

REJEKSİYON TANISINDA YENİ YAKLAŞIMLAR:

dd-cfDNA

Prof. Dr. Duygu Övünç Hacıhamdioğlu

Bahçeşehir Üniversitesi Tıp Fakültesi

27.09.2025

Çocuk Böbrek Nakli Güncelleme Sempozyumu-IV

Sunum Planı

Hücresiz DNA (cell free DNA; cfDNA)

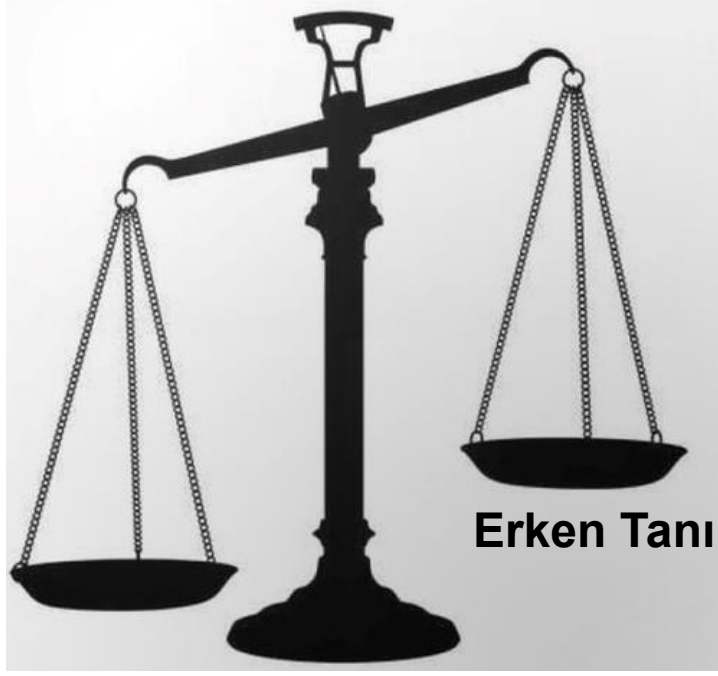
Akut rejeksiyonda (AR) verici kaynaklı cfDNA (dd-cfDNA)

Yetişkin Hastalar

Çocuk Hastalar

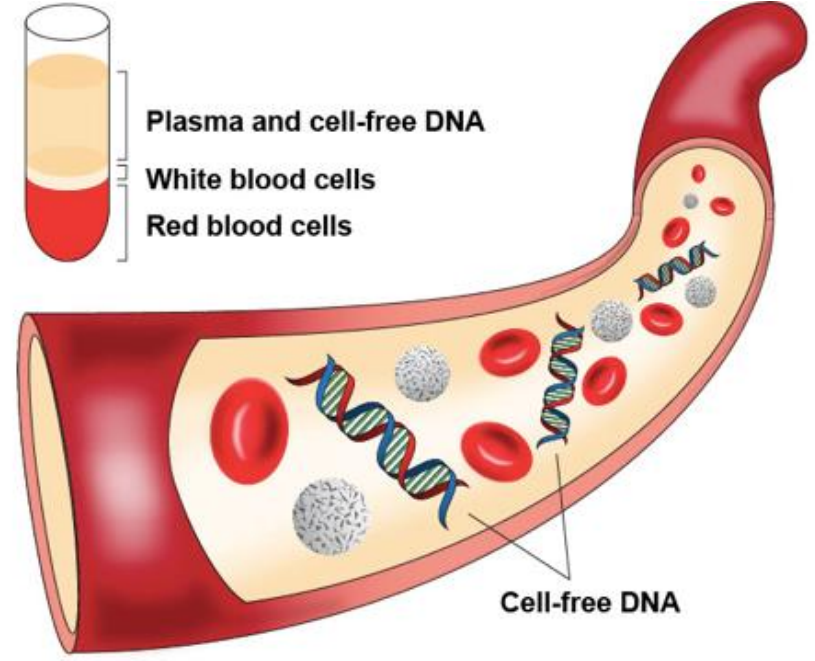
Avantaj & Dezavantajları

Protokol biyopsisi (Bx)



Örneklem hataları ve
Yorumlama farklılıkları

Klinik bulgular $\neq$ subklinik allograft hasarını tanımlamak ve
geri dönüşü olmayan hasar gelişmeden önce müdahale etmek için

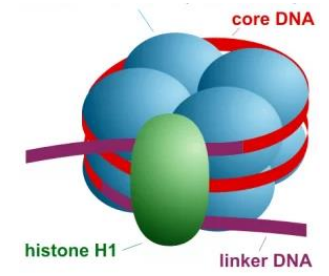


...1948
...1965
...2000

Kanser tedavisinde dokudaki gerçek zamanlı değişiklikleri
izlemek için 'Likid Biyopsi' ve antenatal tanı amaçlı

Hücresiz DNA (cell free DNA, cfDNA)

Kan dolaşımında uzunluğu 80 – 200 bp (ort: 167 bp) olan çift sarmallı bir DNA fragmanı



- İnflamasyon

- Kanser
- Otoimmünite
- Sepsis
- Yanık

- ✓ Apoptoz
- ✓ Nekroz
- ✓ Netoz
- ✓ Aktif sekresyon

- Paralizi
- Fiziksel efor, travma
- Eritroblast enükleasyonu

cfDNA



genetik ve
epigenetik değişiklikler
fragmanlarının uzunluk
ve bütünlüğüne göre

Kaynaklandığı hücreler

Median $t_{1/2}$: 16 dk – 2.5 sa (ort 30 dk)

Allogreft hasarı için potansiyel bir erken gösterge,
donörden türetilmiş hücresiz DNA olan dd-cf DNA

