 enzim sistemi tarafından metabolize edilmekte ve transportu hücre membranında taşıyıcı protein olarak tanımlanan p-glikoprotein (ABCB1-ATP bağlayıcı kaset alt ailesi B üyesi) tarafından gerçekleştirilmektedir. Büyük oranda ilk geçiş etkisine maruz kalmaktadır. TAC'ın oral biyoyararlanımı düşüktür [% 4 ile % 89 (böbrek yetmezliği olan hastalar ve karaciğer, böbrek nakli olan hastalarda ortalama % 25 civarında)] ve bireyler arasında büyük bir değişkenlik göstermektedir (4). Transplantasyon ve birçok otoimmün hastalıktaki faydalı immünosüpresif etkilerine karşın TAC'un klinik kullanımı kronik nefrotoksisitesi nedeni ile tehlikeye girmektedir (5). TAC'ın neden olduğu nefrotoksisitenin, böbrek dışı nakil hastalarının % 10 ile % 20'sinde meydana geldiği ve bunlardan bir kısmının böbrek nakli ile sonuçlandığı tespit edilmiştir (6). TAC, afferent ve efferent glomerüler arteriyollerin vazokonstriksiyonuna ve böbrek kan akımı ve glomerüler filtrasyon hızında (GFR) azalmaya ve endotel hücre fonksiyonda önemli ölçüde bozulmaya neden olur. Bu da, vazodilatörlerin (prostaglandinler ve nitrik oksit) üretiminin azalmasına ve vazokonstriktörlerin (endotelin ve tromboksan) salgılanmasının artmasına yol açar (7). Böbrekte glomerüler skleroz, tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis gibi değişiklikler ile son dönem böbrek yetmezliğine neden olabilir (5). Akut organ rejeksiyonu tanısı ise idrar üretiminin azalması ve antirejeksiyon tedavisine cevap olarak plazma kreatininindeki artış gibi laboratuvar ve klinik

bulgulara dayanır (8). Renal kalsinörin inhibitörü (CNI) metabolizması ve taşıyıcı genlerindeki genetik varyasyonlar dahil olmak üzere, nefrotoksisite gelişimine katkıda bulunan risk faktörleri araştırılmıştır ve böbrek nakil hastalarında, CYP3A5, ABCB1, CYP2C8 ve ACE(Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim) gen polimorfizmleri ile TAC kaynaklı nefrotoksisite arasında olası bir ilişki olduğu kabul edilmiştir (9). TAC'ın farmakokinetik (ABCB1 ve CYP3A5) ve farmakodinamiğinde (TGF-b, CYP2C8, ACE, CCR5) yer alan genlerdeki farklılıkların, nakil alıcılarında TAC kaynaklı nefrotoksisite gelişme riskini etkileyebileceğini göstermektedir (5). Yüksek TAC seviyeleri akut nefrotoksisite ile ilişkili olup kronik toksisite ile ilişkisi henüz netleşmemiştir. TAC'ın dar bir terapötik penceresi vardır ve terapötik ilaç düzeyi takibi önerilir (4). TAC ile ilişkili akut ve kronik nefrotoksisite, iyi bilinen bir yan etkidir ve sıklıkla kalıcı böbrek hasarına ve hatta böbrek kaybına neden olan olabilir. Ojo ve arkadaşları tarafından yapılan 2003'deki çalışmada, beş yıllık toplam 70.000 yetişkin hastanın %28.9'unda (10) son dönem böbrek hastalığının (ESRD) geliştiği tespit edilmiştir (11). Kalsinörin inhibitörleri olan siklosporin ve Takrolimus her ikisi de nefrotoksisite ile ilişkilidir, ancak insidans ve altta yatan mekanizmalar farklı görünmektedir. Sonuç olarak, ACE, TGF-b ve CYP2C8 gibi bu süreçleri etkileyen genlerdeki değişiklik, TAC kullanırken böbrek yetmezliği gelişme riskini de etkileyebilir (4). Kuypers ve ark. yaptıkları çalışmada nakil hastalarındaki kombine CYP3A4*1/CYP3A5*1 ve CYP3A4*1B/CYP3A5*1 genotiplerinin, takrolimusla ilişkili nefrotoksisite gelişiminde CYP3A4 * 1 / CYP3A5 * 3 genotipine göre anlamlı ölçüde ilişkili bulmuşlardır (10). Nakledilen böbrek, TAC kaynaklı nefrotoksisite ile ilişkilendirilmiştir. P-gp ile ilişkili dışa atım (efflux) aktivitesi, oral yoldan verilen ilaçların bağırsak emilimini azaltırken, karaciğerde biliyer atımlarını ve böbrekteki tübüler atılımını artırır. Bu nedenle, P-gp'nin bağırsak ekspresyonundaki varyasyonun TAC biyoyararlanımı ve bunun sonuçta ortaya çıkan yan etkilerini, özellikle böbrek fonksiyon bozukluğunu etkilemesi beklenir (1). CNI kaynaklı nefrotoksisite muhtemelen CNI'in böbrek içi konsantrasyonları ile ilişkilidir. Renal tübüllerde eksprese edilen ABCB1, idrarla atılımını sağlayarak böbreklerde TAC ve metabolitlerinin lokal birikimini sınırlayabilir. CYP2C8, böbreklerde araşidonik asidin (AA) metabolik işleminde rol oynayan P450 süper familyasının bir üyesidir. Epokseikosatrienoik asitler (EET), böbreklerin, CNI'lerin vazokonstriktör-etkilerine

karşı koymalarına yardımcı olmak için biyolojik olarak aktiftir; bu, CYP2C8'in CNI-nefrotoksisite üzerindeki faydalı rolünü gösterir (12). CYP2C8'in, TAC'ın vazokonstriktör etkisini, EET'lerin oluşumunu azaltarak karşı koyduğu düşünülmektedir (4). Yakın gelecekte, immünsüpresif tedavi protokollerinin, çeşitli genlerdeki polimorfizmlerle ilgili verilerle birleştirilen hasta özelliklerine dayanması öngörülmektedir (13). Çalışmamızda Böbrek nakli sonrası yaygın olarak kullanılan immünsüpresif ajan olan TAC'un önemli bir yan etkisi olan nefrotoksisite ve böbrek fonksiyonu üzerine etkisinde CYP3A5,CYP2C8 ve ABCB1 gen polimorfizmlerin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Böbrek Yetmezliği

Kronik böbrek hastalığı (KBH) dünya çapında nüfusun % 8 ila % 16'sını etkileyen ve sıklıkla hasta ve klinisyen tarafından geç farkedilen bir sağlık sorunudur. Kronik böbrek yetmezliği (KBY) böbrek hastalığının etyolojisinden bağımsız olarak 3 aydan uzun süren 60 mL / dak / 1.73 m²'den düşük glomerüler filtrasyon hızı (GFR), günlük ≥ 30 mg albüminüri veya böbrek hasarı bulguları (hematüri, polikistik veya displastik böbrekler gibi yapısal anormallikler) ile tanımlanır (14). Dünyada KBY prevalansı yılda 50-250/1000000'dir. Önemli bir halk sağlığı sorunu olan KBY, böbrek fonksiyonunun kalıcı olarak bozulmasına bağlı olarak, gerekli olan uyum mekanizmalarının kaybıdır (15). KBY şiddetinin doğru değerlendirilmesi ve etkin tedavi önerileri için GFR değerleri esas alınarak sınıflandırma yapılmıştır. Buna göre kronik böbrek hastalığının son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) olarak adlandırılan şiddetli evresinde GFR değeri < 15 mL/dk/1,73 m² olarak değerlendirilmiştir (16). Yapısal veya fonksiyonel böbrek hasarı bulguları; albüminüri saptanması (30 mg/gün veya ≥ 3 mg/mmol), idrar sedimenti anormalliği olması, tübüler fonksiyon bozukluğuna bağlı elektrolit dengesizliği, anormal histolojik bulgu saptanması, radyolojik görüntüleme yapısal anomali tespit edilmesi ve böbrek nakli öyküsü olmasını kapsamaktadır (17).

Kronik Böbrek Hastalığı - Küresel Sonuçlarının İyileştirilmesi (KDIGO-Kidney Disease: Improving Global Outcomes) grubu tarafından hazırlanan 2012 yılı Kronik Böbrek Hastalığı (KBH) Değerlendirme ve Yönetim Kılavuzunda, belirtilen KBH kriterleri şu şekildedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Kronik böbrek hastalığı kriterleri.

KBH Kriterleri (en az biri 3 aydan uzun süredir var olmalı)	
Böbrek hasarının belirteçleri	Albümünüri(AER \geq 30 mg/saat; ACR(albumin/creatinine ratio) \geq 30 mg/gr)
	İdrar sediment anormallikleri
	Tübüler bozukluklara bağlı elektrolit ve diğer anomallikler
	Histolojik olarak saptanmış anormallikler
	Görüntüleme ile saptanmış yapısal anormallikler
	Böbrek nakil öyküsü
	GFH< 60 ml/dk/1,73 m ²
GFH: Glomerüler filtrasyon hızı	

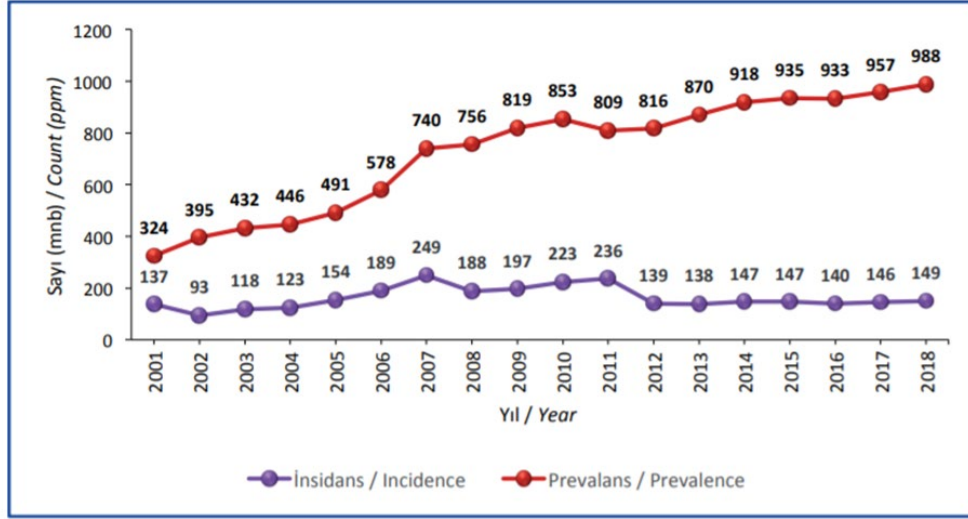
KDIGO 2012 kılavuzuna bazı eklemeler yapılarak KBH tanımında evre 3 olgular iki gruba ayrılmış ve albüminüri de kriterlere eklenmiştir (Tablo 2.2) (18).

Tablo 2.2. GFH Kategorisi.

GFH Evreleri	GFH(ml/dk/1,73 m ²)	Tanımlar
G1	\geq 90	Normal veya yüksek
G2	60-89	Hafif azalmış
G3a	45-59	Hafif orta derece azalmış
G3b	30-44	Orta- şiddetli derece azalmış
G4	15-29	Şiddetli azalmış
G5	<15	Böbrek yetmezliği

Türk Nefroloji Derneği 2017 yılı verilerine baktığımızda, Türkiye’de renal replasman tedavisi gerektiren SDBY sayısı 77.311 olup prevalansı 957kişi/milyon, insidansı ise 146 kişi/milyondur. Türkiye’de de tüm dünyada olduğu gibi en çok tercih edilen tedavi yöntemi hemodiyalizdir (%76). Hastaların %20’sine böbrek nakli yapılmaktadır. Türkiye’de 2000 yılından 2010’a kadar olan dönemde SDBY insidansı

yaklaşık 4 kat, prevalansı yaklaşık 2 kat artmıştır, sonrasındaki azalma eğilimi dikkat çekmektedir (Şekil 2.1) (19-21).



Şekil 2.1. Türkiye’de 2000-2010 yılları arasında SDBY insidansı (21).

2.2. Böbrek Nakli

Böbrek nakli son yıllarda SDBY olan hastalarda en başarılı ve canlı vericisinin bulunması durumunda en fazla tercih edilen tedavi yöntemi haline gelmiştir. Bundaki en önemli faktör; immunsupresif tedavi seçeneklerinde, infeksiyonların kontrolünde ve cerrahi teknikte sağlanan gelişmelerdir (22). İlk uzun vadeli ve başarılı böbrek nakli 1954’te Joseph Murray tarafından yapılmış ve organ 8 yıl yaşamıştır. 1960’lı yıllardan bu yana böbrek nakli, KBY’liği olan birçok hastanın sağlıklı ve uzun bir hayat sürmesini sağlamıştır. Türkiye’de ilk kez canlı donörden böbrek naklini Prof.Dr. Mehmet HABERAL, 1975’te gerçekleştirmiştir (23).

Birleşik Devletler Renal Data Sistemi (USRDS) 2015 yılı veri raporuna göre 2008-2013 yılları arasında hemodiyaliz (HD) hastalarının 5 yıllık sağkalım oranı %40, periton diyalizi (PD) hastalarında %50, kadavra vericiden böbrek nakli yapılan hastalarda %75, canlı vericiden böbrek nakli yapılan hastaların ise %87 olarak bildirilmiştir (18).

Türk Nefroloji Derneği böbrek kayıt sistem raporundaki 2000-2017 yılları kayıtlarına göre ülkemizde yapılan böbrek naklinde vericilerin yaklaşık %20-30’u

kadavradır. Bu oran batı ülkelerinde % 80 olarak bildirilmektedir (20). Akraba olmayan canlı vericiden yapılan nakiller yasal ve etik sorunlara neden olabilmektedir. Canlı böbrek bağıışı, her ülkenin ve onun yönetici veya düzenleyici kurumlarının yasa ve yönetmelikleri çerçevesinde uygulanmalıdır. Donörlerin verici olmalarına engel teşkil edecek durumlar (canlı donör için kısa ve uzun vadeli risk, donör böbrek hastalığı öyküsü, kanser, diabetes mellitus, aktif enfeksiyon, gebelik vs) yok ise aday olabilmektedirler. Böbrek nakli yapılabilmesi için alıcı ile verici arasında ABO kan grubu sisteminde uyum olmalıdır. Rh sisteminin ise bir önemi bulunmamaktadır (24).

HLA

Böbrek naklinin başarısını etkileyen önemli faktörleri; hasta ve donör arasındaki Lökosit Antijenlerinin (Human Leukocyte Antigens=HLA) uyumu, ABO kan grupları uygunluğu ve etkili bir immüsupresif tedavi olarak sıralanabilir (15). HLA sistemi, 6. kromozomun kısa kolu üzerinde yerleşmiş doku uygunluk antijenlerini içermektedir. Anne ve babadan gelen birer haplotipten oluşan antijenlerdir. Nakil sonrası en iyi sonuç doku uygunluk antijenlerinde tam uyum olduğu durumlarda alınmaktadır. Greftin uyumunda, minör doku uygunluk antijenleri, monosit, vasküler endotel hücreleri de önemlidir (22). Organ nakillerinde hasta ve donör arasındaki ABO uyumu kan transfüzyonlarındaki kadar önemli iken Rh faktörü ve diğer eritrosit antijenleri ABO uyumu kadar önemli değildir. Panel Reaktif Antikor (PRA) testi, nakil olacak hastanın HLA antijenlerine karşı antikor oluşturup oluşturmadığının ve oluşan antikorların nicel ve nitel olarak sınıflandırılması ve PRA pozitiflik oranının belirlenmesi amacıyla yapılan testtir. PRA gebelikte, nakillerde ve kan transfüzyonunda oluşan donör antijenlerine karşı alıcı bireyde oluşmuş antikorlara verilen genel isimdir. PRA'nın oranının belirlenmesi böbrek naklinde operasyon öncesi bakılması gereken önemli bir parametredir. Donör Spesifik Antikorlar (DSA); alıcının serumunda donör antijenlerine karşı önceden oluşmuş anti-HLA antikorların varlığını gösterir. Nakil öncesinde DSA'nın saptanması, antikor aracılı hiperakut rejeksiyonu öngörmek için gereklidir. DSA belirlemek için kullanılan en temel immünolojik test Cross-match'tir. Alıcı bireyin serumu ile donör HLA'ları arasındaki reaksiyonun gözlemlendiği nakil başarısını arttıran en önemli parametredir. Günümüzde nakil öncesi yapılan immünolojik testler sayesinde nakil sonrası saatler içerisinde meydana gelen hiperakut rejeksiyon görülme oranı azalmıştır. Ancak akut ve kronik

rejeksiyon allogreft nakillerde çözülmesi gereken önemli engel olarak bulunmaktadır (15, 25). HLA uyumsuz böbrek nakli, yüksek antikor aracılı red insidansı ve düşük greft sağkalımı ile ilişkilidir (26). Hastanın KBY yol açan primer böbrek hastalığı, gebelik sayısı, yapılan kan transfüzyon sayısı gibi etkenler naklin başarısını etkileyen faktörlerdir (22). Bunun gibi durumlarda yoğun immüsupresif tedavi gerekliliği, gecikmiş greft fonksiyonudur (DGF; delayed graft function) ve akut rejeksiyon gibi istenmeyen komplikasyonlara yol açabilmektedir (27).

USRDS son verilerine göre 2018 yılında nakil olan hastaların nakil öncesi son dönem böbrek yetmezliğine neden olan etyolojik faktörler; %21,6 ile glomerulonefrit, %22,9 HT (hipertansiyon), %25,6 DM (diyabetes mellitus) ve %29,9 diğer faktörler olarak tespit edilmiştir. USRDS verilerine göre kadavra vericiden böbrek nakli olanlarda 1 yıllık greft sağkalımı% 93,0' a, canlı donörden nakil olanlarda ise 1 yıllık greft sağkalımı % 96,9 olduğu tespit edilmiştir. 5 yıllık tüm nedenlere bağlı greft kayıp oranları kadavra vericiden böbrek nakli olanlar için 2000 yılında %35 iken 2013 yılı için bu oran %24'e, hasta ölüm oranları %19'dan %13'5'e gerilemiştir. Canlı vericiden böbrek nakli olan hastalar için tüm nedenlere bağlı greft kayıp oranları 2000 yılında %24 iken 2013 yılı için bu oran %14'e, hasta ölüm oranları %10.5'ten %6.5'e gerilemiş olarak tespit edilmiştir (28).

Tablo 2.3. Böbrek nakli hasta sağkalımını etkileyen faktörler.

Hasta ile ilgili faktörler	Nakil ilişkili faktörler	Vericiyle ilişkili faktörler
- Yaş (yaşlı donör, genç alıcı)	- Cerrahi teknik, deneyim	-Donör tipi(canlı, kadavra)
- Cinsiyet	- Soğuk iskemi süresi	-Vericinin bağış özellikleri
- HLA antikorları	- Gecikmiş greft fonksiyonu	- Vericinin ölüm nedeni
- PRA >30%	-DSA (donör spesifik antikor)	- Cinsiyet
- Nakil sayısı		
-Böbrek hastalığı nedeni		
- Ek hastalıklar		

Tablo 2.3 ‘‘Devam’’Böbrek nakli hasta sağkalımını etkileyen faktörler.

-BKİ (beden kitle indeksi)		
- Alıcının takip uyumu		

2.3. Böbrek Naklinde İmmüsupresif Tedavi

İmmüsupresif ilaçların gelişim tarihçesi

İmmüsupresif ilaçların kullanıma girmesiyle beraber önceki yıllarda organ nakillerinde karşılaşılan başarısızlıklar yaşanırken bu ilaçların kullanılmasıyla organ nakillerinde başarı giderek artmıştır. Organ nakillerindeki ilerleme, immün nedenlere bağlı allogreft rejeksiyonunun immüsupresif tedavi ile önlenmesine bağlıdır (29).

Tablo 2.4. İmmüsupresif ilaçların tarihsel gelişimi (15).

Yıl	İmmüsupresif ilaçların keşfi ve kullanımı
1950	Steroidlerin İmmünolojik hastalıklarda kullanımı
1954	İlk başarılı böbrek nakline total vücut ışınlanması uygulanması
1959	6-merkaptopürin (6-MP) veya Metotreksat (MTX)
1960	Azatiopürin (Aza)’nin kullanılmaya başlanması
1976	Monoklonal antikorlar (Muromonab-CD3/OKT3) ve anti CD25 antikor (IL-2 reseptör)
1978	Siklosporin (CsA)’in kullanılmaya başlanması ve üçlü tedavilerin uygulanması
1981	Anti-CD3
1988	FK506’nın keşfi ve kullanımı
1991	Mikofenolat mofetil (MMF)
1998	Sirolimus (Rapamisin)

Tablo 2.4 ‘‘Devam’’ İmmüsupresif ilaçların tarihsel gelişimi(15).

2005	Monoklonal antikor simulect (Basiliximab) ve zenapax (Daklizumab) kullanılması
2006	Everolimus

CNI günümüzde böbrek nakil hastalarının idame tedavisindeki en güçlü ve vazgeçilmez ilaçlardır. Düşük doz TAC, mikofenolat ve prednizon kullanımının en ideal rejim olduğu ELITE-SYMPHONY çalışmasında bildirilmiştir (30). Dünyada en sık kullanılan idame immüsupresif tedavi rejimidir. Her iki CNI karşılaştırıldığında; TAC grubunda posttransplant diyabet ve tremor ve sekonder epilepsi gibi nörotoksisite, CsA da ise hiperlipidemi, hiperürisemi, gingival hipertrofi ve hirsutizm TAC’a göre daha fazla meydana gelmektedir. Klinikte hipertansiyon ve böbrek disfonksiyonu CNI’lerin en önemli komplikasyonu olarak karşımıza çıkmaktadır (31). TAC’ın terapötik düzey ölçümü özellikle nefrotoksisiteyi en aza indirmek ve etkinliğini artırmak amacıyla gerekmektedir. TAC için bu terapötik aralıklar, nakil sonrası süreye, eşzamanlı immünosupresif ilaçlara ve immünolojik riske göre ayarlanmıştır (32). Nakil sonrası reddi önlemek için immüsupresyon gerekli olmakla birlikte bu immüsupresif ilaçlara sekonder gelişecek malignite ve metabolik komplikasyonları en aza indirmek için idame tedavinin nakil sonrası süreçte zamanla azaltılması gerekmektedir. Yine infeksiyonların nakil sonrası ilk üç aylık yoğun immüsupresif tedavi sürecinde ortaya çıkma ihtimali yüksektir (17).

Nakil hastasının immüsupresif tedavi protokolleri aşağıdaki şekilde özetlenebilir.

- a) İndüksiyon tedavisi
- b) İdame tedavisi
- c) Anti-rejeksiyon tedavisi

a) İndüksiyon tedavisi

Nakil öncesi ve nakilden sonra erken dönemde profilaktik yoğun immünespresif ilaç yüklemesinin yapıldığı tedavi yöntemidir. Nakil sonrası ilk bir-iki haftalık süreci kapsar. Bu dönemde güçlü immünespresif etkileri olan ajanlar kullanılmaktadır. Bu grupta monoklonal (basiliksimab) ve poliklonal antikorlar (anti-timosit globülin, anti lenfosit globulin) vardır.

- Monoklonal antikorlar: Muromonab-CD3 (OKT3)
- Poliklonal antikorlar: Anti-timosit globulin (ATG), anti-lenfosit globulin (ALG)
- Basiliksumab (Anti-CD25 monoklonal antikor)
- Antilenfosit antikorlar (ALA)

b) İdame tedavi

Nakilden sonraki erken dönem ve sonrasını kapsayan immünespresyon tedavisidir. Zamanla ilaçların kan konsantrasyonları hedef düzeye ulaşacağı ve şiddetli immün baskılanmanın gereği ortadan kalkacağı için daha düşük dozlarla rejeksiyonu önleyen aynı zamanda yan etki ve toksisiteyi en aza indiren tedavi yaklaşımıdır.

- Kortikosteroidler: Yeni jenerasyon immünespresif ajanlara rağmen steroidler indüksiyon, idame ve rejeksiyon tedavisinde önemli yer tutmaktadır. Etki mekanizması B ve T lenfositler, endotelial hücreler ve makrofajlar üzerinden gerçekleşmektedir. İnterlökin 3 (IL-3), interlökin-6 (IL-6) ve interferon-alfa (IFN-alfa) transkripsiyonunu inhibe ederler. Nakil sonrası ilk üç-beş gün intravenöz (IV) veya oral (PO) yüksek dozlarda kullanılarak, sonrasında haftalar içinde giderek azalan dozlarda steroid tedavisine devam edilmektedir.
- Kalsinörin İnhibitörleri: Takrolimus (TAC), siklosporin-A (CSA). Bu grupta en sık kullanılan ajanlar olup nakil sonrası immünespresif tedavi de en önemli ajanlardır.
- mTOR inhibitörleri (mTORi):

Sirolimus mTOR aktivasyonunu inhibe ederek T hücre aktivasyonunu durdurur. Günlük tek doz olarak kullanılmaktadır.

Everolimus Sirolimus'un metabolitidir. T lenfositlerinin aktivasyonunu engeller. Ayrıca fibroblast büyüme faktörünü de inhibe eder. Sirolimustan farklı olarak günlük iki doz olarak kullanılmaktadır.

- Anti-proliferatif ilaçlar: Mikofenolat mofetil (MMF), azatiopirin (AZA)

Mikofenolik asit (MPA; mikofenolat mofetil-MMF/mikofenolat sodyum-MPS): Mikofenoloik asit inozin monofosfat dehidrogenaz (İMPDH) enziminin selektif ve geri dönüşümlü inhibitörüdür. Bu grup ilaçlar T ve B hücre proliferasyonunu, antikor yapımını inhibe edip sitotoksik T hücre oluşumunu engellerler.

Antimetabolit ajan Azatiyoprin (AZA): İMPDH (inozinmonofosfat dehidrogenaz) enzimini baskılayarak adenozin monofosfat sentezini baskılar. Doz bağımlı olarak kemik iliği supresyonu yapar.

c) Akut rejeksiyon tedavisi

İndüksiyon tedavisine benzerdir. Grefti kurtarmak için kısa süreli yoğun immünsupresif tedavi uygulanmaktadır (33, 34).

Tablo 2.5. İmmünsupresif ilaçlar (35).

Glukokortikoidler	Prednizolon, metilprednizolon
Kalsinorin inhibitörleri	Siklofilin binding drug: siklosporin, ISA(TX)247 FKBP binding drug: TAC, modifiye salınımlı TAC
mTOR inhibitörleri	Sirolimus, everolimus
Antimetabolit	AZA
Springozin1 fosfat antagonistisi	Fty720 (fingolimod)
Antiproliferatif ilaçlar	Mikofenolat mofetil (MMF) Mikofenolik asit (MYF) Mizoribin
	Leflunomid FK778

Tablo 2.5 ‘Devam’ İmmüsupresif ilaçlar(35).

Poliklonal antikorlar	Antitimosit globülin (ATG) Antilenfosit globülin (ALG)
Monoklonal antikorlar	Muromonab-CD3(OKT3) Alemtuzumab Rutiksimab
Füzyon proteini	Basiliximab (Anti-CD25 monoklonal antikor) Daklisumab CTLA-4-Ig
IV	İntravenöz immünglobulin (IVIG)

Nakil sonrası greft fonksiyonunun başarılı bir şekilde sürdürülmesinde immüsupresif tedavi ana rolü oynar. Yoğun immüsupresyon fırsatçı enfeksiyon ve malignite gelişme riskini arttırırken, yetersiz immüsupresyon ise organ reddi tehlikesini ortaya çıkarır. İmmüsupresyon tedavisinde kullanılan ilaçların kan düzeylerinin izlenmesi ve optimum dozların ayarlanmasında önemlidir. İlaç düzeyinin düşük olması yetersiz immüsupresif etki sonucu rejeksiyon riskinin artmasına sebep olurken, yüksek düzeyler ise nefrotoksisite ve nörotoksisite gibi yan etkilerin artmasına neden olmaktadır. İlaç tedavisinin bireyselleştirilmesi ile ilaç etkinliğinde artma ve yan etki sıklığında azalma sağlanabilir (36).

Tablo 2.6. İmmüsupresif ilaçların yan etkileri (33).

Yan etki	steroid	CSa	TAC	mTOR	MMF	AZA
Yeni başlangıçlı diyabet	↑	↑	↑↑			
Hipertansiyon	↑↑	↑↑	↑			
Dislipidemi	↑	↑		↑		
Osteopeni	↑↑	↑	(↑)			
Anemi, lökopeni				↑	↑	↑

Tablo 2.6. İmmünesupresif ilaçların yan etkiler (33).

