

# Szívtranszplantációt követő kilökődés noninvazív diagnosztikája – A donoreredetű sejtmentes DNS mérésének lehetősége a gondozás során

Teszák Tímea<sup>1</sup>, Bödör Csaba<sup>2</sup>, Hegyi Lajos<sup>2</sup>, Lévy Luca<sup>2</sup>,  
Nagy Ákos<sup>2</sup>, Fintha Attila<sup>2</sup>, Pólos Miklós<sup>1</sup>,  
Hartyánszky István<sup>1</sup>, Merkely Béla<sup>1</sup>, Sax Balázs<sup>1</sup>



A szerző  
video-összefoglalója

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika, Budapest

<sup>2</sup>Semmelweis Egyetem, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Molekuláris Diagnosztika Részleg, Budapest

Levelezési cím:

Dr. Teszák Tímea, 1122 Budapest, Városmajor utca 68. E-mail: teszak.timea@med.semmelweis-univ.hu

**Bevezetés:** A szívtranszplantátum kilökődése a modern immunsuppresszív gyógyszeres kezelés mellett is a graft-diszfunkció, hospitalizáció és halálozás egyik fő etiológiai tényezője. A rejekció diagnosztikájában használatos, reguláris surveillance során végzett invazív transzvenás endomiokardiális biopszia (EMB) azonban a hospitalizáció mellett számos potenciális szövődémmel bír, interpretálását magas interobszerver variabilitás jellemzi. A rejekció megítélésében használatos noninvazív eljárások nagy klinikai jelentőséggel bírnak. A graftkárosodást jellemző donoreredetű sejtmentes DNS (dd-cfDNA) a recipiens szérumból mutatható ki új generációs szekvenálás (NGS) alkalmazásával, szintje már az EMB által igazolt kilökődést megelőzően emelkedést mutat és magas negatív prediktív értékkel bír.

**Célkritériumok:** Munkánk során a dd-cfDNA-assay beállításával és bevezetésével kapcsolatos első magyarországi tapasztalatainkat kívánjuk megosztani.

**Módszerek:** Részben keresztmetszeti, részben longitudinális vizsgálatunkban a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikán gondozott, 2021. decembertől dd-cfDNA-vizsgálaton (CareDx AlloSeq) átesett szívtranszplantált betegek eredményeit tekintjük át. A méréseket legalább 14 nappal a szívatültetést követően végeztük, a több szervtranszplantáció kizárási kritériumot jelent. Az eredmény a keringő donoreredetű cfDNA és plazma teljes (recipiens és donoreredetű) cfDNA arányát mutatja: a 0,20% alatti dd-cfDNA-érték negatívnak minősül, a 0,35% vagy afölötti érték súlyos graftkárosodásra utal, a két érték közötti eredmények szürke zónába esnek.

**Eredmények:** A minőségbiztosítási eredmények a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika Részlegén beállított új generációs szekvenálási mérések megbízhatóságát és reprodukálhatóságát igazolták. A dd-cfDNA-assay-t 27 esetben rutin EMB-vel párhuzamosan végeztük, 2 esetben magas dd-cfDNA-érték miatt végeztünk EMB-t. A kezelést igénylő kilökődéstől mentes betegek dd-cfDNA-értéke alacsony maradt (0,10% [0,03%–0,21%]). A for-cause EMB-k antitest-mediálta kilökődést igazoltak. A negatív dd-cfDNA-értékek alapján a reguláris surveillance EMB-k 92%-a, 60 db EMB elhagyható volt.

**Következtetés:** A perifériás vérmintából végzett dd-cfDNA-vizsgálat mellett biztonságosan csökkenthető az invazív EMB-k száma. A korai graftkárosodás kimutatása által lehetőség nyílik az immunsuppresszív terápia korai és személyre szabott módosítására a súlyosabb fokú kilökődés és irreverzibilis graftkárosodás megelőzése, illetve a gyógyszer-toxicitás elkerülése érdekében.

**Kulcsszavak:** allograft-rejekció, donoreredetű sejtmentes DNS, graftkárosodás, szívtranszplantáció, új generációs szekvenálás

## Noninvasive detection of allograft injury after heart transplantation – Utilization of donor-derived cell-free DNA assay in the management of heart transplant recipients

**Background:** Cardiac allograft rejection is a major etiological factor of graft dysfunction, hospitalisation, and death after heart transplantation (HTx). Endomyocardial biopsy (EMB) is still considered gold standard method of monitoring rejection; however, besides the need for hospitalisation, common concerns are its complications, and high interobserver variability in its interpretation. Noninvasive methods for diagnosing allograft injury are of paramount importance. Donor-derived cell-free DNA (dd-cfDNA) characterizes graft injury and it can be isolated from the recipient's sera and quantified using next-generation sequencing (NGS). Elevated dd-cfDNA levels precede the diagnosis of rejection on EMB, and possess high negative predictive value.