Transplantasyonda dd-cfDNA kantifikasyonu

- ✓ Mutlak

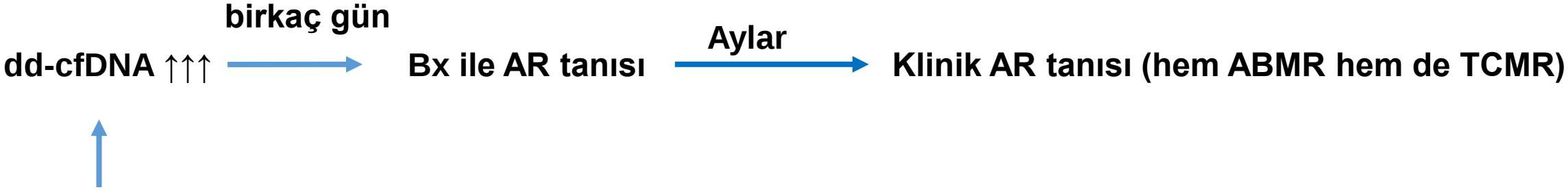
ml başına kopya (cp/ml) veya
genom eşdeğeri (GE/ml)

- ✓ Fraksiyonel (% , bağlı)

toplam cfDNA havuzundaki dd-cfDNA'nın yüzdesi ✓

Normalde, dolaşımdaki cf-DNA'nın küçük bir kısmı (<%0.2) **dd-cfDNA**

AR durumlarında ↑ ↑ ↑, AR süresi boyunca ↑ ↑ ↑, sonraki 3 ay içinde ↓



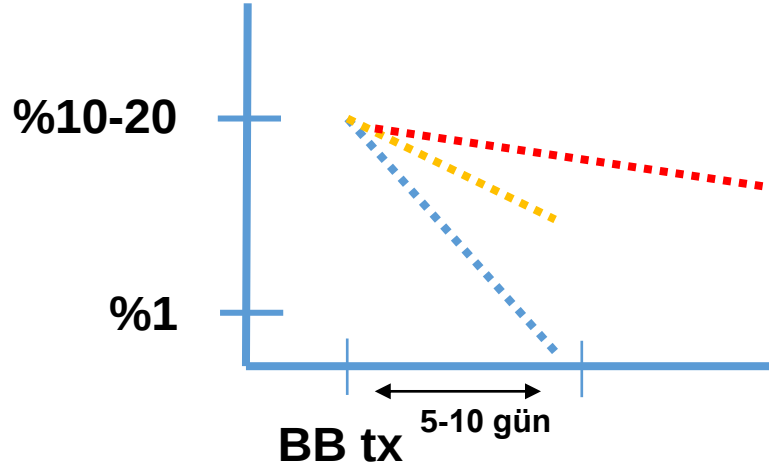
Ancak,

- ✓ AR dışı durumlarda
 - ✓ Enfeksiyon dahil diğer greft hasarı türlerinde
- rolü hala araştırılmaktadır

dd-cfDNA'daki artış → klinik patoloji belirtisi

İskemi Reperfüzyon Hasarı

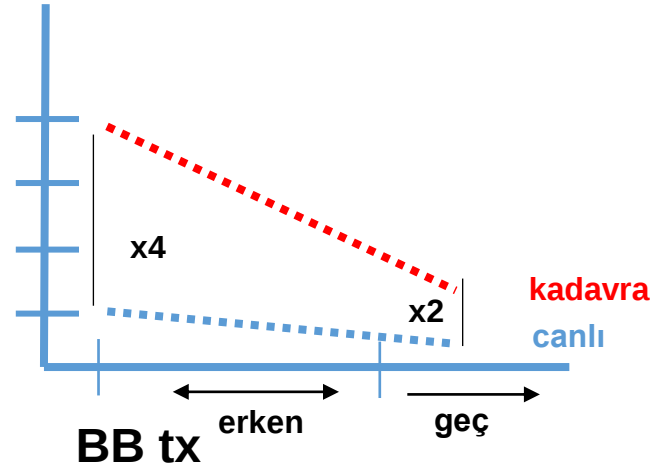
dd-cfDNA



<10 gün ↑ dd-cfDNA → Gelecekteki komplikasyonların bir işareti

>10 gün ↑ dd-cfDNA → Stabil olmayan hastada allotransplant hasarı

%



Kadavra Tx'lerde & canlı verici Tx'lere göre

↓
dd-cfDNA %: erken dönemde **X4**, uzun vadede **X2** ↑

Diagnostic Accuracy of Donor-derived Cell-free DNA in Renal-allograft Rejection: A Meta-analysis

Xiao, Hanyu MD¹; Gao, Fang MD²; Pang, Qidan MD³; Xia, Qiuxiang MD, PhD¹; Zeng, Xianpeng MD, PhD¹; Peng, Jingtao

n=9 çalışma +; bunlardan n=6 (ABMR+TCMR) için dd-cfDNA'nın tanısal doğruluğuna odaklı