Yara iyileşmesinde gecikme				↑		
Diyare, bulantı/kusma			↑		↑↑	
Proteinüri				↑↑		
GFR'de azalma		↑	↑			
Hirsutizm		↑				

2.4. Kalsinörin inhibitörleri ve Takrolimus

2.4.1. Kalsinörin inhibitörleri

Kalsinörin inhibitörleri (CNIs) TAC ve siklosporin solid organ transplantasyonundaki immünesupresif tedavi rejiminin köşe taşlarıdır. Ancak yüksek farmakokinetik (PK) ve farmakodinamik (PD) değişkenlik nedeniyle kullanımları karmaşıktır. Bu nedenle, terapötik ilaç izleme (TDMİ) klinikte rutin olarak kullanılmakta olup, CNI kan konsantrasyonunun terapötik aralıkta tutulması amacıyla ilaç dozu ayarlanmaktadır. TAC ve CsA yapısal olarak farklı olmakla birlikte benzer farmakokinetik özellikler taşırlar. Mevcut siklosporin mikroemülsiyon formülasyonu (Neoral), iyi çözünürlük sergilemesine rağmen, her ikisi de zayıf çözünürlükle oldukça lipofilik ilaçlardır. TAC günde iki (Prograf) ve günde bir kez değiştirilmiş salım (Advagraf) formülasyonlarında bulunur (37). TAC'ın ortalama dağılım yarı ömrü yaklaşık 12 saattir. Bu nedenle, kararlı durum konsantrasyonlarının iki ila üç gün içinde olması beklenir. Tam kan TAC çukur konsantrasyonlarının terapötik seviyeleri 5-20 ng/ml arasında değişir, ancak toksisiteyi önlemek için normal aralık 5–15 ng/ml'dir. Yüksek yağlı ve yüksek karbonhidratlı öğünler, maksimum konsantrasyonu (C_{max}) önemli ölçüde azaltabilir ve T_{max}'ı artırabilir. TAC'ın yüksek derecede lipofilik karakteri bu durumu büyük ölçüde açıklamaktadır (38). Biyoyararlanım, zayıf çözünürlük ve daha da önemlisi etkin ilk geçiş metabolizması nedeniyle hem siklosporin [% 5-60 (ortalama% 25), hem de TAC % 4-89 (ortalama% 25)] için düşük ve oldukça değişkendir. Esas olarak sitokrom CYP3A4 ve CYP3A5 enzimleri ve P-

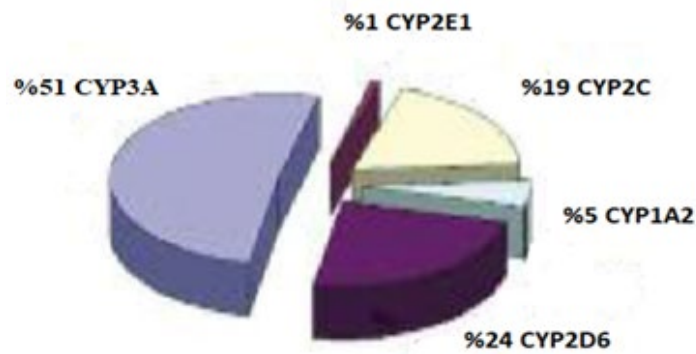
glikoprotein efluks pompası tarafından kontrol edilir. Kalsinörin inhibitörleri (CNI'ler), lipofiliklikleri ve kırmızı kan hücreleri (RBC)'de immünofilinlerin varlığı nedeniyle RBC'ye yüksek oranda bağlanır. TACun geri kalan fraksiyonu, albümine, a₁-asit glikoproteine, globulinlere ve daha az ölçüde lipoproteinlere yüksek oranda bağlanır. Lenfositler gibi hedef beyaz kan hücreleri, dolaşımdaki CNI'nin % 0,5-5'ini içerir. CNI'nin RBC'ye alınması, konsantrasyona bağlıdır ve daha yüksek CNI konsantrasyonlarında daha düşük bir kan/plazma oranına bağlıdır ve ayrıca sıcaklığa bağlıdır (tipik hidrofobik etkileşimler). Bu nedenle plazma ve RBC'nin bağlanmamış plazma konsantrasyonlarını belirlemek için 37⁰C de ayrılması gerekir (39). Kalsinörin inhibitörlerinin böbrek nakillerinde kullanıma girmesi ile akut hücresele rejeksiyon sıklığında azalma ve graft sağkalımında iyileşmeler görülmüştür. İmmün yanıtı seçici olarak baskılamaktadırlar. Steroidlerden farklı özellikleri nötrofillerin fagositik fonksiyonlarını baskılamamalarıdır ve yine AZA'da olduğu gibi kemik iliği supresyonu etkileri yoktur. CNI etki mekanizması, kendilerine özgü sitoplazmik proteinleri ile bileşik oluşturmalarına bağlıdır. Kalsinörin inhibisyonu, T hücre aktivasyonunu ve sonrasında önemli sitokin genlerinin ekspresyonunu bozmaktadır. Kalsinörin inhibitörü temelli immünsupresif tedavisi başarılı olan hastalar, konak savunmasında yeterli düzeyde immün yanıt işlevlerini sürdürebilirler (40).

2.4.2. Kalsinörin İnhibitörleri ve P450 Enzim Sistemi

CYP'ler hayvanlar, bitkiler, mantarlar ve bakterilerde bulunan hemeoproteinlerin süper ailesini oluştururlar. Memelilerde CYP enzimleri, karaciğer ve ince bağırsakta en yüksek konsantrasyonlara sahip olup tüm dokularda bulunur. Bunlar, mikrozomlarda yüksek miktarda bulunan zara bağlı proteinlerdir. Karaciğer fonksiyonu ve safra asidi biyosentezinde ve ayrıca ilaçlar, ksenebiyotikler ve kanserojenler gibi yabancı bileşiklerin metabolizmasında çok önemli role sahiptirler. CYP'ler ayrıca adrenal korteks, testis, yumurtalık, meme ve plasenta gibi steroidojenik dokuların mitokondriyal iç membranında bulunurlar ve endojen steroid hormonlarının sentezi ve metabolizmasında görev alırlar. Böylece CYP'ler hücresele metabolizmada merkezi bir rol oynar ve hücresele homeostazı korurlar (41).

İlaçlar memelilerde ardışık iki yolak üzerinden metabolize edilirler. Bu yollarda polimorfik yapıda birçok enzim görev alır. İlaç metabolize edici enzimler

fazI ve fazII enzimleri olarak iki grupta toplanır. Faz I enzimler, ilacın primer yapısının direkt modifikasyonunu katalizler. İlaçların yaklaşık yarısı karaciğerde Sitokrom p450 enzim sistemi tarafından metabolize edilmektedir. Oksidasyon, redüksiyon, hidroksilasyon, demetilasyon FazI enzim reaksiyonlarıdır. Faz II enzimleri ise glukuronik asit, sülfat, glutatyon konjugasyonu katalizlerler. Faz I metabolizması büyük ölçüde sitokrom P450 enzimleri tarafından gerçekleşir. İnsanlarda sitokrom P450 enzimlerine bağlı ilaç metabolizmasının yaklaşık %40' ı polimorfik yollarla kontrol edilirler (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. TAC metabolizmasında CYP enzimlerinin dağılımı.

Enzimler karaciğer dışında böbrek, akciğer, beyin dokusunda büyük ölçüde hücrelerin endoplazmik retikulumunda yer alırlar. CYP enzim sisteminin aracılık ettiği biyokimyasal olaylar sonucunda ilaçlar hidrofilik yapı kazanır ve safra ve idrardan eliminasyonu sağlanır.

CYP enzimleri ilk numaradan itibaren alellere ayrılmıştır.

1- p450 1 (CYP 1): (CYP1A1 ve CYP1A2)

2- p450 2 (CYP 2): (CYP2A, CYP2B, CYP2C, CYP2D, CYP2E1)

3- p450 3 (CYP 3): (CYP3A4, CYP3A5 ve CYP3A7)

TAC'ın farmakokinetiğinde CYP3A5, CYP3A4 ve MDR-1 tarafından kodlanan P-gp rol oynamaktadır (40).

2.4.3. Takrolimus (FK506)

Bir kalsinörin inhibitörü (CNI) olan Takrolimus (FK506), İlk kez 1987'de *Streptomyces tsukubaensis*'ten izole edilen 23 üyeli makrolid türevi antibiyotik bileşenidir. 1994'te FDA (U.S. Food and Drug Administration) ilk olarak TAC'ı karaciğer nakli için onaylamıştır. Daha sonra TAC, böbrek, kalp, akciğer, bağırsak ve kemik iliği nakli için birinci basamak rejim olarak kullanılmaya başlanmıştır (12). TAC, başlıca terapötik etkisini T hücre aktivasyonunu inhibe ederek gösterir. T hücresi aktivasyonundaki erken dönemde inhibisyon, immün yanıtı koordine eden sitokinleri kodlayan genlerin transkripsiyonunda başarısızlığa yol açar. Yüksek derecede lipofilik olup, yapı olarak CsA'dan farklı olsa da benzer bir etki gösterir. FK506 ön ilaçtır, yalnızca endojen hücre içi reseptörlerle kompleks oluşturarak, immünofilinler olarak adlandırılan protein grubundan FKBP-12'e bağlanarak aktif hale dönüşmektedir. Bu kompleksin hedefi kalsinorindir. Ca^{++} ve kalmoduline bağlı bir fosfataz olan kalsinörin, IL-2 geninin çoğaltıcı bölgesinin aktivasyonunda görev alan Ca^{++} 'a bağlı sinyalin iletilmesinde rol oynar. NFAT'yı defosforile eder ve defosforilasyon gerçekleşince, NFAT T hücre büyüme faktörü IL-2 ve IL-2 reseptör kodlayan genleri de içeren genlerin promotör bölgesine bağlanmaktadır. Kalsinörin / NFAT sinyal yolu ilk olarak T hücrelerinde, hücre yüzeyindeki T-hücresi reseptörlerinden kaynaklanan sinyalleri çekirdekte transkripsiyonel aktivasyonla bağlayan bir yol olarak tanımlanmıştır. Böylece nükleusda IL-2 geninin transkripsiyonu engellenmiş olur (42, 43). FK506 oral alımını sonrası absorpsiyonu üst sindirim sisteminden hızlı bir şekilde olmaktadır. FK506'nın başlangıç dozu rutinde 0,1-0,2 mg/kg/gün şeklinde uygulanır. Bu doz günde iki defa alınacak şekilde 12 saat arayla uygulanır. Nakil sonrası ilk aylarda kan düzeyi 10-15 ng/ml daha sonraki aylarda da 5-10 ng/ml aralığında tutulmalıdır. TAC verilen hastalarda, efektif immunsupresyonunun görüldüğü kan düzeyi 5-15 ng/ml'dir. CsA'ya kıyasla in vitro olarak 100 kat daha güçlüdür ancak bunun yanında yan etkileri şiddetli ve terapötik aralığı daha dar bir ajandır. Hastaların takibi süresince serum kreatinin düzeyi yakından izlenilmelidir. Serum kreatinin değerinde % 15-20'lik artışlar bile nefrotoksisite şüphesini akla getirmelidir (15).

2.4.4. Takrolimusun Yan etkileri

FK506'nın ciddi yan etkileri arasında nefrotoksisite, diyabet, titreme, malign tümör gelişim sıklığı, nörotoksisite ve diyare sayılabilir. TAC terapötik aralığı dar bir ajan olup TAC ile ilişkili akut böbrek fonksiyon bozukluğunu en aza indirmek için terapötik ilaç izlemi önerilir. TAC ile ilişkili akut ve kronik nefrotoksisite, iyi bilinen yan etkilerdir. Sıklıkla kalıcı böbrek hasarına ve böbrek kaybına yol açabilir. Bu arada TAC, solid organ nakilli hastalarda immünsüpresan tedavisi için birincil kalsinörin inhibitörü haline gelmiştir. Bu ilaçların yan etki profilleri farklıdır. TAC ve siklosporinin başlıca metabolizması CYP3A4 ve CYP3A5 enzimleriyle olup CYP3A5 daha baskındır. İmmünsüpresif tedavi olarak TAC kullanan nakil hastalarında kronik böbrek yetmezliği riski artmasına rağmen, tüm hastalarda böbrek yetmezliği gelişmez. Risk altındaki hastaları tanımlamak için genetik ve genetik olmayan risk faktörleri hakkında daha derinlemesine bilgi sahibi olunması gerekmektedir (4).

2.5. Greft Fonksiyonu

Böbrek nakli sonrasında idrar çıkışının iyi olması ve serum kreatinin değerinin hızla düşmesi optimal böbrek fonksiyonu olarak tanımlanmaktadır.

Böbrek Nakli Sonrasında Görülen Böbrek Fonksiyon Bozuklukları

Gecikmiş Greft Fonksiyonu (GGF): Gecikmiş greft fonksiyonu, nakil sonrası ilk hafta diyaliz ihtiyacı olması şeklinde tanımlanmaktadır.

Kronik Allograft Hasarı (KAH): İnterstisyel fibrozis ve tübüler atrofi sonucu böbrek fonksiyonlarının giderek azalmasıyla ilerleyen dönemlerde mikrovasküler hasar ve glomerülosklerozun görüldüğü durumdur. Etyolojisinde iskemi-reperfüzyon hasarı, rejeksiyon, hipertansiyon, kalsinörün inhibitörü toksisitesi, glomerüler hastalık nüksü bulunmaktadır (44). İmmünsüpresif tedavideki gelişmeler ve erken allograft sağ kalımının artması ile birlikte günümüzde greft kaybının en önemli sebebi haline gelmiştir. Orta- ağır kronik allograft hasarı nakil sonrası 1. yılda hastaların neredeyse dörtte birinde, 10. yılda %90'ında görülmektedir. Tanısı biyopsi ile greft fonksiyonundaki azalmaya sebep olabilecek diğer nedenlerin dışlanması ile konur. Biyopsi nedenlerin tespiti için gereklidir. Eğer biyopsi bulguları kalsinörün toksisitesi

ile uyumlu ise tedavi dozu azaltılmalı, kesilmeli ya da değiştirilmelidir. KDIGO eGFH>40ml/dk/1.73m² ve toplam protein atılımı <500mg/g kreatinin ise sirolimusa geçilmesini önermektedir (33).

Böbrek allograft biyopsisinin önerildiği durumlar şunlardır:

- Serum kreatinin düzeyinin kalıcı ve açıklanamayan yüksekliği,
- Akut rejeksiyon tedavisi sonrası serum kreatinin düzeyinin eski düzeyine dönmemesi
- GGF sırasında her 7-10 günde bir
- Nakil sonrası 1-2 aylık süre içinde beklenen serum kreatinin düzeyine ulaşamaması
- Yeni başlangıçlı proteinüri ya da açıklanamayan 3g/24 saat proteinüri (19).

2.6. CNI Nefrotoksisitesi

Takrolimus kullanımına bağlı nefrotoksisite solid organ nakillerinde akut veya kronik olarak gelişebilir ve bu durum nakil sonrası uzun süreli greft hasarına yol açar (45). CNI aracılı nefrotoksisite, vasküler endotel ve tübüler epitel üzerindeki hemodinamik ve doğrudan hücresel etkilerin sonucudur. Fonksiyonel nefrotoksisite preglomerüller afferent arteriollerdeki vazokonstruksiyona bağlıdır. Artan sempatik tonus, RAA sistem aktivasyonu, dengenin tromboksan ve prostaglandinler yönüne kayması, endotel hücrelerinde endotelin-1 artışı ve NO (Nitrik oksit) yapımının azalmasıyla bu olay tetiklenir.

Kalsinörin inhibitörleri ayrıca endotelial ve tübüler hücreler üzerinde çeşitli vazoaaktif bileşiklerin salgılanmasına katkıda bulunabilecek doğrudan toksik bir etki gösterir. Renin-anjiyotensin sisteminin aktivasyonunu ve transforme edici büyüme faktörü-b (TGF-b) sentezi gibi diğer fibrojenik araçları da tetikler. Yapılan birçok çalışmalarda kayıtlara göre, böbrek dışı nakil alıcılarında kronik böbrek yetmezliği riskinin esas olarak kalsinörin inhibitörü immünosüpresif ajanlar ile ilişkili olduğunu göstermektedir. CNI doz ve kan düzeyine bakılarak böbrek hasarını öngörmek güçtür. Nakil sonrası bağımsız bireysel duyarlılık özelliklerinin de nefrotoksisitede etkisi olduğu düşünülmektedir. TAC hedef düzeyine ulaşmak için günlük doz ile artan ilaç maruziyeti ve renal hasar oluşmasında zayıf korelasyon olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (6, 46).

Histopatolojik bulgular, klinikte artmış serum kreatinininin en yaygın nedenlerinden biri olan akut rejeksiyon ve ilaç toksisitesi arasında ayırım yapmada faydalıdır. Rejeksiyon intestinal tubulusta inflamasyonla karakterize olup CNI nefrotoksitesinde ise tubuler epitel vakuolizasyonu tanımlanır. Randhawa ve ark.'nın yaptığı çalışmada biopsiler akut rejeksiyonu göstermekte fakat tübüler epitelde klinik olarak belirgin osmolar veya iskemik hasar ile açıklanamayan nadir görülen izometrik tübüler vakuoller tespit edilmemiştir (9).

TAC kullanımına bağlı gelişen nefrotoksiteyi işlevsel, akut ve kronik toksisite olarak değerlendirebiliriz.

2.6.1. İşlevsel nefrotoksite

İlaç toksisitesinin hafif formudur. Hipertansiyon, sodyum retansiyonu, hiperkalemi, hipomagnezemi, hiperürisemi ve böbrek disfonksiyonunun eşlik ettiği vazokonstrüksiyon ve artmış kreatinin azalmış GFR ile karakterizedir. Histolojik olarak biopsi örneklerinde değişiklik tespit edilmez. Bu işlevsel değişikliklere afferent arteriolar vazokonstrüksiyonun neden olduğu düşünülmektedir. RAA aktivasyonu, artmış sempatik sistem aktivasyonu, değişen prostaglandin mekanizması ve endotelin sekresyonu toksisite gelişiminde rol almaktadır (47). Bu bulgular böbrek hücrelerinde CNI birikiminin böbrek fonksiyon bozukluğunun kritik bir belirleyicisi olabileceğini düşündürmektedir (48).

Tablo 2.7. CNI nefrotoksitesitesi

	Akut TAC toksisitesi	Akut rejeksiyon	Kronik TAC toksisitesi
Tübüller	İzovolümetrik vakuolizasyon	Tubulit	Atrofi
	Dev mitokondri		
	Mikrokalsifikasyon		
İnterstisyum	Hafif ya da değişiklik yok	Mononükleer hücre infiltrasyonu	Çizgili interstisyel fibrozis
Arterioller	Mediyada fokal miyosit nekrozu	Hücrel arterit	Hyalin veya fibromukoid birikimi
Glomerul			Sklerozis

2.6.2. Akut toksisite

CNI kaynaklı akut böbrek yetmezliği afferent arteriyollerde vazokonstriksiyon olarak ortaya çıkabilir ve bu ilk dozdan itibaren olabilir. Bu durum serum kreatinini yükselterek GFR'de azalmaya yol açar. Hipertansiyon (HT), hiperkalemi, tubuler asidoz ve oligüri ile bağlantılı artan Na reabsorbsiyonu bunu takip eder. Bu hemodinamik etkiler ve fonksiyonel değişiklikler çoğunlukla doz bağımlıdır ve azalan TAC dozu ile geri dönebilir. Klinik ve morfolojik değişiklikler TAC ve siklosporin nefrotoksitesitesinde benzerdir. Akut rejeksiyon ile ayırıcı tanısı güçtür. Akut rejeksiyonda kreatinin artışı daha erken görülür ve daha fazladır. Ateş ve proteinüri nefrotoksitesitede gözlenmez. Akut rejeksiyonda böbrek biyopsisinde interstisyel infiltrasyon, tubülit gözlenmektedir. Bu bulgular genelde TAC kaynaklı nefrotoksitesitede yoktur. İlaç nefrotoksitesitesinde doz azaltıldığında böbrek disfonksiyon ve morfolojik değişiklikler geri dönüşümlü olabilir (31, 47).

Vasküler Etkiler: Akut CNI nefropatisi (Akut Arteriopatı): Böbrekte Reversible fonksiyon bozukluğu CNI kullanımına bağlı olarak afferent arteriollerde

vazokonstruksiyona bağlı olduğu Murrey ve ark. tarafından gösterilmiştir (49). Afferent ve efferent arteriyollerde, CNI kullanımıyla ilişkili olarak vasküler akımda değişiklikler meydana gelerek afferent arteriyollerin çapı azalmaktadır (50). Vasküler disfonksiyon, endotelin ve tromboksan içeren vazokonstriktör faktörlerdeki artış, renin-anjiyotensin sisteminin (RAS) aktivasyonu ve prostasiklin, prostaglandin E₂ ve NO gibi vazodilatör faktörlerin azalmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte serbest radikal oluşumu, akut CNI nefrotoksisitesinde ve böbreklerde sempatik sistem aktivasyonunda rol oynar. Reversibl tübüler disfonksiyon akut CNI nefrotoksisitesinin bir özelliği olarak kabul edilmektedir. Bu etkilerin kalsinörin/NFAT bağımlı mekanizmalarla ilişkili olup olmadığı şu anda bilinmemektedir, ancak tamamen farklı bir moleküler yapıya ve hücre içi bağlanma yerine sahip olan ancak benzer bir toksisite profiline sahip olan siklosporin ve TAC arasındaki benzerlikler, durumun böyle olabileceğini düşündürmektedir. Endotelin, böbrek ve vasküler yataklarda yaygın olarak salgılanan güçlü bir vazokonstriktördür. Doğrudan kalsinörin inhibitörü aracılı renal arteriolar vazokonstriksiyon, güçlü bir vazokonstriktör olan endotelin-1'in artmış seviyesi ile ilişkili bulunmuştur (51, 52). RAS aktivasyonu, anjiyotensin II'nin etkisiyle renal kan akışını azaltır, bu mekanizma CNI'lerin kullanımı ile ilişkili renal hemodinamik değişikliklerin kısır döngüye girmesine neden olur. Kalsinörin inhibisyonu ile ilişkili artan renin sekresyonu bazen jukstaglomerüler aparatın hiperplazisi olarak görülür ve tipik olarak kronik renin stimülasyonu durumlarında gözlenir. Sonuç olarak araşidonik asit metabolitlerinin (eikosanoidler) vazodilatör/vazokonstriktör oranında denge bozulur ve vazokonstruksiyon meydana gelir. NFAT ve COX-2 (siklooksijenaz-2) arasındaki ilişki gösterilebilir. COX-2 gen promotörü, NFAT için bağlanma bölgeleri içerir ve NFAT'ın, in vitro COX-2 gen ekspresyonunun düzenlenmesi için büyük önem taşıdığı bildirilmiştir (53). Birlikte ele alındığında, bu doğrudan çalışılmamış olmasına rağmen, COX-2 inhibisyonu ve buna bağlı olarak kalsinörin/NFAT inhibisyonu ile azalmış prostaglandin E₂ oluşumu, CNI'lerin renal vazokonstriksiyona ve GFR'de azalmaya yol açtığı ana mekanizma olabilir. Ek olarak, COX türevi prostanoidlerin, jukstaglomerüler aparatında ve ayrıca tübüler tuz ve su işlemede renin sentezi ve sekresyonunun düzenlenmesinde rol oynadığına dair ikna edici kanıtlar vardır (54). Bu nedenle, CNI'lerin COX-2 inhibisyonu üzerindeki etkileri, CNI nefrotoksisitesinin gelişmesi için çok önemli

olabilir. Akut CNI nefrotoksitesinin patogenezinde endotel disfonksiyonunun temel faktörlerden biridir. TAC, NO sentezini ve endotele bağımlı NO aracılı renal vazodilatasyonu inhibe eder. CNI'lerin sempatik sinir aktivitesi üzerindeki etkileri, kalsinörinin nöral dokuda her yerde eksprese edilmesi ile açıklanabilir.

Son zamanlarda, kalsinörin inhibisyonunun böbrek afferentlerini sinapsinler üzerindeki etkiyle uyardığı öne sürülmüştür. Sinapsinler, presinaptik veziküllerin ve duyuusal sinir uçlarındaki mikroveziküllerin bileşenleridir (55, 56).

Tübüler Etkiler: Akut CNI Nefrotoksitesisi Histolojisi; endoplazmik retikulumun genişlemesi ve artmış lizozomların bir sonucu olarak tübüler sitoplazmanın izometrik vakuolizasyonu ile ilişkilendirilmiştir. Bununla birlikte, akut nefrotoksitede böbrek disfonksiyonu genellikle morfolojik lezyonlar yokluğunda mevcuttur. Buna rağmen, izometrik tübüler vakuolizasyon, CNI nedenli böbrek fonksiyon bozukluğu oluşmadan görülebilir ve yakın zamanda yapılan bir çalışma, izometrik tübüler vakuolizasyonun kronik CNI nefrotoksitesine ilerleme ile ilişkili olmadığını göstermiştir (57).

İzometrik tübüler epitel hücre vakuolizasyonu böbrek transplantasyonundan sonra akut CNI nefrotoksitesisi gözlemlenmesine rağmen spesifik bir bulgu değildir ayrıca steroidler ve azatioprin kullanan hastaların allogreft biyopsilerinde de görülür. Bu tübüler vakuolizasyon bazen "ozmotik nefroz" olarak adlandırılmaktadır. İzometrik tübüler vakuolizasyon, afferent arteriyolar vazokonstriksiyonun neden olduğu göreceli iskeminin bir sonucu olabilir, ancak tübüler epitel hücrelerinde kalsinörin inhibisyonunun doğrudan etkilerinin endoplazmik retikulum yapısında ve işleyişinde değişikliklere neden olma olasılığı göz ardı edilemez. Bunlara ek olarak CNI maruziyetinin ısı şok protein ekspresyonunu indüklediği, hücre kültürlerinde tübüler epitel hücrelerinde NO üretimini azalttığı ve sitozolik kalsiyum konsantrasyonundaki değişikliklere yol açarak kalsinörin inhibisyonunun tübüler fonksiyon üzerinde doğrudan toksik etkilerini açıkladığı gösterilmiştir (58, 59).

Trombotik Mikroanjiyopati: TAC kullanımı, transplantasyon sonrası trombotik mikroanjiyopatiye (TMA) için önemli bir risk faktörüdür. Bu, vazokonstriksiyonla ilişkili iskemiye ikincil endotel hasarıyla ilişkilendirilir ve TACun trombosit agregasyonunu artırabileceği ve protrombotik faktörleri

etkinleştirebileceği öne sürülmüştür. Siklosporin (CsA) ve TAC akut durumda TMA neden olabilir ve bu muhtemelen vazokonstriksiyona bağlı iskemiye sekonder endotel hasarından kaynaklanmaktadır. CNI hemodinamik değişikliklere yol açabilir ve tubul epitel hücreleri üzerine direkt toksik etki gösterebilir (60).

2.6.3. Kronik Nefrotoksisitesi

CNI tedavisi sonucunda, damarlar (arteriolar hyalinosis), tubulo-interstitium (tübüler atrofi ve interstisyel fibroz) ve glomerul (Bowman kapsülünün kalınlaşması ve fibrozu ve fokal segmental veya global glomerüler skleroz) olmak üzere böbreğin her üç kompartmanı da geri dönüşümsüz olarak etkilenebilir. Biyopsi çalışmalarında, kronik CNI nefrotoksisitesi düşündüren lezyonlar, transplantasyondan sonra zamanla ilerler (56, 61). Yapılan çalışmalar nakilden 10 yıl sonra, neredeyse tüm vakalarda kronik CNI nefrotoksisitesini düşündüren lezyonların görüldüğünü göstermiştir (62). Arteriolar hyalin kalınlaşması, kronik CNI nefrotoksisitesi tanısı için en karakteristik lezyondur ve CNI nefrotoksisitesinin en hassas ve en erken histolojik göstergesidir. CNI nefrotoksisitesinin histolojik tanısı, lezyonların histolojik derecelendirilmesinin yetersiz tekrarlanabilirliği nedeniyle bazen zordur.

Vasküler etki: Afferent arteriyollerin nodüler hyalin birikintileri, CNI nefrotoksisitesinin ayırt edici özelliği olarak kabul edilir. Bu arteriyollerin duvarının çevresinde fokal veya dairesel hyalin protein birikimi ile karakterizedir. Sonuç olarak nodüler hyalin birikintileri, damar lümenin daralmasına neden olacak kadar büyük hale gelir (63).

