

Noninvazív rejekció utánkövetése szolid szervek átültetését követően: a donoreredetű sejtmentes DNS vizsgálata

Teszák Tímea dr.¹ ▪ Bödör Csaba dr.² ▪ Hegyi Lajos² ▪ Lévy Luca²
Nagy Beáta dr.² ▪ Finttha Attila dr.² ▪ Merkely Béla dr.¹ ▪ Sax Balázs dr.¹

¹Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinika, Budapest

²Semmelweis Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézet, Budapest

A szolidszerv-transzplantátum kilökődése a modern immunszuppresszív kezelés mellett is a grafitdyszfunkció, a hospitalizáció és a halálozás egyik fő etiológiai tényezője. A rejekció diagnosztikájában 'gold standard' invazív biopszia azonban a hospitalizáció mellett számos szövődménnyel járhat, interpretálását nagy interobserver variabilitás jellemzi. A rejekció megítélésében a noninvazív módszerek ezért nagy klinikai jelentőséggel bírnak. A grafitkárosodást jellemző donoreredetű sejtmentes DNS (dd-cfDNA) a recipiens szérumból mutatható ki, szintje már a biopszia által igazolt kilökődést megelőzően emelkedést mutat, és magas negatív prediktív értékkel bír. Munkánk során a dd-cfDNA-assay szolid szerv (vese, máj, szív, tüdő, hasnyálmirigy) transzplantációját követően betöltött szerepét vizsgáltuk az elérhető irodalom összefoglalásával, továbbá a szívtranszplantáltak körében a rutin klinikai gyakorlatba 2022. októberben bevezetett dd-cfDNA-alapú rejekció utánkövetése során nyert első hazai eredményeinket kívánjuk megosztani. Cardialis allograftrejekció utánkövetése során 46 szívtranszplantált beteg 264 dd-cfDNA-mintáját elemeztük. Az eredmény a keringő donoreredetű sejtmentes DNS és a plazma teljes (recipiens- és donoreredetű) sejtmentes DNS arányát mutatja: a $\geq 0,20\%$ dd-cfDNA-érték károsodásra, míg a $\geq 0,35\%$ dd-cfDNA-szint súlyos grafitkárosodásra utal. A dd-cfDNA-minták 80%-a $< 0,20\%$ értéket mutatott. Myocardium-károsodásra utaló dd-cfDNA-érték következtében összesen 20 szívizom-biopsziát végeztünk: kilökődés 6 esetben igazolódott. 16 hónap során 232, a reguláris surveillance-biopsziák 88%-a biztonságosan elhagyható volt a dd-cfDNA-értékek alapján. A korai grafitkárosodás kimutatása által lehetőség nyílik az immunszuppresszív terápia korai és személyre szabott módosítására a súlyosabb fokú kilökődés és az irreverzibilis grafitkárosodás megelőzése, illetve a gyógyszertoxicitás elkerülése érdekében. Orv Hetil. 2024; 165(33): 1275–1285.

Kulcsszavak: allograft-rejekció, donoreredetű sejtmentes DNS, grafitkárosodás, szívtranszplantáció, szolidszerv-transzplantáció

Noninvasive rejection surveillance after solid organ transplantations: analysis of the donor-derived cell-free DNA

Solid organ transplant rejection is a major etiological factor of graft dysfunction, hospitalisation, and death. Invasive biopsy is still considered the gold standard method of monitoring rejection; however, besides the need for hospitalisation, common concerns are its complications and the high interobserver variability. Thus, noninvasive methods for monitoring 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. Elevated dd-cfDNA levels precede the diagnosis of rejection on biopsy and possess high negative predictive value. We aimed to analyze the role of dd-cfDNA testing after solid organ (kidney, liver, heart, lung, and pancreas) transplantation and to present the first Hungarian results with the dd-cfDNA-based routine heart allograft rejection surveillance programme. Since October 2022, dd-cfDNA testing has been performed on 264 occasions in 46 heart transplant recipients. The amount of dd-cfDNA is measured relative to the total amount of cell-free DNA derived from a plasma sample. A dd-cfDNA level of $\geq 0.20\%$ indicates injury, while severe injury threshold is at $\geq 0.35\%$. 80% of dd-cfDNA data points were below the injury threshold. Meanwhile, elevated dd-cfDNA values indicated 20 for-cause endomyocardial biopsies (EMB). Six heart allograft rejection episodes were diagnosed. Based on the dd-cfDNA levels, 232 EMBs, *i.e.*, 88% of routine surveillance biop-

sies that would have otherwise been performed over 16 months were safely avoided. 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, solid organ transplantation

Teszák T, Bödör Cs, Hegyi L, Lévy L, Nagy B, Fintha A, Merkely B, Sax B. [Noninvasive rejection surveillance after solid organ transplantations: analysis of the donor-derived cell-free DNA]. *Orv Hetil.* 2024; 165(33): 1275–1285.

(Beérkezett: 2024. május 29.; elfogadva: 2024. június 16.)

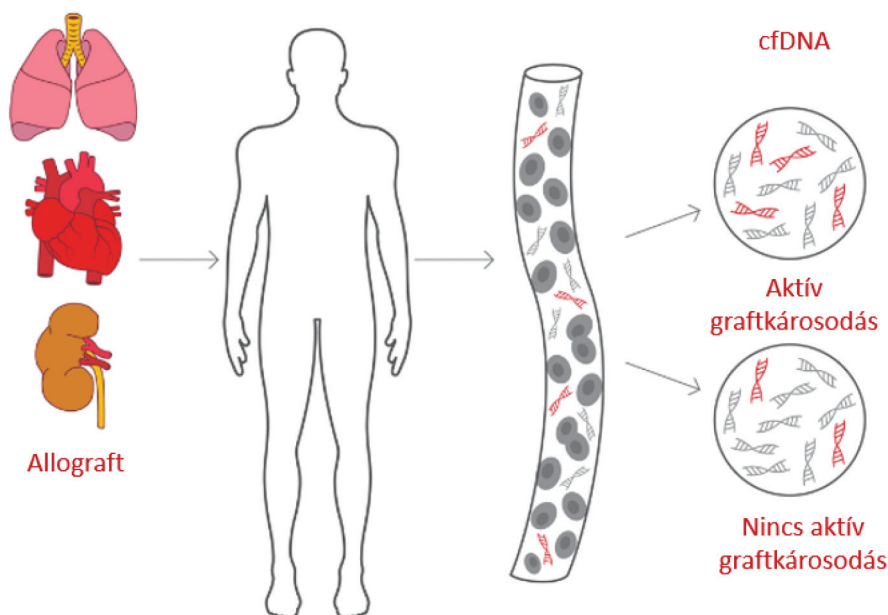
Rövidítések

ABMR = (antibody-mediated rejection) antitestmediált rejeckció; ACR = akut celluláris rejeckció; ALAD = (acute lung allograft dysfunction) akut tüdőallograft-diszfunkció; AUC = (area under the curve) görbe alatti terület; CE = (Conformité Européenne) európai megfelelés; cfDNA = (cell-free DNA) sejtmentes DNS; CLAD = (chronic lung allograft dysfunction) krónikus tüdőallograft-diszfunkció; dd-cfDNA = (donor-derived cell-free DNA) donoreredetű sejtmentes DNS; dnDSA = *de novo* donorspecifikus antitest; DNS = dezoxiribonukleinsav; DSA = donorspecifikus antitest; EMB = (endomyocardial biopsy) szívizom-biopszia; FEV1 = (forced expiratory volume in 1 second) egy másodperc alatti forszírozott kilégzési volumen; HLA = humán leukocytantigén; IQR = (interquartile range) interkvartil tartomány; ISHLT = (International Society for Heart and Lung Transplantation) Nemzetközi Szív- és Tüdőtranszplantációs Társaság; IVD = *in vitro* diagnosztikai orvostechnikai eszköz; MRI = (magnetic resonance imaging) mágnesesrezonancia-képzéskészítés; NGS = (next-generation sequencing) újgenerációs szekvenálás; pAMR = (pathology antibody-mediated rejection) patológiailag igazolt antitestmediált kilökődés; PCR = (polymerase chain reaction) polimerázláncreakció; RNS = ribonukleinsav; SNP = (single nucleotide polymorphism) egypontos nukleotid-polimorfizmus

A végstádiumú szervéltelenség (vese, máj, szív, tüdő, hasnyálmirigy) definitív terápiája az allogén szervtranszplantáció. A modern immunosuppresszív gyógyszeres kezelés mellett a beültetett szerv kilökődése továbbra is a grafitdiszfunkció, a hospitalizáció és a halálozás egyik fő tényezője [1–7]. A beültetett szervben végbemenő kilökődési reakció állapotát mutató invazív biopszia a betegek számára megterhelő, hospitalizációval, számos szövődémmel és mintavételezési elégtelenséggel járhat. Szöveti értékelését nagy interobszerver variabilitás jellemzi, és a kilökődés korai fázisának kimutatására nem szenzitív módszer [8–16]. A korábbiakban felmerült biomarkerek (például szérumkreatinin, -glükóz, -amiláz és -lipáz, májfunkciós paraméterek, troponin, natriuretikus peptidek, mikro-RNS és eszközös vizsgálatok, például hasi ultrahangvizsgálat, elektrokardiográfia, echokardiográfia, szív-MRI, légzésfunkciós teszt) egyike sem elég szenzitív vagy specifikus önmagában a kilökődés folyamatának megítélésére [17–23]. A noninvazív eljárás-

sok ezért nagy klinikai jelentőséggel bírnak a rejeckió megítélésében.