**Purpose:** We aimed to present the first Hungarian experience with dd-cfDNA assay for allograft rejection surveillance.

**Methods:** Analysis was performed on the clinical data of HTx recipients who have undergone dd-cfDNA testing (CareDx AlloSeq) since December 2021. The assay was performed  $\geq 14$  days after HTx. The amount of dd-cfDNA is measured relative to the total amount of cfDNA derived from a plasma sample. A dd-cfDNA level of  $< 0.20\%$  is considered negative, while severe injury threshold is at  $\geq 0.35\%$ .

**Results:** We analysed 107 dd-cfDNA data points of 43 HTx patients in our cross-sectional and longitudinal study. In 27 cases, dd-cfDNA testing was paired with routine EMB, while elevated dd-cfDNA values indicated for-cause EMB in 2 cases. Patients without rejection episodes had low dd-cfDNA values ( $0.10\%$  [ $0.03\%–0.21\%$ ]). For-cause EMBs proved antibody-mediated rejection. Owing to normal dd-cfDNA levels, 60 EMBs, i.e. 92% of routine surveillance EMBs could be avoided.

**Conclusions:** The noninvasive dd-cfDNA assay safely decreases the rate of invasive surveillance EMBs. Since it has the potential to detect early signs of graft injury, it opens the door to earlier and more personalized titration of immunosuppressive therapy, thus avoiding its toxicities, more severe allograft rejection, and irreversible graft dysfunction.

**Keywords:** allograft rejection, donor-derived cell-free DNA, graft injury, heart transplantation, next-generation sequencing

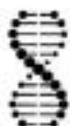
### Szívtranszplantációt követő kilökődés noninvazív diagnosztikája – A donor eredetű sejtmentes DNS mérésének lehetősége a gondozás során



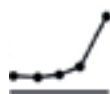
A szívtranszplantátum **kilökődése** a **graftdiszfunkció**, **hospitalizáció** és **halálozás** egyik fő etiológiai tényezője.



A rejeckió surveillance során használatos **invazív szívizombiopszia** a **hospitalizáció** mellett számos **szövődménnyel** járhat és **interpretálását magas interobszerver variabilitás** jellemzi.



Graftkárosodás esetén **donor eredetű sejtmentes DNS** (dd-cfDNA) szabadul fel, amely a **recipiens plazmájából** mutatható ki mennyiségi analízissel: keringő dd-cfDNA/plazma cfDNA aránya.



A **magas dd-cfDNA-érték graftkárosodásra** utal. Az assay **magas negatív prediktív értékkel** bír és **nagy pontossággal** képes **kizárni a kilökődést**. Longitudinális vizsgálatunkban a rutin **szívizombiopsziák 92%-a biztonságosan elhagyható volt**, missed rejeckiót nem észleltünk.

#### KONKLÚZIÓ:

- a **dd-cfDNA** az **allograft-károsodás** és **rejeckió** surveillance **megbízható, noninvazív biomarkere**
- jelentős mértékben **csökkenti** a reguláris invazív **szívizombiopsziák szükségességét**
- akut **rejeckió érzékenyebb és korai felismerése** lehetővé válik