Tubulointertisyel etki: Kronik TAC kullanımı, olası arteriolopati ve arteriolar lümenin daralması, interstisyel fibroz ve tübüler atrofiyle birlikte glomerüler skleroz gelişiminde katkıda bulunur. Takrolimusun böbrekteki vazokonstriktör etkisi sonucu meydana gelen tubulo-interstisyel bölgenin lokal hipoksisi veya iskemisi, serbest radikallerin veya reaktif oksijenlerin oluşumuna yol açar. Diğer organlarda meydana gelen hipoksise olduğu gibi, renal vazokonstriksiyon renal hipoperfüzyona ve hipoksi-reoksijenasyon hasarına ve daha sonra reaktif oksijen türlerinin ve serbest radikallerin oluşumuna, bunlar ise hücresel hasara ve apoptoza neden olur. TGF-'nin upregülasyonu, kronik CNI nefrotoksisitesinde önemli bir etyolojik faktör olarak

kabul edilir. TGF- epitelyal mezenkimal geçişi (EMT) indükler ve EMT renal interstisyel fibrozise katkıda bulunan önemli bir mekanizma olarak kabul edilmektedir (56). CNI'nin TGF β upregulasyonunu arttırması CNI bağlı nefrotoksisitede önemli bir faktör olduğunu düşündürür. Çünkü TGF- β 'nin artışı böbrek interstisyel fibrozunun altında yatan önemli bir mekanizma olan EMT'ye yol açar. Epitelial Mezenkimal Transition (EMT), epitelyal hücrelerin farklı durum ve uyarılar sonucunda epitelyal özelliklerini kaybederek mezenkimal özellikler kazanmaları durumudur. CNI aktive ettiği RAA sistemi renal interstisyel fibrozu ve nefrotoksisiteyi doğrudan tetikler. CNI bağlı akut nefrotoksisitenin belirteci akut arterilopati, tübüler vakuolizasyon ve TMA'dır (64, 65).

Anjiyotensin II, akut CNI nefrotoksik etkisi önemli olup, aynı zamanda aldosteron salınımı, tübüler transportun uyarılması, proinflamatuvar etkiler ve TGF-indüksiyonu ile (Anjiyotensin-II tip 1) AT1 reseptörlerinin aracılık ettiği profibrojenik ve büyümeyi uyarıcı etkileri içeren pleiotropik etkilere sahiptir. Kalsinörin inhibisyonu ayrıca apoptoz genlerini doğrudan aktive edebilir ve tübüler ve interstisyel hücrelerde apoptozu artırabilir. Böylece tübüler atrofiyi indükleyebilir. Ek olarak, makrofaj infiltrasyonu ile enflamasyon, kronik CNI nefrotoksisitesi ile ilişkilendirilmiştir (66).

Glomeruler etki: CNI'lerin kronik kullanımını birçok farklı tipte glomerüler hasara neden olabilir. En yaygın olarak, global glomerüloskleroz, şiddetli CNI ile ilişkili arteriolar hyalinosis ve arteriolopati ve sekonder glomerüler iskemiden kaynaklanır. Tübüler hasar, atubüler glomerüllerin gelişmesine neden olur, Atubular glomerüller daha küçük görünür ve sıklıkla periglomerular fibroza sahiptirler. Kalsinörin inhibisyonu, muhtemelen arteriolar hyalinosis veya global glomeruloskleroz ile ilişkili hiperfiltrasyon hasarından kaynaklanan fokal segmental glomerüloskleroz lezyonlarına neden olabilir.

Elektrolit Bozuklukları: TAC kullanımını böbrek hemodinamiği ve yapısal etkilerine ek olarak hiperkalemi, hipomagnezemi ve magnezyum kaybı, hiperkloremik metabolik asidoz (distal tübüler asidoz) ve hiperürisemi gibi tübüler fonksiyon değişikliklerine ve elektrolit bozukluklarına yol açar. CNI'lerin tübüler fonksiyon üzerindeki etkilerinden bazıları; tübüler epitel hücre membranında azalan NaK2CL

kotransportudur. Kalsinörin inhibisyonu sonucu görülen hiperkalemi çok faktörlüdür ve toplama kanallarında Na⁺-K-ATPaz üzerindeki olası inhibitör etki ve distal tübüler asidoz ile ilgilidir. Ancak bu bulgular, CNI'lerinin elektrolit dengesi üzerindeki etkisini tamamen açıklamaz ve kalsinörin inhibisyonunun tübüler fonksiyon üzerindeki etkileri muhtemelen çok daha karmaşıktır ve farklı nefron segmentleri arasında değişiklik gösterir (56). Buna ek olarak sodyum atılımındaki bozulma CNI'nın tübüler transport üzerindeki etkisine bağlanmıştır (67).

2.7. Gen Polimorfizmi Farmakokinetik ve Farmakodinamiğe Etkisi

Organ naklinde klinisyenlerin klinik rutinde TAC ile ilişkili yan etkiler geliştirme riski taşıyan hastaları belirlemek için bir yaklaşıma ihtiyaçları vardır. Hastanın bireysel TAC metabolizma tipinin immünosupresif rejimin uyarlanması için kullanılabileceğini birçok çalışma önermiştir. TAC metabolizmasının temelini farmakokinetik faktörlerin yanı sıra çeşitli bireysel, genetik ve klinik faktörler oluşturur (68). Nakil hastasının yaşı, cinsiyet, vücut kitle indeksi, gecikmiş greft fonksiyonu, hematokrit, serum albümin ve emilimin ilgili belirleyiciler olduğu ileri sürülmüştür. Bununla birlikte, bu faktörlerin bazıları hala tartışma konusudur (68, 69).

Glomerüler skleroz, tübüler atrofi ve interstisyel fibrozis dahil olmak üzere böbrek yapısında meydana gelen değişiklikler, son dönem böbrek yetmezliğine yol açabilir. İlaç dozu iyi bilindiği üzere kronik CNI bağlı nefrotoksisite için öngörü teşkil etmez. Nefrotoksisite gelişimine katkıda bulunan böbrekte CNI metabolizması ve transport genlerindeki varyasyonlar araştırılmıştır. KC nakil hastalarında CYP3A5, ABCB1, CYP2C8 ve ACE genetik polimorfizmleri ile TAC kaynaklı nefrotoksisite arasında ilişki olduğu tahmin edilmektedir. TACun farmakokinetik (ABCB1 ve CYP3A5) ve farmakodinamik (TGF- β , CYP2C8, ACE, CCR5) genleriyle ilgili varyasyonların TAC'un indüklediği nefrotoksisiteyle ilgili olduğu savunulmuştur. Nakil sonrası böbrek yetmezliği erken tanıda geri dönüşümlü olabilir dolayısıyla tespit ve tedavisi acilen yapılmalıdır. Bu sebepten dolayı nakil sonrası erken dönemde risk faktörlerinin ve önemli belirteçlerin iyi bilinmesi gerekmektedir (5).

2.7.1. CYP3A5 Polimorfizminin Böbrek Fonksiyonu Üzerine Etkisi

CYP450, ilk kez sıçan karaciğerinden mikrozomda spektrofotometrik çalışmalar yapan Martin Klingenberg tarafından tanımlanmıştır. Genetik olarak polimorfik sitokrom P450 3A5 (CYP3A5) TAC farmakokinetiğinde rol oynayan bir faz I metabolize edici enzimdir (13). TAC metabolizması sit450 enzimlerinden CYP3A ekspresyonundan etkilenir. Sato ve ark. yaptıkları çalışmada olağan TAC dozunu alan hastalarda diyare durumunda normale kıyasla hedef ilaç düzeyine erişimde uzama olduğunu göstermişlerdir. Bu TAC'ın başlıca metabolizma yerinin duodenum ve jejunum olduğunu düşündürmüştür (70). Karaciğer ve barsaktaki CYP450 enzim sistemi oral uygulanan TAC'ın metabolizmasından sorumlu ana enzimlerdir. CYP enzim sisteminde 50 den fazla izoenzim mevcuttur. Bu sistemin alt aileleri arasında CYP3A alt ailesi en popüler gruptur (36).

CYP3A5 polimorfik olarak eksprese edilir ve en az 11 SNP tanımlanmıştır. En kapsamlı incelenen CYP3A5 SNP, CYP3A5 geninin intron 3'ü (rs776746) içinde 6986 pozisyonunda A'dan G'ye geçişi içerir. Bu SNP alışılmadık bir durumdur, çünkü yabanıl tip alel, varyant alelden daha düşük bir frekansta görülür. SNP CYP3A5 6986A> G, CYP3A5 * 1 yabanıl tip alel ve CYP3A5*3 varyant alel olarak değerlendirilmiştir. Heterozigot ya da homozigot CYP3A5*1 allel taşıyıcıları yüksek düzeyde tam uzunlukta CYP3A5 mRNA üretir ve benzer düzeyde fonksiyonel CYP3A5 proteinini eksprese ederler (CYP3A5 ekspresör). CYP3A5*3 homozigot varyant allel taşıyıcıları çok düşük ya da tespit edilemeyecek düzeylerde fonksiyonel CYP3A5 proteini üretirler (CYP3A5 nonekspresör). En az bir CYP3A5 * 1 alelinin kalıtımı, invitro çalışmalarda karaciğerde artmış CYP3A5'e metabolizma ile güçlü bir şekilde ilişkilidir (71). CYP 3A5'te sık görülen SNP (6986 A>G) (rs776746) TAC'ın farmakokinetik değişkenliğine katkıda bulunan ana faktör olarak kabul edilir. CYP 3A5*1/*1 ya da CYP 3A5*1/*3 genotipleri fonksiyonel enzime sahiptir ve ekspresör olarak adlandırılır. CYP3A5*1 wildtip (yabanıl tip) olarak adlandırılır. CYP3A5*3 ise mutant aleldir. CYP3A5*3 alelinin taşınması, erken bir durdurma kodonuna ve CYP3A5 proteininin bulunmamasına (ekspresör olmayan) neden olur. Bu genotip nonekspresördür ve fonksiyonel enzime sahip değildir. Yüksek seviye CYP3A5 enzimi miktarı en az bir CYP3A5*1 taşıyan kişilerde görülür. Bu nedenle, CYP3A5

*1/*3 polimorfizminin TAC farmakokinetiğinin bireyler arası varyasyonuna katkıda bulunduğu düşünülmektedir. CYP3A5 6986A>G SNP sıklığının en önemli faktörlerinden biri etnisitedir. CYP3A5*1 alleli %45-73 Afrikan-Amerikalı, %15-35 Asya, %25 Meksika, ve %5-15 Kafkas ırkında görülür (36).

Ekspressör alel taşıyıcı olan kişilerde enzim aktivitesi yüksek olduğu için ilaçlar hızla metabolize edilerek vücuttan atılırlar. Bu grupta yan etkiler daha az izlenirken hastalar düşük kan düzeyleri nedeniyle daha yüksek ilaç dozlarına ihtiyaç duyarlar. Afrikanlı-Amerikalılarda CYP3A5*1 alleleline sahip olma sıklığı %85 iken, beyazlarda ise bu sıklığın sadece %25 olduğu bildirilmektedir. Afrikanlı-Amerikalılarda böbrek nakli sonrası daha sık rejeksiyon görülmesinin CYP3A5 genindeki polimorfizmlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu etnik grup için TAC kan konsantrasyonlarının (TAC çukur kan düzeyleri), beyaz ırkta gözlenen değerlerden çok daha düşük olduğu ve bu nedenle hedef konsantrasyona ulaşmak için daha yüksek dozlarda TAC gerektirdiği ifade edilmektedir. Afrikanlı-Amerikalılarda subterapötik TAC düzeylerinin daha sık görüldüğü ve bunu akut rejeksiyon atakları ve daha kısa greft sağ kalım süresi ile ilişkilendiren yayınlar mevcuttur (72, 73).

Ekspressör olmayan alel taşıyıcıların enzim aktivitesi düşüktür ve düşük ilaç dozunda bile kısa sürede kısa terapötik düzeyin aşılması nedeniyle yan etkilere karşı bu bireyler daha duyarlıdır. CYP3A5*3, enzimde fonksiyon düşüklüğüne yol açan, TAC metabolizmasını yavaşlatarak ilaç kan düzeylerinin yükselmesine sebep olan en önemli alel olarak bildirilmektedir. CYP3A5*6, CYP3A5*7, CYP3A4*22 allelleri ise diğer yavaş metabolize edici polimorfizmlerdir. Nakil sonrası TAC başlangıç dozlarını daha düşük dozlarda başlayarak ilaç toksisitesinden hasta korunabilir. TAC'ın kan düzeyleri yükseldiğinde nefrotoksik etkilerinden dolayı greft fonksiyonuna etkisi düşünülürse, bu bilgi nakilin başlangıcından itibaren hasta ve greft sağkalımı açısından çok büyük avantajlar sunmaktadır. Organ nakilleri sonrası immunsupresif tedavilerin en önemli hedefi en kısa sürede etkin kan düzeylerine ulaşmak ve ilaç konsantrasyonunun o sınırlar içerisinde kalmasını sağlamaktır. Terapötik düzey altında kalmak rejeksiyon riskini arttıran çok önemli bir problemdir. Etkin kan düzeyine ulaşmakta zorlanılan bu bireylerde erken dönemde akut rejeksiyon sorunları yaşanabilir. Nakil sonrası kullanılan immunsupresif ilaçlar, yavaş metabolize edildiğinde ise yüksek kan düzeyi, ilaç toksisitesi ve hatta organ kayıplarına yol

açabilmektedir. CYP3A5, TAC için CYP3A4'e göre iki kat daha yüksek intrinsik katalitik aktiviteye sahiptir (74, 75). Sonuç olarak CYP3A5 ekspresörler alel taşıyıcılığı aynı terapötik seviyelere ulaşmak için daha yüksek doz TAC kullanımı gerektirir. Yüksek TAC düzeyleri de akut böbrek yetmezliği ile ilişkilendirildiği için CYP3A5'teki genetik varyasyon kronik böbrek yetmezliği gelişme riskini de etkileyebilir (4).

Renal transplantasyonun sonuçlarını etkileyebilecek başka CYP enzimleri de vardır. CYP2C8 ve CYP2J2 böbrekte polimorfik olarak eksprese edilir ve akut red veya toksisiteye yol açabilecek süreçlere karşı vazodilatör mekanizmaları ile koruyucu bir rol oynayan EET'lerin sentezinde rol oynar (13). CYP3A enzimi ve P-glikoprotein CNI'nin ince bağırsaktan emilimi için bariyer oluştururlar. CYP3A4 ve CYP3A5 enzimleri ince barsak, karaciğer ve böbrekte bulunur. TACun biyotransformasyonu sürecinde M1, M2, M3 ve M6 başlıca 4 metabolit oluşur. Bugüne kadar tanımlanan TAC metabolitleri ana ilaca göre daha az aktiftir, ancak metabolit toksisitesi hakkında daha fazla araştırma gereklidir (71).

CYP3A5 ekspresör bireyler nonekspresörlerden farklı metabolit oluşum patternine sahiptirler. Bu da nefrotoksisite gelişmesinde etkili olabilir. Böbrekteki CYP3A5 ekspresyonu, böbrek hücrelerinin kalsinörin inhibitörlerine maruziyetini azaltarak böbrek fonksiyon bozukluğunun gelişmesine karşı koruyucu bir rol oynuyor olabilir. Donör böbrekteki CYP3A5 ekspresyonu böbrek nakil alıcılarında nefrotoksisite gelişimine karşı önemli bir koruyucu olabilir. Biyopsi örneklerinin alınıp immünohistokimyasal değerlendirilme yapılan bir çalışmada 29 nefrotoksik ve 30 kontrol böbrek biopsisine göre nefrotoksik grubun kontrol grubuna kıyasla proksimal ve distal tubüllerin her ikisinin apikal membranlarında CYP3A5 ekspresyonunun daha az olduğu gösterilmiştir. 60 kişilik karaciğer nakil hastalarıyla yapılan bir çalışmada CYP3A5*3 homozigot olan hastaların nefrotoksite insidansında artış gösterilmiştir. Böbrekteki CYP3A5 ekspresyonunun böbrek hücrelerinin TAC'a maruz kalmasını sınırlandırarak nefrotoksisiteye karşı koruyucu bir rol oynayabileceğini öne sürmüştür. 30 kişilik genç böbrek nakil hastasının olduğu bir grupta yapılan çalışmaya göre 1 yıllık süreçte CYP3A5*1 allel içeren grubun ortalama arteriyel kan basınçları CYP3A5*3 homozigot grubuna kıyasla yüksek bulunmuştur (76-78).

Normal bir böbrekte CYP3A5 ekspresyonu proksimal tubul epitel hücrelerinde toplama kanallarına kıyasla ise daha fazladır. Bireyler arasında bağırsak ve hepatik CYP3A aktivitesinde büyük farklılıklar vardır ve enzim aktivitesindeki bu değişkenlik kısmen CNI'ların farmakokinetiğindeki belirgin olan bireylerarası değişkenlikten sorumludur. Azaltılmış CYP3A5 ekspresyonunun, muhtemelen azalmış intrarenal detoksifikasyon yoluyla, CNI tedavisine ikincil yapısal nefrotoksisite gelişimi için bir risk faktörü olabileceğini düşündürmektedir (79).

2.7.2. ABCB1 Polimorfizminin Böbrek Fonksiyonu Üzerine Etkisi

İlaçların emilim, dağılım ve eliminasyon gibi farmakokinetik süreçlerde taşıyıcı moleküller rol oynar. Bunlar arasında en önemli grup, ATP-Binding Casette (ABC) Ailesi Proteinleri'dir. İnsanda, gen yapılarına, amino asit sekanslarına ve filogenetik analizlerine dayalı olarak 7 alt aileye (ABCA'dan ABCG'ye) bölünmüş 40'tan fazla ABC taşıyıcısı tanımlanmıştır. Bunlardan P-glikoprotein (P-GP/ABCB1), çoklu ilaç rezistans bağlantılı proteinler (MRP'ler/ABCC'ler) ve meme kanseri rezistans proteini (BCRP/ABCG2) dahil en az 11 ABC taşıyıcısı, çoklu ilaç direnci (MDR) gelişiminde rol oynar. P-glikoprotein (P-gp), 1280 aminoasitten oluşan 170 kDa büyüklüğünde tek zincirli protein yapısındadır. P-gp'nin iki ATP bağlayıcı bölge ve iki transmembran bölgesi bulunmaktadır. Bu membran proteini ilaç direncini, geçirgenliği değiştirerek oluşturduğu için "permeability" kelimesinin kısaltması olan P ile isimlendirilerek P-glikoprotein olarak adlandırılmıştır (80). ABCB1 geni (MDR1 olarak da bilinir), birçok ilacın transmembran akışını yönlendiren P-glikoproteinini (P-gp) kodlar. P-gp, substratlarını ATP enerjisi ile aktif olarak hücrelerden dışarı taşıyan ATP-bağlayıcı kaset taşıyıcılarından biridir (8).

P-gp; hepatositlerde, safra kanalı endotel hücrelerinde, proksimal tübüllerin apikal yüzeylerinde, böbreklerde, bağırsak epitel hücrelerinde, adrenal bez, pankreas, beyin ve testisteki kapiller endotelial hücrelerinde bulunmaktadır. Bazı hastalıklarda ilaç direncine neden olmakla beraber ksenobiyotiklerin safra, idrar ve barsak lümenine atılmalarında; beyin ve testiste birikmelerinin önlenmesinde katkısı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, P-gp ile eflüx yani dışa atım aktivitesi, ilaçların bağırsaktan emilimini azaltırken, safra, karaciğer ve böbrekte tübüler atılımı artırır. Günümüze kadar MDR1 geninde en az 105 varyant keşfedilmiştir. Bu SNP(Tek nükleotid

polimorfizmi) lerin 48'i intronik, 29'u kodlanmayan bölgelerde bulunup aminoasit değişimine yol açmamaktadır. Kodlanan bölgelerde bulunan 28 adet varyanttan 10'u aminoasit değişimine yol açmaktadır. Bu SNP'lerden sadece 4 tanesi %1'den daha fazla sıklıkta görülmektedir (81). Nükleotid ve aminoasit değişimleri tabloda gösterilmiştir (Tablo 2.8).

Tablo 2.8. ABCB1 nükleotid ve aminoasit değişimleri.

Nükleotid değişimi	Ekzon	Aminoasit değişimi
A61G	2	Asn21Asp
T307C	5	Phe103Leu
A548G	7	Asn183Ser
G1199A	11	Ser400Asn
C1236T	12	Sinonim/Sessiz

Türk popülasyonunda yapılan bir çalışmada, C alel sıklığı %40, T allel sıklığı %60 olarak bildirilmektedir. T allel sıklık yüzdesinin fazla oluşu ile Türk popülasyonun bazı sitotoksik ajanlara karşı daha hassas olabileceği düşünülmektedir (82).

ABCB1 geni üzerinde saptanan polimorfizmler arasında en iyi bilinenleri ekson 13'de 1236C>T (rs1128503), ekson 22'de 2677G>A/T (rs2032582) ve ekson 26 de bulunan 3435C>T (rs1045642) polimorfizmleridir. Hoffmeyer ve ark. yaptığı bir çalışmada 3435C>T polimorfizmi için TT genotipine sahip kişilerde P-gp ekspresyonunun azaldığı gözlenmiştir. 3435C>T polimorfizmi ile ilaç farmakokinetiği arasında bir ilişki olup olmadığını araştırmaya yönelik birçok çalışma yapılmıştır. 3435C>T polimorfizminin alternatif splicing (uçbirleşme) oluşturarak yabancı tipe kıyasla daha kısa bir protein meydana geldiği gözlemlenmiştir (83-85) . Greft fonksiyonu üzerine olan etki P-gp'nin böbrek epitel hücrelerindeki heterojen ekspresyonuna bağlı olabilir ve sonuç olarak bu hücreler tarafından TAC emiliminde farklılıklara neden olabilir. ABCB1 varyantlarının TAC dozu üzerindeki etkisi tartışmalıdır: ortak C3435T SNP (rs1045642), bazı yazarlar tarafından TAC biyoyararlanımı ile ilişkilendirilmiştir, ancak diğerleri ilişkiyi doğrulayamamıştır (6-

9). Son çalışmalar vericinin ABCB1 genotipinin de, CNI kaynaklı kronik histolojik hasar ve düşük GFR ile ilişkili olabileceğini öngörmüşlerdir (8).

Böbrek tübüllerinin apikal membranı üzerindeki P-gp, böbreklerden ilaç geçişini düzenler böylece renal P-gp ekspresyonu CNI bağlı nefrotoksisitenin düzenlenmesinde rol oynayabilir. 136 böbrek nakil hastasının olduğu bir çalışmada nakilden sonraki 3. günden 1 yılın sonuna kadar olan süreçte ABCB1 3435C>T SNP ile, biyopsi ile gösterilen akut rejeksiyon, greft kaybı ve renal fonksiyon arasında bağlantı gösterilememiştir (86). 117 yetişkin akciğer nakil hastasında yapılan çalışmada ABCB1 3435CC veya 3435CT genotiplerine sahip hastaların %72 inde, 3435TT genotipinde ise %52’de rejeksiyon geliştiği gösterilmiştir (87). Bu durum varyant genotipteki hastalarda P-gp fonksiyon kaybıyla barsaklardan ilaç absorpsiyonunun artmasına ve sistem ve T lenfositlerde ilaç konsantrasyonunun artmasına bağlı olarak bulunmuş olabilir (76).

CNI nefrotoksisitesi nakil hastalarının CNI doz ve maruziyeti açısından önemli fark olmadığı gözlemlenmiş olup, bu gözlemler sonucunda CNI bağımlı nefrotoksisitenin ABCB1 3435TT genotipli hastalarda renal tübüler epitelyumdan azalan ABCB1 aracılı CNIT eliminasyonu ile açıklanmıştır. CNI kaynaklı nefrotoksisite gerçekte CNI ‘nın yüksek intrarenal konsantrasyonundan kaynaklanmaktadır (79). ABCB1 3435TT homozigotlarında CNI’lerin azalmış renal eliminasyonunu Naesen ve ark. yaptıkları çalışmada kanıt olarak göstermişlerdir (88). Bu farklılık CNI ‘nın sistematik maruziyeti ile açıklanamaz. Araştırmacılar, T alleli taşıyıcılarındaki DGF insidansının yüksek olmasının, daha fazla reaktif oksijen türü üretimine ve daha şiddetli oksidatif strese neden olan lökositlerdeki yüksek hücre içi CsA konsantrasyonlarından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir (89).

CNI organ ve kan-beyin bariyeri, testis, plasenta, kalp, böbrek, pankreas vs gibi vücut kompartmanlarına geçişi P-gp tarafından arttırılabilir ya da sınırlandırılabilir. Bağırsağın apikal veya lümenin fırça sınırında, P-gp sitoplazmadan hücrenin dışına bağırsak lümenine toksinleri veya birçok ilacı pompalayabilir ve bu nedenle emilim ve oral biyoyararlanımı etkiler. Bu nedenle güçlü bir P-gp ekspresyonu ilaçların absorpsiyonunu azaltabilir ya da azalmış ekspresyon absorpsiyonunu attırabilir (36). P-gp CNI’lerinin kan beyin bariyeri, plasenta, kalp, böbrek, testis gibi vücut

kompartımanlarına geçişini kolaylaştırabilir ya da kısıtlayabilir. rnek olarak P-gp yokluğu knockout fare modellerinde Siklosporin ve TAC'ın beyindeki konsantrasyonunda birkaç kat artışa neden olmuştur (76). TAC, ABCB1 için bir substrat olduğundan, ABCB1 ekspresyon hızındaki varyasyonun, TAC'ın plazma ve / veya hücre içi konsantrasyonunu etkilediği düşünülmektedir (4).

CNI ile indüklenen nefrotoksisite, muhtemelen CNI'lerin böbrek içi konsantrasyonları ile ilişkilidir. Ancak bu konsantrasyon tam kan CNI konsantrasyonları tarafından düzgün bir şekilde yansıtılamaz. Hipoteze göre TAC'ın kendisi değil metabolitinin nefrotoksisiteye yol açtığı iddia edilmiştir. Renal tübüllerde eksprese edilen ABCB1, TAC ve metabolitlerinin böbrekte birikmesini idrarla kolaylaştırarak sınırlandırabilir. Bu da düşük ABCB1 ekspresyonunun TAC ile ilişkili nefrotoksisite riskini arttırmasıyla bağlantılı olabilir. Ancak bu konuda literatür verileri tutarsızdır. Bunun bir açıklaması ekspresyondan ziyade fonksiyonu olabileceğidir. Bunun yanında CYP3A5 vasküler ve tubulointertisyel kompartmanlarda ABCB1 ile farklı etkileşimlere sahip olabilir. Ayrıca ABCB1'e ek olarak CYP2C8 ve CYP3A da nefrotoksisite ile ilgili polimorfizmler arasında incelenmektedir (12).

Son yıllarda taşıyıcı enzimler ve ilaç metabolize edici enzimler ve bunların kronik CNI ile indüklenen nefrotoksisitenin patofizyolojisindeki rolleri ilgi odağı haline gelmiştir. ABCB1 ayrıca T ve B lenfositleri ve dendritik hücreler dahil olmak üzere çeşitli lökositler üzerinde eksprese edilir. ABCB1 böbreğin proksimal tübüler epitel hücrelerinin fırça sınırında eksprese edilir. Ek olarak, ABCB1, Bowman kapsülünün epitel hücrelerinde, glomerüler mezengial hücrelerde, Henle kulpunun kalın çıkan bölümünün apikal membranında, hücre içi olarak uzak tübüllerde ve toplama kanalının apikal membranında eksprese edilir. İntrarenal ABCB1'in metabolik atık ürünlerin ve toksinlerin renal eliminasyonunda önemli bir rol oynadığı düşünülmektedir. Naesen ve ark., böbrek nakli biyopsilerinde düşük ABCB1 ekspresyonunun TAC ile tedavi edilen böbrek nakli alıcılarında kronik histolojik hasarın gelişimi için bir risk faktörü olduğunu gözlemlemişlerdir. Renal parankimal hücrelerde ABCB1 ekspresyonunun yeterince regüle edilmemesi, CNI'ların intrarenal birikmesine yol açabilir ve hastaları CNI ile ilişkili nefrotoksisite oluşumuna yatkın hale getirebilir (79, 88).