A sejtmentes DNS (cfDNA) klinikai gyakorlatban történő alkalmazása az 1948. évi felfedezését követően számos indikációval bír [24, 25]. A donoreredetű sejtmentes DNS (dd-cfDNA) szolid szerv-transzplantáció területén történő alkalmazása 1998 után terjedt el, amikor elsőként vese- és májtranszplantált betegek plazmájában mutatták ki [26]. A dd-cfDNA rövid, extracelluláris DNS-fragmentum, mely az átültetett szerv sejtjeiből szabadul fel, így kizárólag a donorszerv károsodásának markere, és a recipiens plazmájából mutatható ki. A vizsgálati eredmény a recipienseredetű cfDNA és a donor plazmájában észlelhető teljes cfDNA százalékos arányát (%) vagy a dd-cfDNA abszolútértékét jelöli (kópia/ml, ng/ml) [26, 27]. A dd-cfDNA értéke alacsony a stabil állapotú, kezelést nem igénylő kilökődéssel bíró betegek esetében [21, 28–32]. Az akut rejeckió – akut celluláris (ACR) és antitestmediált rejeckió (ABMR) – esetén nagyobb mennyiségű dd-cfDNA szabadul fel a keringésbe a károsodott allograftból a beültetett szerv sejtjeinek nekrozisa és apoptozisa következtében (*1. ábra*) [33]. Értéke korrelál mind az ACR, mind az ABMR súlyossági fokával, a grafitdiszfunkció súlyosságával, illetve *de novo* donorspecifikus antitest (dnDSA) megjelenésekor is emelkedést mutat. A módszer lehetőséget nyújt a kilökődés korai fázisban történő felismerésére: szintje már a grafitdiszfunkciót és a biopszia által igazolt kilökődést megelőzően 0,5–5 hónappal emelkedést mutat mind ACR, mind ABMR esetén (az utóbbi esetén szintje korábban indul emelkedésnek). Ebben a fázisban az egyéb laboratóriumi markerek vagy a biopátum hagyományos patológiai vizsgálata eltérést még nem igazol [16, 19–21, 28–36]. Az akut rejeckió kezelését követően a terápiára adott válaszként a dd-cfDNA értéke csökken, és a kilökődésre adott terápia hatékonyságának utánkövetésére is alkalmas. Az antirejeckió kezelését követően az emelkedett dd-cfDNA-érték csökkenésének elmaradása szteroidrezisztens kilökődésre vagy nem rejeckióhoz társult grafitkárosodásra vezethető vissza [9, 21, 32, 37, 38]. A dd-cfDNA értéke emelkedett az elégtelen mértékű immunosuppresszió következtében az immunaktiváció okozta grafitkárosodás miatt, így vizsgálata elősegítheti



1. ábra

A dd-cfDNA rövid, extracelluláris DNS-fragmentum, mely az átültetett szerv sejtjeiből szabadul fel, így kizárólag a donorszerv károsodásának markere, és a recipiens plazmájából mutatható ki. Értéke alacsony stabil állapotú, graftkárosodással és kezelést igénylő kilökődéssel nem bíró betegek esetében. Az akut rejeckió esetén nagyobb mennyiségű dd-cfDNA szabadul fel a keringésbe a károsodott allograftból a beültetett szerv sejtjeinek nekrozisa és apoptózisa következtében [33]

cfDNA = sejtmentes DNS; dd-cfDNA = donoreredetű sejtmentes DNS; DNS = dezoxiribonukleinsav

az immunszuppresszió típusának és mértékének módosítását [8, 39, 40]. A cfDNA féléletideje rövid (30 perc – 2 óra), így a vizsgálat a kilökődés monitorizálása és az antirejeckió kezelés hatékonyságának ellenőrzése céljából napokon belül megismételhető, a graftkárosodás dinamikusan indikátora [41]. A dd-cfDNA-assay magas negatív prediktív értékkel bír, és nagy pontossággal képes kizárni az akut kilökődést, minimalizálva az invazív surveillance-biopsziák szükségességét [4, 16, 19–21, 28, 30, 31, 35, 42, 43].

A nemzetközi irányelvek a dd-cfDNA-assay alkalmazását elsősorban a szubklinikai rejeckiót kiszűrő teszt céljából javasolják a stabil szívtranszplantált populációban [18]. A rejeckió klinikumával jelentkező betegek esetében továbbra is 'for-cause' szívizom-biopszia (EMB) elvégzése javasolt. A transzplantátum károsodásának korai, még az előrehaladott immunrendszeri aktiváció okozta hisztopatológiai eltérések megjelenése előtt történő felismerése lehetővé teszi az immunszuppresszív terápia korai és személyre szabott módosítását a súlyosabb fokú kilökődés, allograft-diszfunkció és -vasculopathia, irreverzibilis graftkárosodás megelőzése, illetve a gyógyszer-toxicitás elkerülése érdekében. Amennyiben a dd-cfDNA-érték megemelkedik, a kilökődés típusának patológiai megítélése a pontos terápiás terv felállításában játszik szerepet. Emelkedett dd-cfDNA-érték mellett negatív biopsziás eredménnyel bíró páciensek esetében az immunszuppresszív terápia típusának és mértékének, az adherenciának, a graftfunkciónak, az allograft-vasculopathiának és a donorspecifikus antitestnek (DSA), illetve szelektált esetekben az intragraft génexpressziós mintá-

zatnak a meghatározása szükséges, illetve fontos a szoros surveillance [10, 19, 21, 23, 28, 30, 44–47].

A dd-cfDNA az immunrendszer aktivációjának és sejtkárosodásnak a szenzitív markere, így értékét a kilökődés mellett a beültetett szerv ischaemiája, trauma és allograft-vasculopathia is befolyásolhatja. Értéke a korai poszttranszplantációs időszakban a hidegischaemia, a szervátültetés és az ischaemia-reperfúzió mint noxa miatt emelkedett lehet. A dd-cfDNA-arányt az allograft-eredetű tényezőkhöz kívül recipienseredetű faktorok – leukocytosis és leukopenia jelenléte, erős fizikai megterhelés – is befolyásolhatják. Ezekben az esetekben a dd-cfDNA abszolútértékének meghatározása segít [8, 23]. A korai posztoperatív időszakban a dd-cfDNA-szint csökkenésének elmaradása, illetve az emelkedett értékek összefüggést mutatnak az adverz kimenettel (mortalitás, retranszplantáció, graftdiszfunkció) [9, 23, 28, 30, 31, 43, 48–50]. Az assay alkalmazása nem javasolt többszerv-transzplantáció, monozigóta ikertestvér eredetű transzplantátum, allogén csontvelő-transzplantáció, 30 napon belül végzett, fehérvérsejtet tartalmazó vérkészítmény transzfúziója, terhesség, illetve 24 órán belül elvégzett allograft-biopszia esetén [51].

Munkánk során a dd-cfDNA-assay szolid szerv (vese, máj, szív, tüdő, hasnyálmirigy) transzplantációját követően betöltött szerepét vizsgáltuk az elérhető irodalom összefoglalásával, továbbá a szívtranszplantáltak körében a rutin klinikai gyakorlatba bevezetett dd-cfDNA-alapú rejeckiósurveillance során nyert első magyarországi eredményeinket kívánjuk megosztani.

Vesetranszplantáció

A dd-cfDNA értéke az első két poszttranszplantációs hét során exponenciálisan csökken a baseline-érték eléréséig [40, 50]. A transzplantációt követő első öt napban az élő donoros vesetranszplantáció esetén a dd-cfDNA aránya és abszolútértéke is alacsonyabb a cadaververse-transzplantáció esetén megfigyelt értékeknél, aminek háttérben a kevesebb ischaemia-reperfúziós károsodás állhat [40]. Az első poszttranszplantációs hónapban a kettős veseátültetés és a retranszplantált páciensek esetében a medián-dd-cfDNA-érték nagyobb [52]. A tanulmányok alapján a medián baseline dd-cfDNA-érték 0,21%–0,46% [19, 40, 50, 53]. A vesetranszplantációt követő öt év során a dd-cfDNA-érték szignifikáns emelkedését figyelték meg 0,8%-ról 2,1%-ra [54]. Pyelonephritis, akut tubularis nekrosis és biopsziával igazolt BK-vírus-nephropathia fennállása esetén nagyobb dd-cfDNA-értékek mérhetők, melyek az allograft károsodását tükrözik [8].