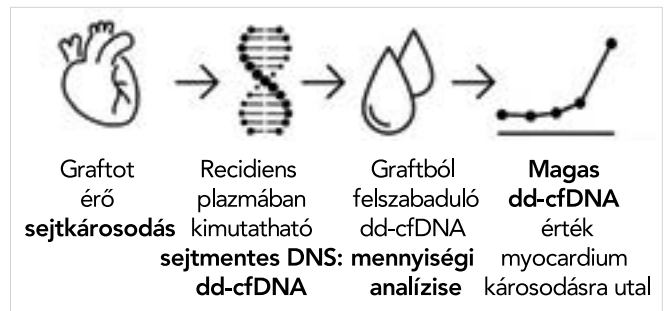
GRAFIKAI ABSZTRAKT

## Bevezetés

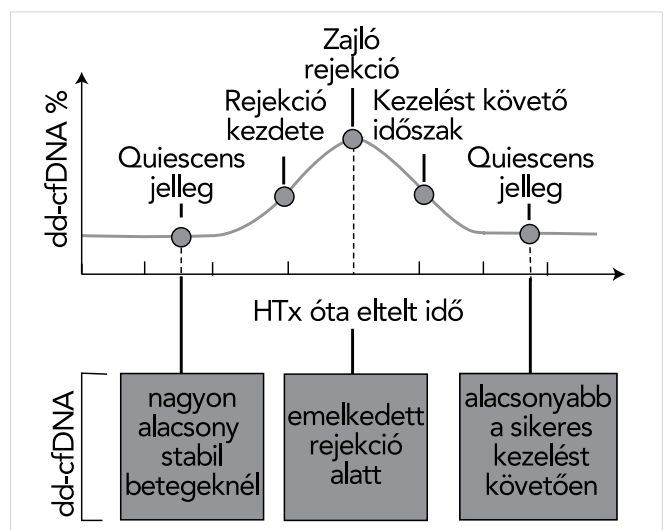
A szívtranszplantáció (HTx) az előrehaladott szívelégtelenség gold standard terápiája, amely az életszínvonal és a funkcionális kapacitás nagymértékű javulásával jár (1–3). A szívtranszplantátum kilökődése azonban a grafterdiszfunkció, hospitalizáció és halálozás egyik fő etiológiai tényezője (3). A rejekció diagnosztikájában használatos, jelenleg gold standard invazív transzvenás szívizombiopszia (EMB) a betegek számára megterhelő, hospitalizáció szükségességével és számos szövödménnyel járhat (punkciós szövödmények, pneumothorax, tüdőembólia, haemopericardium, perikardiális tamponád, pitvari és kamrai ritmuszavarok, tricuspidalis billentyűsérülés és következményes organikus tricuspidalis regurgitáció). Szöveti interpretálását magas interobserver variabilitás jellemzi, illetve a kilökődés korai fázisának kimutatására nem szenzitív módszer (4–10).

A noninvaszív eljárások nagy klinikai jelentőséggel bírnak a rejekció megítélésében. A korábbiakban felmerült biomarkerek (pl. troponin, nátriuretikus peptidek) és eszközös vizsgálatok (pl. EKG, echokardiográfia, szív-MRI) egyike sem elég szenzitív vagy specifikus önmagában a kilökődés folyamatának megítélésére. A donoreredetű sejtmentes DNS (dd-cfDNA) rövid, extracelluláris DNS-fragmentum, amely az allograft sejtjeiből szabadul fel, így kizárólag a donorszerv károsodásának markere és a recipiens plazmájából mutatható ki (1. ábra). Az assay a transzplantátumot ért direkt károsodás kvantifikálásával a grafterkárosodás objektívebb és pontosabb kimutatását teheti lehetővé (6). A dd-cfDNA értéke alacsony stabil állapotú, kezelést nem igénylő kilökődéssel bíró betegek esetében. Az akut rejekció – mind akut celluláris (ACR), mind antitest-mediálta rejekció (ABMR) – esetén nagyobb mennyiségű dd-cfDNA szabadul fel a keringésbe a károsodott allograftból a myocytanekrózis és apoptózis következtében. Értéke korrelál mind az ACR, mind az ABMR súlyossági fokával. Szintje magasabb alloszenzitizáció és ABMR esetén, mint ACR diagnózisakor (6–8). A rövid cfDNA-fragmentumok és a guanozin-citozin bázisok aránya ABMR esetén a legnagyobb (7). A dd-cfDNA értéke korrelál a grafterdiszfunkció súlyosságával, illetve de novo donorspecifikus antitest (DSA) megjelenésekor emelkedést mutat (6–8,11). Az akut rejekció kezelését követően a terápiára adott válaszként értéke csökken (2. ábra). A cfDNA féléletideje rövid (30 perc-2 óra), így a vizsgálat a rejekció monitorizálása és az antirejekciós kezelés hatékonyságának ellenőrzése céljából napokon belül megismételhető.

A dd-cfDNA-assay magas negatív prediktív értékkel bír (6–8). A D-OAR-vizsgálatban a 0,2%-os cut-off értéknél a negatív prediktív értéke 97,1%-nak bizonyult, a GRAFT-vizsgálatban a 0,25% dd-cfDNA cut-off értéknél 99,2%-os negatív prediktív értéket igazoltak (6, 7). Következésképpen a módszer nagy pontossággal képes kizárni a kilökődést és így minimalizálni az invazív



1. ÁBRA. Grafterkárosodáskor a donor szívizomsejtekből sejtmentes DNS szabadul fel a recipiens plazmájába, ami emelkedett donoreredetű sejtmentes DNS- (dd-cfDNA) értékhez vezet



2. ÁBRA. A dd-cfDNA értéke alacsony stabil állapotú betegeknél. Szintje már az EMB által igazolt kilökődést megelőzően emelkedést mutat, majd az akut rejekció kezelését követően a terápiára adott válaszként értéke csökken

surveillance EMB-k számát, amely kiemelt jelentőséggel bír az antikoagulált, anatómiai variációval bíró betegcsoportban (6, 7, 11).