ABMR

ABMR+TCMR

Hassasiyet (Sensitivity): 0.84

0.70



Özgüllük (Specificity): 0.80

0.78

ROC Eğrisi Altında Kalan Alan (AUC): 0.89

0.81

Tanısal Odds Oranı (DOR): 20.48

8.18

Negative Likelihood ratio (NLR): 0.20

0.39



dd-cfDNA: negatif → ABMR olasılığı ↓

ABMR'yi elemek (rule out) için çok kullanışlı

Yanlış Negatif ↑ → mutlaka allograft biyopsisi

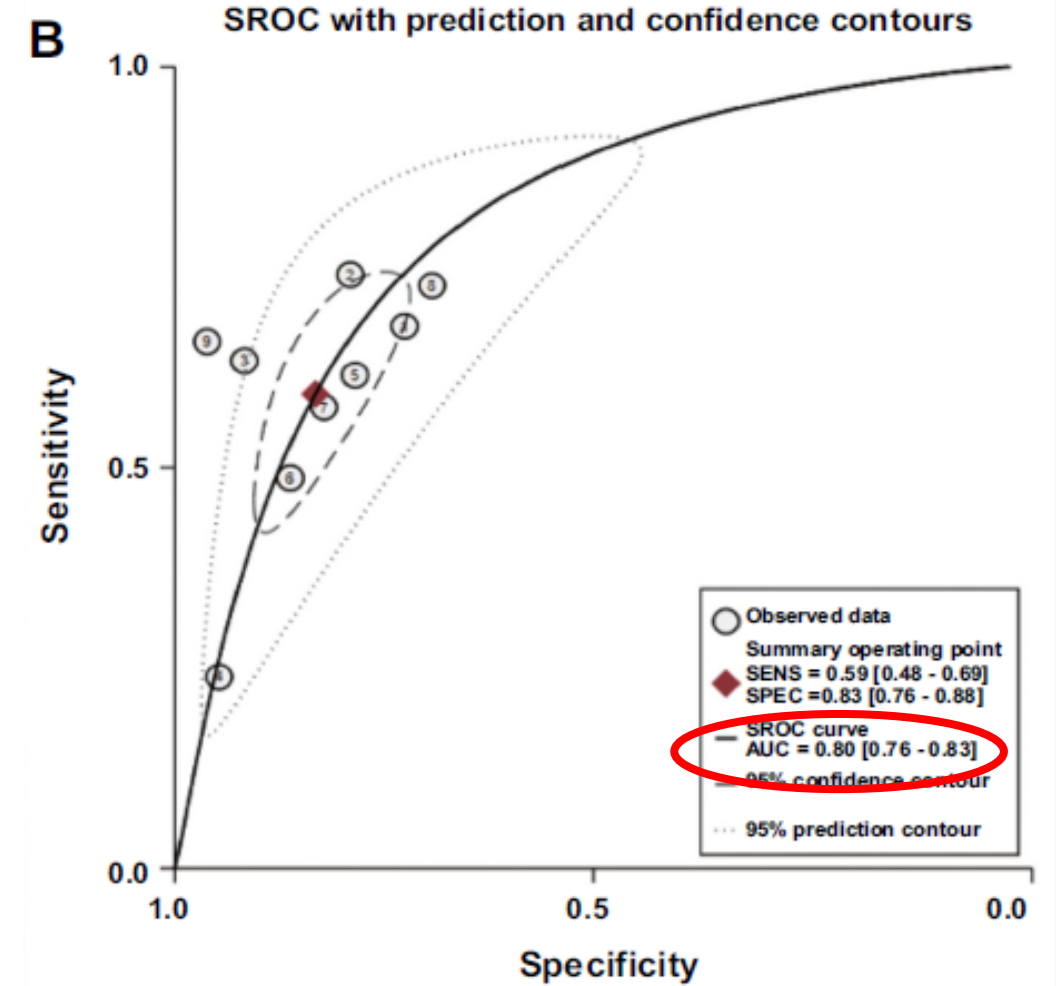
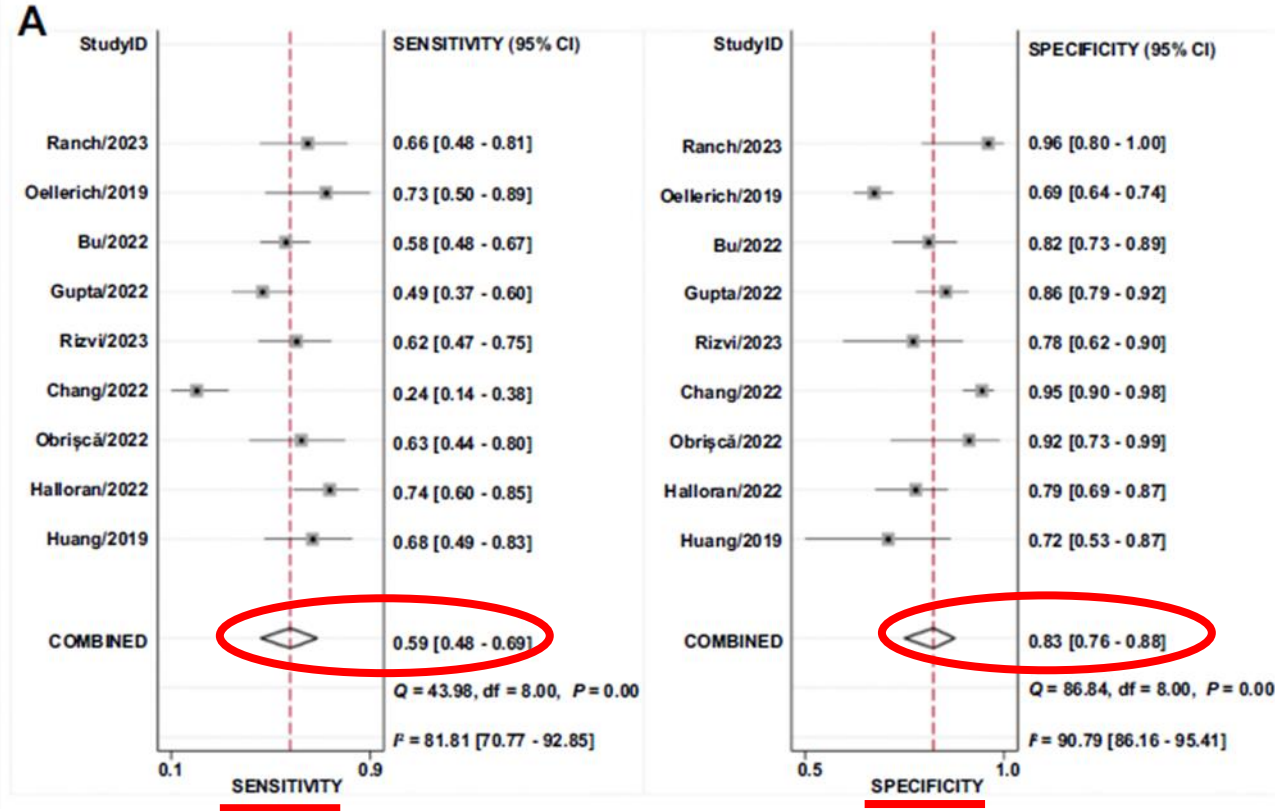
Donor-derived cell-free DNA as a diagnostic marker for kidney-allograft rejection: A systematic review and meta-analysis