A „Circulating Donor-Derived Cell-Free DNA in Blood for Diagnosing Acute Rejection in Kidney Transplant Recipients” (DART) prospektív, multicentrikus, obszervációs vizsgálatban újgenerációs szekvenálással (AlloSure, CareDx, Inc., Brisbane, CA, USA) vizsgálták 102 vesetranszplantált beteg dd-cfDNA-mintáját. Rejekció esetén a medián-dd-cfDNA-érték nagyobb volt a rejekcióval nem bíró páciensek eredményeinél (1,6% *vs.* 0,3%; $p < 0,001$). A medián-dd-cfDNA a legnagyobb értéket ABMR esetén érte el (2,9%). ABMR 16 esetben igazolódott, míg ACR 11 esetben (a Banff-osztályozás szerinti IA kilökődés esetén 0,2%, IB és IIA kilökődés esetén 1,2%, míg kilökődéssel nem bíró páciensek esetén 0,3% volt a medián-dd-cfDNA-érték). Az 1% dd-cfDNA 'cut-off' érték alkalmazásával a rejekció megítélésében a negatív prediktív érték 84% volt (AUC: 0,74). Az 1% dd-cfDNA 'cut-off' érték használatával az ABMR és az azal nem bíró betegek elkülönítésében nagyobb AUC (0,87) és negatív prediktív érték (96%) volt megfigyelhető [19].

Egy egycentrumos vizsgálatban 63, rejekció gyanúja miatt kivizsgálás alatt álló felnőtt vesetranszplantációs páciens dd-cfDNA-értékét (AlloSure) vizsgálták. A mintavételezés a 'for-cause' biopsziát megelőző 30 napban történt. Az ABMR-rel bíró betegek medián-dd-cfDNA-aránya nagyobb volt a nem rejektáló betegek (1,35% [IQR: 1,10–1,90%] *vs.* 0,38% [IQR: 0,26–1,10%]; $p < 0,001$) és a sejtes kilökődéssel bíró betegek eredményeinél (medián-dd-cfDNA: 0,27% [IQR: 0,19%–1,30%]; $p = 0,01$). Az ABMR diagnózisában a $\geq 0,74\%$ dd-cfDNA-érték esetén a negatív prediktív érték 100%-nak bizonyult (AUC: 0,82%). A dd-cfDNA értéke nem különbözött a sejtes kilökődéssel bíró betegek és a nem rejektáló páciensek között [42].

Egy keresztmetszeti vizsgálatban 171 vesetranszplantációs páciens esetében vizsgálták a dd-cfDNA és a dnDSA közötti összefüggést. A dnDSA vizsgálata Luminex-assay (One Lambda, Inc., West Hills, CA, USA), míg a

dd-cfDNA kvantifikálása AlloSure dd-cfDNA-assay segítségével történt. A medián-dd-cfDNA-érték 0,25% (IQR: 0,19–0,51%) volt. A $> 1\%$ dd-cfDNA-érték szignifikáns összefüggést mutatott a dnDSA jelenlétével. A II. osztályú HLA elleni dnDSA-val (medián-dd-cfDNA: 0,62%, IQR: 0,19–2,7%), illetve a mind I., mind II. osztályú HLA elleni dnDSA-val (medián-dd-cfDNA: 3,6%, IQR: 0,85–3,6%) bíró betegek dd-cfDNA-értéke nagyobb volt a csak I. osztályú HLA elleni dnDSA-val bíró (medián-dd-cfDNA: 0,3%, IQR: 0,22–0,74%), illetve a dnDSA-val nem bíró betegek eredményeinél (medián-dd-cfDNA: 0,22% [IQR: 0,17–0,37%]; $p < 0,001$). A dnDSA átlagos fluoreszcenciaintenzitása korrelált a dd-cfDNA-szintekkel ($r = 0,36$; $p < 0,001$). 54 beteg esett át biopszián: 12 beteg esetében ABMR, 12 esetben ACR, míg 6 esetben kevert sejtes és humorális kilökődés igazolódott. ABMR esetén a medián-dd-cfDNA-érték 2,55% (IQR: 1,75–4,07%), kevert sejtes és humorális kilökődés esetén 2,36% (IQR: 1,77%–3,72%), ACR esetén 0,27% (IQR: 0,18–0,68%), míg kilökődés hiányában 0,2% (IQR: 0,15–0,32%) volt. Az 1% dd-cfDNA-érték prediktívnek bizonyult ABMR tekintetében [36].

Az „Assessing AlloSure Dd-cfDNA, Monitoring Insights of Renal Allografts with Longitudinal Surveillance” (ADMIRAL) multicentrikus, obszervációs kohorszvizsgálatban 1092 felnőtt vesetranszplantált páciens 5873 dd-cfDNA-eredményét (AlloSure) vizsgálták. 203 páciens esetében összesen 219 biopszia történt, melyek közül 110 'for-cause' biopszia volt. A medián-dd-cfDNA szignifikánsan magasabb volt mind ACR, mind ABMR esetén a nem rejektáló páciensek eredményeinél (1,6% [IQR: 0,68%–2,6%] *vs.* 0,23% [IQR: 0,19–0,64%]; $p < 0,001$). ABMR 75 esetben igazolódott, és a medián-dd-cfDNA-érték szignifikánsan nagyobb volt a nem rejektáló páciensekéhez képest (medián-dd-cfDNA: 1,8%; $p < 0,11$). ACR 38 esetben igazolódott, és a medián-dd-cfDNA-érték szintén szignifikánsan nagyobb volt a rejekcióval nem bíró páciensek eredményeinél (medián-dd-cfDNA: 0,7%; $p < 0,001$). A dd-cfDNA hatékonynak bizonyult mind a klinikai tünetekkel járó, mind a szubklinikus ABMR és ACR kimutatásában. Az emelkedett dd-cfDNA-érték összefüggést mutatott a romló becsült glomerularis filtrációs rátával és a dnDSA kialakulásával. Az allograft károsodásának interpretálásában a dd-cfDNA-értékek longitudinális változása is jelentőséggel bír: a baseline-értékekhez képest a medián-dd-cfDNA-szint 149%-os emelkedése potenciális graftkárosodást jelez. A rutin poszttranszplantációs dd-cfDNA-surveillance – mely mind az abszolút dd-cfDNA-értéket, mind annak longitudinális változását tekintetbe veszi – emeli a klinikai tünetekkel még nem járó graftkárosodás igazolásának szenzitivitását. A $< 0,5\%$ dd-cfDNA-érték fennállása esetén az invazív biopszia szükségessége csökkenthető [20].

Két, jelenleg is zajló vizsgálat („Kidney Allograft Outcomes AlloSure Registry” [KOAR] és „Outcomes of KidneyCare on Renal Allografts” [OKRA] regiszterek) összesen 4000 vesetranszplantált páciens bevonásával az

AlloSure dd-cfDNA-assay és a KidneyCare (AlloSure, AlloMap Kidney [a perifériás génexpressziós mintázatot vizsgáló assay jelenleg áll kifejlesztés alatt], iBox [machine-learning alapú kockázatbecslő algoritmus]) biztonságosságát és hatékonyságát vizsgálja [55].

Májtranszplantáció

Az allograft méretéből fakadóan a dd-cfDNA-szintek magasabbak májtranszplantációt követően, mint egyéb szerv átültetése után [23, 56].

Egy prospektív, multicentrikus, obszervációs kohorsz-vizsgálatban 107 felnőtt májtranszplantált beteg dd-cfDNA-értékét vizsgálták 'digital droplet' polimeráz-lánreakció (PCR) segítségével (recipiens- és donoreredetű plazma genotipizálását igényli). Az első poszttranszplantációs napon a dd-cfDNA-érték magas volt, mediánértéke azonban a 7–10. poszttranszplantációs napot követően <10%-ra csökkent stabil, nem rejektáló páciensek esetén. A rejeccióval nem bíró 88 recipiens 393 dd-cfDNA-értéke az első poszttranszplantációs évben stabil maradt. A 31. biopsziával igazolt akut kilökődés során vizsgált medián-dd-cfDNA-érték szignifikánsan nagyobb volt a 282, stabil recipiens medián-dd-cfDNA-értékénél (29,6% vs. 3,3%; $p < 0,001$). A biopszia-igazolt akut kilökődés megítélésében a 10% dd-cfDNA 'cut-off' érték esetében az AUC 96,5% volt. Enyhén emelkedett medián-dd-cfDNA-érték (5,9%) igazolódott 17, hepatitis C-vírus-fertőzéssel bíró, nem rejektáló beteg esetében [23].