2.7.3. CYP2C8 Polimorfizminin Böbrek Fonksiyonu Üzerine Etkisi

CYP2C'ler, başlıca karaciğerde bulunan P450 enzimlerinin önemli bir alt ailesidir, aynı zamanda çeşitli ekstrahepatik dokularda da bulunurlar. CYP2C8 böbrekte ve karaciğerde araşidonik asidin (AA) epoksiyeikosatrienoik asitlere (EET) metabolik dönüşüm sürecinde rol oynayan ana enzimdir. İnsanda bilinen dört CYP2C enzimi vardır. Bunlar CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 ve CYP2C19'dir. CYP2C8 böbrekte EET'ler CNI'lerin vazokonstrüktör etkilerine karşı koruyucu rol oynarlar. EET'lerin önemli fizyolojik rolleri vardır. Örneğin, karaciğer glikojenolizini, pankreasta peptit hormonu salgılanmasını ve böbrekte Na taşınmasını ve su geri emilimini, trombosit agregasyonunu, vasküler iltihaplanmayı ve vasküler düz kas tonusunu etkilerler. CYP2C8'deki polimorfizmler bu nedenle potansiyel olarak insanlarda dramatik fizyolojik ve patolojik değişikliklere yol açabilir. DGF böbrek transplantasyonundan sonra uzun süreli allogreft sağkalımını azaltan sık görülen bir komplikasyondur. DGF'nin en sık kullanılan tanımı, nakilden sonraki ilk hafta içinde diyalize duyulan ihtiyaçtır. İskemi reperfüzyon hasarı DGF'nin başlıca nedenidir. Bazı çalışmalar CYP2C8 ve CYP3A5'nin DGF ile ilişkili olduğunu göstermiştir (12). TAC kullananlarda CYP2C8, ACE ve TGF-b'deki polimorfizmlerin böbrek hasarına etkisi olabilir. Transforming growth faktör-b (TGF), TAC kaynaklı nefrotoksisitenin tipik histolojik özelliği olan böbrekte fibrozis gelişiminde rol oynamaktadır. CYP2C8'in, EET oluşumunu azaltarak TAC'ın vazokonstriktif etkisine karşı olduğu düşünülmektedir (4, 90). CNI'ler, böbrekte endojen damar koruyucu AA metabolitleri olan epoksiyeikosatrienoik asitler (EET)'in üretimini etkileyebilir. EET'ler, AA'nın sitokrom P450 (CYP) aracılı epoksidasyonu yoluyla üretilir ve çözünür epoksit hidrolaz tarafından dihidroksiyeikosatrienoik asitlere (DHET'ler) hidrolize edilir. EET'lerin tübüler su emilimi ve Na⁺ taşınması, inflamasyona karşı koruma ve vasküler düz kas tonusunun korunması dahil olmak üzere kan basıncı homeostazının korunmasına yardımcı olan önemli fizyolojik rolleri vardır. Özellikle, 11,12-EET'in, muhtemelen endojen potasyum kanallarını açma kabiliyeti nedeniyle, sıçan jukstamedüller nefron preparatlarında vazodilatör olduğu gösterilmiştir. EET'ler ayrıca, antihipertansif özelliklerine katkıda bulunan Na⁺-K⁺-ATPase ve anjiyotensin II ile indüklenen natriürez inhibitörleridir. CYP2C8 tarafından oluşturulan araşidonik asit metabolitleri, hipertansiyonun önlenmesinde rol oynamıştır (91-94).

Bu veriler ışığında genetik polimorfizmlerin takrolimus nefrotoksitesinde etkili olabileceğini ve çalışmamızda CYP3A5 (6986A>G), ABCB (13435C>T) ve CYP2C8 (A1196G) polimorfizmlerin takrolimus kullanan böbrek nakil hastalarında böbrek fonksiyonu üzerine etkisini araştırarak nefrotoksositeye yol açan faktörleri önceden belirlemeyi amaçladık.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Olgular

Çalışmaya Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Nefroloji Bilim Dalı kliniğinde böbrek nakli nedeniyle takip edilen 18-65 yaş aralığında olan ve nakil sonrası TAC tedavisi alan 115 hasta dahil edildi. Çalışmaya dahil edilen tüm hastalara çalışma hakkında detaylı bilgi verildi ve önce aydınlatılmış onam formu ile yazılı onayları alındı.

Hastaların TAC kan düzeyleri (C0) ölçümü ESOGÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji İlaç Düzeyi ve Uyuşturucu Madde Analiz Laboratuvarında yapıldı. CYP3A5 (6986A>G), ABCB1 (13435C>T) ve CYP2C8 (A1196G) genlerine ait Tek Nükleotid Polimorfizmleri(SNP) analizleri Tıbbi Farmakoloji AbD Farmakogenetik Laboratuvarında yapıldı. Çalışmaya ESOGÜ Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Uygulamalar Etik Kurul 19.0.9.2019 tarih ve 48 nolu onayı alındıktan sonra başlandı (ESOGÜ BAP: Proje no 2019/2742).

Hastalara ait muayene bulguları ve laboratuvar verileri hastane otomasyon (enlil) sisteminden ve hasta dosyalarından elde edildi. Çalışma kriterlerine uygun olan ve aydınlatılmış onam formu olan hastaların polimorfizm için genotiplenmesi yapıldı.

Bu çalışmada dahil edilme kriterleri; 18-65 yaş aralığında olmak ve immünsupresif tedavi olarak takrolimus kullanıyor olmak. Hariç tutma kriterleri; fonksiyonel olmayan grefti, ilerlemiş karaciğer yetmezliğini, hipoalbuminemi ve takrolimus farmakokinetiğini etkileyecek ciddi ishal, çoklu organlı nakli.

Rutin poliklinik kontrolü sırasında hastadan alınan ve Tıbbi Farmakoloji İlaç Düzeyi ve Uyuşturucu Madde Analiz laboratuvarında TAC kan düzeyi ölçümü için çalışılan yaklaşık 10 ml kandan artan miktar ile genotiplenme yapıldı. EDTA'lı tüplerdeki 10'ar ml'lik venöz kan örneği DNA izolasyonu yapılana kadar -80°C'de saklandı.

DNA (Deoksiribo nükleik asit) izolasyonları, PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ve RFLP (Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) analizleri Tıbbi Farmakoloji Farmakogenetik Laboratuvarımızda gerçekleştirildi.

3.2. Kullanılan Cihazlar

PCR Cihazı (Thermocycler)	TECHNE Touchgene Gradient
Elektroforez Tankı	BIO-RAD Power PAC
Santrifüj	Thermo IEC micromax rf
Su Banyosu	Braun
Spektrofotometre	Thermo scientific
Vortex (karıştırıcı)	Nuve 110
Derin dondurucu (-20oC)	Samsung
Derin dondurucu (-80oC)	Templow
Otoklav	Tuttnauer

3.3. Kullanılan Sarf Malzemeleri

Kullanılan primerler

** CYP3A5*3 primerleri: intron 3 CYP3A5 6986A>G (293 bp).

5¢-CATCAGTTAGTAGACAGATGA-3¢ (forward primer).

5¢-GGTCCAAACAGGGAAGAAATA-3¢ (reverse primer).

** MDR1 primerleri: ABCB1 3435C>T [(exon 26 (rs1045642))] (244 bp)

5¢-GATCTGTGAACTCTTGTTTTCA-3¢ (forward primer).

5¢-GAAGAGAGACTTACATTAGGC-3¢ (reverse primer).

**CYP2C8*3 primerleri: CYP2C8*3 (A1196G).

5'- CTTCCGTGCTACATGATGACG-3' (forward primer).

5'- CTGCTGAGAAAGGCATGAAG-3'(reverse primer).

Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) yönteminde kullanılan restriksiyon enzimleri

CYP3A5 6986A>G için SspI

ABCB1 3435C>T için Mbol

CYP2C8 (A1196G) için Xmnl Restriksiyon enzimleri kullanıldı.

3.4. Genotipleme

Genotipleme genetik sinyalin çözümlenmesi işlemidir. Hastalardan TAC düzeyi ölçümü için alınmış numune sonrasında DNA izolasyonu için -80 °C’de saklandı. Periferik kandan elde edilen genomik DNA’da, ‘Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)’ kullanılarak istenilen bölge amplifiye edildi ve sonrasında RFLP yöntemi ile gerekli gen bölgeleri kesilerek jel elektroforezi sonrasında UV (ultraviyole) ışık altında görüntülendi

3.4.1. Periferik Kandan DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu, hücre parçalanmasından sonra proteinaz yardımıyla proteinlerin yıkılması ve nükleik asitlerin yüksek tuz derişimi ortamında santrifüjle çöktürülmesi işlemine dayanır. Lökositlerde bulunan DNA miktarı PCR analizi için yeterlidir.

Kandan DNA izolasyonu için vivantis (GF-1 nucleic acid extraction kit) izolasyon kiti kullanıldı. İşlem sonunda yaklaşık 200 µl DNA solusyonu elde edildi. DNA izolasyon protokolü aşağıdaki basamaklardan oluşmaktadır.

Ependorf tüplere alınan 200 µl kan örnekleri 10 µl proteinaz K ile karıştırıldı. 200 µl extraction buffer 1,5 ml santrifüj tüpüne koyularak 15 sn vortekslendi. 16 dakika 56 °C’de bekletildi. Kapaktaki damlaları uzaklaştırmak için kısa santrifüj yapıldı. 210 µl binding buffer eklendi ve 15 sn vortekslendi. Solüsyon spin kolona aktarıldı ve 6000 (dakikada dönme sayısı) RPM’de 1 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra tüpün altındaki sıvı döküldü. Spin kolona 650 µl Wash buffer eklendi ve 6000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpün altındaki sıvı döküldü ve tekrar spin kolona 500 µl Wash buffer II eklendi ve 6000 rpm’de 1 dk santrifüj

edildi. Santrifüj sonrasında tüpün altındaki sıvı döküldü. Spin kolona 250 µl Wash buffer II eklenip 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj edildi. Spin kolondaki sıvı yeni bir 1,5 ml lik eppendorfa aktarıldı ve üzerine 250 µl elution buffer eklenerek kapağı kapatıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi. Daha sonra 8000 rpmde 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj işlemi sonrası ependorf tüplerde izole DNA elde edildi. Spektrofotometre ile nükleik asitlerin saflık ve konsantrasyon ölçümü yapıldı.

3.4.2. PCR

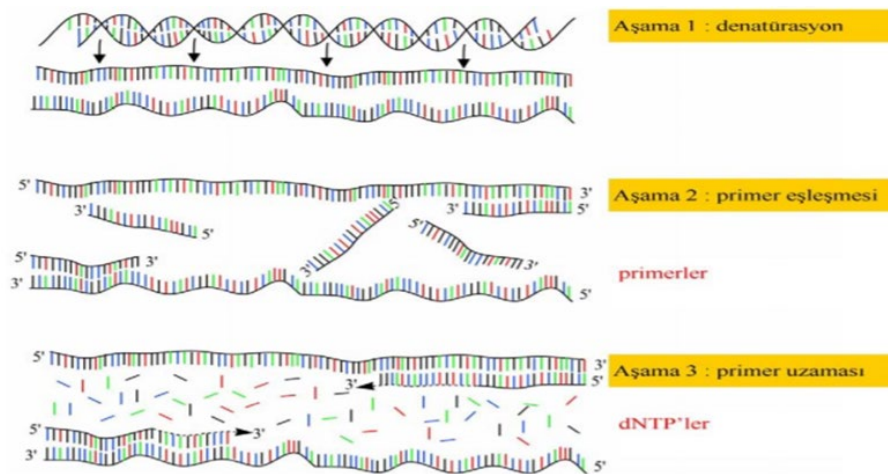
PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA'da belirli bir bölgenin çoğaltılmasına dayanan in vitro DNA sentez yöntemidir. Hedef gen bölgesi PCR ile bir DNA polimeraz enzimi kullanılarak in vitro koşullarda tek bir orijinal kopyadan milyonlarca kez çoğaltılabilmektedir. Yöntemin temeli, çoğaltılmak istenen bölgenin iki ucuna özgü, ilgili bölgedeki baz dizilerine tamamlayıcı olan, 18-20 baz uzunluğunda bir çift sentetik oligonükleotid primer kullanarak, bu bölgenin enzimatik olarak sentezlenmesine dayanmaktadır. PCR tekrarlanan döngülerden oluşan bir klonlama reaksiyonudur. Bu döngüler kalıp DNA'nın zincirlerinin açılması (denatürasyon, 92-95°C), primerlerin DNA'ya bağlanması (annealing, 50-54°C) ve sentez (polimerizasyon, 72°C) aşamalarından oluşmaktadır.

PCR yukarıda da belirtildiği üzere 3 temel basamaktan oluşmaktadır.

1. Denatürasyon Basamağı: Çoğaltılacak çift iplikli DNA yüksek sıcaklıkta denatürasyona uğrar. Kopyalanma işlemi DNA'nın 92-94 °C'ye kadar ısıtılması ile başlar. Bu sıcaklıkta kalıp DNA ipliklerini birlikte tutan hidrojen bağları kırılır her iki sarmal birbirinden ayrılmaya başlar ve primerlerin her iki sarmal arasına girmesi sağlanır. Ayrılan DNA iplikleri yeni sentezlenecek DNA için kalıp görevi görürler.

2. Primerlerin Birleşmesi Basamağı (annealing): Bu basamakta sıcaklık 50-60°C'e kadar aniden düşürülerek çoğaltılacak kalıbın dizilerine tamamlayıcı olarak tasarlanmış primerlerin hedef bölgelerini tanıması ve bağlanması sağlanır. Primerlerden biri hedef dizinin bir tarafındaki DNA molekülünün bir zincirine komplementer iken diğer primer de hedef dizinin karşı tarafındaki DNA molekülünün diğer zincirine komplementerdir. Kullanılacak bağlanma sıcaklığı primerlerin Tm (erime sıcaklığı) değerinin 3-5 °C altındaki sıcaklık değeridir.

3. Yeni Zincir Sentezi: Primerlerin Uzaması Basamağı: Taq DNA polimeraz enziminin en yüksek aktivite gösterdiği 72°C sıcaklıkta, primerler ortama katılan büyük miktarlardaki deoksiribonükleozid trifosfatlar (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) ve DNA polimeraz enzimi ile yeni bir DNA çift zincir formunda uzarlar. *Thermus aquaticus* adlı bakteriden elde edilen termostabil bir enzim olan 'DNA Taq polimeraz' enzimi Nükleotidleri 5' ucundan 3' ucuna doğru ekleyerek primerlerin uzamasını sağlayan DNA polimeraz enzimi olarak kullanılır.



Şekil 3.1. PCR aşamaları

PCR bileşenleri

Kalıp DNA, oligonükleotid primerler, serbest deoksiribonükleozid trifosfatlar (dNTP: dATP, dCTP, dGTP, dTTP), DNA polimeraz (Taq polimeraz)'dır.

Primerlerin hazırlanması

Çalışmamızda değerlendirilen polimorfizmlerin tespiti için kullanılan ileri (Forward=F) ve geri (Reverse=R) primerler, liyofilize halde satın alındı. Primerler, saf su ile çözdürüldükten sonra (100pmol/μl) -20 °C'de muhafaza edildi.

PCR karışımı

CYP3A5*3, ABCB1, CYP2C8*3 gen polimorfizmlerinin tespiti için 20μl reaksiyon hacminde PCR karışımı hazırlandı. Bu polimorfizmlerinin herbiri için PCR karışım koşulları aşağıdaki gibidir.

2X PCR Taq MasterMIX dye (abm) (10 µl)

ForwardPrimer (10 pmol) (1 µl)

ReversePrimer (10 pmol) (1 µl)

dH2O (6 µl)

DNA (30-50 ng/µl) (2 µl)

Her bir gen bölgesi için uygun PCR şartları ile amplifikasyon yapıldı.

CYP3A5 ve ABCB1 için PCR Thermal Cyclers Programı

Pre denatürasyon	94 °C	5 dk
Denatürasyon	94 °C	30 sn
Anneling	55 °C	30 sn
Extension	70 °C	30 sn
Final Extension	72 °C	7 dk *35 siklus

CYP2C8 için PCR Thermal Cyclers Programı

Pre denatürasyon	95 °C	5 dk
Denatürasyon	95 °C	30 sn
Anneling	56 °C	30 sn
Extension	72 °C	60 sn
Final Extensision	72 °C	7 dk *35 siklus

Hazırlanan karışım 1 ml'lik eppendorf içine koyularak PCR cihazına yerleştirildi. Yaklaşık 2 saatlik reaksiyon sonunda elde edilen ilgili gen bölgeleri yatay elektroforezde etidium bromid (2 µl + 0% 1 lik agaroz jelde 120 V da) 60 dk yürütülerek görüntüleme sistemi kullanılarak değerlendirildi.

3.4.3. Agaroz Jelin Hazırlanması

% 1 konsantrasyonda agaroz jel hazırlamak için öncelikle 1 g agaroz 100 ml 1XTBE tamponu içinde çözüldü ve mikrodalga fırında kaynatıldı. Jel 60 °C'ye kadar soğutuldu. 2 µl ethidium bromür ilave edildi. Elektroforez kasetine agaroz döküldü ve jel soğuduktan sonra taraklar çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

3.4.4. PCR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

PCR ürünlerinin jeldeki kuyucuklara çöktürmek amacıyla 6X brom fenol mavisi içeren yükleme tamponundan 2µl, PCR ürününden 10µl örnek karıştırılarak jeldeki kuyucuklara yüklendi. Yüklenen örnekler ve 100 bp'lik DNA ladder belirteç 120V, 400mA'de 60 dakika yürütüldü. İşlem sonunda jel görüntüleme sisteminde UV ışığı altında incelendi.

3.4.5. RFLP

Restriksiyon enzimleri kullanılarak DNA molekülünün farklı büyüklükteki fragmentlere ayrılması ve elde edilen DNA parçalarının jel elektroforez tekniği ile görüntülenmesi işlemi RFLP (Restriksiyon Fragment Length Polymorphism/Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi) olarak adlandırılır

Genom dizininde, kodlayıcı olmayan bölgelerde, her 200 nükleotidde 1 dizi farklılığı görülür. Bu farklılıklar ; tek bir nükleotid çiftinde değişiklik, nükleotid çiftinin çıkarılması (delesyon) veya araya sokulması (insersiyon) şeklinde olabilmektedir. Restriksiyon enzimleriyle kesim sonucu oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar “restriksiyon parça uzunluk polimorfizmleri” (Restriction Fragment Length Polymorphism-RFLP) olarak adlandırılır. Restriksiyon enzimleri çift iplikli sarmal DNA'yı çok özgül olarak nükleotid dizilerini tanıyabilen ve DNA'nın her iki ipliğini de belirli bölgelerden kesen enzimlerdir. Kesim sonucunda DNA parçaları oluşmaktadır. DNA'daki ilgili bölgeleri 4-8 baz çifti uzunluğunda parçalar şeklinde keserler.

Restriksiyon Enzim Kesimi

PCR ile çoğaltılan gen bölgesindeki polimorfik bölgeye özel restriksiyon enzimleri kullanılarak restriksiyon enzim kesimi yapıldı.

CYP3A5*3 Polimorfizmi için PCR ürününün SspI enzimi ile kesilmesi

CYP3A5 genin intron 3 (ekson 3B)'de 6986 pozisyonda 6986G / A değişimi SspI enzimi için kesim bölgesi oluşturur.

SspI restriksiyon enzimi için kesim koşulları:

5 µl Buffer O

1 µl SspI restriksiyon enzimi

20 µl PCR ürünü (yaklaşık 1 mikrogram)

dH₂O eklenerek toplam hacim 50 µl hazırlandı.

Enzim kesimi için 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Enzim kesiminden sonra, 293 bp uzunluğundaki PCR ürününün SspI enzimi ile kesilen bantları % 3'lük agaroz jelde görüntülendi. Nükleotid değişimi olmayan (AA) (CYP3A5*1*1) bireylerde 148 bp, 125 bp, 20 bp'lik bantlar oluşturmaktadır. Heterozigot (GA) (CYP3A5*1*3) bireylerde ise, 168 bp, 148 bp, 125 bp'lik bantlar. Her iki alellinde nükleotid değişimi taşıyan (GG) (CYP3A5*3*3) bireylerde 168 bp, 125 bp'lik bantlar oluşturur.

ABCB1 polimorfizmi için PCR ürününün Mbol enzimi ile kesilmesi

Mbol restriksiyon enzimi için kesim koşulları:

5 µl 10X Buffer

1 µl SspI restriksiyon enzimi

20 µl PCR ürünü (yaklaşık 1 mikrogram)

dH₂O eklenerek toplam hacim 50 µl hazırlandı.

Kesim için 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Enzim kesiminden sonra 248 bp uzunluğundaki PCR ürününün Mbol enzimi ile kesilen bant boyları % 3'lük agaroz

jelde tespit edildi. Yabanıl tipte 172 bp, 60 bp ve 16 bp, homozigot mutant 238 bp ve 16 bp' lik bantlar oluşturur.

2C8*3 polimorfizmi için PCR ürününün XmnI enzimi ile kesilmesi

XmnI restriksiyon enzimi için kesim koşulları:

5 µl 10X Buffer

1 µl SspI restriksiyon enzimi

20 µl PCR ürünü (yaklaşık 1 mikrogram)

dH₂O eklenerek toplam hacim 50 µl hazırlandı.

Enzim kesimi için 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Enzim kesiminden sonra, 117 bp uzunluğundaki PCR ürününün XmnI enzimi ile kesilen bant boyları % 3' lük agaroz jelde tespit edildi. CYP2C8*3*3 bireylerde kesim olmayıp 117 bp bantta görülürken, CYP2C8*1*1 25 bp ve 92 bp bantlar görüldü. CYP2C8*1*3 olanlar ise 117 bp, 25 bp ve 92 bp bantları görüldü.

Agaroz Jelin Hazırlanması

% 3 konsantrasyonda agaroz jel hazırlamak için öncelikle 3 g agaroz 100 ml 1XTBE tamponu içinde çözüldü ve mikrodalga fırında kaynatıldı. Jel 60 °C'ye kadar soğutuldu. 2 µl ethidium bromür ilave edildi. Elektroforez kasetine agaroz döküldü ve jel soğuduktan sonra taraklar çıkarılarak elektroforez tankına yerleştirildi.

RFLP Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezinde Görüntülenmesi

Enzim kesimi için 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. Enzim kesiminden sonra kesilen bant boyları %3'lük agaroz jelde tespit edildi. 130 V 400 mA 75 dakika yürütüldü. İşlem sonunda jel UV ışığı altında incelendi.

3.4.6. Genotipleme Sonucunda Hastaların Alel Sınıflarına Göre Gruplandırılması

Çalışmaya genotipleme için 120 hastanın numunesi çalışıldı. CYP3A5 (6986A>G), ABCB1(3435C>T) ve CYP2C8 (A1196G) polimorfizmleri incelendi.

Laboratuvar çalışması tamamlandıktan sonra hastalar 3 ayrı polimorfizm için gruplara ayrıldı. CYP2C8*3 polimorfizm çalışması sonunda (*1*3 ve *3*3) ve *1*1 alel gruplarına, CYP3A5 polimorfizm çalışması sonrasında hastalar *1*3 heterozigot (ekspresör), *3*3 (non-ekspresör) alel gruplarına, ABCB1 polimorfizm çalışması sonunda ise hastalar ABCB1CC, ABCB1CT ve ABCB1TT alel gruplarına ayrıldı.

Genotipleme sonrası takibe devam etmeyip çalışmadan ayrılan ve ilaç değişikliğine giden toplam 15 hasta çalışmadan çıkarıldı. Çalışma toplam 105 hasta ile tamamlandı.

3.5. İmmüsupresif İlaçların Kan Düzeylerinin Saptanması

Böbrek naklinden sonra TAC kan düzeyi için ilk kan örneğinin alınması ilacın konsantrasyonunun kararlı düzeye ulaşmasından (4-5 yarılanma ömrü) sonra olur. Alınan kan örneği bir sonraki dozdan hemen önce alınan (çukur/trough) zaman dilimidir. Co için sabah saatlerinde ilacı almadan hemen önceki zamanda verilen kan örneğinde serum konsantrasyonu tespit edilir. Hastalardan alınan kan ESOGÜ Tıbbi Farmakoloji İlaç Düzeyi ve Uyuşturucu Madde Analiz Laboratuvarında Beckman coulter AU480 marka cihaz ile çalışıldı.

3.6. Hastalara Ait Laboratuvar ve Poliklinik Verileri ve Değerlendirilmesi

3.6.1. Laboratuvar Tetkikleri ve Değerlendirilmesi

Hastaların böbrek naklinden sonraki 3. 6. ve 12. aylardaki TAC kan konsantrasyonu (Co) ve aynı döneme ait kullandığı günlük TAC ilaç dozu kaydedildi. TAC ilaç farmakokinetiğini değerlendirmek için C/D (ng/mL) /mg hesaplandı. Aynı tarihe ait diğer laboratuvar verileri hemoglobin, hematokrit, platelet, albümin, total protein ve böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için serum kreatinin (mg/dl) ve Tahmini Glomerul filtrasyon hızı (eGFR) (mL/min/1.73 m²) ve idrar protein/kreatinin (mg/gr) düzeyleri de kaydedildi.

3.6.2. Hastalara Ait Demografik ve Klinik Veriler

Hastaları son dönem böbrek yetmezliği etyolojisi, nakil sonrası vücut ağırlıkları, immüsupresif tedaviye ek eş zamanlı ilaç kullanımı, eşlik eden enfeksiyon ve hastalıklar kaydedildi. Çalışmaya dahil edilen hastaların nakil sonrasında böbrek biopsisi sorgulandı ve sayısal veri olarak kaydedildi.

3.6.3. Böbrek Fonksiyon Değerlendirilmesi

Nakil olan hastaların böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için nakil sonrası 3, 6 ve 12 aylık kontrol dönemlerinde serum eGFR (mL/min/1.73 m²) düzeyleri The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formülü kullanılarak tespit edildi. Serum kreatinin (mg/dl) ve 12. ay idrar protein/kreatinin (mg/gr) düzeyleri değerlendirildi.

3.7. İstatistiksel Yöntemler

Sürekli nicel değişkenler, ortalama ve standart sapma olarak, Nitel değişkenler ise n, ortanca değer, 25'inci ve 75'inci yüzdeler olarak ifade edilmiştir. Değişkenlere ait normalite testlerinde Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro-Wilk testleri kullanılmıştır. Bağımlı (tekrarlayan) değişkenlerden oluşan ve normal dağılmayan değişkenlere Friedman Repeated Measures Analysis of Variance on Ranks Test ile analiz edilmiştir. Bağımsız değişkenlerden oluşan ve normal dağılım gösteren ikili gruplarına Independent Samples T Test, normal dağılmayan ikili gruplarda Mann whitney U, üç ve üzeri gruplardan Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks Test uygulanmıştır. p<0.05 olasılık değerleri anlamlı kabul edilmiştir. Tüm veri analizleri IBM SPSS Statistics 22 paket programları ile yapılmıştır.

3.8. Etik Kurul Onayı

Çalışma için Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan 19/09/2019 tarihi 80558721/48 sayılı karar ile onay alındı. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu onayı ile bütçe oluşturuldu.

4. BULGULAR

4.1. Genel Özellikler

ESOGÜ Tıp Fakültesi Hastanesi Nefroloji AbD' da böbrek nakli sonrası takip edilen 200 hastanın verileri incelendi. Çalışmaya dahil edilme kriterleri göz önünde bulundurularak toplam 115 hasta bilgilendirilmiş onam formu ile onayları alınarak çalışmaya dahil edildi. Genotipleme sonrası 10 hastanın laboratuvar verilerinde eksiklik olması nedeniyle 105 hasta üzerinden istatistiksel çalışma yapıldı. 50 (%47.7) kadın, 55 (%52.3) erkek olan toplam 105 hastanın yaş ortalaması 41.1 olarak tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen kadınların yaş ortalaması 39.5 erkeklerin ise 42,5 idi. Hastaların nakil sonrası 3. ayda kiloları ortalama 66.1 kg (Erkek: 69.7, Kadın: 62.6) olarak tespit edildi. Nakil sonrası 10 hastaya böbrek fonksiyon bozukluğu nedeniyle böbrek biyopsisi yapılmıştır. Biopsi tarihleri hastaya göre değişmekte olup nakil sonrası aylar ya da yıllar sonrasında gerçekleştiği tespit edilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Hastalara ait demografik özellikler.

DEĞİŞKENLER	NAKİLHASTALARI (N:105)
Yaş (yıl)	41,12 (K:39,5/ E: 42,5)
Cinsiyet (K/E)	50/55
Kilo (kg)	66.1 (E: 69.7/K:62.6)
Primer hastalık tanısı	
Kronik glomerulonefrit	10
Nefrolityazis	15
Vezikouretral reflü	2
Diyabetik nefropati	67
Hipertansif böbrek hastalığı	10

Tablo 4.1 ‘Devam’ Hastalara ait demografik özellikler.

SLE, FMF, Amiloidoz	12
Polikistik böbrek	3
Atropik böbrek	2
Diğer	5
Nakil sonrası biopsi olan hasta sayısı	10
<i>CYP2C8*3*3</i>	4
<i>CYP2C8*1*1</i>	6
<i>ABCB1 CT</i>	4
<i>ABCB1 TT</i>	3
<i>ABCB1 CC</i>	3
<i>CYP3A5*3*3</i>	10

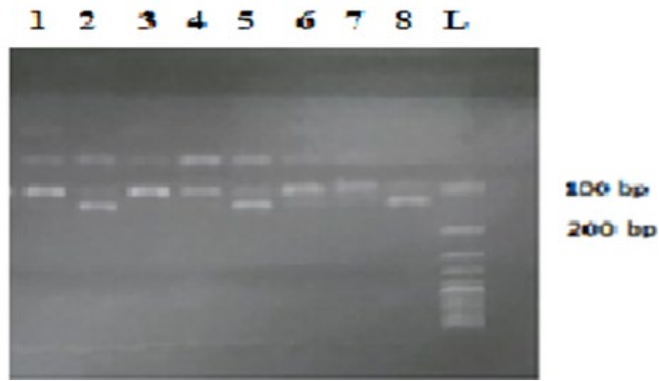
4.2. Hasta Gruplarının CYP3A5 (6986A>G), CYP2C8 (A1196G), ABCB1 (3435C>T) Gen Polimorfizmlerinin Genotip ve Alel Sıklığı.