Biomolecules and Biomedicine, 2024

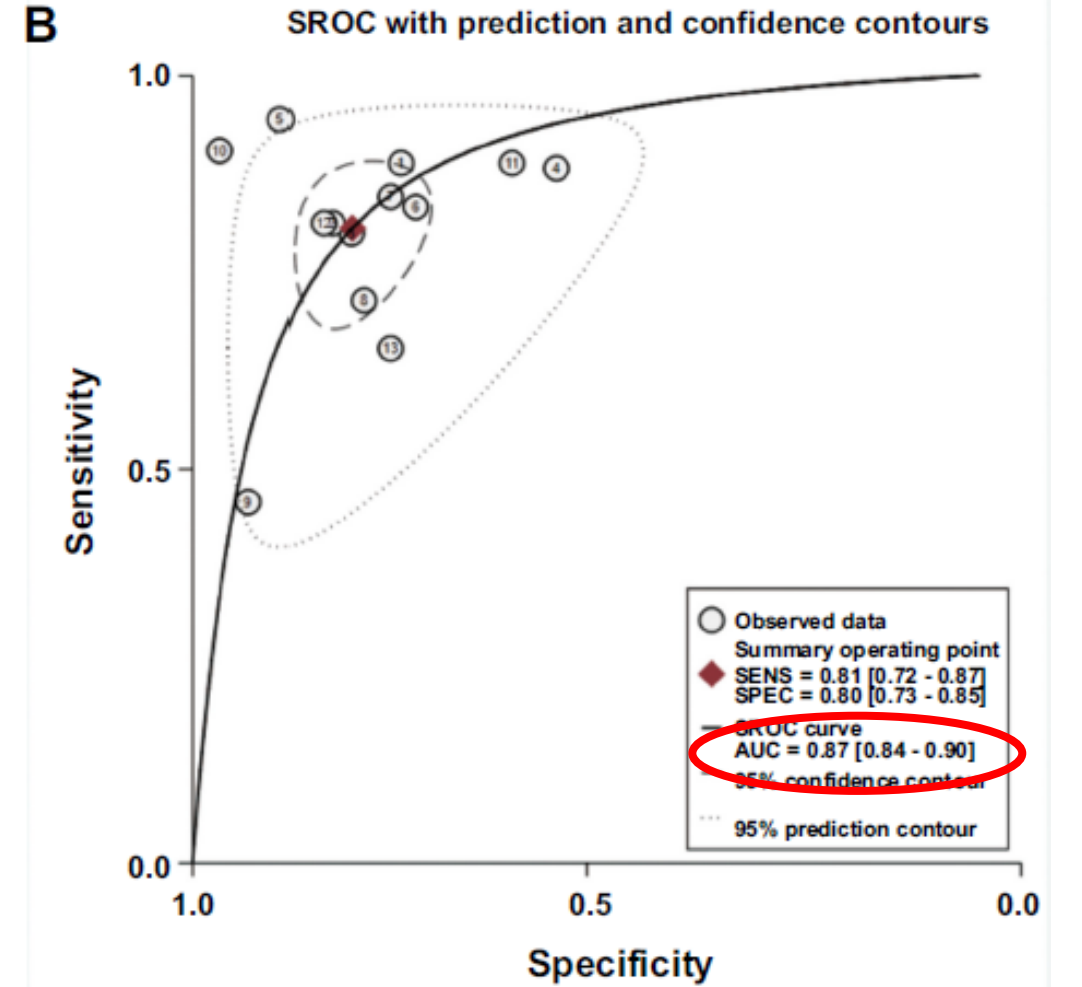
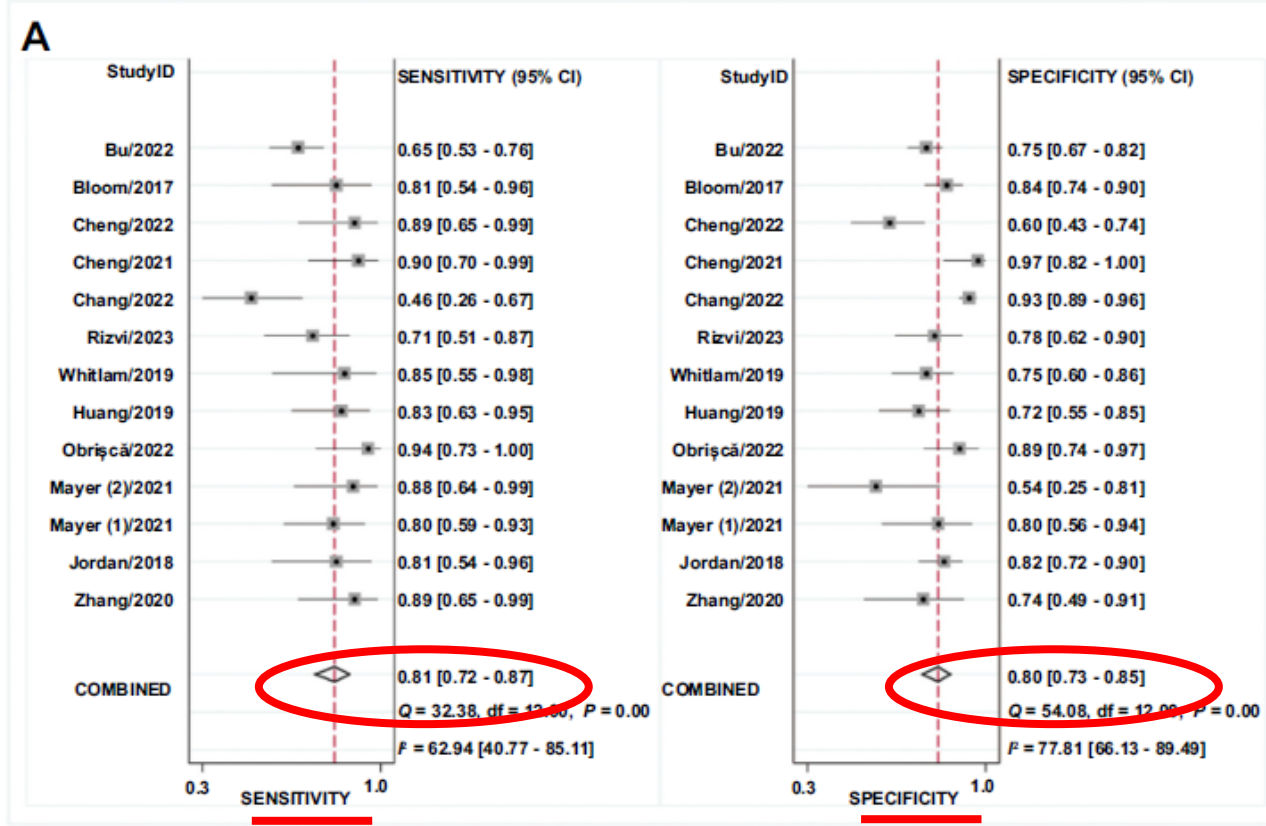
Vol. 24, No. 4, 731–740