Egy obszervációs vizsgálat keretei között 27 felnőtt májtranszplantált beteg 59 plazmamintáját vizsgálták 'digital droplet' PCR segítségével. A rejektáló páciensek esetében a dd-cfDNA értéke nagyobb volt a rejeccióval nem bíró betegekenél (medián-dd-cfDNA: 51,9 ng/ml vs. 24,2 ng/ml; $p = 0,02$). A vizsgálat keretei között 17 beteg 38 dd-cfDNA-mintáját NGS-módszeren alapuló assay-vel is megmérték (AlloSeq, CareDx, Inc., Brisbane CA, USA). A <5% dd-cfDNA-értékek esetén a 'digital droplet' PCR és az NGS-módszerrel mért eredmények közötti alacsony korreláció a 'digital droplet' PCR korlátozott képességére utalt a <5% dd-cfDNA-tartományba eső értékek pontos kvantifikálásában [9].

Multicentrikus obszervációs vizsgálat keretében újgenerációs szekvenálással 219 felnőtt beteg májtranszplantált plazmamintáját vizsgálták. Az akut kilökődés és a normális graftműködés esetében az 5,3% (AUC: 0,85; negatív prediktív érték: 100%), a kilökődés és a nem kilökődés okozta akut allograft-diszfunkció esetében a 20,4% (AUC: 0,71), míg az akut kilökődés és a nem rejektáló csoport (nem kilökődés okozta allograft-diszfunkcióval, továbbá a normális graftműködéssel bíró betegcsoportok halmaza) esetében a 15% (AUC: 0,85; negatív prediktív érték: 95,1%) dd-cfDNA-érték bizonyult küszöbértéknek [21].

Szívtranszplantáció

A dd-cfDNA cardialis allograft-rejecció ellenőrzésében betöltött szerepének vizsgálatát a Stanford Egyetemen kezdték meg, ahol egy prospektív vizsgálat során 44 felnőtt és 21 gyermek szívtranszplantált beteg 565 plazmamintáját vizsgálták ('shotgun' DNS-szekvenálás, a genotipizálás donor- és recipienseredetű plazma vizsgálatát is igényelte). Az EMB által igazolt ACR (\geq ISHLT grade 2R kilökődés) vagy ABMR alkotta kompozit végponttal a 0,25% dd-cfDNA-érték mutatott összefüggést (AUC: 0,83) [27, 29].

A „Genomic Research Alliance for Transplantation” (GRAfT) multicentrikus, prospektív, longitudinális vizsgálatban 165 felnőtt szívtranszplantált beteg 1867 plazmamintáját vizsgálták ('shotgun' DNS-szekvenálás). A 0,25% dd-cfDNA-küszöbérték összefüggést mutatott az \geq ISHLT grade 2R súlyosságú ACR és a \geq pAMR 1. fokú ABMR jelenlétével (AUC: 0,92). A negatív prediktív érték 99,2% volt. Emelkedett dd-cfDNA-érték mellé 135 esetben EMB-vel igazolt kilökődés nem társult: 21%-ban a szívtranszplantátum diszfunkciója ábrázolódott (transthoracalis echokardiográfiával igazoltan a bal kamrai ejekciós frakció \geq 5%-os csökkenése), míg a dd-cfDNA-emelkedés 44%-ban egy későbbiekben igazolódott cardialisallograft-rejecciót előzött meg. A preklinikai fejlesztések eredményei arra utalnak, hogy a későbbiekben a teszt esetleg alkalmas lehet az ACR és az ABMR elkülönítésére is a dd-cfDNA-fragmentshossz, a genomi összetétel, a dd-cfDNA emelkedésének mértéke és időbeli lefolyása alapján (szintje magasabb alloszenzitiváció és ABMR esetén, mint ACR diagnózisakor, illetve a rövid cfDNA-fragmentumok és a guanozin-citozinbázisok aránya ABMR esetén a legnagyobb) [30].

Az NGS megjelenése a vizsgálati módszer szélesebb körben történő elterjedését és a vizsgálati eredmények gyorsabb elérését tette lehetővé. A módszerrel elkerülhető a donor- és recipienseredetű plazma genotipizálásának szükségessége. A plazmából történő extrakcióját követően a cfDNA amplifikálása multiplex PCR segítségével történik, amely egy pontos nukleotid-polimorfizmusokhoz (single nucleotide polymorphisms [SNP-k]) tartalmaz PCR-primereket. A DNS szekvenálása által az SNP-k segítségével – amelyek különbséget mutatnak a donor és a recipiens között – lehetővé válik a recipiens- és donoreredetű DNS-fragmentumok kvantifikálása megelőző genotipizálás nélkül [32, 57]. Az NGS-ek az Egyesült Államokban széles körben elérhetők, ahol centralizált molekuláris diagnosztikai mérésekkel, obszervációs és prospektív, multicentrikus klinikai vizsgálatok keretében igazolták a dd-cfDNA-assay-nek a cardialisallograft-károsodás, -rejecció és graftdiszfunkció diagnosztikájában betöltött szerepét [28, 31, 32, 34, 35, 58].

A legszélesebb körben tanulmányozott és használt assay a klinikumban az egyedül az Egyesült Államokban elérhető AlloSure assay, mely a „Donor-Derived Cell-

Free DNA Outcomes AlloMap Registry” (D-OAR) vizsgálatban került klinikai validálásra. A multicentrikus, prospektív, obszervációs vizsgálatban 740, 15 évesnél idősebb szívtranszplantált beteg 2447 plazmamintáját vizsgálták. A 0,20% dd-cfDNA-küszöbérték alkalmazásával az \geq ISHLT grade 2R súlyosságú ACR, illetve a \geq pAMR 1. fokú ABMR diagnózisában a negatív prediktív érték 97,1%-nak bizonyult (AUC: 0,64). A dd-cfDNA-emelkedés összefüggést mutatott a kilöködés súlyosságával, illetve ABMR esetén nagyobb dd-cfDNA-értékek igazolódtak, mint ACR fennállásakor. A dd-cfDNA-értékek az első két poszttranszplantációs év során a kilöködéssel nem bíró páciensek esetén stabilak maradtak [28].

Az AlloSeq cfDNA-assay (CareDx, Inc., Brisbane, CA, USA) CE-IVD minősítéssel rendelkezik diagnosztikai használat céljára az Európai Unióban (2020; a kereskedelemben jelenleg elérhető 'stand-alone' dd-cfDNA-assay-k [Prospera Heart, Natera; Viracor TRAC Heart, Eurofins Viracor; valamint AlloSure és AlloSeq, CareDx] közül egyedülként). A dd-cfDNA-plazmaszintek és az assay értékelése megegyezik az AlloSure assay-ével [35]. Európában a legelsőként a Semmelweis Egyetem Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikáján vezették be a rutin klinikai gyakorlatba a szívtranszplantáltak utánkövetésében a dd-cfDNA-alapú noninvaszív rejekeciósurveillance-t [59].

Az Egyesült Államokban elérhető Prospera dd-cfDNA-assay (Natera, Inc., San Carlos, CA, USA) segítségével a DEDUCE obszervációs vizsgálat keretében két centrumban 223 felnőtt szívtranszplantált beteg 811 vérmintáját vizsgálták. A rejekecióval bíró betegek (\geq ISHLT grade 1R ACR vagy \geq pAMR 0. fokú ABMR) esetében a dd-cfDNA-emelkedés szignifikánsnak bizonyult a nem rejekektáló betegek eredményeihez képest (AUC: 0,86). A 0,15%-os dd-cfDNA-értéknél a negatív prediktív érték 97,3% volt [31].

Számos vizsgálat zajlik jelenleg is a noninvaszív rejekeciósurveillance alkalmazásával. Az Egyesült Államokban a „Surveillance HeartCare Outcomes Registry” (SHORE) prospektív, obszervációs kohorszvizsgálatban 2707 szívtranszplantált páciens bevonásával vizsgálják dd-cfDNA-assay (AlloSure) segítségével a graftkárosodás, illetve génextpressziós mintázat (AlloMap, CareDx, Inc., Brisbane, CA, USA) segítségével az immunaktivitás mértékét. A vizsgálati végpontokat a halálozás, az elvégzett EMB-k és a rejekeciós epizódok száma, illetve a graftfunkció jelenti [35, 46].

A „Molecular Outcome Surveillance using AlloSure and AlloMap Guided Immunomodulation in Cardiac Transplantation” (MOSAIC) randomizált, klinikai vizsgálatban a HeartCare (AlloSure és AlloMap) segítségével történő immunszuppresszió-optimalizálás szerepét vizsgálják a jelenleg elérhető 'standard-of-care' terápiával szemben.

A Trifecta-Heart cfDNA-MMDX prospektív kohorszvizsgálat a dd-cfDNA-vizsgálat (Prospera), az anti-HLA-

antitestek (One Lambda) és a molekuláris mikroszkóp diagnosztikai rendszer (MMDx, Alberta Transplant Applied Genomics Centre, University of Alberta, Edmonton, AB, Kanada) eredményei közötti összefüggést vizsgálja.