115 hastanın gen polimorfizminin genotip ve alel sıklığı değerlendirilmiştir. CYP3A5 (6986A>G) için; 9 hasta heterozigot CYP3A5*1*3 (ekspresör) genotipi, 106 hastada heterozigot CYP3A5*3*3 (ekspresör olmayan) genotipi saptanmıştır. Homozigot CYP3A5*1*1 genotipi ise saptanmamıştır. CYP2C8*3 (A1196G) için; 18 hastada CYP2C8*1*3 ve CYP2C8*3*3 genotipi, 97 hastada ise CYP2C8*1*1 genotipi tespit edilmiştir. ABCB1 (3435C>T) için; 25 hastada ABCB1 CC genotipi, 64 hastada ABCB1 CT, 26 hastada ise ABCB1 TT genotipi tespit edilmiştir.

10 hastanın dosya verilerindeki eksiklik nedeniyle çalışmaya dahil edilmemiştir. 105 hasta alellerine göre gruplandırılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir (Tablo 4.2).

Tablo 4.2. Genotipleme sonucunda CYP3A5 (6986A>G), CYP2C8*3 (A1196G) ve ABCB1 3435C>T alel sıklıkları

	CYP2C8		CYP3A5		ABCB1		
	*1/*3+*3/*3	*1/*1	*1/*3	*3/*3	3435CC	3435CT	3435TT
Hasta sayısı(N)	18	87	5	100	26	54	25

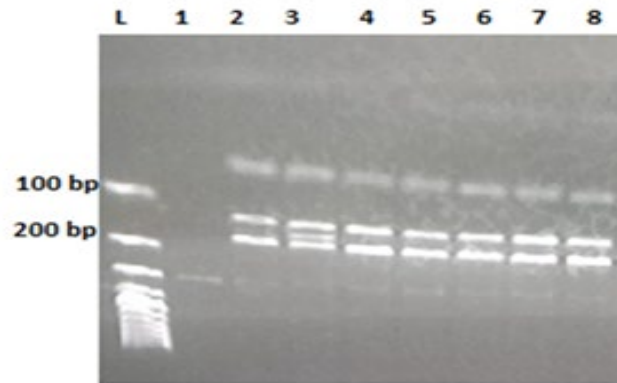


L: ladder, 2,5,8: CYP2C8(*3*3+*1*3)

1,3,4,6,7: CYP2C8*1*1

Şekil.4.1. CYP2C8 (A1196G) genotip analizi

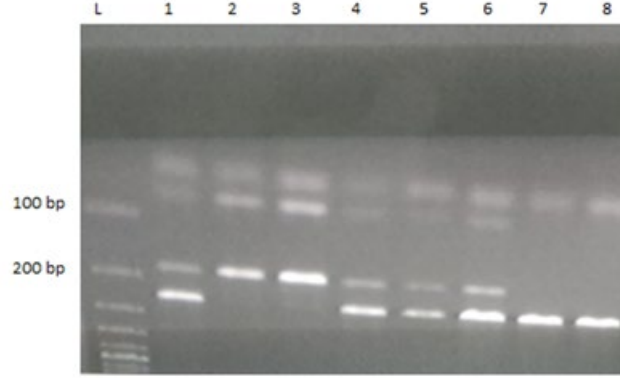
CYP2C8*3 (A1196G) allellerinin XmnI analizi sonucunda homozigot * 1 yabancı tip, heterozigot * 1 / * 3 ve homozigot * 3 varyant tip olarak tanımlandı.



L: ladder 2,4,5,6,7,8: CYP3A5*3*3, 3: CYP3A5*1*3

Şekil 4.2. CYP3A5 genotip analizi.

CYP3A5 6986A> G allellerinin SspI analizi sonucunda homozigot * 1 yabancı tip (G / G), heterozigot * 1 / * 3 (G / A) ve homozigot * 3 (A / A) varyant tipi olarak tanımlandı.



Şekil 4.3. ABCB1 RFLP sonrası UV ışık altında görüntüsü

L: Ladder, 1,4,5,6: (CT) 2,3,: (CC) 7,8: (TT)

MDR1 3435 C> T polimorfizminin MboI analizi sonucunda, CC (yabancı tip), CT (heterozigotlar) ve TT (homozigot varyantı) olarak tanımlandı.

4.3. CYP2C8*3 (A1196G) Polimorfizmi İçin Bulgular

Hastaların günlük TAC dozu (mg/kg/gün) değerlendirildiğinde; CYP2C8 (*1*3+*3*3) grubunun 3. , 6. ve 12. aylarda günlük dozların ortanca değerleri sırasıyla 0.07 (0.04-0.11), 0.05(0.03-0.07), 0.05(0.03-0.06) mg/kg/gün, CYP2C8*1*1 grubunun ise 0.08 (0.05-0.11), 0.06 (0.04-0.08), 0.05 (0.03-0.06) mg/kg/gün olarak tespit edilmiştir. (*1*3+*3*3) ve *1*1 grupları arasında günlük ilaç dozu açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 4.3).

Hastaların TAC kan konsantrasyonları (ng/mL) değerlendirildiğinde; CYP2C8*3*3 grubunun TAC kan konsantrasyonunun ortanca değeri 3. ay, 6. ay ve 12. aylarda sırasıyla 9.76 (6.88-11.65), 7.97 (6.90-9.33), 7.17 (6.30-7.88) ng/ml, CYP2C3(8)*1*1 grubunun ise 3., 6. ve 12. aylarda sırasıyla 10.2 (7.9-12.7), 9.2 (7.5-10.7), 7.6 (6.0-9.0) ng/ml olarak tespit edilmiştir. İki grup arasında ilaç konsantrasyonları açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır (Tablo 4.3).

Hastaların TAC konsantrasyon doz oranı C/D (ng/mL)/mg değerlendirildiğinde; CYP2C8*3*3 grubunun doz konsantrasyon oranı (C/D), 3., 6.

ve 12. aylarda sırasıyla 1.95 (1.35-2.86), 2.90 (1.81-4.24), 2.83 (1.88-3.46), olarak tespit edilmiştir. CYP2C8*1*1 grubunun ise ortanca C/D değerleri 3., 6. ve 12. aylarda sırasıyla 2.33 (1.60-2.67), 2.80 (1.83-3.00), 2.90 (1.73-3.03) olup olarak tespit edilmiştir. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 4. 3).

Hastaların kreatinin değerleri (mg/ml) değerlendirildiğinde; CYP2C8*3*3 grubunun ortanca kreatinin değerleri 3., 6. ve 12. aylarda sırasıyla 1.26 (1.01-1.77), 1.32 (0.95-1.85), 1.58 (0.97-2.09) mg/ml, CYP2C8*1*1 grubunun ise sırasıyla 1.20 (0.93-1.50), 1.20 (0.91-1.39), 1.20 (0.97-1.39) mg/ml olarak tespit edilmiştir. 12. ayda CYP2C8 (*1*3+*3*3) grubunun kreatinin değerinin CYP2C8*1*1 grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilmiştir (p: 0,021*) (Tablo 4.3).

Hastaların GFR değerleri (mL/min/1.73m²) değerlendirildiğinde; CYP2C8 (*3*3+*1*3) grubunun 3., 6. ve 12. aylarda ortanca GFR değerleri sırasıyla 60.5 (42.05-80.25), 66 (36.80-85.25), 61 (39.08-86.75) mL/min/1.73m² olarak, tespit edilmiştir. CYP2C8*1*1 grubunun ise bu değerler sırasıyla 66 (51.00-86.00), 70 (55.60-87.60), 68.05 (56.00-85.00) mL/min/1.73m² olarak tespit edilmiştir. İki grubun eGFR değerleri arasında fark bulunup ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (Tablo 4.3).

12. ayda hasta gruplarının idrar protein/ kreatinin değerleri ortanca değeri CYP2C8(*3*3+*1*3) grubunun 221 (134-493) mg/gr ve CYP2C8*1*1 grubunun ise 168 (103-305) mg/gr olarak tespit edilmiştir. CYP2C8*3*3 alel grubunun 12. ayda ortanca protein/kreatinin değeri CYP2C8*1*1 grubuna kıyasla yüksek bulunmuş ancak istatistik olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir (Tablo 4.3).

Hastaların 3. ay ile 12. aylar arasındaki kreatinin farkları hesaplandı ve farkların ortanca değerleri CYP3C8*1*3 grubunda 0.07 (-0.09-0.69), CYP2C8*1*1 grubunda ise -0.07 (-0.20-0.10) olarak tespit edildi. CYP3C8 (*3*3 +*1*3) gruplarının zamanla kreatinin değerlerindeki yükselme CYP2C8*1*1 grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı olarak tespit edilmiştir (p:0.036*) (Tablo 3) (şekil 4).

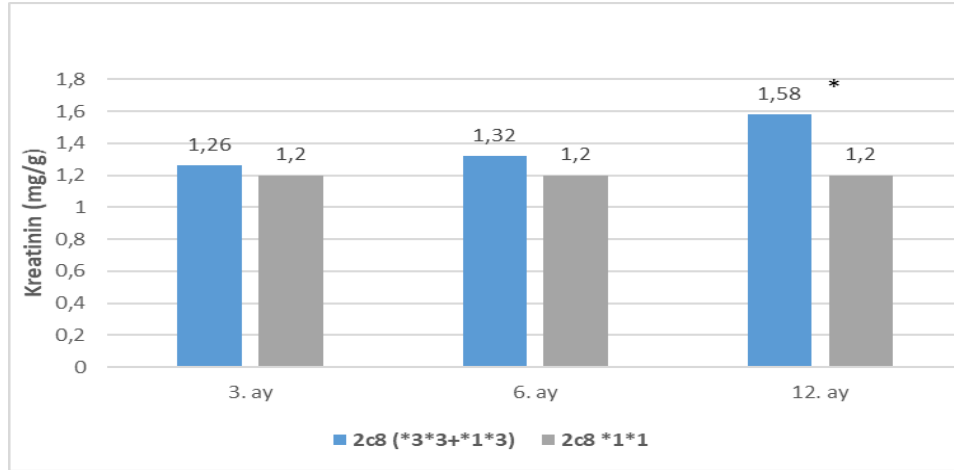
3. ay ile 12. aylar arasındaki GFR değişimleri (Δ GFR) hesaplandı ve farkların ortanca değerleri CYP3C8*1*3 grubunda -1.50 (-15.93-14.75) CYP2C8*1*1 grubunda ise 3.90 (-5.00-13.00) bulundu. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir (Tablo 4.3 Şekil 4.5).

Tablo 4.3. CYP2C8 (A1196G) alel gruplarının laboratuvar verileri.

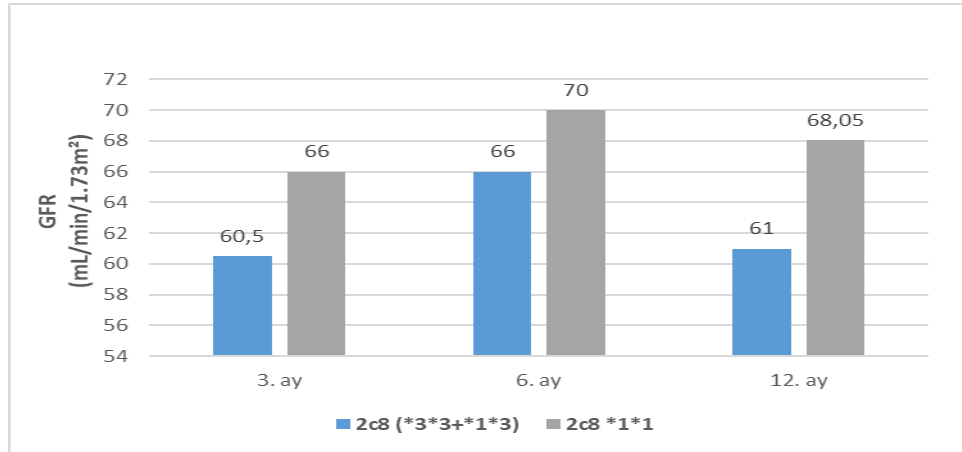
Grup	*1*3+*3*3 N: 18 Median (%25-%75)	*1*1 N:87 Median (%25-%75)	P
Doz (mg/kg)			
3. ay	0.07 (0.04-0.11)	0.08 (0.05-0.11)	0.929
6. ay	0.05 (0.03-0.07)	0.06 (0.04-0.08)	0.258
12. ay	0.05 (0.03-0.06)	0.05 (0.03-0.06)	0.795
Konsantrasyon (ng/mL)			
3. ay	9.76 (6.88-11.65)	10.2 (7.9-12.7)	0.429
6. ay	7.97 (6.90-9.33)	9.2 (7.5-10.7)	0.082
12. ay	7.17 (6.30-7.88)	7.6 (6.0-9.0)	0.395
C/D (ng/mL) /mg)			
3. ay	1.95 (1.35-2.86)	2.33 (1.60-2.67)	0.223
6. ay	2.90 (1.81-4.24)	2.80 (1.83-3.00)	0.329
12. ay	2.83 (1.88-3.46)	2.90 (1.73-3.03)	0.705
Kreatinin (mg/dL)			
3. ay	1.26 (1.01-1.77)	1.20(0.93-1.50)	0.515
6. ay	1.32 (0.95-1.85)	1.20(0.91-1.39)	0.230
12. ay	1.58 (0.97-2.09)	1.20(0.97-1.39)	0.021*
eGFR (mL/min/1.73 m2)			
3. ay	60.50(42.05-80.25)	66.00 (51.00-86.00)	0.358

Tablo 4.3 ‘Devam’ CYP2C8 (A1196G) alel gruplarının laboratuvar verileri.

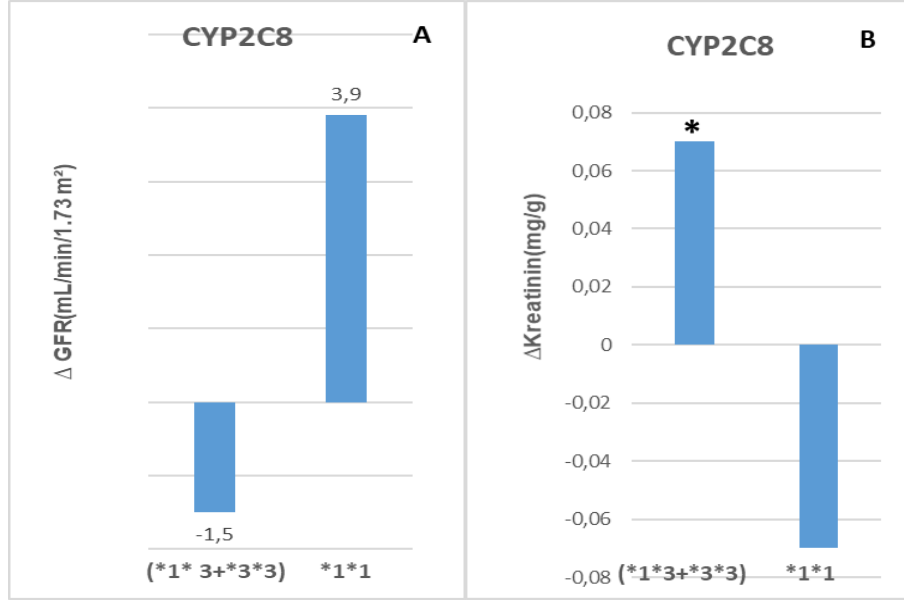
6. ay	66.00(36.80-85.25)	70.00 (55.60-87.60)	0.269
12. ay	61.00(39.08-86.75)	68.05 (56.00-85.00)	0.180
Protein/kreatinin(mg/g)	221 (134-493)	168 (103-305)	0.145
Δ kreatinin (3. ve 12. ay)	0.07 (-0.09-0.69)	-0.07 (-0.20-0.10)	0.036*
Δ eGFR (3. ve 12. ay)	-1.50 (-15.93-14.75)	3.90 (-5.00-13.00)	0.439
Hct (%)			
3. ay	36.75(32.75-40.53)	38.63 (36.00-41.00)	0.073
6. ay	38.36(35.50-42.25)	40.51 (37.00-44.00)	0.147
12. ay	39.48(36.35-42.00)	40.05 (37.00-43.00)	0.301
Platelet (\times *1,000/ μ L)			
3. ay	219 (157-267)	256 (199-277)	0.124
6. ay	203 (169-242)	252 (206-273)	0.008*
12. ay	213 (173-271)	261 (212-295)	0.032*
Albumin (g/dL)			
3. ay	4.30(4.00-4.53)	4.38 (4.30-4.50)	0.131
6. ay	4.36(4.08-4.60)	4.51 (4.40-4.60)	0.086
12. ay	4.10(4.10-4.33)	4.44 (4.10-4.60)	0.029*



Şekil 4.4. CYP2C8 alel gruplarının aylara göre ortalama kreatinin değerleri (*: $p < 0,05$).



Şekil 4.5. CYP2C8 alel gruplarının aylara göre ortalama GFR değerleri.



Şekil 4.6. CYP2C8 (*1*1) ve CYP2C8 (*1*3+*3*3) gruplarının 1 yıllık (A): kreatinin ve (B): GFR değerlerindeki değişimlerinin kıyaslanması.

4.4. CYP3A5 (6986A>G) Polimorfizmi İçin Bulgular

105 hasta CYP3A5 polimorfizmi için yapılan genotipleme sonucunda 5 hasta *1*3 ekspresör, 100 hastada ise *3*3 nonekspresör genotipi tespit edildi. Ekspresör grup hasta sayısı yetersiz olduğu için nonparametrik test istatistik yöntem olarak uygulandı.

Hastaların günlük TAC dozu (mg/kg/gün) değerlendirildiğinde; CYP3A5*1*3 allel grubunda günlük ilaç dozu 3., 6. ve 12. aylarda sırasıyla 0.22 (0.15-0.25), 0.13 (0.12-0.19), 0.11 (0.08-0.13) mg/kg, CYP3A5*3*3 grubunda ise sırasıyla 0.07 (0.05-0.10), 0.06 (0.04-0.07), 0.05 (0.03-0.06) mg/kg olarak tespit edilmiştir. Günlük TAC dozu açısından değerlendirildiğinde iki grup arasında tüm aylarda istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu gözlenmiştir (p: <0.001*) (Tablo 4.4).

Hastaların TAC kan konsantrasyonları (ng/mL) değerlendirildiğinde; CYP3A5*1*3 grubunun TAC kan konsantrasyonları 3. , 6. ve 12. aylarda sırasıyla 8.90 (6.40 -10.0), 8.00 (7.70 - 8.70), 7.83 (7.30 - 7.90) ng/ml, CYP3A5*3*3 grubunun ise sırasıyla 10.3 (7.98-12.5), 8.90 (7.23-10.1), 7.45 (6.00-8.35) ng/ml olarak tespit edilmiştir. İki grubun ilaç kan konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir (p>0.05).

Hastaların TAC konsantrasyon doz oranı C/D (ng/mL)/mg değerlendirildiğinde; İlaç doz konsantrasyon oranı (C/D) CYP3A5*1*3 grubunda 3., 6. ve 12. aylarda sırasıyla 0.640 (0.450-0.880), 1.09 (0.890 - 1.10), 1.18 (1.18 - 1.21) (ng/mL) /mg, *3*3 grubunda ise sırasıyla 2.30 (1.62 - 2.83), 2.80 (1.91 - 3.34), 2.99 (1.97 - 3.13) (ng/mL) /mg olarak tespit edilmiştir. İki grup arasında konsantrasyon doz oranı (C/D) değerleri açısından tüm aylarda istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p \leq 0.01$).

Hastaların kreatinin değerleri (mg/ml) değerlendirildiğinde; *1*3 grubunun 3., 6. ve 12. aylarda ortalama kreatinin değerleri sırasıyla 1.03 (0.94-2.05), 1.00 (0.94-1.36), 0.93 (0.73-1.26), *3*3 grubunun ise sırasıyla 1.20 (0.95-1.50), 1.20 (0.93-1.53), 1.20 (0.97-1.40) olarak tespit edilmiştir. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$).

Hastaların GFR (mL/min/1.73m²) değerleri değerlendirildiğinde; CYP3A5*1*3 grubunun 3., 6. ve 12. aylarda ortalama GFR değerleri sırasıyla 72,00 (46.50-89.50), 76.00 (56.00-89.00), 100.00 (60.00-109.00), CYP3A5*3*3 grubun ise sırasıyla 65.50 (51.20-84.75), 68.50 (53.00-85.75), 65.47 (52.00-84.75) olarak bulunmuş olup iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir .

Nakil sonrası 12. ayda CYP3A5*1*3 grubunun ortalama idrar protein/kreatinin değeri 105.00 (85.00-279.00), CYP3A5*3*3 grubunun ise 180.50 (107.25-309.00) olarak bulunmuştur. İki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4.4).

Hastaların 3. ay ile 12. aylar arasındaki kreatinin farkları hesaplandı ve farkların ortalama değerleri *1*3 grubunun -0,22 (-0,91-0,04), *3*3 grubunun ise 0.01 (-0,20-0,16) olarak bulunmuştur. İki grup arasında kreatininin zamansal değişimleri açısından fark tespit edilememiştir. 3. ve 12. aylar arasında GFR farkları (Δ GFR) hesaplandı ve farkların ortalama değeri CYP3A5*1*3 grubunun 28.00 (4.00-29.00), *3*3 grubunun ise 1.74 (-7.00-11.75) olarak hesaplandı ve gruplar arasında zamanla GFR değerlerindeki değişim açısından istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu tespit edilmiştir ($p: 0,045^*$) (Tablo 4.4 şekil 4.11).

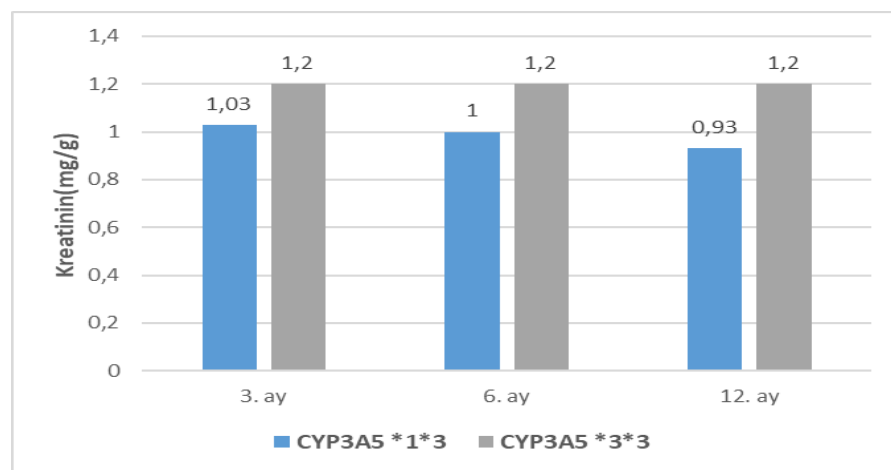
Tablo 4.4. CYP3A5 alel gruplarının laboratuvar verileri.

Grup	*1*3 N:5 Median (%25-%75)	*3*3 N:100 Median (%25-%75)	P
Doz (mg/kg)			
3. ay	0.22(0.15-0.25)	0.07(0.05-0.10)	<0.001***
6. ay	0.13(0.12-0.19)	0.06(0.04-0.07)	<0.001***
12. ay	0.11(0.08-0.13)	0.05(0.03-0.06)	<0.001***
Konsantrasyon (ng/mL)			
3. ay	8.90 (6.40 - 10.0)	10.3 (7.98 - 12.5)	0.175
6. ay	8.00 (7.70 - 8.70)	8.90 (7.23 - 10.1)	0.988
12. ay	7.83 (7.30 - 7.90)	7.45 (6.00 - 8.35)	0.493
C/D (ng/mL) /mg)			
3. ay	0.640 (0.450-0.880)	2.30 (1.62 - 2.83)	<0.001***
6. ay	1.09 (0.890 - 1.10)	2.80 (1.91 - 3.34)	0.0013**
12. ay	1.18 (1.18 - 1.21)	2.99 (1.97 - 3.13)	0.0036**
Kreatinin (mg/dL)			
3. ay	1.03(0.94-2.05)	1.20(0.95-1.50)	0.769
6. ay	1.00(0.94-1.36)	1.20(0.93-1.53)	0.498
12. ay	0.93(0.73-1.26)	1.20(0.97-1.40)	0.136
GFR(mL/min/1.73 m ²)			
3. ay	72.00(46.50-89.50)	65.50(51.20-84.75)	0.663
6. ay	76.00(56.00-89.00)	68.50(53.00-85.75)	0.701
12. ay	100.00(60.00-109.00)	65.47(52.00-84.75)	0.142
Protein/kreatinin(mg/gr)	105.00(85.00-279.00)	180.50(107.25-309.00)	0.296

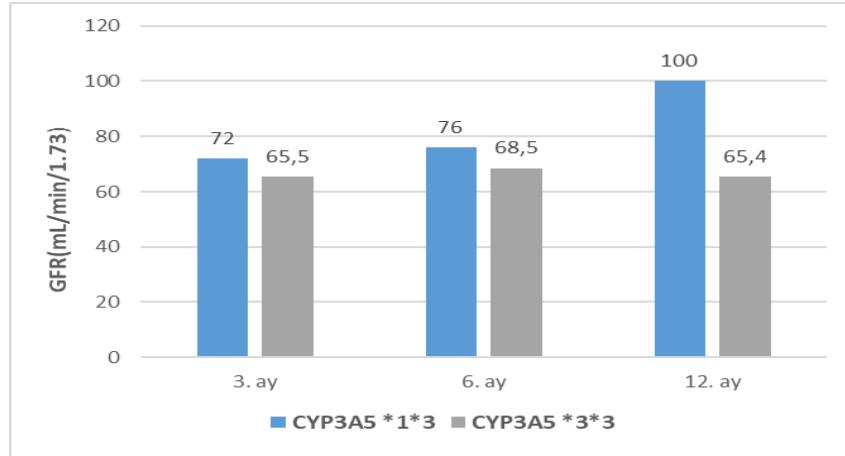
Tablo 4.4 ‘Devam’ CYP3A5 alel gruplarının laboratuvar verileri.

Δ kreatinin (3. ve 12. ay)	-0.22 (-0.91-0.04)	0.01 (-0.20-0.16)	0.073
Δ GFR (3. ve 12. ay)	28.00 (4.00-29.00)	1.74 (-7.00-11.75)	0.045*
Hct (%)			
3. ay	35.0 (34.0 - 39.3)	38.4 (36.0 - 41.0)	0.428
6. ay	38.0 (37.7 - 39.0)	42.0 (37.1 - 47.3)	0.185
12. ay	38.0 (35.0 - 38.5)	42.0 (37.2 - 43.1)	0.222
Platelet (x*1,000/μL)			
3. ay	408 (402 - 452)	245 (195 - 261)	<0.001***
6. ay	313 (255 - 440)	240 (200 - 262)	0.104
12. ay	384 (288 - 442)	249 (206 - 277)	0.0615
Albumin (g/dL)			
3. ay	4.40 (4.00 - 4.50)	4.36 (4.20 - 4.50)	0.92
6. ay	4.03 (4.00 - 4.03)	4.51 (4.40 - 4.60)	0.0314*
12. ay	4.00(4.00-4.00)	4.41 (4.28 - 4.60)	0.0033**

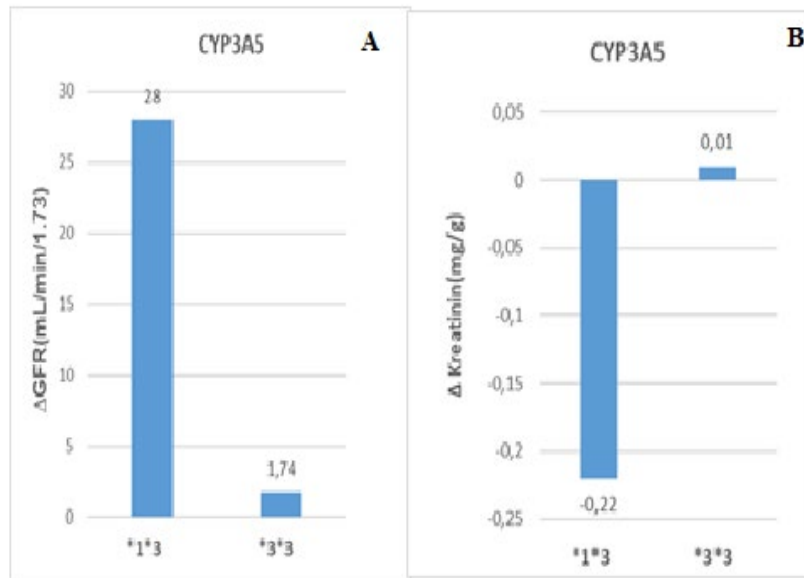
*: p<0.05, **: p<0.01,***p<0.001



Şekil 4.7. CYP3A5 alel gruplarının aylara göre ortanca kreatinin değerleri.