Yanbo Xing ^{1,2#}, Qiang Guo ^{1#}, Cong Wang ^{1,2}, Haoying Shi ^{1,2}, Jiarui Zheng ^{1,2}, Yijun Jia ^{1,2}, Chengyong Li ¹, and Chuan Hao ^{1*}

AR için %1 eşik değere göre dd-cfDNA'nın tanısal doğruluğuna odaklanan 9 makale analiz edilmiş



ABMR için %1 eşik değere göre dd-cfDNA'nın tanısal doğruluğuna odaklanan 13 makale analiz edilmiş



✓ AR tanısında dd-cfDNA'nın doğruluğu çok güvenilir değil

AR için

Negatif Prediktif değer (NPV)  → "**dışlama testi**" olarak değer katar

✓ ABMR için bir tanı göstergesi olarak yararlıdır

Rejeksiyon Tipini Belirmedeki Rolü

ABMR

TCMR

İnterstisyel inflamasyon ve tübülit; dd-cfDNA'nın yaygın bozulmasına → daha küçük parçalara

Kompleman aracılı ‘membrane attack complex’;
hücre lizisi; dolaşıma ↑↑↑↑ cfDNA

Apopitoz sonrası fagositoz; hücre içi içeriğin çoğunu izole eder; dolaşıma ↑ cfDNA salınması

Antikorlar ve vasküler endotel arasındaki etkileşimler;
dd-cfDNA'nın doğrudan kan dolaşımına salınması

Daha az damarı tutulumu

TCMR'yi tespit etmek için test performanslarının daha fazla araştırılması gerekir

Oellerich, et al. Liquid biopsies: Donor-derived cell-free DNA for the detection of kidney allograft injury. *Nat. Rev. Nephrol.* **2021**
Dauber EM, et al. Quantitative PCR of INDELs to measure donor-derived cell-freeDNA—a potential method to detect acute rejection in kidney transplantation: a pilot study. *Transpl Int* **2019**
Clausen FB, et al. Droplet digital PCR-based testing for donor-derived cell-free DNA in trans-planted patients as noninvasive marker of allograft health: Method- ological aspects. *PLoS One* **2023**
Kueht, M.L., et al. The Current State of Donor-Derived Cell-Free DNA Use in Allograft Monitoring in Kidney Transplantation. *J. Pers. Med.* **2022**
Bloom, R.D., et al. Cell-Free DNA and Active Rejection in Kidney Allografts. *J. Am. Soc. Nephrol.* **2017**
Halloran, P.F., et al. Antibody-mediated Rejection Without Detectable Donor-specific Antibody Releases Donor-derived Cell-free DNA: Results From the Trifecta Study. *Transplantation* **2023**

AR için dnDSA & dd-cfDNA?

Moleküler Mikroskop Tanı Sistemi

n=280 biyopside → dd-cfDNA
DSA

ABMR + %75 dd-cfDNA $\geq$ %1.0
%44 DSA +

ABMR'yi öngördüren bir faktör olarak

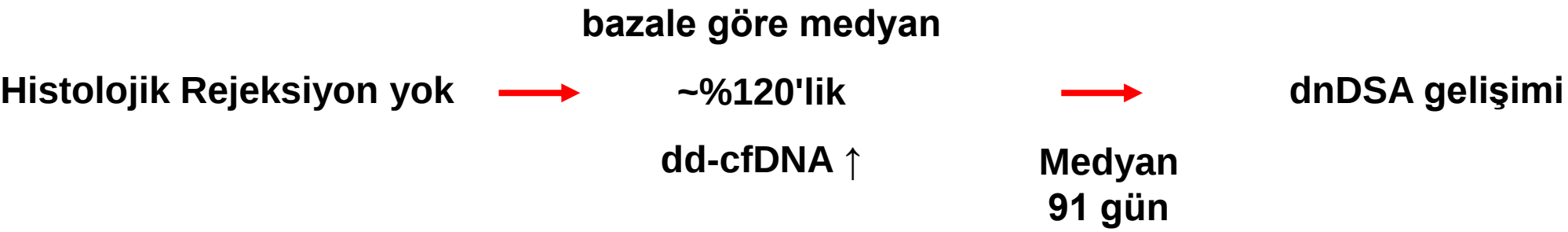
AUC	dd-cfDNA	0.85
	DSA	0.66

Bu da dd-cfDNA'yı AR'yi tanımada DSA'ya göre daha iyi bir biyobelirteç haline getirmektedir

dnDSA ile dd-cfDNA ilişkisi

dd-cfDNA kalıcı >%0.5 olanlarda, gelecekte 3 x daha fazla dnDSA üretimi riski

dd-cfDNA her %1'lik artış, dnDSA oluşumu riskinde %20'lik bir artışla ilişkili



AR için dnDSA + dd-cfDNA?