A módszer lehetőséget nyújt a kilökődés korai fázisban történő felismerésére. Szintje már a grafterdiszfunkciót és az EMB által igazolt kilökődést megelőzően 0,5-5 hónappal emelkedést mutat mind ACR, mind ABMR esetén (utóbbi esetén szintje korábban indul emelkedésnek) (6, 7, 11–13). A grafterkárosodás korai, még az előrehaladott immunrendszeri aktiváció okozta hisztopatológiai eltérések megjelenése előtt történő felismerése lehetővé teszi az immunosuppresszív terápia korai és személyre szabott módosítását a súlyosabb fokú kilökődés, kardiális allograft vasculopathia és irreverzibilis grafterkárosodás megelőzése, illetve gyógyszer-toxicitás elkerülése érdekében. A korai grafterkárosodás igazolása nagy jelentőséggel bír a magas rizikójú betegek utánkövetésében. Amennyiben a dd-cfDNA-érték megemelkedik, az EMB által kimutatott grafterkárosodás vagy kilökődés típusának patológiai megítélésére

a pontos terápiás terv felállításában játszik szerepet. Emelkedett dd-cfDNA-érték mellett negatív EMB-vel bíró páciensek esetében az immun-suppresszív terápia mértékének, az adherencia, a grafftunkció, a koronáriastátusz és a DSA, továbbá szelektált esetekben az intragraft génextpressziós mintázat meghatározása szükséges, illetve fontos a szoros surveillance (6, 7, 10, 12–18).

A dd-cfDNA az immunrendszer aktivációjának és a sejt-károsodásnak a szenzitív markere, így értékét az akut kilökődés mellett a miokardiális iszkémia, trauma és koszorúér-betegség is befolyásolhatja. A korai poszttranszplantációs időszakban a hideg iszkémia és a szívátültetés, mint noxa miatt értéke emelkedett lehet (6–8). Egy megelőző vizsgálat az assay stabilitását a 14. poszttranszplantációs napot követően igazolta (6). A dd-cfDNA-értékek stabilak és alacsony szinten stagnálnak az első két poszttranszplantációs év során akut rejekcióval nem bíró betegek esetében. A korai posztoperatív időszakban a dd-cfDNA-szint csökkenésének elmaradása, illetve az emelkedett értékek összefüggést mutatnak az adverz kimenetellel (mortalitás, retranszplantáció, graftdiszfunkció) (6–8). Az assay alkalmazása során kizárási kritérium a több szervtranszplantáció, a monozigóta ikertestvér-eredetű transzplantátum, allogén csontvelő-transzplantáció, 30 napon belül végzett, fehérvérsejtet tartalmazó vérkészítmény transzfúziója, terhesség, illetve 24 órán belül elvégzett EMB.

A noninvaszív diagnosztikai módszer növeli a páciensek megelégedettségét és biztonságosságát (11, 19–21). A dd-cfDNA-assay alkalmazása elsősorban a szubklinikus rejekciót kiszűrő teszt céljából javasolt a stabil transzplantált populációban (11, 19, 20). A rejekció klinikumával jelentkező betegek esetében továbbra is for-cause EMB elvégzése ajánlott. A szolid szervtranszplantáció területén a kereskedelemben jelenleg elérhető stand-alone dd-cfDNA-assay-k (Prospera Heart, Natera; Viracor TRAC, Eurofins Viracor és AlloSeq, CareDx) közül egyedül a CareDx AlloSeq cfDNA kit rendelkezik diagnosztikai használat céljára CE-IVD-minősítéssel az Európai Unióban (2020) (11). Az új generációs szekvenálás módszerén (next-generation sequencing [NGS]) alapuló assay-k az Egyesült Államokban széles körben elérhetők, ahol centralizált molekuláris diagnosztikai mérésekkel, obszervációs és prospektív, multicentrikus klinikai vizsgálatok keretében igazolták a dd-cfDNA-assay kardiális allograft-károsodás, rejekció és graftdiszfunkció diagnosztikájában betöltött szerepét (6–8, 11, 12, 15, 22).

## Célkitűzés

Vizsgálatunkban a dd-cfDNA-assay beállításával és bevezetésével kapcsolatos első magyarországi tapasztalatainkat kívánjuk megosztani.

## Módszerek

Részben keresztmetszeti, részben longitudinális vizsgálatunkban a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikán gondozott, 2021. december-től dd-cfDNA-vizsgálaton (CareDx AlloSeq dd-cfDNA mennyiségi vizsgálat és kapcsolódó bioinformatikai analízis) átesett szívtranszplantált betegek eredményeit tekintjük át.

Keresztmetszeti vizsgálatunkba heterogén betegcsoportot vontunk be a HTx és a mintavételezés alkalmával megfigyelt életkort, a HTx és a mintavételezés közötti intervallumot, a rejekciós anamnézist (negatív rejekciós anamnézis, krónikus enyhe fokú sejt kilökődés, közepes fokú ACR, akut és krónikus ABMR, magas átlagos fluoreszcencia-intenzitású DSA jelenléte) és a graftdiszfunkció jelenlétét tekintetbe véve.

Rejekció surveillance céljából longitudinális vizsgálatunkba stabil, legalább 14 napja és maximum egy éve szívtranszplantált, alacsony rejekciós kockázattal bíró betegeket vontunk be.