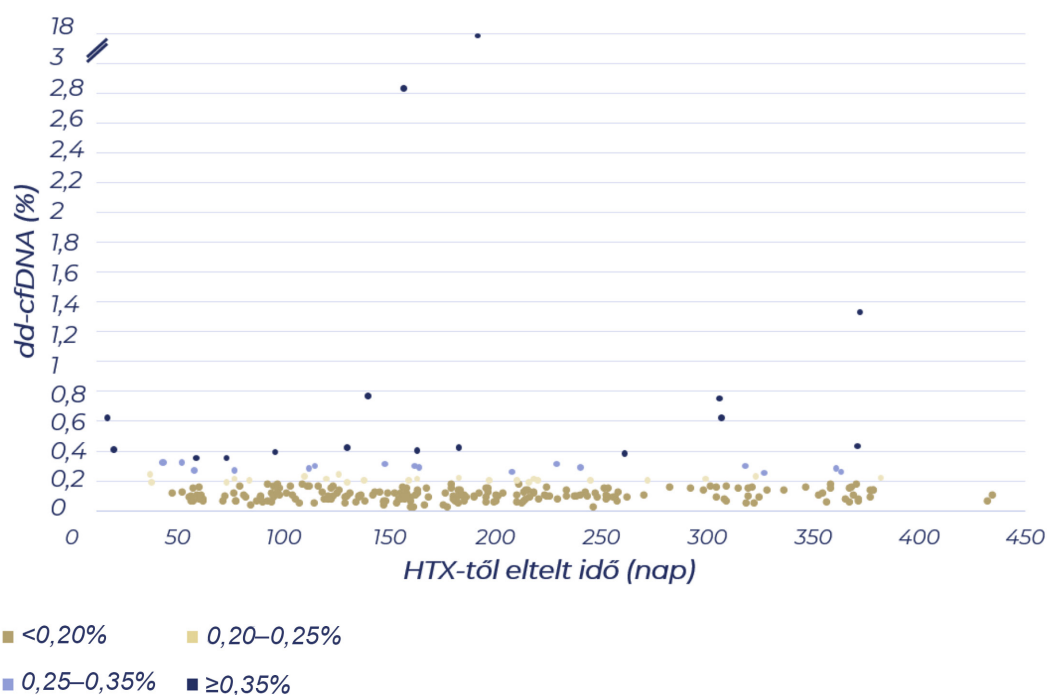
A „Prospera Test Evaluation in Cardiac Transplant” (ProTECT) obszervációs, longitudinális, multicentrikus vizsgálatban azoknak a legalább 60 napja szívtranszplantált felnőtt betegeknek az eredményeit vizsgálják, akiknél a dd-cfDNA-vizsgálat (Prospera) a rutin klinikai ellátás részét képezi.

Az első multicentrikus, randomizált, kontrollált, klinikai „Donor-Derived Cell-free DNA to DETect REjection in Cardiac Transplantation” (DETECT) vizsgálatban több mint 775 szívtranszplantált páciens esetében a poszttranszplantációs 4. héten megkezdett dd-cfDNA-alapú (Prospera) rejekeciósurveillance noninferioritását vizsgálják az EMB-alapú utánkövetéssel szemben [35].

Saját tapasztalatok szívtranszplantációt követően

A Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikán 2022. októberben vezettük be az invazív rejekeciósurveillance helyett a dd-cfDNA-alapú szűrési protokollt a kis rejekeciós kockázattal bíró, legalább 14 napja szívtranszplantált pácienseknél. A mintavételezéseket és az NGS-alapú méréseket a poszttranszplantációs első évben, havi gyakorisággal végezzük. A mintavételezés (\geq 8 ml perifériás vér) cfDNA vérvételi vákuumcsőbe történik (Streck, La Vista, NE, USA), mely stabilizálja a sejtmagvas vérésejket, hogy lehetővé tegye a jó minőségű cfDNA-extrakciót. A cfDNA amplifikációját követően kapott PCR-termék szekvenálását NGS-eszközzel (MiSeq, Illumina, Inc., San Diego, CA, USA) végezzük. A szekvenciaadatokat CareDx AlloSeq cfDNA szoftverrel analizáljuk. A vizsgálati eredmények minőség-ellenőrzésen esnek át (átlagos lefedettség, uniformitás, sikeresen azonosított lókuszek minimális értéke), és a cfDNA extrakcióját követő harmadik munkanapon elérhető. A korábbi validációs vizsgálat alapján a \geq 0,20% dd-cfDNA-érték károsodásra, míg a \geq 0,35% dd-cfDNA-érték súlyos graftkárosodásra utal [28]. Amennyiben a vérvétellel párhuzamosan vagy pozitív dd-cfDNA-eredmény miatt történt szívizombiopszia, a szövettani minta patológiai osztályozását ACR és ABMR tekintetében az ISHLT-klasszifikáció alapján végeztük [60, 61].

2024. januárig összesen 46 beteg 264 dd-cfDNA-mintáját elemeztük. 11 esetben a legelső dd-cfDNA-minta vételezése rutin EMB-vel párhuzamosan történt: 7 esetben kilöködés nem igazolódtott, 4 esetben aszimptomás, enyhe fokú sejtes kilöködést észleltünk megtartott graftfunkció mellett. A dd-cfDNA-minták 80%-a $<$ 0,20% értéket mutatott. 19 minta értéke a 0,20–0,25% dd-cfDNA-tartományba (a páciensek utánkövetése dd-cfDNA segítségével történt), míg 16 mintáé a 0,25–0,35% dd-cfDNA-intervallumba esett (2. ábra). Myo-



2. ábra

A dd-cfDNA értékeinek megoszlása a Városmajori Szív- és Érgyógyászati Klinikán gondozott, 2022. október óta dd-cfDNA-alapú rejekciósurveillance-ban részesülő szívtranszplantált betegek esetén

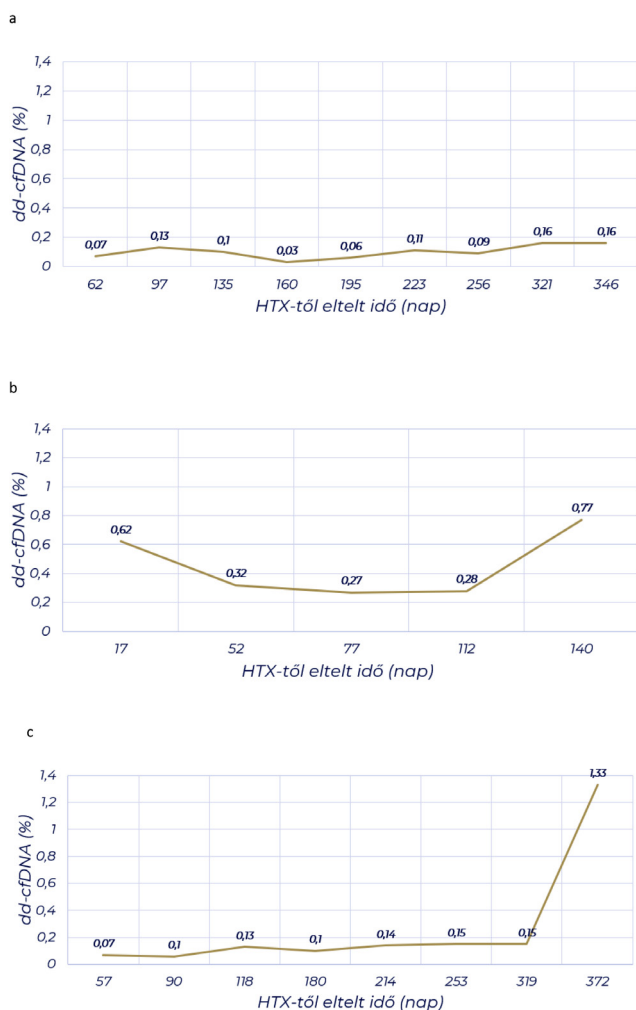
dd-cfDNA = donoreredetű sejtmentes DNS; HTX = szívtranszplantáció

cardium-károsodásra utaló dd-cfDNA-érték következtében 20 EMB-t végeztünk: 3 esetben enyhe fokú ACR, 1 esetben közepes fokú ACR, 1 esetben enyhe fokú ABMR, 1 esetben pedig kevert sejt és humorális kilökődés igazolódott. 14 esetben az EMB nem igazolt kilökődést: 2 esetben a dd-cfDNA-minta vételezése a szívtranszplantációt követő első hónapon belül történt, amikor az emelkedett dd-cfDNA-érték a perioperatív károsodást tükrözi. 16 hónap során 232, a reguláris surveillance-EMB-k 88%-a biztonságosan elhagyható volt a dd-cfDNA-értékek alapján (3. ábra).