İki bağımsız kohortta DSA + dd-cfDNA kombinasyonunun AR tanısal değerine etkisi

- Post Tx >180 gün DSA + subklinik vakalar



ABMR'nin tanımlanmasında
tanısal verimi iyileştirmiş

dd-cfDNA eklenmesi

- Endikasyon biyopsileri ile ABMR aranan vakalar



TCMR, glomerülonefrit ve BKVN için benzer
bir tanısal değere dönüşmemiş

dd-cfDNA, DSA ve ABMR'nin tanı eksenini güçlendirirken,
diğer patolojileri tanımlamadaki tanısal doğruluğu, optimalin altında kalmıştır

Donor-derived cell-free DNA monitoring for early diagnosis of antibody-mediated rejection after kidney transplantation: a randomized trial

Nephrol Dial Transplant, 2025, 40, 1384–1395

Aylin Akifova ¹, Klemens Budde ¹, Kerstin Amann², Maike Buettner-Herold², Mira Choi¹, Michael Oellerich³, Julia Beck⁴,



Tek merkezli, açık etiketli, randomize klinik çalışmada

Methods

40 KTRs with dnDSA
1:1 randomization

Intervention
dd-cfDNA
monitoring



Control
Standard
of care

If dd-cfDNA
> 50cp/mL

If clinical
indication



Kidney biopsy

Primary endpoint:
Time to AMR diagnosis

- >18 yaş
- Post-Tx >180 gün
- En son yıllık HLA taramasında dnDSA'nın MFI > 1000

Results

Biopsies



**Intervention
dd-cfDNA
monitoring**

13



**Control
Standard
of care**

13

Results

Biopsies



**Intervention
dd-cfDNA
monitoring**

13

AMR diagnosed

7



**Control
Standard
of care**

13

5

dnDSA+ Bb Tx'de
mutlak dd-cfDNA
rehberliğinde bx, ABMR
tanısına kadar geçen süreyi
kısaltabilir

Results		
	 Intervention dd-cfDNA monitoring	 Control Standard of care
Biopsies	13	13
AMR diagnosed	7	5
Time to AMR diagnosis	2.8 months	14.5 months
Ortanca (IQR)	1.7-5.3	13.3-16.7

Evaluation of *de novo* donor specific antibodies after kidney transplantation in the era of donor-derived cell-free DNA

Yuan Tian¹, Lukas Frischknecht¹, Anna Mallone¹,
Fabian Rössler², Thomas Schachtner³ and Jakob Nilsson^{1*}

TYPE Original Research

PUBLISHED 16 January 2025

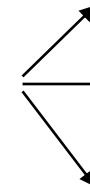
DOI 10.3389/fimmu.2024.1530065

dd-cfDNA → dnDSA için patojenik olanı & olmayan antikorlardan ayırt etmeye ?