A mintavételezést ( $\geq 8$  ml perifériás vér) cfDNA vérvételei vákuumcsőbe végeztük (Streck, La Vista, NE, USA), amely stabilizálja a sejtmagvas vörsejteket, hogy lehetővé tegye a jó minőségű cfDNA-extrakciót. A plazmából történő extrakcióját követően a cfDNA-t multiplex polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction [PCR]) módszerrel amplifikáltuk az irodalomban részletezett módszereknek megfelelően, amely 202 egy pontos nukleotid-polimorfizmushoz (single nucleotide polymorphisms [SNP]) tartalmaz PCR primereket (14, 23). A kapott PCR-termék szekvenálását NGS-eszközzel (MiSeq, Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) végeztük. A DNS szekvenálása által az SNP-k segítségével – amelyek különbséget mutatnak a donor és recipiens között – lehetővé válik a recipiens és donoreredetű DNS-fragmentumok kvantifikálása megelőző genotipizálás nélkül (14, 23). A szekvencia-adatokat CareDx AlloSeq cfDNA-szoftverrel analizáltuk (CareDx, San Francisco, CA, USA). A minőségellenőrzés során a minőségi küszöbököt az átlagos lefedettség, uniformitás és a sikeresen azonosított lókusok minimális értéke jelenti egy adott mintánál. Az eredmény a keringő dd-cfDNA és plazma cfDNA arányát mutatja: a  $< 0,20\%$  érték negatív, súlyos graftkárosodásra a  $\geq 0,35\%$  érték utal, a két érték közötti eredmények szürke zónába esnek (6).

A szívizombióptátum patológiai osztályozását ACR és ABMR tekintetében az ISHLT szerinti klasszifikáció alapján végeztük (24, 25).

A folytonos változókat medián (min-max) formában adtuk meg. A normalitás vizsgálatához D'Agostino–Pearson- és Shapiro–Wilk-teszteket használtunk. Csoportok összehasonlítására végzett statisztikai számítások során nem normáloszlás esetén Mann–Whitney U-tesztet használtunk. A  $p < 0,05$  értéket tekintettük szignifikánsnak. A statisztikai analízishez GraphPad Prism 6 szoftvert használtunk (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA).