Şekil 4.8. CYP3A5 alel gruplarının aylara göre ortanca GFR değerleri.



Şekil 4.9. CYP3A5 (*1*3) ve CYP3A5*3*3 alel gruplarının 1 yıllık

(A): GFR ve (B): kreatinin değerlerindeki değişimlerinin (Δ) kıyaslanması.

4.5. ABCB1 (3435C>T) Polimorfizmi İçin Bulgular

Hastaların günlük TAC dozu (mg/kg/gün) değerlendirildiğinde; CC alel grubunda günlük ilaç dozu 3., 6. ve 12. aylarda sırasıyla 0,09 (0.05-0.13), 0.06 (0.04-0.07), 0.05 (0.04-0.06) mg/kg ,CT grubunda sırasıyla 0.07 (0.05-0.11), 0.06 (0.04-0.08), 0.05 (0.03-0.07) mg/kg TT grubunda ise sırasıyla 0,07 (0.05-0,10), 0.05 (0,04-0,07), 0.04 (0,03-0,05) olarak bulunmuştur. Gruplar arasında günlük TAC dozu bakımından anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Hastaların TAC kan konsantrasyonları (ng/mL) değerlendirildiğinde; CC grubunun TAC kan konsantrasyonu ortanca değerleri 3. , 6. ve 12. aylarda sırasıyla 10.2 (7.93 - 12.6), 8.35 (7.60 - 9.58), 7.30 (6.33 - 8.01), CT grubunun 9.83 (7.50 - 11.8), 9.10 (7.55 -10.0), 7.80 (6.10 -8.83), TT grubunun ise 10.0 (8.50 - 12.4), 9.30 (6.80 - 11.0), 7.10 (6.00 - 8.50) olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında ilaç kan konsantrasyonları açısından anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Hastaların TAC konsantrasyon doz oranı C/D (ng/mL)/mg değerlendirildiğinde; CC grubunda 3. , 6. ve 12. aylarda sırasıyla 1.90 (1.35 - 2.52), 2.68 (2.02 - 2.98), 2.36 (2.29 - 2.67) (ng/mL) /mg , CT grubunun 2.34 (1.51 -2.67), 2.90 (1.59 -3.33), 2.98 (1.65 -3.08) (ng/mL) /mg TT grubunda ise 2.27 (1.78 - 2.82), 2.70 (2.11 - 3.00), 3.20 (1.90 - 3.40) olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p>0.05$).

Hastaların kreatinin değerleri (mg/ml) değerlendirildiğinde; CC grubunun 3., 6. ve 12. aylarda ortanca kreatinin değerleri sırasıyla 1.21 (0.99-1,60), 1.24 (0.90-1.52), 1.26 (0.98-1.82), CT grubunun 1.10 (0.90-1.52), 1.10 (0.89-1.41), 1.17 (0.92-1.34) mg/g, TT grubunun ise 1.35 (0,94-1,52), 1.24 (1.00-1.46), 1.25 (0,99-1,53) olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir($p>0.05$) (Tablo 4.5; Şekil 4.13).

Hastaların GFR değerleri (mL/min/1.73m²) değerlendirildiğinde; CC grubunun 3., 6. ve 12. aylarda ortanca GFR değerleri sırasıyla 64.00 (44.35-81.25), 67.40 (43.75-85.00), 63.75 (43.00-85.75), CT grubunun 74.80 (51.95-86.25), 74.50 (53.75-88.25), 67.43 (54.50-90.00), TT grubunun ise 63.00 (50.50-78.00), 67.00 (52.80-86.50), 67.00 (56.00-76.00) olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Şekil 4.12).

Nakil sonrası 12. ayda CC grubunun ortalama idrar protein/kreatinin değeri 165,5 (106,5-426,2), CT grubunun 187,5 (106,5-312,7), TT grubunun ise 190 (102,5-317) olarak tespit edilmiştir. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir (Tablo 4.5).

Hastaların 3. ile 12. aylar arasındaki kreatinin farkları hesaplandı ve farkların ortanca değerleri CC grubunda -0,05 (-0,13-0,14), CT grubunun -0,06 (-0,22-0,17),

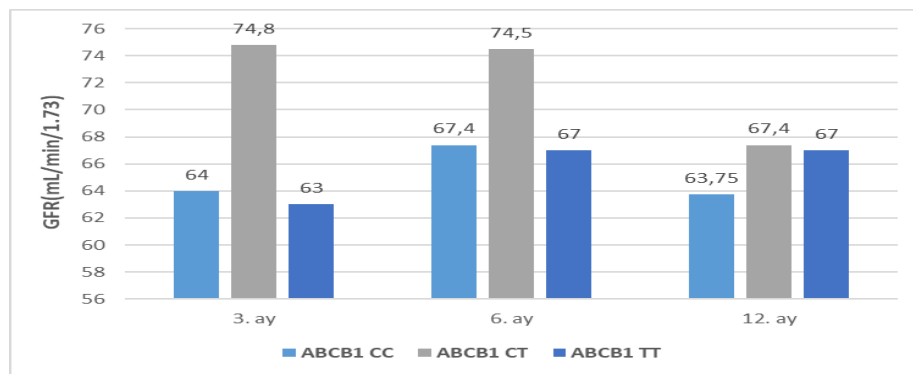
TT grubunun ise 0,05 (-0,14-0,13) olarak bulunmuştur. Gruplar arasında kreatinin zamansal değişimleri açısından fark tespit edilememiştir. 3. ve 12. aylar arasında GFR değişimleri (Δ GFR) hesaplanmış ve farkların ortanca değerleri CC grubunda 2,50 (-6,00-8,25), CT grubunda 3,88 (-9,50-14,00), TT grubunda ise 0,20 (-4,00-20,00) olarak tespit edilmiş. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). (Tablo 4.5; Şekil 4.14-15).

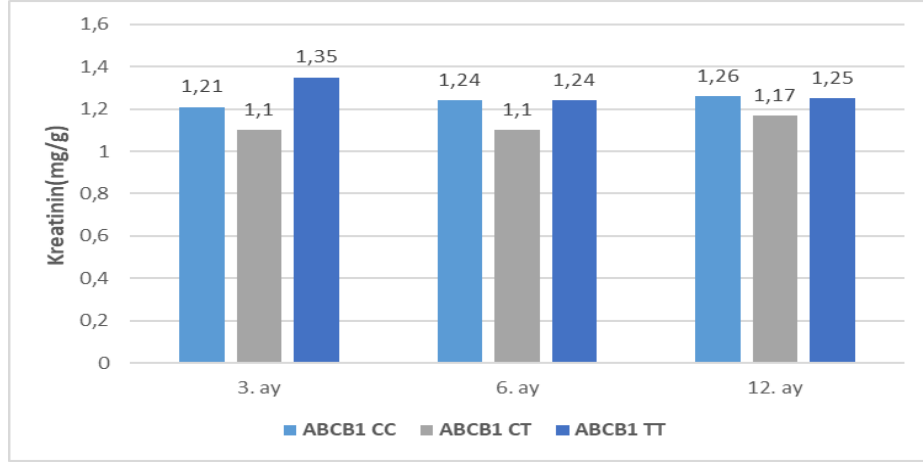
Tablo 4.5. ABCB1 alel gruplarının laboratuvar verileri.

ABCB1	CC N:26	CT N:54	TT N:25	P
Doz (mg/kg)				
3. ay	0.09(0.05-0.13)	0.07(0.05-0.11)	0.07(0.05-0.10)	0.348
6. ay	0.06 (0.04-0.07)	0.06(0.04-0.08)	0.05(0.04-0.07)	0.373
12. ay	0.05 (.04-0.06)	0.05(0.03-0.07)	0.04(0.03-0.05)	0.202
Konsantrasyon (ng/ml)				
3. ay	10.2 (7.93 - 12.6)	9.83 (7.50 -11.8)	10.0(8.50 - 12.4)	0.674
6. ay	8.35 (7.60 - 9.58)	9.10 (7.55 -10.0)	9.30(6.80 - 11.0)	0.965
12. ay	7.30 (6.33 - 8.01)	7.80 (6.10 -8.83)	7.10(6.00 - 8.50)	0.72
C/D (ng/mL) /mg				
3. ay	1.90(1.35-2.52)	2.34 (1.51 -2.67)	2.27(1.78 - 2.82)	0.267
6. ay	2.68(2.02-2.98)	2.90 (1.59 -3.33)	2.70(2.11 - 3.00)	0.808
12. ay	2.36 (2.29 -2.67)	2.98 (1.65 -3.08)	3.20(1.90 - 3.40)	0.0741
Kreatinin (mg/dL)				
3. ay	1.21(0.99-1.60)	1.10(0.90-1.52)	1.35(0.94-1.52)	0.466
6. ay	1.24(0.90-1.52)	1.10(0.89-1.41)	1.24(1.00-1.46)	0.570
12. ay	1.26(0.98-1.82)	1.17(0.92-1.34)	1.25(0.99-1.53)	0.238
Gfr(mL/min/1.73 m2)				

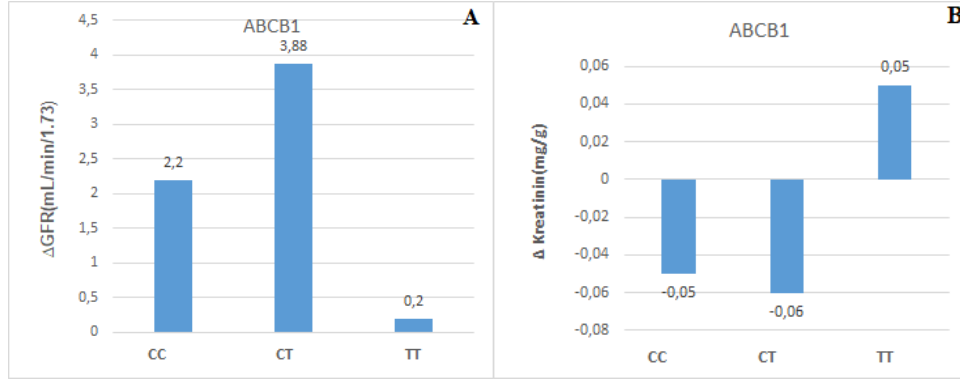
Tablo 4.5 ‘‘Devam’’ ABCB1 alel gruplarının laboratuvar verileri.

3. ay	64.00(44.35-81.25)	74.80(51.9-86.2)	63.00(50.5-78)	0.276
6. ay	67.4(43.7-85)	74.5(53.7-88.2)	67.00(52.8-86.5)	0.490
12. ay	63.75(43 -85.7)	67.43(54.5-90)	67.00(56-76)	0.571
Protein/kreatinin	165.5(106.5-426.2)	187.5(106.5-312)	190 (102.5-317)	0.994
Δ kreatinin(3-12 ay)	-0.05 (-0.13-0.14)	-0.06(-0.22-0.17)	0.05(-0.14-0.13)	0.608
Δ eGFR farkı (3-12)	2.50 (-6.00-8.25)	3.88(-9.50 14)	0.20(-4-20)	0.908
Hct (%)				
3. ay	39.3(36.3-42.5)	37.7(35.9-39.2)	38.3(36.0 - 41.0)	0.234
6. ay	39.8(37.2-43.0)	40.4(37.7-43)	40.0(35.0 - 44.0)	0.586
12. ay	38.5 (36.2 - 41.0)	42.0 (38 - 46.9)	41.8(39.0 - 44.8)	0.0152*
Platelet (x*1,000/μL)				
3. ay	247 (201 - 273)	257 (193 - 273)	256 (222 - 265)	0.874
6. ay	242 (201 - 281)	239 (201 - 255)	253 (212 - 300)	0.415
12. ay	263 (217 - 306)	246 (194 - 274)	264 (210 - 274)	0.249
Albumin (g/dL)				
3. ay	4.40(4.33-4.58)	4.33(4.03 - 4.50)	4.37(4.37 - 4.40)	0.1
6. ay	4.52(4.33 - 4.6)	4.51(4.40 - 4.58)	4.43(4.43 - 4.50)	0.276
12. ay	4.40 (4.08 - 4.4)	4.29 (4.03 -4.50)	4.50(4.38 - 4.78)	0.0291

**Şekil 4.10.** ABCB1 alel gruplarının (CC, CT,TT) aylara göre ortanca GFR değerleri.



Şekil 4.11. ABCB1 alel gruplarının (CC, CT ve TT) aylara göre ortalama kreatinin değerleri.



Şekil 4.12. ABCB1 (CC), (CT) ve (TT) alel gruplarının 1 yıllık (A): GFR ve (B): kreatinin değerlerindeki değişimlerinin (Δ) kıyaslanması.

4.6. Hastaların Böbrek Fonksiyonu ile Takrolimus Doz-Konsantrasyon İlişkisinin Değerlendirilmesi

Çalışmaya dahil edilen 105 hastanın serum kreatinin ve GFR değerleri ile TAC dozu ve konsantrasyonu ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Hastalar böbrek fonksiyonu sınıflandırılması için GFR değeri $60 <$ ve ≥ 60 (mL/min/1.73 m²) olarak iki gruba ayrılmıştır. Nakil sonrası 12. ayda 34 hastanın GFR değeri <60 (mL/min/1.73 m²), 71 hastanın ise ≥ 60 (mL/min/1.73 m²) olarak tespit edilmiştir. GFR ≥ 60 (mL/min/1.73 m²) olan grubun doz konsantrasyon (C/D) oranı 2,90 (1,95-3,20), GFR <60 (mL/min/1.73 m²) olan grubun ise 2,80 (1,53-3,01) olarak bulunmuştur. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$) (tablo 4.6).

Tablo 4.6. GFR C/D (konsantrasyon/doz) oranlarının karşılaştırılması.

	GFR <60 (N: 34)	GFR ≥60 (N:71)	P
C/D (ng/mL) /mg)	2.80 (1.53-3.01)	2.90 (1.95-3.20)	0.328

4.7. Hastaların Nakil Sonrası 1 Yıllık Süreçte GFR Aralıklarına Göre Sınıflandırılması

Çalışmaya dahil edilen hastalar nakil sonrası 3 ve 12 aylık zaman dönemindeki kronik böbrek hasarı evrelemesine göre GFR aralıkları seçilerek gruplandırıldı. EGFR değeri 0-29 (mL/min/1.73 m²), 30-59 (mL/min/1.73 m²), 60-90 (mL/min/1.73 m²), ≥90(mL/min/1.73 m²) aralıklarına göre alel gruplarının sayıları tespit edildi. CYP2C8*1*3 grubunun 3. ayda 1 hasta 0-30 aralığında, 8 hasta 30-59 aralığında, 8 hasta 60-89 aralığında ve 1 hastanın GFR değeri ise ≥90 olarak tespit edildi. Aynı grubun 12. ayda 3 hastanın GFR değeri 0-29 aralığında, 5'i 30-59 aralığında, 7 'si 60-89 aralığında ve 3'ünün GFR ise ≥90 olarak tespit edildi.

CYP2C8*1*1 grubunun ise 3. ayda GFR değerlerine göre 4 hasta 0-29 aralığında, 27'si 30-59 aralığında, 39' u 60-89 aralığında ve 17'sinin GFR değeri ≥90 olarak tespit edilmiştir.

12. ayda aynı grupta 26'sının GFR değeri 30-59 aralığında, 42'sinin 60-89 aralığında ve 19 hastanın GFR değeri ise ≥90 olduğu tespit edilmiştir. İki grupta GFR grupları açısından zamana karşı anlamlı bir değişiklik tespit edilmemiştir (p>0.05) .

CYP3A5*1*3 alel grubunda 3. ayda 1 hasta 0-29 aralığında 3 hasta 60-89, 1 hastanın GFR değeri ise ≥90 olduğu tespit edilmiştir. 12. ayda 1 hasta 30-59 aralığında 1 'i 60-89, 3 hastanın GFR değeri ise ≥90 olacak şekilde arttığı tespit edilmiştir.

CYP3A5*3*3 grubunda 3. ay 5 hastanın GFR değeri 5, 34'ü 30-60 aralığında, 44'ü 60-89 aralığında ve 17 hastanın GFR değeri ise ≥90 bulunmuştur. 12. ayda ise 4 hasta 0-29 arasında 29'u 30-59 aralığında, 48'i 60-89 aralığında ve 1 hastanın GFR değeri ≥90 olarak tespit edilmiştir.

ABCB1 CC grubunda 3. ayda 2 hasta 0-29 aralığında, 7'si GFR değeri 30-59 aralığında, 14'ü GFR değeri 60-89 aralığında ve 3'ünün GFR değeri ise ≥ 90 olarak tespit edilmiştir. 12 ayda 0-29 ile 30-59 değeri arasında hasta sayısı değişmemiş olup 60-89 arasında olan bir hastanın GFR değeri ≥ 90 olmuştur.

ABCB1 CT grubunun 3. ayda 3 hastanın GFR değeri 0-30 aralığında, 16'sı 30-59 aralığında, 24' ü 60-89 aralığında ve 11'inin GFR değeri ≥ 90 olarak tespit edilmiştir. 12 ayda ise 2 hastanın GFR değeri 0-29 aralığında, 187'si 30-59 aralığında, 22'si 60-89 aralığında ve 14'ünün GFR değeri ≥ 90 olarak tespit edilmiştir. ABCB1 TT grubunun 3. ayda 2 hastanın GFR değeri 30-59 arasında 9'u 30-59 aralığında ve 4'ünün GFR değeri ≥ 90 olarak tespit edilmiştir. Bu grubun 12. ayda ise GFR değeri 30-59 olan 7 hastanın GFR değerleri 60-89 olarak yükselmiştir. ABCB1 TT olan hastaların zamanla GFR gruplarında fark bulunmuş ancak istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmemiştir.

Diğer alel gruplarının 3. ay ile 12 aylar arasında GFR gruplandırılmasına göre değişimlerinde istatistiksel açıdan anlamlı fark tespit edilememiştir ($p > 0.05$) (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Alel gruplarının GFR aralıklarına göre nakil sonrası 3. ve 12. aylardaki dağılımı.

eGFR	0-29 (mL/min/1.73 m ²)	30-59 (mL/min/1.73 m ²)	60-89 (mL/min/1.73 m ²)	≥ 90 (mL/min/1.73 m ²)	P
CYP2C8(*1*3+*3*3)					
3. ay	1	8	8	1	>0.05
12. ay	3	5	7	3	

Tablo 4.7 "Devam" Alel gruplarının GFR aralıklarına göre nakil sonrası 3. ve 12. aylardaki dağılımı.

CYP2C8*1*1					
3. ay	4	27	39	17	>0.05
12. ay	-	26	42	19	
CYP3A5*1*3					
3. ay	1	-	3	1	>0.05
12. ay	-	1	1	3	
CYP3A5*3*3					
3. ay	5	34	44	17	>0.05
12. ay	4	29	48	19	
ABCB1 CC					
3. ay	2	7	14	3	>0.05
12. ay	2	7	13	4	
ABCB1 CT					
3. ay	3	16	24	11	>0.05
1. ay	1	17	22	14	
ABCB1 TT					
3. ay	-	12	9	4	>0.05
12. ay	-	7	14	4	

Nakil sonrası toplam 10 hastaya böbrek biopsisi yapıldığı tespit edilmiştir. CYP2C8 *1*3+*3*3 polimorfizmi olan hastalardan 4'üne, CYP2C8*1*1 alel grubunda ise 6'sına biopsi yapılmıştır. ABCB1 alel gruplarında ABCB1 CT grubunda 4, CC grubunda 3 ve TT grubunda ise 3 hastaya biopsi yapıldığı, CYP3A5 *1*3 alel grubunda ise biopsi yapılmadığı gözlemlenmiştir.

5. TARTIŞMA

ESOGU Tıp Fakültesi nefroloji polikliniğinde takipli Takrolimus kullanan böbrek nakil hastalarından çalışmaya dahil edilen 115 hastanın genotiplemesi farmakogenetik laboratuvarımızda yapıldı. Çalışmadan çıkarılan 10 hasta sonrasında ABCB1 polimorfizmi için alel dağılımı 26 hastanın ABCB1 (CC), 54 hastanın ABCB1 (CT) ve 25 hasta ABCB1 (TT) olarak bulundu.

KBY, kronik seyirli böbrek hastalıklarında, ilerleyici nefron kaybı sonucunda böbrek fonksiyonlarının bozulması ve GFR'nın kalıcı azalması ile kendini gösteren bir tablodur. SDBY gelişen hasta sayısı dünyada ve ülkemizde giderek artmaktadır. Böbrek nakli, SDBY hastalarının en seçkin tedavi yöntemi olarak bilinmektedir (40).

Organ nakilleri sonrası immunsupresif tedavilerin en önemli hedefi en kısa sürede etkin ilaç kan düzeylerine ulaşmak ve tedavi sürecinde o sınırlar içerisinde kalmaktır. Terapötik düzey olarak bilinen bu sınırların altında olması organın rejeksiyon riskini arttıran çok önemli bir problemdir. Etkin kan düzeyine ulaşmakta zorlanılan nakil olgularında erken dönemde akut rejeksiyon sorunları yaşanabilir. Bu immunsupresif ilaçlar, yavaş metabolize edildiğinde ise yüksek kan düzeyi, ilaç toksisitesi, toksisiteye bağlı önemli yan etkiler ve hatta organ kayıplarına yol açabilmektedir. TAC günümüzde solid organ nakillerinde özellikle de böbrek naklinde yaygın şekilde kullanılan kalsinörin inhibitörü sınıfında yer alan bir ajandır (22).

TAC, 1980'lerden beri etkili immünosupresan olarak kullanılmaktadır. Terapötik etkisi ve yaygın kullanımına rağmen nefrotoksik yan etkisi nedeniyle iyi işleve sahip greftlerde bile uzun vadeli greft sağkalımında olumsuz etkisinden bahsedilmektedir (61).

Yakın zamanda yapılan araştırmalar, CYP3A5 ve ABCB1 için tek nükleotid polimorfizmlerinden (SNP) bazılarının, nakil hastalarında TAC farmakokinetiği ve nefrotoksitesite üzerindeki etkisini değerlendirmişlerdir (76).

Farmakogenetik, DNA dizisindeki varyasyonların ilaç tepkisi üzerindeki etkisini tanımlar. Bu farmakogenetik ile farmakokinetik ve farmakodinamik ilişkiyi ve aynı zamanda farmakogenomik alanda çalışmaları içerir (95). Bazı çalışmalar serum kreatinin konsantrasyonu ile TAC klirensi arasında herhangi bir kolerasyon olmadığını

bildirmişlerdir. Serum kreatinin konsantrasyonu 344-1064 ($\mu\text{mol/L}$) arasında olan diyaliz hastalarıyla sağlıklı gönüllülerin TAC klirensinin benzer olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (96).

Çalışmamızda genotipleme sonucunda tespit ettiğimiz aleller arası dağılım oranı daha önceki çalışmamızda (36) ve yine ülkemizde Akbaş ve ark (97) yaptığı çalışmadaki oranlara benzer şekilde bulunmuştur.

CYP2C8 polimorfizm için yapılan genotipleme sonucunda 18 hastada $*1*3+*3*3$ aleli, 87 hastada ise $*1*1$ aleli tespit edilmiştir. CYP2C8 enzimine ait farklı polimorfizmler tespit edilmiş olup biz çalışmamızda daha önce ilaçların farmakokinetiği üzerine etkisi gösterilmiş olan CYP2C8*3 (A1196G) alelinin nefrotoksisite üzerine etkisini değerlendirmeyi amaçladık (90, 98, 99). Bu polimorfizm sıklığının ırklara göre 0,7 ile 0,15 arasında değiştiği tespit edilmiştir (100, 101). Biz çalışmamızda $*1*3+*3*3$ alel frekansını 18 bireyde tespit ederek %15,6 (0,15) bulduk.

Çalışmamızda CYP3A5 polimorfizmi için yapılan genotiplemede 10 hastada CYP3A5*1*3 heterozigot, 101 hasta da ise CYP3A5*3*3 homozigot alel tespit ettik. Alel frekansı %7,92(0,07) bulundu.10 hastanın dosya verileri yetersiz olduğu için çalışma 105 hastanın verileri $*3*3$ N: 100, $*1*3$ N:5 üzerinden tamamlanmıştır.

Kronik böbrek yetmezliği gelişimi CNI kullanan hastalarda uzun vadede önemli bir komplikasyondur. Böbrek hasarının erken teşhisi önemlidir. Nakil sonrası böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için kullanılan metodolojiler: serum kreatinin, BUN, GFR ve toplam idrar çıkışıdır (48). Böbrek nakli sonrasında böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için birçok çalışmada kreatinin ve GFR düzeyleri kullanılmıştır (13, 102-105). Biz çalışmamızda nakil hastalarının böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için serum kreatinin ve GFR değerlerini nakil sonrası 3., 6. ve 12. aylarda inceledik ve gruplar arasındaki farkı istatistiksel olarak değerlendirdik. Hastalara ait laboratuvar verileri normal dağılım göstermediği için nonparametrik testler kullanıldı ve ortanca değerler sayısal olarak verildi. Hastaların GFR düzeyi hesaplanırken CKD-EPI formülü kullanıldı. CDK-EPI formülü KDIGO'da 2012'den bu yana yer alan GFR hesaplaması için kullanılan en güvenilir hesaplama yöntemlerinden biridir. Tahmini Glomerul filtrasyon hızı (eGFR)'nin ölçümü için

kullanılan Cockcroft – Gault, MDRD ve CKD-EPI gibi formüller genellikle serum kreatinin ölçümüne dayanır. Bunun yanında son zamanlarda sistatin C de kullanılmaktadır. İnülin ile GFR hesaplaması altın standarttır fakat klinikte kullanımı zaman alan ve pahalı bir yöntem olduğu için uygun değildir. Kreatinin kullanılması hızlı ve uygun maliyetli bir yöntemdir. Kreatinin kas kitlesinden etkilenip yaş, cinsiyet ve etnisiteye göre değişkenlik göstermektedir. Diğer bir faktör ise kreatininin üretimi ve salgılanmasını etkileyen genç ve yaşlılar arasında değişkenlik gösteren günlük protein alımı, malnutrisyon ve ilaç kullanımınıdır. Kronik böbrek hastalarında, ekstrarenal kreatinin artışı ve kreatininin idrarla atılmasındaki azalma, GFR'nin fazla hesaplanmasına yol açar.

Cockcroft-Gault (CG) denklemi kreatinin klirensinin doğrudan bir GFR ölçüsü olduğu varsayımına dayanarak, kreatinin klirensini tahmin etmek için geliştirilmiştir. EGFR için yaygın kullanılan denklem dört değişkenli kısaltılmış MDRD denklemi kullanılmaya başlanmış ve daha sonraki yıllarda MDRD ile aynı dört temel değişkeni kullanarak eGFR'yi hesaplayan daha yeni ve daha doğru kreatinin temelli bir yöntem olan CKD-EPI geliştirilmiştir. Bu yöntemin etkinliği geniş popülasyonları içeren çalışma gruplarında gösterilmiştir (105, 106).

Hastaların 12. ay sonunda böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için baktığımız bir diğer parametre idrar protein/kreatinin (P/C) oranı idi. Proteinüri böbrek hastalıklarını değerlendirmede kullanılan önemli bir parametredir. Bunun ölçümü için 24 saatlik idrarda protein tayini uygulanması bakımından zor olduğu için bunun yerine protein / kreatinin oranı veya albümin / kreatinin oranını altın standart olarak değiştirecek çok sayıda çalışma yapılmıştır (107). Ayrıca Naka ve ark. strip idrar testiyle protein/kreatinin ölçüm yönteminin kıyasladığı başka bir çalışmada P/C yönteminin proteinüriyi göstermede kullanışlı olduğu vurgulanmıştır (108). P/C oranı >300 proteinüri açısından anlamlı değer olarak kabul edilmektedir.

CYP2C8*3 polimorfizminin TAC kullanan bireylerde nefrotoksik yan etkisi olduğu Smith ve ark. yaptığı çalışmada gösterilmiştir (91) ve yine başka bir çalışma CYP2C8*3'i karaciğer nakli sonrası erken dönemde böbrekte tubulointertisyel hasar ile ilişkilendirmiştir (5).