**MFI >500 dnDSA +
n=75 hasta**



**Reaktivite örüntüsünü
ve epitop özgüllüğüne göre**

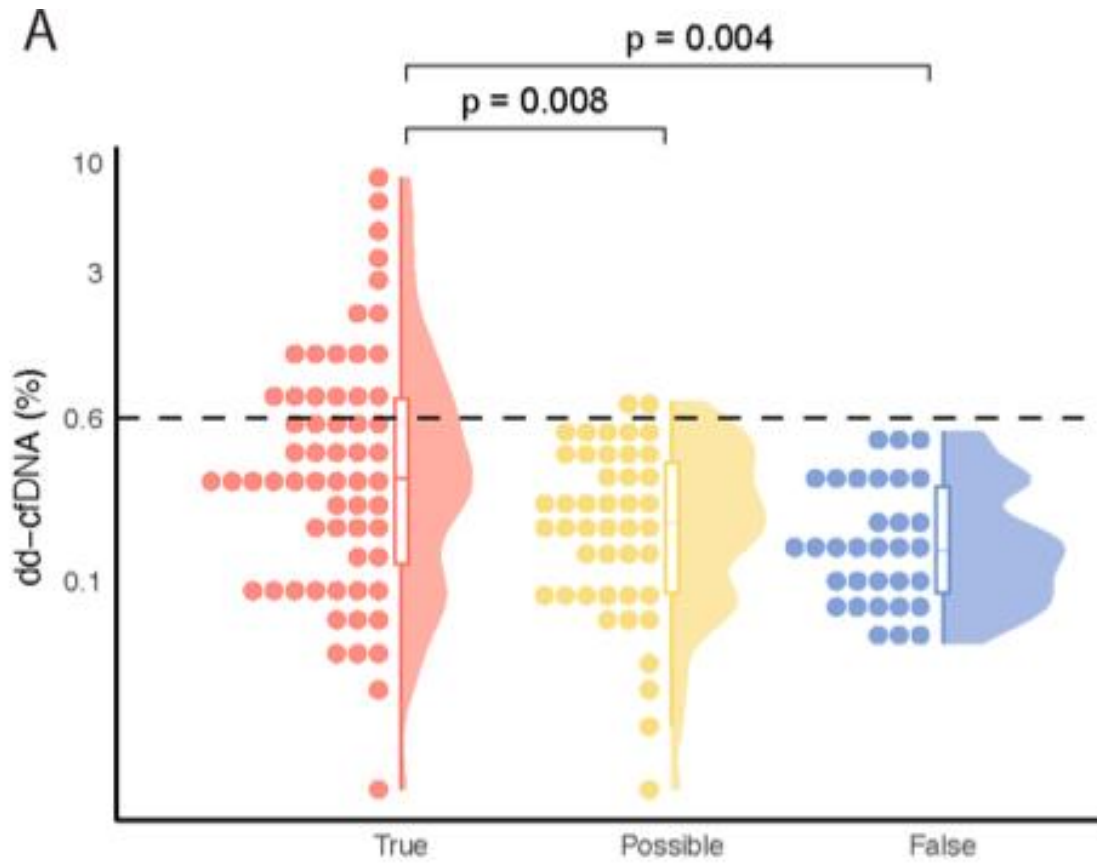


Gerçek n=28

Olası n=27

Yanlış n=20

**Transplantasyon öncesi genotipleme +
dd-cfDNA eşik değeri %0.6**



dd-cfDNA



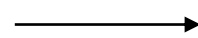
↑
n=2
>%0.6

—
<%0.6

> %0.6 dd-cfDNA

$\propto$

gerçek dnDSA



Greft hasar riski



Donor-derived cell-free DNA (dd-cfDNA) for detection of allograft rejection in pediatric kidney transplants

Pediatric Transplantation.

2021;25:e13850.

Dechu P. Puliya¹  | Rita Swinford² | Helen Pizzo¹ | Jonathan Garrison¹ | Aleksandra M. De Golovine² | Stanley C. Jordan¹

n= 67	dd-cfDNA medyan
- Klinik olarak endikasyon (n=48) (greft disfonksiyonu, DSA, viral enfeksiyon, lökopeni)	0.47
-Önceden belirlenmiş zamanlar her 3-6 ayda bir /n=19)	0.37

n= 48 klinik olarak AR şüphesi +
n=7 dd-cfDNA skoru ≤%1
n=3 bx'de AR+

dd-cfDNA > %1.0 veya klinik endikasyon biyopsi

AR tanısında dd-cfDNA >%1 eşik değeri için

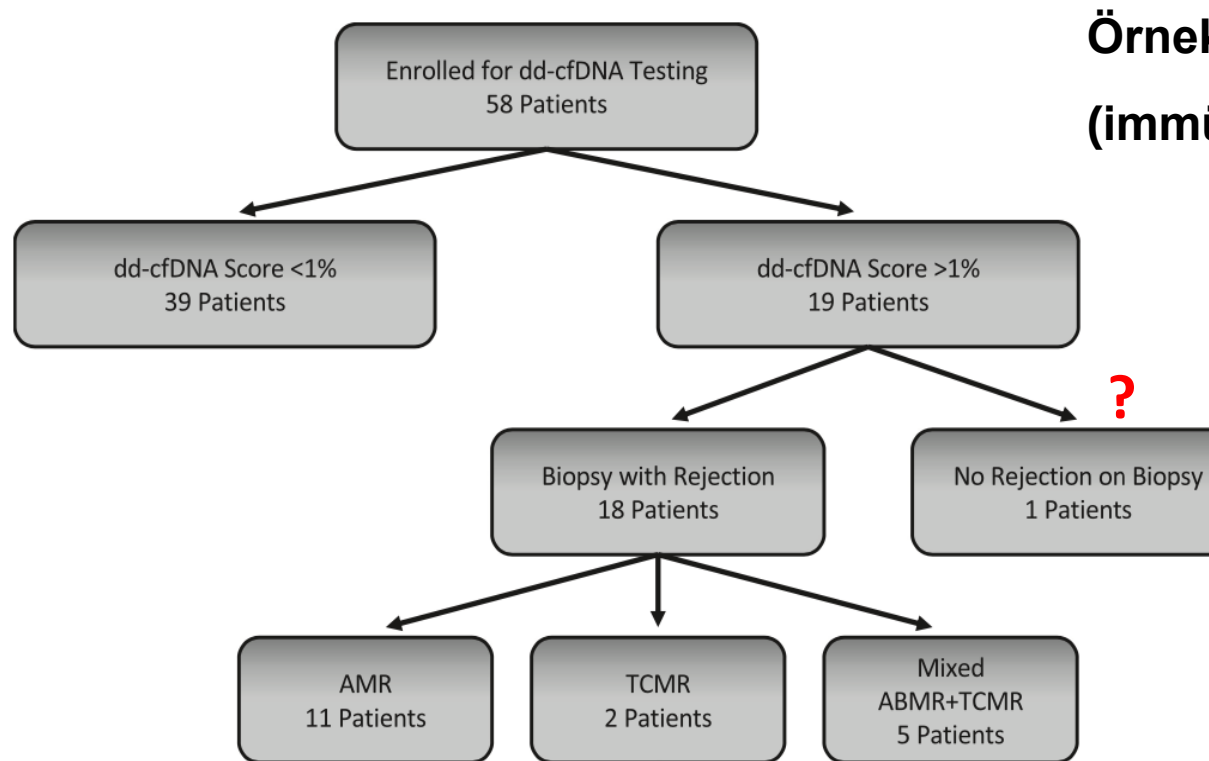
%86 duyarlılık ve %100 özgüllük

(AUC: 0.996, 0.98-1.00; p= 0.002)

Use of a donor-derived cell-free DNA assay to monitor treatment response in pediatric renal transplant recipients with allograft rejection

Pediatric Transplantation.
2022;26:e14258.