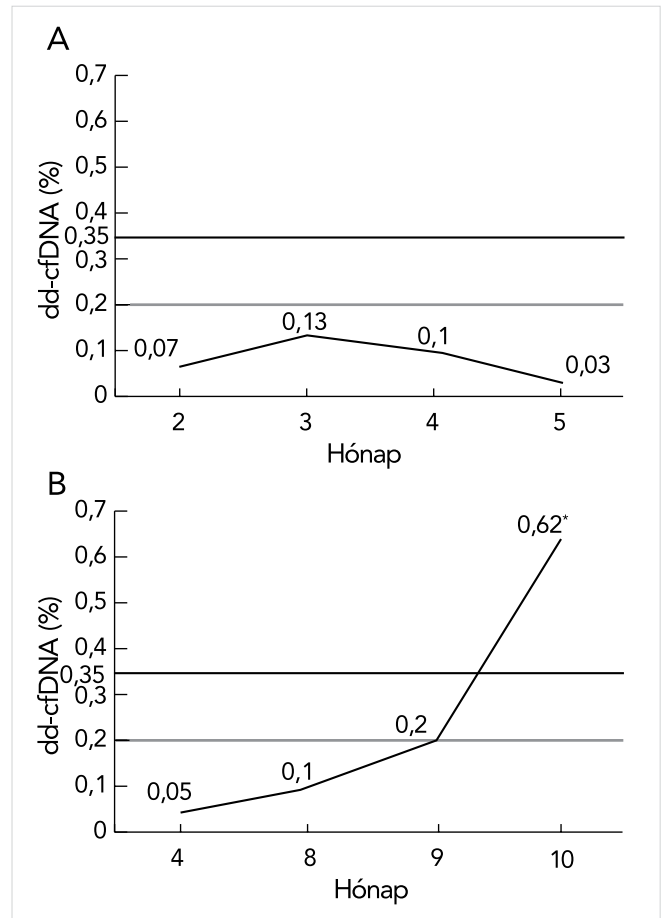
## Eredmények

A minőségbiztosítási eredmények a Semmelweis Egyetem Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet Molekuláris Diagnosztika Részlegén beállított új generációs szekvenálási mérések megbízhatóságát és reprodukálhatóságát igazolták. 2021. decembertől a keresztmetszeti vizsgálatunk során 33 beteg 42 mintáját vizsgáltuk meg. A mintavételezést medián 683 (36-6900) nappal a HTx-t követően, rutin ambuláns kontroll vagy EMB elvégzésével párhuzamosan végeztük. A minták 40%-a az első, 10%-a a második, 12%-a a harmadik poszttranszplantációs évben, míg 19%-a az ötödik poszt-HTx évet követően került levételre. A betegek életkora 56 (19–79) év volt a vizsgálatba történt bevonáskor. A páciensek 30%-a volt nő. Az első dd-cfDNA mintavételezést követő utánkövetési idő 264 (31–438) nap volt. A dd-cfDNA assay-t 27 esetben reguláris surveillance EMB-vel párhuzamosan végeztük és a kezelést igénylő kilökődéstől mentes betegek dd-cfDNA-értéke alacsony maradt (0,10% [0,03%–0,21%]) (3. a ábra). Két esetben a magas dd-cfDNA-érték következtében végeztünk for-cause EMB-t, amelyek a tünetmentesség ellenére ABMR-t igazoltak. Egy esetben a hagyományos EMB által kimutatott ABMR-t (pAMR2) megelőzően hat héttel észleltünk kiemelkedően magas dd-cfDNA-értéket (5,5%), az ekkor elvégzett EMB ABMR-t még nem igazolt. A biopátumok molekuláris fenotipizálása során három beteg esetében észleltünk ABMR-t, esetükben a medián dd-cfDNA-érték magas volt (3,2% [2,7%–5,9%]). ABMR esetén a medián dd-cfDNA-érték harminckétszer magasabb volt a kezelést igénylő kilökődéssel nem bíró betegek eredményénél (3,2% vs. 0,10%;  $p < 0,0001$ ) (4. ábra).

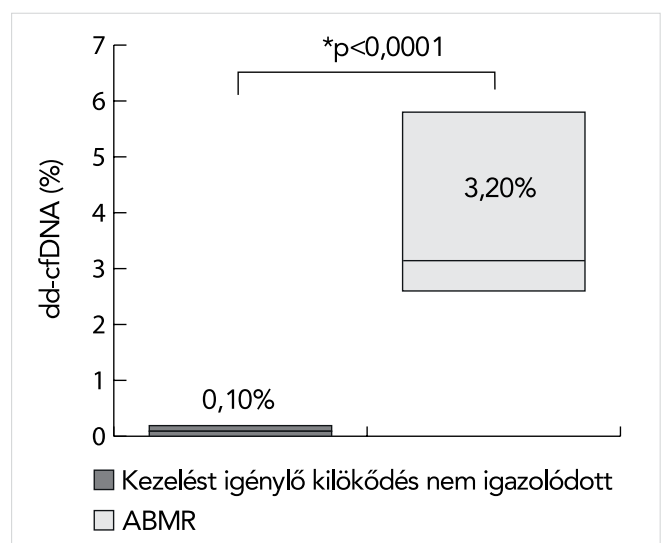
A 2022. októberben indított longitudinális vizsgálatunkban 21 beteg 65 dd-cfDNA-mintáját elemeztük. A mintavételezést és az új generációs szekvenálási méréseket havi gyakorisággal végeztük. A vizsgálati eredmény a cfDNA extrakcióját követő harmadik munkanapon volt elérhető. Öt hónap során 60 db reguláris EMB elhagyható volt a negatív dd-cfDNA-értékek alapján és így a surveillance EMB-k 92%-a volt eliminálható. Obszervációnk során missed rejekciót (azaz később a klinikum vagy egyéb vizsgálati eredmények által felvetett, EMB-vel megerősített kilökődést) nem észleltünk.

## Megbeszélés

Munkánk során szolid szervtranszplantált betegcsoportban, validált és standardizált dd-cfDNA-assay során nyert első magyarországi tapasztalatainkat mutattuk be. A korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan a stabil, kezelést igénylő rejekcióval nem bíró páciensek dd-cfDNA-értéke alacsony maradt. Az allograft-károsodást jellemző dd-cfDNA értéke megemelkedik akut allograft-rejeksió esetén és szintje korrelál mind az



3. ÁBRA. Két beteg dd-cfDNA eredményei: alacsony dd-cfDNA-értékek alapján a reguláris EMB elhagyható (A). Graftkárosodásra utaló, magas dd-cfDNA-érték következtében (B) végzett for-cause EMB (csillag) enyhe fokú sejt kilökődést igazolt



4. ÁBRA. ABMR esetén a medián dd-cfDNA-érték harminckétszer magasabb volt a kezelést igénylő rejekcióval nem bíró betegek eredményénél

ACR, mind az ABMR súlyossági fokával. ABMR esetén jelentősen magasabb értékeket észleltünk a rejekcióval nem bíró betegek eredményéhez képest, amelyek összevethetők a megelőző vizsgálatokkal (6–8). A preklinikai fejlesztések eredményei arra utalnak, hogy a későbbiekben a teszt esetleg alkalmas lehet a celluláris és az antitest-mediálta kilökődés elkülönítésére is a dd-cfDNA-fragmenshossz, genomi összetétel, a dd-cfDNA emelkedésének mértéke és időbeli lefolyása alapján (7).