Tüdőtranszplantáció

A stanfordi „Genome Transplant Dynamics” (GTD) vizsgálatban 38, 15 évesnél idősebb tüdőtranszplantált beteg 107 plazmamintáját vizsgálták NGS elvén alapuló assay segítségével (AlloSure). A medián-dd-cfDNA-érték szignifikánsan nagyobb volt ACR esetén, mint a rejekcióval nem bíró betegekben (0,91% [IQR: 0,39–2,07%] vs. 0,38% [IQR: 0,23–0,87%]; $p = 0,021$). CLAD esetén a dd-cfDNA-értékek nagyobbak voltak a stabil populációéhoz képest (2,06% [IQR: 0,97–3,34%]; $p = 0,02$). A rejekció megítélésében a 0,85% dd-cfDNA-küszöbérték esetén a negatív prediktív érték 83,6% volt. A 33 allograft-asszociált infekció esetén a medián-dd-cfDNA-érték nem különbözött a stabil páciensek eredményeitől [4].

A „Genomic Research Alliance for Transplantation” (GRAfT) multicentrikus, prospektív kohorszvizsgálatban 148 felnőtt tüdőtranszplantált beteg 1549 plazmamintáját vizsgálták. A dd-cfDNA-meghatározás ’shotgun’ DNS-szekvenálással történt. A dd-cfDNA-érték a korai poszttranszplantációs időszakban magas volt, másfél hónappal a transzplantációt követően elérte a 0,43% (IQR: 0,24–0,83%) értéket, majd 4 hónappal a transzplantációt követően a legalacsonyabb, 0,21% értéket. A 9. hónapig szintje stabil maradt, majd az 1–24. hónap között a 0,60–0,68% dd-cfDNA-tartományba emelkedett [48]. A stabil betegek esetében <5. poszttranszplantációs évben és az 5. évet követően végzett dd-cfDNA-vizsgálatok eredményei között szignifikáns különbség volt (medián-dd-cfDNA 0,41% [IQR: 0,21–0,64%] vs. 0,50% [IQR: 0,33–0,76%]; $p = 0,02$) [62]. A dd-cfDNA-értékek mind az ACR súlyosságával, mind pedig az egy másodperc alatti forszírozott kilégzési volumen (FEV1) csökkenésével jellemzett graftdiszfunkció súlyosságával összefüggést mutattak. Akut rejekció esetén a dd-cfDNA értéke hatszor nagyobb volt a kontrollmintákhoz képest. Akut rejekció kimutatása során a 0,5% dd-cfDNA-küszöbértéknél a negatív prediktív érték 96%, míg az 1% dd-cfDNA-küszöbértéknél 90% volt. ABMR esetén a dd-cfDNA értéke kétszer nagyobb volt az ACR során mért értékeknél (2,32% [IQR: 1,56–7,23%] vs. 1,23% [IQR: 0,65–2,03%]; $p < 0,01$). A vizsgálat során az alacsony dd-cfDNA-értékek fényében a bronchoszkópiák kétharmada elhagyható volt. Normális hisztopatológiai és spirometriai eredmény mellett igazolt patogének ese-



3. ábra

Három beteg dd-cfDNA-eredményei. A dd-cfDNA alacsony értékei alapján a reguláris szívizom-biopszia biztonságosan elhagyható (a). A dd-cfDNA korai, perioperatív károsodásnak megfelelő emelkedése, majd 140 nappal a szívtranszplantációt követően a dd-cfDNA ismét emelkedett szintje biopszia által igazolt, közepes fokú sejtes kilökődésnek felelt meg (b). A dd-cfDNA graftkárosodásra utaló, magas értéke következtében végzett 'for-cause' szívizom-biopszia kevert, közepes fokú sejtes és enyhe fokú antitestmediált kilökődést igazolt (c)

dd-cfDNA = donoreredetű sejtmentes DNS; HTX = szívtranszplantáció

tén a dd-cfDNA értéke megegyezett azon betegek eredményével, akiknél kórokozó jelenléte nem igazolódott. Azon fertőzések esetén, melyek abnormalis hisztopatológiával vagy légzésfunkciós teszttel társultak, a dd-cfDNA értéke háromszoros emelkedést mutatott [48].

A „Lung Allograft Rejection Gene Expression Observational” (LARGO) multicentrikus, obszervációs vizsgálatban 69 tüdőtranszplantált páciens dd-cfDNA-eredményeit vizsgálták (NGS-módszeren alapuló assay [AlloSure]). ACR esetén a dd-cfDNA-érték szignifikánsan nagyobb volt (1,52% [IQR: 0,52–2,55%] vs. 0,48% [IQR: 0,22–0,79%]; p = 0,026). Stabil allograft mellett a dd-cfDNA-érték <0,5% volt, mely összevethető volt a

'shotgun' DNS-szekvenálás-alapú dd-cfDNA-értékekkel [63].

Egy Egyesült Államokban végzett multicentrikus, retrospektív, obszervációs kohorszvizsgálatban 175 tüdőtranszplantált beteg 380 dd-cfDNA-eredményét vizsgálták a rutin klinikai gyakorlatban. A dd-cfDNA-minta-vételezések (AlloSure) a rutin surveillance-bronchoszkópiák helyett történtek akut allograft-rejekció és -infekció megítélés céljából. A stabil páciensek esetében a dd-cfDNA-értékek kisebbek voltak unilaterális, mint bilaterális tüdőtranszplantációt követően (0,24% [IQR: 0,12–0,39%] vs. 0,37% [IQR: 0,23–0,79%]; p<0,01). A dd-cfDNA-értékek nagyobbak voltak azon betegeknél, akiknél a FEV1-értékben ≥10% csökkenést észleltek (0,70% vs. 0,35%; p = 0,02). Akut tüdőallograft-diszfunkció (ALAD; akut rejekció és infekció kompozit végpontja) esetén a medián-dd-cfDNA-érték nagyobb volt, mint stabil páciensek esetében (1,7% [IQR: 0,63–3,1%] vs. 0,35% [IQR: 0,22–0,79%]; p<0,001). Az ACR és az ABMR tekintetében a dd-cfDNA-értékek között nem volt szignifikáns különbség. A dd-cfDNA-eredmények nem különböztek akut rejekció vagy infekció fennállásakor (1,6% [IQR: 0,38–3,4%] vs. 1,8% [IQR: 0,84–2,7%]; p = 0,82). A ≥1% dd-cfDNA-értékkel bíró páciensek esetében surveillance-bronchoszkópia, DSA-vizsgálat és spirometria történt. 0,5–1% közötti dd-cfDNA-értékkel bíró, aszimptomás páciensek esetében 1–2 hét múlva ismételt dd-cfDNA-mintavételezés történt, és amennyiben a dd-cfDNA-eredmény ≥1% volt, bronchoszkópiát végeztek. A <0,5% dd-cfDNA-szinttel bíró recipiensek esetében a reguláris dd-cfDNA-mintavételezés folytatódott. Az ALAD tekintetében a ≥1% dd-cfDNA-érték negatív prediktív értéke 96,5% volt (AUC: 0,79). A dd-cfDNA-eredmények alapján a reguláris bronchoszkópiák 82,1%-a elhagyható volt. A dd-cfDNA lehetővé tette az ALAD azonosítását aszimptomás tüdőtranszplantált pácienseknél, mely a csak klinikailag indikált biopszia-alapú utánkötés esetén nem került volna diagnosztizálásra. A <1% dd-cfDNA-eredmény esetén az akut kilökődés és infekció kizárható volt [16].

Hasnyálmirigy-transzplantáció

A PancDx prospektív, multicentrikus, obszervációs vizsgálatban 77, hasnyálmirigy-átültetésen átesett felnőtt 181 vérmintáját vizsgálták DNS-szekvenálással (AlloSure). A betegek 83,1%-a szimultán vese-hasnyálmirigy átültetésen, míg 16,9%-uk szoliter pancreastranszplantáción esett át. Fertőzés vagy kilökődés hiányában a medián-dd-cfDNA-érték 0,24% (0,12–0,63%) volt. Az első poszttranszplantációs hónapban a dd-cfDNA értéke emelkedett volt (medián-dd-cfDNA: 0,78% [0,36–1,65%]), mely az első hónapot követően stabilizálódott (medián-dd-cfDNA: 0,22% [0,00–0,48%]). Ezzel ellentétben az infekcióval vagy rejekcióval bíró betegek medián-dd-cfDNA-értéke emelkedett volt (0,39% [0,16–0,89%]). A vese- vagy hasnyálmirigy-transzplantátum

kilökődésével bíró betegek medián-dd-cfDNA-értéke magas volt (0,56% [0,16–0,90%]). A dnDSA-val bíró betegek medián-dd-cfDNA értéke nagyobb volt az ezzel nem rendelkező betegekéhez képest (0,54% [0,20–0,75%] vs. 0,39% [0,00–0,91%]). Szimultán vese-hasnyálmirigy transzplantációt követően infekció és rejecció hiányában a medián-dd-cfDNA-érték összevethető volt a teljes populáció értékével (medián-dd-cfDNA-érték: 0,28% [0,13–0,64%]). A vese- vagy hasnyálmirigy-transzplantátum kilökődése esetén a medián-dd-cfDNA-érték emelkedett volt (0,56% [0,13–0,64%]). Szoliter pancreastranszplantációt követően infekció és rejecció hiányában a medián-dd-cfDNA-érték 0,20% (0,00–0,32%) volt. Egyetlen szoliter hasnyálmirigy-transzplantált páciensnél igazolódott kilökődés, nála magas dd-cfDNA-érték igazolódott (0,59%). Gyulladás és fertőzés következtében megemelkedhet a dd-cfDNA értéke (0,40% [0,18–0,91%]). A teljes kohorsz körében fertőzés és kilökődés hiányában a dd-cfDNA értéke <1% volt, mely megegyezik a vesetranszplantáció esetén megfigyelhető dd-cfDNA-eredményekkel [19, 64]. Optimális küszöbértéknek a 0,5% dd-cfDNA-érték bizonyult [65].