CYP2C8*3 polimorfizminin ilaçların farmakokinetiğinde de etkili olduğu bazı çalışmalarda gösterilmiştir (109). CYP2C8*3 polimorfizmi ilaçların farmakokinetiğini etkilediği gibi AA gibi endojen bileşikleri vasküler tonus ve kan basıncında önemli aktif epoksit metabolitlerine dönüştürür. Hem akut hem kronik CNI nefrotoksisitesinde AA metabolizması önemlidir (110). Dai D ve ark. yaptığı çalışmada CYP2C8*3 polimorfizmi sonucunda oluşan enzim inaktif olup AA'den ETT oluşumu metabolizması etkileyerek bunun sonucunda CYP2C8*3 ile AA metabolizmasındaki azalma ilişkilendirilmiştir (90). Biz çalışmamızda CYP2C8*3 genotipi için alel gruplarının serum kreatinin değerlerini kıyasladığımız zaman nakil sonrası 12. ayda *3*3 alel grubunun ortanca düzeyi 1.58 mg/dl , *1*1 grubunun ise 1.2 mg/dl bulduk. *3*3 alel grubunun serum kreatinin düzeyi *1*1 grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edildi (p:0.021). *1*1 grubunda nakil sonrası 1 yıllık dönemde ortanca kreatinin değerlerinde değişme olmamıştır (1.20mg/dl).*3*3 grubunda ise bu değerler 1.26 mg/dl'den 1.58 mg/dl'e yükselmiştir. Ortanca GFR değerleri ise aylara göre *3*3 grubunda (60, 66, 61 mL/min/1.73 m²) *1*1'e grubuna (66, 70, 68 mL/min/1.73 m²) göre düşük bulunmuş olup ancak istatistiksel olarak anlamlı sonuç tespit edilmemiştir.

CYP2C8*3 polimorfizmi TAC farmakokinetiğinden ziyade farmakodinamiğinde etkili bulunmuştur. CNIT nefrotoksisitesinin serum ilaç doz ve konsantrasyonundan bağımsız olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir (71, 111). CNI nefrotoksisitesinde ilaç dozu belirleyici bir faktör olmadığından ve nakil olan her bireyde oluşmadığı için kalsinörin metabolizması ve transportundaki genetik varyasyonları içeren bireysel risk faktörlerinin değerlendirilmesi geliştirilmiştir (112). Biz de bu çalışma ile CYP2C8 polimorfizminin ilaç doz, konsantrasyon düzeylerini tespit ederek ilaç metabolizmasındaki bireysel farklılıkları incelemiş olduk.

Bizim çalışmamızda da kreatinin ve GFR değerlerinde farklılık tespit ettiğimiz CYP2C8 alel gruplarının günlük dozları ve C/D oranlarında fark görülmedi (p>0.05)

Park ve ark. yaptığı çalışmada böbrek fonksiyonunun zamanla değişimini gözlemlemek için hastaların kreatinin ve GFR değerlerinin persantil ve farklarının ortalamalarına bakılmıştır (113). Biz de çalışmamızda CYP2C8 genotipi için iki grubun nakil sonrası bir yıllık süreçte kreatinin farklarının ortanca değerlerini

hesapladık ve anlamlı derecede fark tespit edildi ($p:0.036^*$). 3^*3 grubunun 9 aylık süreç içerisinde kreatinin farkları ortanca değeri $+0.07$, 1^*1 grubunun kreatinin değerleri farklarının ortanca değeri -0.07 bulundu. Sonuçta çalışmamız sonunda 3^*3 grubunda kreatinin değerleri arttığını 1^*1 grubunda ise azaldığını göstermiş olduk. Grupların zamanla GFR düzeylerinin farklarını hesaplayarak ortanca değeri bulundu. 3^*3 grubunda zamanla GFR azalma görülürken 1^*1 grubunda ise artış tespit edildi. GFR değişimleri gruplar arası anlamlı bulunurken istatistiksel olarak fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Bu değişimin kreatininde anlamlı olup GFR'ye istatistiksel olarak yansımamış olması GFR'yi etkileyen cinsiyet, ırk, yaş gibi faktörlerin GFR hesaplamasını etkilemesinden kaynaklandığını düşünmekteyiz (114).

Çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların ayrıca kan hematokrit, albümin ve platelet gibi başka laboratuvar verileri de incelendi. Bu parametrelerin ilaç farmakokinetiğini etkilediği bazı yayınlarda gösterilmiştir (115, 116). Dolayısıyla hastaların diğer laboratuvar verilerinin ilaç konsantrasyonunu etkileyecek düzeyde olup olmadığı da çalışmamızda değerlendirilmiş olduk. İki grup arasında 6. ve 12. aylarda platelet ve albümin düzeylerinin ortanca değerleri arasında fark tespit edildi. Ancak her iki grubun bu değerleri normal sınırlar içerisinde olduğu gözlemlendi.

Böbrekte eksprese edilen ana CYP3A izoformu TAC metabolizmasında katkıda bulunan ve birikimini önleyen CYP3A5'tir. Ancak sonuçlar arasında çelişkiler mevcuttur. Bu tutarsızlıkların olası nedenleri, etnik köken, örnek büyüklüğü ve nefrotoksisite tanımındaki farklılıkları içerir (117, 118). Ek olarak, TAC'ın kendisi değil, onun metabolitlerinin nefrotoksisiteden sorumlu olduğunu savunan hipotezler de mevcuttur (119). Böbrek tübüllerinde eksprese edilen ABCB1, TAC ve metabolitlerinin böbrekte lokal birikimini idrarla atılımını kolaylaştırarak sınırlayabilir (12)

CYP3A5 polimorfizminin böbrek nakil hastalarındaki nefrotoksik etkisini akut dönemde inceleyen ve gecikmiş böbrek fonksiyonuyla TAC dozu arasındaki ilişkiyi gösteren çalışma Drink R.J. ve ark. tarafından yapılmıştır (120). Bunun yanında CYP3A5 polimorfizminin akut rejeksiyon ve nakil sonrası 3 aylık dönemde GFR düzeyine herhangi bir etkisinin olmadığını gösteren başka bir çalışma da mevcuttur (121).

CYP3A5'in kronik nefrotoksisitede etkili olduğunu bulan çalışmalar literatürde mevcuttur (122). Kuypers ve ark. yaptığı çalışmada yüksek doz TAC alan hastalarda CYP3A5*1*3 alel grubunda biopsi ile kanıtlanmış CNIT toksisitesi CYP3A5*3*3 grubuna nazaran anlamlı derecede yüksek bulunarak polimorfizm ile ilişkilendirmiştir (123). Bu çalışmayla çelişkili bir şekilde Glowacki ve ark. yaptığı çalışmada ise nakil sonrası 2 yıllık süre içinde akut rejeksiyon, gecikmiş graft fonksiyonu ve ortanca GFR düzeyleri değerlendirilmiş ve CYP3A5 ve ABCB1 gen polimorfizlerinin böbrek fonksiyonunu etkilemediği ve yapılan böbrek biopsi sonuçlarının CNIT nefrotoksisitesiyle ilgili olmadığı gösterilmiştir (124). Kim ve ark. yaptıkları çalışmada CYP3A5 polimorfizminin TAC hedef konsantrasyonunu etkilediğini ancak akut rejeksiyona etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir(125).

Gervasini ve ark. 103 böbrek nakli hastasıyla yaptıkları çalışmada hastaları nakil sonrası 1 yıllık süre için değerlendirmiş ve CYP3A5, CYP3A4 polimorfizmlerinin klinik etkilerini araştırmışlardır. Hastaların kreatinin değerleri, akut rejeksiyon sayıları ve biopsi yapılan hastaların sonuçlarına bakılmış ve genetik haplotiplerin nefrotoksisiteyle bağlantısı olmadığı sonucunu elde etmişlerdir (13).

Bochud ve ark. yaptığı çalışmada CYP3A5'in kan basıncı üzerine ve böbrekte GFR üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. CYP3A5*1 taşıyıcılarının yaş ve sodyum (Na⁺) bağlantılı kan basınçlarının daha yüksek olduğu ve GFR değerlerinin *3*3'e göre daha düşük olduğunu tespit etmişlerdir (126). Literatürdeki bir diğer çalışmada karaciğer nakli olan hastaların nakil sonraki 1 yıllık zamanda serum kreatinin değerleri incelenip, kreatinin düzeyindeki artışın 0.5'den büyük olanlar renal fonksiyon bozukluğu olarak değerlendirilmiş ve buna göre haplotipler kıyaslanmış. Sonuç olarak anlamlı farklılık tespit edilmiştir. Ancak bu çalışmada sadece kreatinin değerlerine bakılmış olup böbrek fonksiyonunu değerlendiren GFR ve proteinüri gibi diğer parametreler bakılmamıştır (78). Chen JS ve ark. yaptığı çalışmada nakil sonrası 1 yıllık dönemde biopsi yapılan akut rejeksiyon hastalarının biopsi bulguları değerlendirilmiş ve istatistiksel veri olarak sunulmuştur. Buna göre ilk 3 aylık dönemde biopsi sonuçlarına göre *3*3 grubunda anlamlı derecede nefrotoksisite yüksek bulunmuş ancak 3-12 aylık dönemde sonuçlar gruplar arasında fark tespit edilmemiştir. Kreatinin düzeyleri gruplar arasında fark görülmemiştir. Bu çalışmada biopsi yapılan hastaların sonuçları değerlendirilmiş olup akut dönemde histopatolojik

olarak *3*3 grubunda nefrotoksik etki gözlemlenmiştir (127). Hiperürisemi ve tubuler asidozun ve böbrek biopsisinin değerlendirildiği çocuklarda nefrotoksisitenin bakıldığı başka çalışmada CYP3A5 polimorfizminin böbrek fonksiyonuna etkisi gösterilememiştir (128). Tüm bu veriler doğrultusunda böbrek nakil hastalarında CYP3A5 genotip çalışmalarının çelişkili sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. (4).

Biz çalışmamızda grupların akut dönemdeki DGF (gecikmiş böbrek fonksiyonu) ve rejeksiyonu değil nakil sonrası 1 yıllık dönemdeki böbrek fonksiyonunu değerlendirdik. CYP3A5 genotip alellerinin serum kreatinin ve GFR düzeylerinde *1*3 ve *3*3 grupları arasında anlamlı fark tespit edilmedi.

CYP3A5 *1*3 polimorfizminin TAC'ın farmakokinetiğini etkilediği birçok çalışmada gösterilmiştir(12). Bizim çalışmamızda da 5 tane hastanın 3. 6. ve 12. aylarda günlük dozları ve C/D oranları CYP3A5*3*3 grubuna göre anlamlı ölçüde fark tespit edildi ($p<0.001$).

ABCB1 CC, CT, TT alel gruplarının aylara göre kreatinin ve GFR sonuçları kıyaslandı ve gruplar arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Aylara göre kreatinin farkları değerlendirildiğinde de her bir grubun 3. ve 12. aylar arasında kreatinin değerlerinde anlamlı bir artış ya da azalış tespit edilmedi.

GFR değerleri değerlendirildiğinde ABCB1 alel grupları arasında anlamlı bir fark bulunmadı.

12. ayda idrar protein /kreatinin oranları CC alel grubunun 165.5(106.5-426.2), CT'nin 187.5 (106.5-312.7), TT'nin 190 (102.5-317) mg/g idi.

Nakil sonrası böbrek fonksiyonları açısından ABCB1 genotip alel grupları arasında fark görülmedi. Deng R ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada da ABCB1 polimorfizminin böbrek fonksiyonuna etkisi ve nefrotoksisite tespit edilmemiştir. Bu çalışmada idrarda α_1 -mikroglobulin ve sistatin C gibi mikroproteinler ve üre ve kreatinin düzeyleri değerlendirilmiştir (5). Bununla birlikte böbrek hücrelerindeki ABCB1 aktivitesinin, lokal ilaç birikimini önlemek için önemli olduğunu ve böbreğini TAC ile ilişkili toksisiteye karşı koruyabileceğini vurgulayarak ABCB1(2677G>T) polimorfizminin nefrotoksisitede etkili olduğunu gösteren çalışma mevcut olup ancak sadece kreatinin düzeyleri incelenmiş olup 3 yıllık süreç değerlendirilmiştir (129).

Birçok çalışma ABCB1 genotipleri ile TAC dozu arasında anlamlı bir ilişki kanıtlayamamıştır ve siklosporin için olduğu gibi TAC dozu için de ABCB1 genotipleri için farmakogenetik teşhis önerilmemiştir (130). Riegersperger M yaptığı bir çalışmada uzun vadede ABCB13435C>T'nin TAC farmakokinetiğini etkilemediğini göstermiştir (131). Naesen ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada farklı bir yaklaşımla donör yaşı ve ABCB1 polimorfizminin greft fonksiyonunda etkili olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada hem donör hem de alıcının polimorfizm taşıyıcı olduğu TT nefrotoksisitenin anlamlı farklı olduğu gösterilmiştir (88). Dolayısıyla bunun gibi greftin nakil öncesindeki fonksiyonu ve genetik yapısının da etkili olabileceğini vurgulayan çalışmalar mevcuttur (132). Ancak Ling yang ve ark. çalışmasında ise hem donör hem de alıcıların ABCB1 polimorfizm açısından nakil sonrası CNIT nefrotoksisitesi ve böbrek fonksiyonu açısından fark tespit edilmemiştir (45).

Yunying shi ve ark.'nın yaptığı çalışmada TAC kullanan karaciğer nakil hastalarında erken dönem nefrotoksisite değerlendirilmiş. Hastalarda α_1 -mikroglobulin (α_1 -m), immunoglobulin (IGU), mikroalbumin (MA) ve transferrin (TRU) değerleri bakılmış mikroproteinüri ile ABCB1 genotipleri arasında ilişki tespit edilmemiştir (48). Biz çalışmamızda böbrek fonksiyonunu değerlendirirken bu verileri kullanmadık.

Hawwa ve ark. yaptığı çalışmada ise ABCB1 alel ve haplotiplerinde GFR'deki düşüşe bakıldığında 3. ve 6. aylarda nefrotoksisite artmışken 12. ayda ABCB1 genotipleriyle nefrotoksisite açısından ilişki tespit edilmemiştir. Bu durum TAC kullanımının nakil sonrası böbrek fonksiyonunu erken ve geç dönem olarak farklı zaman dilimlerinde etkileyebileceğini göstermektedir (1).

Çalışmamızda nakil sonrası bir yıllık zaman sürecinde ABCB1 allel gruplarının zamanla böbrek fonksiyonlarındaki artış veya azalma değerlendirilirken CC ve CT gruplarında 13. ve 12. aylardaki kreatinin farklarının ortanca değerleri -0.05 ve -0.06 iken TT grubunun +0.05 bulundu. Zamanla her üç grupta kreatinin değişimi açısından fark görülmedi. Bu kreatinin değerlerinin GFR ye yansımaları CC grubunda 2.5, CT grubunda 3.88 olurken TT grubunda 0.2 mL/min/1.73 m² idi. ABCB1 genotipi için her üç grubun diğer laboratuvar verileri incelendiğinde hematokrit düzeylerinde 12. ayda

fark tespit edilmiştir. Bunun dışında diğer albümin ve platelet düzeyleri gruplar arasında benzer düzeyde idi.

Çalışmamızda ayrıca CYP2C8*3*3 ve CYP3A5*1*3 haplotiplerinin olduğu hastaları ekarte ederek ABCB1 alel gruplarının verilerini tekrar değerlendirdik. Böylelikle çoklu polimorfizm durumunu ve etkisini ekarte ederek daha sağlıklı veriler elde etmeyi amaçladık. Bu şekilde 83 hastanın GFR ve kreatinin değerleri 3. , 6. ve 12. aylarda kıyaslandı. Yine gruplar arasında (CC, CT ve TT) anlamlı bir fark tespit edilmedi ($p>0.05$). Hem CYP2C8**3*3 ve hemde CYP3A5*1*3 alel taşıyıcısı olan 2 hastada ise böbrek fonksiyonlarının stabil (kreatinin ≤ 1.2 mg/dl ve GFR ≥ 60 (mL/min/1.73 m²) olduğu tespit edildi. Dolayısıyla sayı yetersizliğinden dolayı bu iki haplotipi kombine olarak taşıyan hastaların böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek yeterli bilgi elde edilemedi.

TAC'ın C/D oranı ilaç metabolizmasının uzun vadede böbrek fonksiyonu üzerine etkisini göstermek için faydalı olabilir. Rojas ve ark. CYP3A5*1 alel taşıyıcılarında hedef ilaç düzeyinin CYP3A5*3'e göre düşük olduğu ve ekspresör genotipin akut rejeksiyon ve kronik nefrotoksisite için risk taşıdığını göstermiştir (133). Ancak benzer ve farklı etnik gruplarla yapılan başka çalışmalar çelişkili sonuçlar göstermiştir (88, 122, 127).

Kwiatkowska E ve ark. yaptığı çalışmada C/D oranı cutoff olarak 1.53 olarak belirlenmiş ve buna göre hastalar gruplandırılarak böbrek fonksiyonları kıyaslanmıştır. C/D oranlarının dağılımı gösterilmiş ve GFR kreatinin değerleri bu gruplandırmaya göre anlamlı derecede farklı bulunmuş. C/D oranı artıkça GFR pozitif korelasyon kreatinin ise negatif korelasyon gösterdiği tespit edilmiş (134). Nowicka ve ark.'nın yaptığı başka bir çalışmada C/D cutoff değeri 1.47 olarak belirlenmiştir. Gruplandırma bu değere göre yapılarak nakil sonrası 6 aylık süre için böbrek fonksiyonu değerlendirilmiştir (135).

C/D oranlarını hastaların değerleri ortalaması alınarak hesaplandığı dağılıma göre mean değerini hesaplamasını yapan çalışmada (136) dağılıma göre hastalar hızlı metabolize ediciler ve yavaş metabolize edici olarak gruplandırılmıştır. C/D cutoff değerinin çalışılan hasta popülasyonunun dağılımına göre yapıldığı bu ve bunu baz alan diğer çalışmalardan gözlemlemekteyiz. Gerold ve ark. yaptığı çalışmada akut

CNIT toksisitesi değerlendirilmiş (137) böbrek biyopsileri incelenerek düşük C/D oranının toksisiteye etkili olduğu belirtilmiştir. Biz çalışmamızda akut değil 1 yıllık süreç değerlendirdik.

Yine T Jauve ve ark. çalışmasında C/D cutoff değeri 1.05 alınmış ve nakil sonrası 3. ayda GFR düzeyi ≤ 30 olan hasta sayılarına göre değerlendirilmiştir. C/D oranlarının greft sağkalımıyla ilişkili olduğunu belirtilmiştir. Ancak bu çalışma erken dönem greft sağkalımı ve C/D oranı ilişkisini özellikle vurgulamaktadır (138).

Köklü ve ark.'nın yaptığı ve antiviral tedavi alan bir hasta popülasyonunda hasta grupları KDIGO CKD sınıflandırmasına göre gruplandırılmış ve aylara göre evrelere ayırmışlardır. Zamanla böbrek fonksiyon kaybı alt gruplar incelenerek karşılaştırılmıştır (139). Ong ve ark. ise atorvastatin kullanan hastalarda böbrek fonksiyonunun değerlendirildiği bir çalışmalarında hastaları 0-30, 30-60 ve ≥ 60 (mL/min/1.73 m²) gruplarına göre ve GFR'nin zaman içerisindeki farklarının ortalamaları baz alınarak grupları kıyaslanmışlardır (140). Sapir ve ark. yaptığı çalışmada böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için hastaları GFR değerleri ≥ 60 (mL/min/1.73 m²) ve < 60 (mL/min/1.73 m²) olarak gruplandırmıştır (141).

Biz de çalışmamızda zaman dilimleri içerisinde hastaları 0-29 (mL/min/1.73 m²), 30-59, 60-90 ve ≥ 90 (mL/min/1.73 m²) GFR aralıklarına göre sınıflandırdık.

Alellerin 3. ve 12. aylarda GFR aralık grupları sayısal olarak verildi ve zamanla değişimleri değerlendirildi. CYP2C8*3 grubunda 1 hastanın 3. ayda GFR değeri 0-30 (mL/min/1.73 m²) aralığında iken 1. yılın sonunda bu sayı 3'e yükseldiği, 60-90 arasında olan 1 hasta sayısının ise GFR ≥ 90 olan grupta olduğu görüldü. CYP2C8 *1 grubunda ise GFR değeri 0-30 (mL/min/1.73 m²) grupta olan 4 hasta var iken 1. yılın sonunda bu hastaların GFR değerleri yükselerek bu grupta hasta olmadığını tespit ettik. Ayrıca aynı grupta 30-60 arasında 27 hasta var iken 1. yıl sonunda 26 olduğunu gördük. Totalde CYP2C8*1 grubunda 1 yıllık süreç içerisinde böbrek fonksiyonunda anlamlı bir düzelme olduğu gözlemlendi. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi.

ABCB1 polimorfizmi için baktığımızda TT grubunda 12 hastanın GFR değeri 3. ayda 30-60 (mL/min/1.73 m²) arasında iken 1. yıl sonunda 5 hastanın GFR değerleri

artarak bu sayı 7'e düştü. TT grubunun böbrek fonksiyonlarında zamanla bir iyileşme tespit edilmiştir. Ancak istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Aynı TT grubunun 3. aydan 12. aya kadar geçen süre içerisinde kreatinin ve GFR farklarının ortanca değerleri 0.2 olduğu, kreatinin farkları ortanca değeri 0.05 olduğu tespit edildi.

İmmünespresif ilacın nakil sonrası böbrek fonksiyonuna etkisinin böbrek nakil hastalarında değerlendirilmesi diğer solid organ nakillerine kıyasla bazı zorluklar içermektedir. Bu zorluklar, böbrek nakil hastalarının nakil sonrası bazal kreatinin ve GFR değerlerinin yüksek olması, stabil hale gelmesinin zaman alması ve hastaya göre bu zamanın değişkenlik göstermesi ayrıca nakil hastalarının KBY hastaları olması gibi nedenlerden kaynaklanmaktadır. Diğer organ nakillerinde başlangıç noktasında böbrek fonksiyonu normal olan hastaların zamanla kreatininde artma ve GFR değerlerinde azalma kıyaslanırken, böbrek nakil hastalarında KBY hastaları olmaları greft fonksiyonunun diğer birçok faktörden etkilenmesi değerlendirmeyi güçleştirmiştir. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirirken bu polimorfizmlerden başka polimorfizmlerinde etkisi olabileceği unutulmamalıdır. Başka sitokin polimorfizmlerinin (IL-2, IL-4, IL-10, TGF-beta1 ve TNF-alfa) akut rejeksiyon ve kronik allogreft nefropatisinde etkili olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur(142).

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda böbrek nakil hastalarında CYP3A5 (6986A>G), ABCB1 (13435C>T) ve CYP2C8 (A1196G) polimorfizmlerinin böbrek fonksiyonu üzerine etkisini araştırdık. CYP2C8 (A1196G) polimorfizmi için değerlendirdiğimizde CYP2C8*1*3 ve CYP2C8*3*3 alel taşıyıcısı olan hastaların CYP2C8*1*1 grubuna kıyasla nakil sonrası kreatinin değerlerinin ve idrar kreatinin /protein düzeyinin daha yüksek olduğu, GFR değerlerinin ise daha düşük olduğu tespit edilmiştir. İstatistiksel olarak CYP2C8*1*3 ve CYP2C8*3*3 gruplarında ortanca kreatinin değeri ve zamanla kreatinin düzeyinde artışın CYP2C8*1*1 grubuna kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Bu verilere dayanarak CYP2C8*3 polimorfizminin nakil sonrası böbrek fonksiyonu üzerine olumsuz etkileri olduğu tespit edilmiştir. İlaç doz ve konsantrasyonu için yapılan değerlendirme sonucunda CYP2C8 (A1196G) polimorfizminin takrolimus farmakokinetiğini ve günlük ilaç dozu gereksinimini etkilemediği tespit edilmiştir.

CYP3A5 polimorfizmi için yapılan değerlendirme sonucunda CYP3A5 *1*3 (ekspresör) grubunda günlük TAC doz gereksiniminin CYP3A5*3*3(nonekspresör) gruba kıyasla daha yüksek olduğu ($p<0.01^*$) ilaç konsantrasyon doz oranının (C/D) CYP3A5*3*3 grubuna kıyasla daha düşük olduğu($p<0.001^{***}$) tespit edilmiştir. İki grup arasında kan kreatinin ve GFR düzeyleri değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. CYP3A5*1*3 grubundaki hasta sayımızın 5 olması böbrek fonksiyonunu değerlendirmek için yetersiz bir sayı olup daha fazla hastada bu araştırmanın yapılması daha sağlıklı sonuçlar verecektir.

ABCB1 polimorfizmi için yapılan değerlendirme sonucunda ABCB1 (CC), ABCB1 (CT) ve ABCB1 (TT) alel gruplarının ortanca kreatinin, GFR ve idrar kreatinin/protein oranı açısından anlamlı bir fark tespit edilmemiştir. İlaç doz ve konsantrasyonu için yapılan değerlendirmede bu üç grup arasında fark olmadığı tespit edilmiştir.

Sonuç olarak çalışmamızda takrolimus kullanan hastalarda nakilden sonraki 1 yıllık süreçte CYP2C8 (A1196G) polimorfizminin böbrek fonksiyonunu olumsuz yönde etkilediği, CYP3A5 (6986A>G) ve ABCB1 (13435C>T) polimorfizmlerinin böbrek fonksiyonu üzerine etkisinin olmadığını tespit ettik. Takrolimus farmakokinetiği açısından CYP3A5 (6986A>G) polimorfizminin etkili olduğu,

CYP2C8 (A1196G) ve ABCB (13435C>T) polimorfizmlerinin ise etkisinin olmadığı tespit edilmiştir.

CNIT nefrotoksitesinde polimorfizmlerin etkisini incelemek için gelecek çalışmalarda;

1. Biyokimyasal verilere ek olarak histolojik CNIT nefrotoksitesi verilerinin değerlendirilmesi,

2. Donöre ait faktörlerin ve polimorfizmlerin değerlendirilmesi ,

3. İlaç farmakokinetik ve farmakodinamiğini etkileyebilecek başka polimorfizmlerin birlikte değerlendirilmesi,

4. Daha fazla sayıda hasta ile çalışmanın yürütülmesi önerilmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hawwa AF, McKiernan PJ, Shields M, Millership JS, Collier PS, McElnay JC. Influence of ABCB1 polymorphisms and haplotypes on tacrolimus nephrotoxicity and dosage requirements in children with liver transplant. *Br J Clin Pharmacol.* 2009;68(3):413-21.
2. Voora S, Adey DB. Management of Kidney Transplant Recipients by General Nephrologists: Core Curriculum 2019. *Am J Kidney Dis.* 2019;73(6):866-79.
3. Liu F, Mao JH. Calcineurin inhibitors and nephrotoxicity in children. *World J Pediatr.* 2018;14(2):121-6.
4. Gijzen VM, Madadi P, Dube MP, Hesselink DA, Koren G, de Wildt SN. Tacrolimus-induced nephrotoxicity and genetic variability: a review. *Ann Transplant.* 2012;17(2):111-21.
5. Deng R, Liao Y, Li Y, Tang J. Association of CYP3A5, CYP2C8, and ABCB1 Polymorphisms With Early Renal Injury in Chinese Liver Transplant Recipients Receiving Tacrolimus. *Transplant Proc.* 2018;50(10):3258-65.
6. Stratta P, Canavese C, Quaglia M, Balzola F, Bobbio M, Busca A, et al. Posttransplantation chronic renal damage in nonrenal transplant recipients. *Kidney Int.* 2005;68(4):1453-63.
7. Shrestha BM. Two Decades of Tacrolimus in Renal Transplant: Basic Science and Clinical Evidences. *Exp Clin Transplant.* 2017;15(1):1-9.
8. Tavira B, Gomez J, Diaz-Corte C, Coronel D, Lopez-Larrea C, Suarez B, et al. The donor ABCB1 (MDR-1) C3435T polymorphism is a determinant of the graft glomerular filtration rate among tacrolimus treated kidney transplanted patients. *J Hum Genet.* 2015;60(5):273-6.
9. Randhawa PS, Saad RS, Jordan M, Scantlebury V, Vivas C, Shapiro R. Clinical significance of renal biopsies showing concurrent acute rejection and tacrolimus-associated tubular vacuolization. *Transplantation.* 1999;67(1):85-9.
10. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. CYP3A5 and CYP3A4 but not MDR1 single-nucleotide polymorphisms

determine long-term tacrolimus disposition and drug-related nephrotoxicity in renal recipients. *Clin Pharmacol Ther.* 2007;82(6):711-25.