Míg a hagyományos EMB szerepe limitált a manifeszt allograft-rejekciót megelőző graftkárosodás korai fázisának kimutatásában, korábbi vizsgálatok megerősítették, hogy a dd-cfDNA szintje az EMB-vel igazolt kilökődést megelőzően emelkedést mutat (6, 7, 10, 12–16, 26). A korai graftkárosodás kimutatása által az assay segítséget nyújthat az immunosuppresszív terápia vezetésében: a graftkárosodással nem bíró betegek esetében a kortikoszteroid és a kalcineurin-inhibitor dózisának intenzívebb leépítését, míg magas dd-cfDNA-értékekkel bíró betegeknél a dózisos emelését teheti lehetővé. Következésképpen az akut rejekció szempontjából nagy kockázatú betegek számára hatékonyabb immunosuppressziót tesz lehetővé, míg a stabil betegek körében ezen gyógyszerek mellékhatásai és toxicitása elkerülhetővé válnak. Az emelkedett dd-cfDNA-érték mellett negatív EMB-vel bíró páciensek szorosabb surveillance-t igényelnek.

A dd-cfDNA a graftkárosodás kvantitatív biomarkere, így az assay a transzplantátum károsodásának a hagyományos biopsziánál objektívebb és pontosabb meghatározását teheti lehetővé, a vizsgálat jól reprodukálható (7, 27). A dd-cfDNA-assay a >28 napja szívtranszplantáción átesett, alacsony rejekciós kockázattal bíró betegek esetében a szubklinikus rejekció surveillance megbízható módszerének bizonyult (7, 11). Longitudinális vizsgálatunkban igazoltuk, hogy alacsony dd-cfDNA-értékek mellett a reguláris EMB biztonságosan elhagyható. A rutin EMB-k 92%-át elimináltuk, ami magasabbnak bizonyult a megelőző vizsgálatokban leírtaknál (7, 21). Kiemelendő, hogy obszervációnk során missed rejekciót nem észleltünk. Miként a perifériás vérmintából végzett dd-cfDNA-vizsgálat csökkenti az invazív EMB-k számát, szövődményeit és a hospitalizáció szükségességét, következésképpen a noninvazív diagnosztikai módszer az egészségügyi költségcsökkentés irányába mutat (28).

## Következtetések

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a dd-cfDNA az allograft-károsodás és rejekció surveillance megbízható és reprodukálható noninvazív biomarkere a klinikai gyakorlatban, amely jelentős mértékben és biztonságosan csökkenti a reguláris invazív surveillance EMB-k

szükségességét és szövődményeit szívtranszplantációt követően. A korszerű noninvazív rejekció surveillance által lehetővé válik az akut rejekció érzékenyebb és korai felismerése, következésképpen az individualizált immunosuppresszív terápia, illetve a transzplantációt követő életminőség és kimenetel javulása. Munkánk alapjául szolgálhat egyéb szolid szervtranszplantáció területén is a dd-cfDNA-assay segítségével végzett noninvazív rejekció monitorizálás magyarországi bevezetésének és elterjedésének.

## Nyilatkozat

*A szerzők kijelentik, hogy az összefoglaló közlemény megírásával kapcsolatban nem áll fenn velük szemben pénzügyi vagy egyéb lényeges összeütközés, összeférhetetlenségi ok, amely befolyásolhatja a közleményben bemutatott eredményeket, az abból levont következtetéseket vagy azok értelmezését.*

## Irodalom

- McDonagh TA, Metra M, Adamo M, et al. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure. *Eur Heart J* 2021; 42(36): 3599–3726. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehab368>
- Mehra MR, Canter CE, Hannan MM, et al. The 2016 International Society for Heart Lung Transplantation listing criteria for heart transplantation: A 10-year update. *J Heart Lung Transplant* 2016; 35(1): 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2015.10.023>
- Khush KK, Cherikh WS, Chambers DC, et al. The International Thoracic Organ Transplant Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: Thirty-sixth adult heart transplantation report – 2019; focus theme: Donor and recipient size match. *J Heart Lung Transplant* 2019; 38(10): 1056–1066. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.08.004>
- Crespo-Leiro MG, Zuckermann A, Bara C, et al. Concordance among pathologists in the second Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observational Study (CARGO II). *Transplantation* 2012; 94(11): 1172–1177. <https://doi.org/10.1097/tp.0b013e31826e19e2>
- Marboe CC, Billingham M, Eisen H, et al. Nodular endocardial infiltrates (Quilty lesions) cause significant variability in diagnosis of ISHLT Grade 2 and 3A rejection in cardiac allograft recipients. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24(7 Suppl): S219–226. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2005.04.001>
- Khush KK, Patel J, Pinney S, et al. Noninvasive detection of graft injury after heart transplant using donor-derived cell-free DNA: A prospective multicenter study. *Am J Transplant* 2019; 19(10): 2889–2899. <https://doi.org/10.1111/ajt.15339>
- Agbor-Enoh S, Shah P, Tunc I, et al. Cell-Free DNA to Detect Heart Allograft Acute Rejection. *Circulation* 2021; 143(12): 1184–1197. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.120.049098>
- Kim PJ, Olymbios M, Siu A, et al. A novel donor-derived cell-free DNA assay for the detection of acute rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2022; 41(7): 919–927. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2022.04.002>
- Kittleson MM, Garg S. Solid Gold, or Liquid Gold? Towards a New Diagnostic Standard for Heart Transplant Rejection. *Circulation* 2021; 143(12): 1198–1201. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.120.052925>
- Kobashigawa JA. The Search for a Gold Standard to Detect Rejection in Heart Transplant Patients: Are We There Yet? *Circulation* 2017; 135(10): 936–938. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.117.026752>
- Holzhauser L, DeFilippis EM, Nikolova A, et al. The End of En-