Következtetés

Munkánk során a dd-cfDNA-assay szolid szerv-transzplantációt követően betöltött szerepét vizsgáltuk. Míg a hagyományos invazív biopszia szerepe limitált az allograft-rejecciót megelőző graftkárosodás korai fázisának kimutatásában, a dd-cfDNA szintje a biopsziával igazolt kilökődést megelőzően emelkedést mutat [16, 20, 28–30, 34]. A korai graftkárosodás kimutatása által az assay segítséget nyújthat az immunszuppresszív 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 dózisok emelését teheti lehetővé. Következésképpen az akut rejecció szempontjából nagy kockázatú betegek számára hatékonyabb immunszuppressziót tesz lehetővé, míg a stabil betegek körében ezen gyógyszerek mellékhatásai és toxicitása elkerülhetővé válik. 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 [30, 66].

Szívtranszplantációt követően a rutin klinikai gyakorlatban alkalmazott, dd-cfDNA-alapú rejecciósurveillance során nyert első magyarországi eredményeinket mutattuk be. A korábbi vizsgálatokhoz hasonlóan a stabil, kezelést igénylő rejeccióval nem bíró páciensek dd-cfDNA-értéke alacsony maradt. Az allograft-károsodást jellemző dd-cfDNA-érték megemelkedik akut allograft-rejecció esetén [28, 30–32, 35]. Longitudinális vizsgálatunkban igazoltuk, hogy alacsony dd-cfDNA-értékek mellett a reguláris invazív EMB biztonságosan elhagyható, melyek 88%-át elimináltuk. A dd-cfDNA-assay a >28

napja szívtranszplantáción átesett, alacsony rejecciókockázattal bíró betegek esetében a szubklinikus rejecciósurveillance megbízható módszerének bizonyult [30, 35, 59]. Mivel a perifériás vérmintából végzett dd-cfDNA-vizsgálat csökkenti az invazív EMB-k számát, szövődményeit és a hospitalizáció szükségességét, a noninvazív diagnosztikai módszer az egészségügyi költségcsökkentés irányába mutat [67].

A dd-cfDNA az allograft-károsodás és a rejecciósurveillance megbízható és reprodukálható biomarkere a klinikai gyakorlatban. A dd-cfDNA-alapú rejecciósurveillance által lehetővé válik az akut kilökődés érzékenyebb és korai felismerése, következképpen az individualizált immunszuppresszív terápia, illetve a transzplantációt követően az életminőség, a morbiditás és a kimenetel javulása. A módszer segítségével nagymértékben és biztonságosan csökkenthető az invazív EMB-k szükségessége szívtranszplantációt követően. Munkánk alapul szolgálhat egyéb szolid szerv transzplantációja területén is a dd-cfDNA-assay-alapú rejecció utánkövetése magyarországi bevezetésének és elterjedésének.

Anyagi támogatás: A közlemény megírása, illetve a kapcsolódó kutatómunka anyagi támogatásban nem részesült.

Szerzői munkamegosztás: T. T.: A kutatás alapjául szolgáló adatok összegyűjtése, az eredmények összesítése, a kézirat megszövegezése. B. Cs., H. L., L. L.: A dd-cfDNA-mérések elvégzése. N. B., F. A.: A szívizom-biopsziák patológiai vizsgálata. M. B.: Szakmai véleményezés. S. B.: A kézirat megszövegezése, szakmai véleményezés. A cikk végleges változatát valamennyi szerző elolvasta és jóváhagyta.

Érdekltségek: S. B. és T. T. előadói díjban részesült a CareDx-től.

Irodalom

- [1] Hart A, Lentine KL, Smith JM, et al. OPTN/SRTR 2019 Annual data report: Kidney. Am J Transplant. 2021; 21(Suppl 2): 21–137.
- [2] Dogan N, Hüsing-Kabar A, Schmidt HH, et al. Acute allograft rejection in liver transplant recipients: incidence, risk factors, treatment success, and impact on graft failure. J Int Med Res. 2018; 46: 3979–3990.
- [3] Sato M, Ohmori-Matsuda K, Saito T, et al. Time-dependent changes in the risk of death in pure bronchiolitis obliterans syndrome (BOS). J Heart Lung Transplant. 2013; 32: 484–491.
- [4] Khush KK, De Vlaminck I, Luikart H, et al. Donor-derived, cell-free DNA levels by next-generation targeted sequencing are elevated in allograft rejection after lung transplantation. ERJ Open Res. 2021; 7: 00462-2020.
- [5] Levy L, Huszti E, Renaud-Picard B, et al. Risk assessment of chronic lung allograft dysfunction phenotypes: Validation and proposed refinement of the 2019 International Society for Heart and Lung Transplantation classification system. J Heart Lung Transplant. 2020; 39: 761–770.