11. Ojo AO, Held PJ, Port FK, Wolfe RA, Leichtman AB, Young EW, et al. Chronic renal failure after transplantation of a nonrenal organ. *N Engl J Med.* 2003;349(10):931-40.
12. Yu M, Liu M, Zhang W, Ming Y. Pharmacokinetics, Pharmacodynamics and Pharmacogenetics of Tacrolimus in Kidney Transplantation. *Curr Drug Metab.* 2018;19(6):513-22.
13. Gervasini G, Garcia M, Macias RM, Cubero JJ, Caravaca F, Benitez J. Impact of genetic polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and the clinical outcome of renal transplantation. *Transpl Int.* 2012;25(4):471-80.
14. Chen TK, Knicely DH, Grams ME. Chronic Kidney Disease Diagnosis and Management: A Review. *JAMA.* 2019;322(13):1294-304.
15. Çiftçi HŞ. Böbrek Nakli Yapılan Hastalarda CYP3A, CYP2C ve MDR-1 Polimorfizminin Kalsinörin İnhibitörlerinin Farmakokinetiği İle İlişkisi. Tıbbi Biyoloji AbD Doktora Uzmanlık Tezi: İstanbul Üniversitesi; 2012.
16. National Kidney F. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis.* 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.
17. BOZ SEG. Böbrek Naki Öncesi İmmünesupresif Tedavinin Nakil Sonrası Medikal Komplikasyonlara Etkisinin Retrospektif Değerlendirilmesi İç Hastalıkları AbD Uzmanlık Tezi: Bursa Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi 2019.
18. Şahin NO. Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesinde Böbrek Nakli Hastalarında Hasta ve Greft Sağkalımına Etki Eden Faktörler. İç Hastalıkları AbD Uzmanlık Tezi: Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2016.
19. Kumru G. Böbrek Nakil Alıcılarında Erken ve Geç Dönem Greft Fonksiyonu Üzerine Etkili Faktörlerin Değerlendirilmesi. İç Hastalıkları AbD Tıpta Uzmanlık Tezi: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi; 2015.

20. Seyahi N. Türk Nefroloji Derneği 2017 Yılı Türk Böbrek Kayıt Sistemi Raporu. Türk Nefroloji Derneği, TND Böbrek Kayıt Kurulu. 2017.
21. Ates K, Süleymanlar G, Nurhan S. Türkiye’de Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon–Registry 2017. TC Sağlık Bakanlığı ve Türk Nefroloji Derneği Ortak Raporu. 2019.
22. Muratoğlu H. Böbrek Nakli Olan Çocuklarda Takrolimus Metabolizmasının Greft ve Hasta Sağkalımı Üzerindeki Sonuçlarının CYP3A5 gen polimorfizmi İle İlişkilendirilmesi. İzmir Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Kliniği Tıpta Uzmanlık Tezi.: T.C.Sağlık Bakanlığı Sağlık Bilimleri Üniversitesi 2018.
23. Hatzinger M, Stastny M, Grutzmacher P, Sohn M. [The history of kidney transplantation]. Urologe A. 2016;55(10):1353-9.
24. Lentine KL, Kasiske BL, Levey AS, Adams PL, Alberú J, Bakr MA, et al. Summary of Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) clinical practice guideline on the evaluation and care of living kidney donors. Transplantation. 2017;101(8):1783.
25. OĞUZ FS. Transplantasyon İmmünolojisi. Türkmen A. editör.Türk Nefroloji Derneği. Ankara. Transplantasyon Nefrolojisi. 2016:27.
26. Zhang R. Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. Clin J Am Soc Nephrol. 2018;13(1):182-92.
27. Haas M. An updated Banff schema for diagnosis of antibody-mediated rejection in renal allografts. Curr Opin Organ Transplant. 2014;19(3):315-22.
28. USRD Unnual data report/ End Stage Renal Disease: Chapter 6 Transplantation 2021 [Available from: <https://adr.usrds.org/2020/end-stage-renal-disease/6-transplantation>].
29. Titiz Mİ. Renal Transplantasyona Pratik Yaklaşım. İstanbul. 2010 2004.
30. Ekberg H, Tedesco-Silva H, Demirbas A, Vitko S, Nashan B, Gurkan A, et al. Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation. N Engl J Med. 2007;357(25):2562-75.

31. Hoskova L, Malek I, Kopkan L, Kautzner J. Pathophysiological mechanisms of calcineurin inhibitor-induced nephrotoxicity and arterial hypertension. *Physiol Res.* 2017;66(2):167-80.
32. Brunet M, van Gelder T, Asberg A, Haufroid V, Hesselink DA, Langman L, et al. Therapeutic Drug Monitoring of Tacrolimus-Personalized Therapy: Second Consensus Report. *Ther Drug Monit.* 2019;41(3):261-307.
33. Kidney Disease: Improving Global Outcomes Transplant Work G. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2009;9 Suppl 3:S1-155.
34. Çakır DÜ. Transplantasyon Nefrolojisi Pratik Uygulama Önerileri. Türkmen A editör. *Türk Nefroloji Derneği*. Ankara 51-8 p.
35. Halloran PF. Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *N Engl J Med.* 2004;351(26):2715-29.
36. Yildirim E, Sahin G, Kaltus Z, Colak E. Effect of CYP3A5 and ABCB1 Gene Polymorphisms on Tacrolimus Blood Concentration in Renal Transplant Recipients. *Clin Lab.* 2019;65(11).
37. Vanhove T, Annaert P, Kuypers DR. Clinical determinants of calcineurin inhibitor disposition: a mechanistic review. *Drug Metab Rev.* 2016;48(1):88-112.
38. Sikma MA, van Maarseveen EM, van de Graaf EA, Kirkels JH, Verhaar MC, Donker DW, et al. Pharmacokinetics and Toxicity of Tacrolimus Early After Heart and Lung Transplantation. *Am J Transplant.* 2015;15(9):2301-13.
39. Zahir H, McCaughan G, Gleeson M, Nand RA, McLachlan AJ. Factors affecting variability in distribution of tacrolimus in liver transplant recipients. *Br J Clin Pharmacol.* 2004;57(3):298-309.
40. Çiftçi H KAT, Çalışkan Y, Güney İ, Gürtekin M. Pharmacogenetics and Calcineurine Inhibitors: Review. *Turkiye Klinikleri* 2011: 6(2):62-8.
41. Manikandan P, Nagini S. Cytochrome P450 Structure, Function and Clinical Significance: A Review. *Curr Drug Targets.* 2018;19(1):38-54.

42. Schreiber SL, Crabtree GR. The mechanism of action of cyclosporin A and FK506. *Immunol Today*. 1992;13(4):136-42.
43. Martinez-Martinez S, Redondo JM. Inhibitors of the calcineurin/NFAT pathway. *Curr Med Chem*. 2004;11(8):997-1007.
44. Chapman JR, O'Connell PJ, Nankivell BJ. Chronic renal allograft dysfunction. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(10):3015-26.
45. Yang L, de Winter BC, van Schaik RH, Xie RX, Li Y, Andrews LM, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in living donors do not impact clinical outcome after kidney transplantation. *Pharmacogenomics*. 2018;19(11):895-903.
46. Wilkinson AH, Cohen DJ. Renal failure in the recipients of nonrenal solid organ transplants. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(5):1136-44.
47. Ögütmen MB. Kronik Takrolimus Nefrotoksisitesi Oluşturulmuş Sıçan Modelinde TGF, VEGF, BMP-7 İmmünekspresyonlarının Patogenezdeki Rolü. *Nefroloji AbD Uzmanlık Tezi.*: Marmara üniversitesi; 2004.
48. Shi Y, Li Y, Tang J, Zhang J, Zou Y, Cai B, et al. Influence of CYP3A4, CYP3A5 and MDR-1 polymorphisms on tacrolimus pharmacokinetics and early renal dysfunction in liver transplant recipients. *Gene*. 2013;512(2):226-31.
49. Murray BM, Paller MS, Ferris TF. Effect of cyclosporine administration on renal hemodynamics in conscious rats. *Kidney Int*. 1985;28(5):767-74.
50. English J, Evan A, Houghton DC, Bennett WM. Cyclosporine-induced acute renal dysfunction in the rat. Evidence of arteriolar vasoconstriction with preservation of tubular function. *Transplantation*. 1987;44(1):135-41.
51. Baran DA, Galin ID, Gass AL. Calcineurin inhibitor-associated early renal insufficiency in cardiac transplant recipients: risk factors and strategies for prevention and treatment. *Am J Cardiovasc Drugs*. 2004;4(1):21-9.
52. Textor SC, Burnett JC, Jr., Romero JC, Canzanello VJ, Taler SJ, Wiesner R, et al. Urinary endothelin and renal vasoconstriction with cyclosporine or FK506 after liver transplantation. *Kidney Int*. 1995;47(5):1426-33.

53. Sugimoto T, Haneda M, Sawano H, Isshiki K, Maeda S, Koya D, et al. Endothelin-1 induces cyclooxygenase-2 expression via nuclear factor of activated T-cell transcription factor in glomerular mesangial cells. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(7):1359-68.
54. Schnermann J. Juxtaglomerular cell complex in the regulation of renal salt excretion. *Am J Physiol.* 1998;274(2):R263-79.
55. Zhang W, Li JL, Hosaka M, Janz R, Shelton JM, Albright GM, et al. Cyclosporine A-induced hypertension involves synapsin in renal sensory nerve endings. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(17):9765-70.
56. Naesens M, Kuypers DR, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009;4(2):481-508.
57. Naesens M, Kambham N, Concepcion W, Salvatierra O, Jr., Sarwal M. The evolution of nonimmune histological injury and its clinical relevance in adult-sized kidney grafts in pediatric recipients. *Am J Transplant.* 2007;7(11):2504-14.
58. Moutabarrik A, Ishibashi M, Fukunaga M, Kameoka H, Kawaguchi N, Takano Y, et al. FK506-induced kidney tubular cell injury. *Transplantation.* 1992;54(6):1041-7.
59. Lally C, Healy E, Ryan MP. Cyclosporine A-induced cell cycle arrest and cell death in renal epithelial cells. *Kidney Int.* 1999;56(4):1254-7.
60. Ponticelli C. De novo thrombotic microangiopathy. An underrated complication of renal transplantation. *Clin Nephrol.* 2007;67(6):335-40.
61. Xia T, Zhu S, Wen Y, Gao S, Li M, Tao X, et al. Risk factors for calcineurin inhibitor nephrotoxicity after renal transplantation: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2018;12:417-28.
62. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR. The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med.* 2003;349(24):2326-33.
63. Mihatsch MJ, Kyo M, Morozumi K, Yamaguchi Y, Nickleit V, Ryffel B. The side-effects of cyclosporine-A and tacrolimus. *Clin Nephrol.* 1998;49(6):356-63.

64. Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res.* 2009;19(2):156-72.
65. Bennett J, Cassidy H, Slattery C, Ryan MP, McMorrow T. Tacrolimus Modulates TGF-beta Signaling to Induce Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Renal Proximal Tubule Epithelial Cells. *J Clin Med.* 2016;5(5).
66. Wolf G. Renal injury due to renin-angiotensin-aldosterone system activation of the transforming growth factor-beta pathway. *Kidney Int.* 2006;70(11):1914-9.
67. Hoorn EJ, Walsh SB, McCormick JA, Furstenberg 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.
68. Tholking G, Gerth HU, Schuette-Nuetgen K, Reuter S. Influence of tacrolimus metabolism rate on renal function after solid organ transplantation. *World J Transplant.* 2017;7(1):26-33.
69. Gijzen V, Mital S, van Schaik RH, Soldin OP, Soldin SJ, van der Heiden IP, et al. Age and CYP3A5 genotype affect tacrolimus dosing requirements after transplant in pediatric heart recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(12):1352-9.
70. Sato K, Amada N, Sato T, Miura S, Ohashi Y, Sekiguchi S, et al. Severe elevations of FK506 blood concentration due to diarrhea in renal transplant recipients. *Clin Transplant.* 2004;18(5):585-90.
71. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part I. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49(3):141-75.
72. Neylan JF. Immunosuppressive therapy in high-risk transplant patients: dose-dependent efficacy of mycophenolate mofetil in African-American renal allograft recipients. U.S. Renal Transplant Mycophenolate Mofetil Study Group. *Transplantation.* 1997;64(9):1277-82.
73. Passey C, Birnbaum AK, Brundage RC, Oetting WS, Israni AK, Jacobson PA. Dosing equation for tacrolimus using genetic variants and clinical factors. *Br J Clin Pharmacol.* 2011;72(6):948-57.

74. Iwasaki K. Metabolism of tacrolimus (FK506) and recent topics in clinical pharmacokinetics. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2007;22(5):328-35.
75. Dai Y, Hebert MF, Isoherranen N, Davis CL, Marsh C, Shen DD, et al. Effect of CYP3A5 polymorphism on tacrolimus metabolic clearance in vitro. *Drug Metab Dispos.* 2006;34(5):836-47.
76. Staatz CE, Goodman LK, Tett SE. Effect of CYP3A and ABCB1 single nucleotide polymorphisms on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of calcineurin inhibitors: Part II. *Clin Pharmacokinet.* 2010;49(4):207-21.
77. Joy MS, Hogan SL, Thompson BD, Finn WF, Nickeleit V. Cytochrome P450 3A5 expression in the kidneys of patients with calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22(7):1963-8.
78. Fukudo M, Yano I, Yoshimura A, Masuda S, Uesugi M, Hosohata K, et al. Impact of MDR1 and CYP3A5 on the oral clearance of tacrolimus and tacrolimus-related renal dysfunction in adult living-donor liver transplant patients. *Pharmacogenet Genomics.* 2008;18(5):413-23.
79. Hesselink DA, Bouamar R, van Gelder T. The pharmacogenetics of calcineurin inhibitor-related nephrotoxicity. *Ther Drug Monit.* 2010;32(4):387-93.
80. Liu X. ABC Family Transporters. *Adv Exp Med Biol.* 2019;1141:13-100.
81. Kerb R. Implications of genetic polymorphisms in drug transporters for pharmacotherapy. *Cancer Lett.* 2006;234(1):4-33.
82. Kaya P, Gunduz U, Arpacı F, Ural AU, Guran S. Identification of polymorphisms on the MDR1 gene among Turkish population and their effects on multidrug resistance in acute leukemia patients. *Am J Hematol.* 2005;80(1):26-34.
83. Çolak DF. Ankilozan Spondilit Hastalarında Tedavide Kullanılan İlaçlara Göre MDR1 Gen Polimorfizm ve Ekspresyonunun Araştırılması. *Tıbbi Genetik AbD Uzmanlık Tezi.*: Erciyes Üniversitesi; 2014.
84. Hoffmeyer S, Burk O, von Richter O, Arnold HP, Brockmoller J, John A, et al. Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple

- sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(7):3473-8.
85. Ambudkar SV, Kimchi-Sarfaty C, Sauna ZE, Gottesman MM. P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*. 2003;22(47):7468-85.
86. Hesselink DA, van Schaik RH, van Agteren M, de Fijter JW, Hartmann A, Zeier M, et al. CYP3A5 genotype is not associated with a higher risk of acute rejection in tacrolimus-treated renal transplant recipients. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(4):339-48.
87. Zheng HX, Zeevi A, McCurry K, Schuetz E, Webber S, Ristich J, et al. The impact of pharmacogenomic factors on acute persistent rejection in adult lung transplant patients. *Transpl Immunol*. 2005;14(1):37-42.
88. Naesens M, Lerut E, de Jonge H, Van Damme B, Vanrenterghem Y, Kuypers DR. Donor age and renal P-glycoprotein expression associate with chronic histological damage in renal allografts. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(11):2468-80.
89. Cattaneo D, Ruggenenti P, Baldelli S, Motterlini N, Gotti E, Sandrini S, et al. ABCB1 genotypes predict cyclosporine-related adverse events and kidney allograft outcome. *J Am Soc Nephrol*. 2009;20(6):1404-15.
90. Dai D, Zeldin DC, Blaisdell JA, Chanas B, Coulter SJ, Ghanayem BI, et al. Polymorphisms in human CYP2C8 decrease metabolism of the anticancer drug paclitaxel and arachidonic acid. *Pharmacogenetics*. 2001;11(7):597-607.
91. Smith HE, Jones JP, 3rd, Kalhorn TF, Farin FM, Stapleton PL, Davis CL, et al. Role of cytochrome P450 2C8 and 2J2 genotypes in calcineurin inhibitor-induced chronic kidney disease. *Pharmacogenet Genomics*. 2008;18(11):943-53.
92. Wang MH, Smith A, Zhou Y, Chang HH, Lin S, Zhao X, et al. Downregulation of renal CYP-derived eicosanoid synthesis in rats with diet-induced hypertension. *Hypertension*. 2003;42(4):594-9.
93. Dos Santos EA, Dahly-Vernon AJ, Hoagland KM, Roman RJ. Inhibition of the formation of EETs and 20-HETE with 1-aminobenzotriazole attenuates pressure natriuresis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004;287(1):R58-68.

94. Imig JD. Eicosanoid regulation of the renal vasculature. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2000;279(6):F965-81.
95. Picard N, Marquet P. The influence of pharmacogenetics and cofactors on clinical outcomes in kidney transplantation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2011;7(6):731-43.
96. Gruber SA, Hewitt JM, Sorenson AL, Barber DL, Bowers L, Rynders G, et al. Pharmacokinetics of FK506 after intravenous and oral administration in patients awaiting renal transplantation. *J Clin Pharmacol.* 1994;34(8):859-64.
97. Akbas SH, Bilgen T, Keser I, Tuncer M, Yucetin L, Tosun O, et al. The effect of MDR1 (ABCB1) polymorphism on the pharmacokinetic of tacrolimus in Turkish renal transplant recipients. *Transplant Proc.* 2006;38(5):1290-2.
98. Garcia-Martin E, Martinez C, Tabares B, Frias J, Agundez JA. Interindividual variability in ibuprofen pharmacokinetics is related to interaction of cytochrome P450 2C8 and 2C9 amino acid polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther.* 2004;76(2):119-27.
99. Minhas S, Setia N, Pandita S, Saxena R, Verma IC, Aggarwal S. Prevalence of CYP2C8 polymorphisms in a North Indian population. *Genet Mol Res.* 2013;12(3):2260-6.
100. Bahadur N, Leathart JB, Mutch E, Steimel-Crespi D, Dunn SA, Gilissen R, et al. CYP2C8 polymorphisms in Caucasians and their relationship with paclitaxel 6 α -hydroxylase activity in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol.* 2002;64(11):1579-89.
101. Pechandova K, Buzkova H, Matouskova O, Perlik F, Slanar O. Genetic polymorphisms of CYP2C8 in the Czech Republic. *Genet Test Mol Biomarkers.* 2012;16(7):812-6.
102. Tinti F, Mecule A, Poli L, Bachetoni A, Umbro I, Brunini F, et al. Improvement of graft function after conversion to once daily tacrolimus of stable kidney transplant patients. *Transplant Proc.* 2010;42(10):4047-8.
103. Ferreira A, Felipe C, Cristelli M, Viana L, Basso G, Stopa S, et al. Donor-Specific Anti-Human Leukocyte Antigens Antibodies, Acute Rejection, Renal Function,

- and Histology in Kidney Transplant Recipients Receiving Tacrolimus and Everolimus. *Am J Nephrol*. 2017;45(6):497-508.
104. Schlitt HJ, Barkmann A, Boker KH, Schmidt HH, Emmanouilidis N, Rosenau J, et al. Replacement of calcineurin inhibitors with mycophenolate mofetil in liver-transplant patients with renal dysfunction: a randomised controlled study. *Lancet*. 2001;357(9256):587-91.
105. Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Coresh J, Manzi J, Landis R, et al. Development and validation of GFR-estimating equations using diabetes, transplant and weight. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(2):449-57.
106. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, 3rd, Feldman HI, et al. A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;150(9):604-12.
107. Mariat C, Delanaye P, Bastard JP, Resimont G, Cavalier E, Pieroni L, et al. Urinary protein or albumin/creatinin ratio for reporting measurements results. *Ann Biol Clin (Paris)*. 2018;76(6):643-50.
108. Naka C, Takahashi H, Shiba K, Fujita Y, Fukuta I, Kosaka H, et al. [Usefulness of protein/creatinine ratio in spot urine using test strips]. *Rinsho Byori*. 2005;53(9):810-7.
109. Tornio A, Niemi M, Neuvonen PJ, Backman JT. Trimethoprim and the CYP2C8*3 allele have opposite effects on the pharmacokinetics of pioglitazone. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(1):73-80.
110. Daily EB, Aquilante CL. Cytochrome P450 2C8 pharmacogenetics: a review of clinical studies. *Pharmacogenomics*. 2009;10(9):1489-510.
111. Lai XS, Yang LP, Li XT, Liu JP, Zhou ZW, Zhou SF. Human CYP2C8: structure, substrate specificity, inhibitor selectivity, inducers and polymorphisms. *Curr Drug Metab*. 2009;10(9):1009-47.
112. Gallon L, Akalin E, Lynch P, Rothberg L, Parker M, Schiano T, et al. ACE gene D/D genotype as a risk factor for chronic nephrotoxicity from calcineurin inhibitors in liver transplant recipients. *Transplantation*. 2006;81(3):463-8.

113. Park S, Kim YS, Lee J, Huh W, Yang CW, Kim YL, et al. Reduced Tacrolimus Trough Level Is Reflected by Estimated Glomerular Filtration Rate (eGFR) Changes in Stable Renal Transplantation Recipients: Results of the OPTIMUM Phase 3 Randomized Controlled Study. *Ann Transplant*. 2018;23:401-11.
114. Raman M, Middleton RJ, Kalra PA, Green D. Estimating renal function in old people: an in-depth review. *Int Urol Nephrol*. 2017;49(11):1979-88.
115. Storset E, Holford N, Midtvedt K, Bremer S, Bergan S, Asberg A. Importance of hematocrit for a tacrolimus target concentration strategy. *Eur J Clin Pharmacol*. 2014;70(1):65-77.
116. Robles-Piedras AL, Romano-Moreno S, Fuentes-Noriega I, Mancilla-Urrea E, Gonzalez-Lopez EH, Dominguez-Ramirez A. Relationship among changes in hematocrit, albumin and corticosteroid dose on the disposition of tacrolimus during the first six months following renal transplantation. *Proc West Pharmacol Soc*. 2011;54:30-2.
117. Node K, Huo Y, Ruan X, Yang B, Spiecker M, Ley K, et al. Anti-inflammatory properties of cytochrome P450 epoxygenase-derived eicosanoids. *Science*. 1999;285(5431):1276-9.
118. Koch I, Weil R, Wolbold R, Brockmoller J, Hustert E, Burk O, et al. Interindividual variability and tissue-specificity in the expression of cytochrome P450 3A mRNA. *Drug Metab Dispos*. 2002;30(10):1108-14.
119. Thiebaut F, Tsuruo T, Hamada H, Gottesman MM, Pastan I, Willingham MC. Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987;84(21):7735-8.
120. Kuypers DR, de Jonge H, Naesens M, Vanrenterghem Y. A prospective, open-label, observational clinical cohort study of the association between delayed renal allograft function, tacrolimus exposure, and CYP3A5 genotype in adult recipients. *Clinical therapeutics*. 2010;32(12):2012-23.
121. Hu R, Barratt DT, Collier JK, Sallustio BC, Somogyi AA. Effect of tacrolimus dispositional genetics on acute rejection in the first 2 weeks and estimated

- glomerular filtration rate in the first 3 months following kidney transplantation. *Pharmacogenet Genom.* 2019;29(1):9-17.
122. Quteineh L, Verstuyft C, Furlan V, Durrbach A, Letierce A, Ferlicot S, et al. Influence of CYP3A5 genetic polymorphism on tacrolimus daily dose requirements and acute rejection in renal graft recipients. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2008;103(6):546-52.
123. Kuypers DR, Naesens M, de Jonge H, Lerut E, Verbeke K, Vanrenterghem Y. Tacrolimus dose requirements and CYP3A5 genotype and the development of calcineurin inhibitor-associated nephrotoxicity in renal allograft recipients. *Ther Drug Monit.* 2010;32(4):394-404.
124. Glowacki F, Lionet A, Buob D, Labalette M, Allorge D, Provot F, et al. CYP3A5 and ABCB1 polymorphisms in donor and recipient: impact on Tacrolimus dose requirements and clinical outcome after renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2011;26(9):3046-50.
125. Kim I-W, Moon YJ, Ji E, Im Kim K, Han N, Kim SJ, et al. Clinical and genetic factors affecting tacrolimus trough levels and drug-related outcomes in Korean kidney transplant recipients. *European journal of clinical pharmacology.* 2012;68(5):657-69.
126. Bochud M, Eap CB, Elston RC, Bovet P, Maillard M, Schild L, et al. Association of CYP3A5 genotypes with blood pressure and renal function in African families. *J Hypertens.* 2006;24(5):923-9.
127. Chen JS, Li LS, Cheng DR, Ji SM, Sun QQ, Cheng Z, et al. Effect of CYP3A5 genotype on renal allograft recipients treated with tacrolimus. *Transplant Proc.* 2009;41(5):1557-61.
128. Grenda R, Prokurat S, Ciechanowicz A, Piatosa B, Kalicinski P. Evaluation of the genetic background of standard-immunosuppressant-related toxicity in a cohort of 200 paediatric renal allograft recipients--a retrospective study. *Ann Transplant.* 2009;14(3):18-24.
129. Hebert MF, Dowling AL, Gierwatowski C, Lin YS, Edwards KL, Davis CL, et al. Association between ABCB1 (multidrug resistance transporter) genotype and

- post-liver transplantation renal dysfunction in patients receiving calcineurin inhibitors. *Pharmacogenetics*. 2003;13(11):661-74.
130. Elens L, Bouamar R, Shuker N, Hesselink DA, van Gelder T, van Schaik RH. Clinical implementation of pharmacogenetics in kidney transplantation: calcineurin inhibitors in the starting blocks. *Br J Clin Pharmacol*. 2014;77(4):715-28.
131. Riegersperger M, Plischke M, Steinhauser C, Jallitsch-Halper A, Sengoelge G, Winkelmayr WC, et al. The Effect of ABCB1 Polymorphisms on Serial Tacrolimus Concentrations in Stable Austrian Long-Term Kidney Transplant Recipients. *Clin Lab*. 2016;62(10):1965-72.
132. Hauser IA, Schaeffeler E, Gauer S, Scheuermann EH, Wegner B, Gossmann J, et al. ABCB1 genotype of the donor but not of the recipient is a major risk factor for cyclosporine-related nephrotoxicity after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(5):1501-11.
133. Rojas L, Neumann I, Herrero MJ, Boso V, Reig J, Poveda JL, et al. Effect of CYP3A5*3 on kidney transplant recipients treated with tacrolimus: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Pharmacogenomics J*. 2015;15(1):38-48.
134. Kwiatkowska E, Kwiatkowski S, Wahler F, Gryczman M, Domanki L, Marchelk-Mysliwiec M, et al. C/D Ratio in Long-Term Renal Function. *Transplant Proc*. 2019;51(10):3265-70.
135. Nowicka M, Gorska M, Nowicka Z, Edyko K, Edyko P, Wislicki S, et al. Tacrolimus: Influence of the Posttransplant Concentration/Dose Ratio on Kidney Graft Function in a Two-Year Follow-Up. *Kidney Blood Press Res*. 2019;44(5):1075-88.
136. Tholking G, Fortmann C, Koch R, Gerth HU, Pabst D, Pavenstadt H, et al. The tacrolimus metabolism rate influences renal function after kidney transplantation. *PLoS One*. 2014;9(10):e111128.
137. Tholking G, Schutte-Nutgen K, Schmitz J, Rovas A, Dahmen M, Bautz J, et al. A Low Tacrolimus Concentration/Dose Ratio Increases the Risk for the

- Development of Acute Calcineurin Inhibitor-Induced Nephrotoxicity. *J Clin Med*. 2019;8(10).
138. Jouve T, Fonrose X, Noble J, Janbon B, Fiard G, Malvezzi P, et al. Transplantation Publish Ahead of Print. 2019.
139. Koklu S, Gulsen MT, Tuna Y, Koklu H, Yuksel O, Demir M, et al. Differences in nephrotoxicity risk and renal effects among anti-viral therapies against hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther*. 2015;41(3):310-9.
140. Ong KL, Waters DD, Fayyad R, Vogt L, Melamed S, DeMicco DA, et al. Relationship of High-Density Lipoprotein Cholesterol With Renal Function in Patients Treated With Atorvastatin. *J Am Heart Assoc*. 2018;7(2).
141. Sapir-Pichhadze R, Wang Y, Famure O, Li Y, Kim SJ. Time-dependent variability in tacrolimus trough blood levels is a risk factor for late kidney transplant failure. *Kidney Int*. 2014;85(6):1404-11.
142. Satoh S, Saito M, Inoue K, Miura M, Komatsuda A, Habuchi T. Association of cytokine polymorphisms with subclinical progressive chronic allograft nephropathy in Japanese renal transplant recipients: preliminary study. *Int J Urol*. 2007;14(11):990-4.