- domyocardial Biopsy? A Practical Guide for Noninvasive Heart Transplant Rejection Surveillance. *JACC Heart Fail* 2023. <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2022.11.002>
12. De Vlaminck I, Valentine HA, Snyder TM, et al. Circulating cell-free DNA enables noninvasive diagnosis of heart transplant rejection. *Sci Transl Med* 2014; 6(241): 241ra277. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007803>
13. Snyder TM, Khush KK, Valentine HA, Quake SR. Universal noninvasive detection of solid organ transplant rejection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108(15): 6229–6234. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013924108>
14. Grskovic M, Hiller DJ, Eubank LA, et al. Validation of a Clinical-Grade Assay to Measure Donor-Derived Cell-Free DNA in Solid Organ Transplant Recipients. *J Mol Diagn* 2016; 18(6): 890–902. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2016.07.003>
15. Richmond ME, Zangwill SD, Kindel SJ, et al. Donor fraction cell-free DNA and rejection in adult and pediatric heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2020; 39(5): 454–463. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2019.11.015>
16. Beck J, Oellerich M, Schulz U, et al. Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Transplant Proc* 2015; 47(8): 2400–2403. <https://doi.org/10.1016/j.transproceed.2015.08.035>
17. Halloran PF, Madill-Thomsen K, Aliabadi-Zuckermann AZ, et al. Many heart transplant biopsies currently diagnosed as no rejection have mild molecular antibody-mediated rejection-related changes. *J Heart Lung Transplant* 2022; 41(3): 334–344. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2021.08.004>
18. Loupy A, Duong Van Huyen JP, Hidalgo L, et al. Gene Expression Profiling for the Identification and Classification of Antibody-Mediated Heart Rejection. *Circulation* 2017; 135(10): 917–935. <https://doi.org/10.1161/circulationaha.116.022907>
19. Pham MX, Teuteberg JJ, Kfoury AG, et al. Gene-expression profiling for rejection surveillance after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 2010; 362(20): 1890–1900. <https://doi.org/10.1056/nejmoa0912965>
20. Kobashigawa J, Patel J, Azarbal B, et al. Randomized pilot trial of gene expression profiling versus heart biopsy in the first year after heart transplant: early invasive monitoring attenuation through gene expression trial. *Circ Heart Fail* 2015; 8(3): 557–564. <https://doi.org/10.1161/circheartfailure.114.001658>
21. Amadio JM, Rodenas-Alesina E, Superina S, et al. Sparing the Prod: Providing an Alternative to Endomyocardial Biopsies With Noninvasive Surveillance After Heart Transplantation During COVID-19. *CJC Open* 2022; 4(5): 479–487. <https://doi.org/10.1016/j.cjco.2022.02.002>
22. North PE, Ziegler E, Mahnke DK, et al. Cell-free DNA donor fraction analysis in pediatric and adult heart transplant patients by multiplexed allele-specific quantitative PCR: Validation of a rapid and highly sensitive clinical test for stratification of rejection probability. *PLoS One* 2020; 15(1): e0227385. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227385>
23. Sharon E, Shi H, Kharbanda S, et al. Quantification of transplant-derived circulating cell-free DNA in absence of a donor genotype. *PLoS Comput Biol* 2017; 13(8): e1005629. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005629>
24. Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. *J Heart Lung Transplant* 2005; 24(11): 1710–1720. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2005.03.019>
25. Berry GJ, Burke MM, Andersen C, et al. The 2013 International Society for Heart and Lung Transplantation Working Formulation for the standardization of nomenclature in the pathologic diagnosis of antibody-mediated rejection in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2013; 32(12): 1147–1162. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2013.08.011>
26. Hidestrand M, Tomita-Mitchell A, Hidestrand PM, et al. Highly sensitive noninvasive cardiac transplant rejection monitoring using targeted quantification of donor-specific cell-free deoxyribonucleic acid. *J Am Coll Cardiol* 2014; 63(12): 1224–1226. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.09.029>
27. Agbor-Enoh S, Tunc I, De Vlaminck I, et al. Applying rigor and reproducibility standards to assay donor-derived cell-free DNA as a non-invasive method for detection of acute rejection and graft injury after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2017; 36(9): 1004–1012. <https://doi.org/10.1016/j.healun.2017.05.026>
28. Evans RW, Williams GE, Baron HM, et al. The economic implications of noninvasive molecular testing for cardiac allograft rejection. *Am J Transplant* 2005; 5(6): 1553–1558. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.00869.x>