- [6] Niederhaus SV, Levenson GE, Lorentzen DF, et al. Acute cellular and antibody-mediated rejection of the pancreas allograft: incidence, risk factors and outcomes. *Am J Transplant.* 2013; 13: 2945–2955.
- [7] Langer R. The place of Hungary on Europe's transplantation map. [Magyarország helye Európa transzplantációs térképén.] *Orv Hetil.* 2022; 163: 1181–1188. [Hungarian]
- [8] Oellerich M, Sherwood K, Keown P, et al. Liquid biopsies: donor-derived cell-free DNA for the detection of kidney allograft injury. *Nat Rev Nephrol.* 2021; 17: 591–603.
- [9] Fernández-Galán E, Badenas C, Fondevila C, et al. Monitoring of donor-derived cell-free DNA by short tandem repeats: concentration of total cell-free DNA and fragment size for acute rejection risk assessment in liver transplantation. *Liver Transpl.* 2022; 28: 257–268.
- [10] Kobashigawa JA. The search for a gold standard to detect rejection in heart transplant patients: are we there yet? *Circulation* 2017; 135: 936–938.
- [11] Kittleson MM, Garg S. Solid gold, or liquid gold? Towards a new diagnostic standard for heart transplant rejection. *Circulation* 2021; 143: 1198–1201. Erratum: *Circulation* 2021; 143(23): e1029.
- [12] 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: 1172–1177.
- [13] 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–S226.
- [14] Bhorade SM, Husain AN, Liao C, et al. Interobserver variability in grading transbronchial lung biopsy specimens after lung transplantation. *Chest* 2013; 143: 1717–1724.
- [15] Klassen DK, Weir MR, Cangro CB, et al. Pancreas allograft biopsy: safety of percutaneous biopsy-results of a large experience. *Transplantation* 2002; 73: 553–555.
- [16] Keller M, Sun J, Mutebi C, et al. Donor-derived cell-free DNA as a composite marker of acute lung allograft dysfunction in clinical care. *J Heart Lung Transplant.* 2022; 41: 458–466.
- [17] Coutance G, Racapé M, Baudry G, et al. Validation of the clinical utility of microRNA as noninvasive biomarkers of cardiac allograft rejection: a prospective longitudinal multicenter study. *J Heart Lung Transplant.* 2023; 42: 1505–1509.
- [18] Velleca A, Shullo MA, Dhital K, et al. The International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT) guidelines for the care of heart transplant recipients. *J Heart Lung Transplant.* 2023; 42: e1–e141.
- [19] Bloom RD, Bromberg JS, Poggio ED, et al. Cell-free DNA and active rejection in kidney allografts. *J Am Soc Nephrol.* 2017; 28: 2221–2232.
- [20] Bu L, Gupta G, Pai A, et al. Clinical outcomes from the assessing donor-derived cell-free DNA monitoring insights of kidney allografts with longitudinal surveillance (ADMIRAL) study. *Kidney Int.* 2022; 101: 793–803.
- [21] Levitsky J, Kandpal M, Guo K, et al. Donor-derived cell-free DNA levels predict graft injury in liver transplant recipients. *Am J Transplant.* 2022; 22: 532–540.
- [22] Papadimitriou JC, Drachenberg CB, Wiland A, et al. Histologic grading of acute allograft rejection in pancreas needle biopsy: correlation to serum enzymes, glycemia, and response to immunosuppressive treatment. *Transplantation* 1998; 66: 1741–1745.
- [23] Schütz E, Fischer A, Beck J, et al. Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: a prospective, observational, multicenter cohort study. *PLOS Med.* 2017; 14: e1002286.
- [24] Kant S, Brennan DC. Donor-derived cell-free DNA in kidney transplantation: origins, present and a look to the future. *Medicina (Kaunas)* 2021; 57: 482.
- [25] Csoma SL, Bedekovics J, Veres G, et al. Molecular analysis of cell-free DNA in peripheral blood in biliary tract malignancies. [A perifériás vérben keringő szabad DNS molekuláris vizsgálata epéti malignitásokban.] *Orv Hetil.* 2022; 163: 1982–1991. [Hungarian]
- [26] Lo YM, Tein MS, Pang CC, et al. Presence of donor-specific DNA in plasma of kidney and liver-transplant recipients. *Lancet* 1998; 351: 1329–1330.
- [27] Goldberg JF, Truby LK, Agbor-Enoh S, et al. Selection and interpretation of molecular diagnostics in heart transplantation. *Circulation* 2023; 148: 679–694.
- [28] 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: 2889–2899.
- [29] 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: 241ra77.
- [30] Agbor-Enoh S, Shah P, Tunc I, et al. Cell-free DNA to detect heart allograft acute rejection. *Circulation* 2021; 143: 1184–1197.
- [31] 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: 919–927.
- [32] 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: 890–902.
- [33] CareDx. AlloSeq cfDNA. Available from: <https://caredx.com/products-and-services/transplant-lab-products/post-transplant-surveillance/alloseq-cfdna/> [accessed: June 14, 2024].
- [34] 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: 454–463.
- [35] Holzhauser L, DeFilippis EM, Nikolova A, et al. The end of endomyocardial biopsy? A practical guide for noninvasive heart transplant rejection surveillance. *JACC Heart Fail.* 2023; 11: 263–276.
- [36] Obriscă B, Butiu M, Sibulesky L, et al. Combining donor-derived cell-free DNA and donor specific antibody testing as non-invasive biomarkers for rejection in kidney transplantation. *Sci Rep.* 2022; 12: 15061.
- [37] Kanzow P, Kollmar O, Schütz E, et al. Graft-derived cell-free DNA as an early organ integrity biomarker after transplantation of a marginal HELLP syndrome donor liver. *Transplantation* 2014; 98: e43–e45.
- [38] Hinojosa RJ, Chaffin K, Gillespie M, et al. Donor-derived cell-free DNA may confirm real-time response to treatment of acute rejection in renal transplant recipients. *Transplantation* 2019; 103: e61.
- [39] Oellerich M, Schütz E, Kanzow P, et al. Use of graft-derived cell-free DNA as an organ integrity biomarker to reexamine effective tacrolimus trough concentrations after liver transplantation. *Ther Drug Monit.* 2014; 36: 136–140.
- [40] Oellerich M, Shipkova M, Asendorf T, et al. Absolute quantification of donor-derived cell-free DNA as a marker of rejection and graft injury in kidney transplantation: Results from a prospective observational study. *Am J Transplant.* 2019; 19: 3087–3099.
- [41] Beiter T, Fragasso A, Hudemann J, et al. Short-term treadmill running as a model for studying cell-free DNA kinetics in vivo. *Clin Chem.* 2011; 57: 633–636.
- [42] Huang E, Sethi S, Peng A, et al. Early clinical experience using donor-derived cell-free DNA to detect rejection in kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2019; 19: 1663–1670.
- [43] Pedini P, Coiffard B, Cherouat N, et al. Clinical relevance of cell-free DNA quantification and qualification during the first month after lung transplantation. *Front Immunol.* 2023; 14: 1183949.
- [44] Halloran PF, Madill-Thomsen K, Aliabadi-Zuckermann AZ, et al. Many heart transplant biopsies currently diagnosed as no re-

- jection have mild molecular antibody-mediated rejection-related changes. *J Heart Lung Transplant.* 2022; 41: 334–344.
- [45] Lee DH, Usmani A, Ravichandran V, et al. Relationship between blood and tissue-based rejection-related transcripts in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2024; 43: 359–368.
- [46] Khush KK. Clinical utility of donor-derived cell-free DNA testing in cardiac transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2021; 40: 397–404.
- [47] Kataria A, Kumar D, Gupta G. Donor-derived cell-free DNA in solid-organ transplant diagnostics: indications, limitations, and future directions. *Transplantation.* 2021; 105: 1203–1211.
- [48] Jang MK, Tunc I, Berry GJ, et al. Donor-derived cell-free DNA accurately detects acute rejection in lung transplant patients, a multicenter cohort study. *J Heart Lung Transplant.* 2021; 40: 822–830.
- [49] Agbor-Enoh S, Wang Y, Tunc I, et al. Donor-derived cell-free DNA predicts allograft failure and mortality after lung transplantation. *EBioMedicine* 2019; 40: 541–553.
- [50] Gielis EM, Beirnaert C, Dendooven A, et al. Plasma donor-derived cell-free DNA kinetics after kidney transplantation using a single tube multiplex PCR assay. *PLoS ONE* 2018; 13: e0208207.
- [51] Verhoeven JG, Hesselink DA, Peeters AM, et al. Donor-derived cell-free DNA for the detection of heart allograft injury: the impact of the timing of the liquid biopsy. *Transpl Int.* 2022; 35: 10122.
- [52] Anand S, Lopez-Verdugo F, Sanchez-Garcia J, et al. Longitudinal variance of donor-derived cell-free DNA (dd-cfDNA) in stable kidney transplant (KTx) patients are influenced by donor/recipient variables. *Clin Transplant.* 2021; 35: e14395.
- [53] Sigdel TK, Archila FA, Constantin T, et al. Optimizing detection of kidney transplant injury by assessment of donor-derived cell-free DNA via massively multiplex PCR. *J Clin Med.* 2018; 8: 19.
- [54] Schütz E, Asendorf T, Beck J, et al. Time-dependent apparent increase in dd-cfDNA percentage in clinically stable patients between one and five years following kidney transplantation. *Clin Chem.* 2020; 66: 1290–1299.
- [55] Pai A, Swan JT, Wojciechowski D, et al. Clinical rationale for a routine testing schedule using donor-derived cell-free DNA after kidney transplantation. *Ann Transplant.* 2021; 26: e932249.
- [56] Goh SK, Do H, Testro A, et al. The measurement of donor-specific cell-free DNA identifies recipients with biopsy-proven acute rejection requiring treatment after liver transplantation. *Transplant Direct.* 2019; 5: e462.
- [57] 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: e1005629.
- [58] 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: e0227385.
- [59] Teszak T, Bödör C, Hegyi L, et al. Local laboratory-run donor-derived cell-free DNA assay for rejection surveillance in heart transplantation—first six months of clinical experience. *Clin Transplant.* 2023; 37: e15078.
- [60] 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: 1710–1720.
- [61] 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: 1147–1162.
- [62] Trindade AJ, Chapin KC, Mullican A, et al. Assessment of dd-cfDNA levels in clinically stable lung allograft recipients beyond the initial 2 y posttransplant. *Transplant Direct.* 2022; 8: e1411.
- [63] Sayah D, Weigt SS, Ramsey A, et al. Plasma donor-derived cell-free DNA levels are increased during acute cellular rejection after lung transplant: pilot data. *Transplant Direct.* 2020; 6: e608.
- [64] Yoo A, Riedel A, Qian I, et al. An Initial analysis of the baseline levels of dd-cfDNA after pancreas transplantation: a prospective study from high-volume centers in the United States. *Transplant Direct.* 2023; 9: e1459.
- [65] Chopra B, Sureshkumar KK. Emerging role of cell-free DNA in kidney transplantation. *World J Exp Med.* 2021; 11: 55–65.
- [66] Agbor-Enoh S, Tunc I, De Vlaminc 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: 1004–1012.
- [67] Evans RW, Williams GE, Baron HM, et al. The economic implications of noninvasive molecular testing for cardiac allograft rejection. *Am J Transplant.* 2005; 5: 1553–1558.

(Teszák Tímea dr.,
Budapest, Városmajor u. 68., 1122
 e-mail: teszak.timea@semmelweis.hu)

A cikk a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>) feltételei szerint publikált Open Access közlemény, melynek szellemében a cikk bármilyen médiumban szabadon felhasználható, megosztható és újraközölhető, feltéve, hogy az eredeti szerző és a közlés helye, illetve a CC License linkje és az esetlegesen végrehajtott módosítások feltüntetésre kerülnek. (SID_1)