Justin A. Steggerda  | Helen Pizzo  | Jonathan Garrison | Xiaohai Zhang |
Mark Haas | Irene K. Kim  | Stanley C. Jordan | Dechu P. Puliya 



Örnekler 6 aylık aralıklarla
(immünsüpresyonun ↓ her 3 ayda bir)

Histolojik olarak kanıtlanmış reddi olan hastalar çalışma grubu +

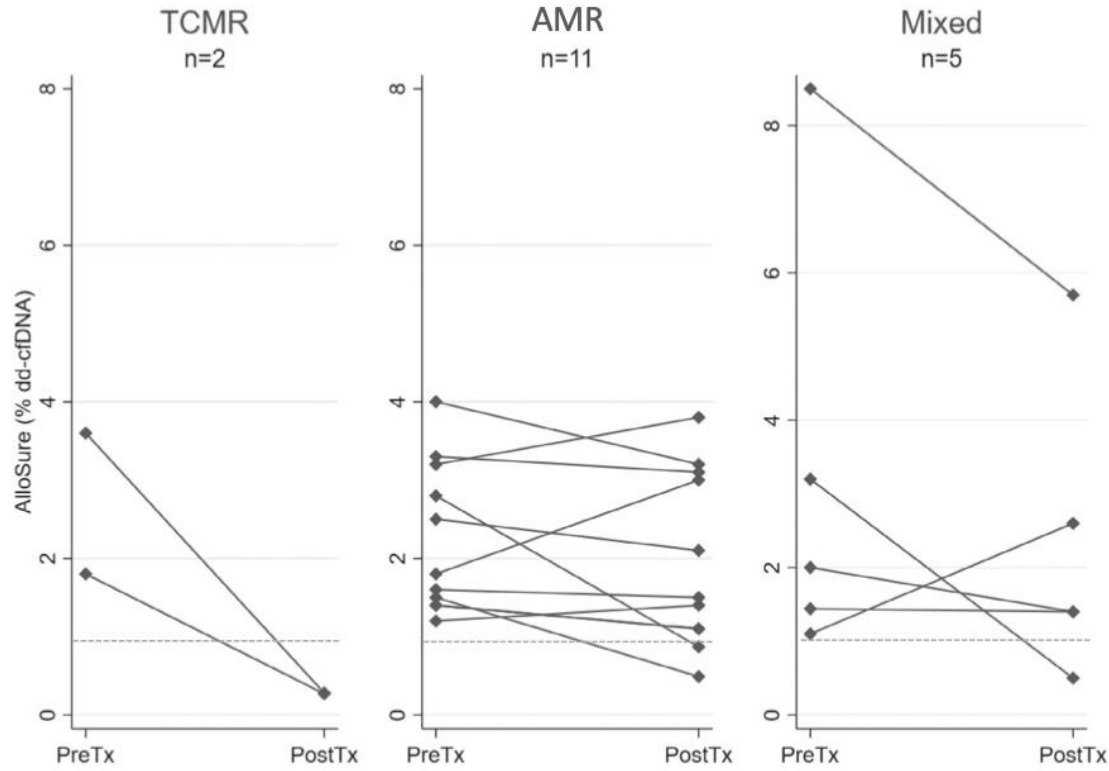


FIGURE 3 Pre- and post-treatment dd-cfDNA measurements. Donor-derived cell-free DNA (dd-cfDNA) measurements are presented for individual patients, separated by rejection subtype. Dotted line represents 1% threshold

Biyopsi SCr 1.28 ± 1.09 mg/dl

Tedaviyi takiben, dd-cfDNA tüm rej türleri için düştü

ABMR %1.50 [%0.90-%3.10]

Karışık %1.40 [%0.95-%4.15]

>%1

SCr, rej tipinden bağımsız olarak tedavi

öncesi seviyelere göre minimum değişiklik

TCMR'li hastalar güvenilir bir şekilde dd-cfDNA ile takip edilebilir

ABMR'de sürekli olarak $\uparrow$ dd-cfDNA ; devam eden subklinik AR mi, testin doğal bir sınırlaması mı ?

Longitudinal Evaluation of Donor-Derived Cellfree DNA in Pediatric Kidney Transplantation

CJASN 17: 1646–1655, 2022.

Raja Dandamudi ¹ Hongjie Gu,² Charles W. Goss,² Leslie Walther,¹ and Vikas R. Dharnidharka¹

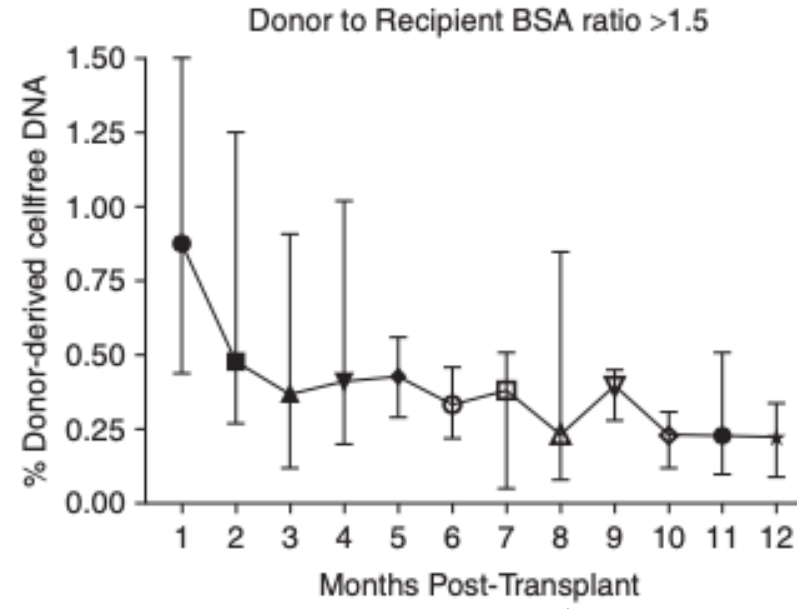
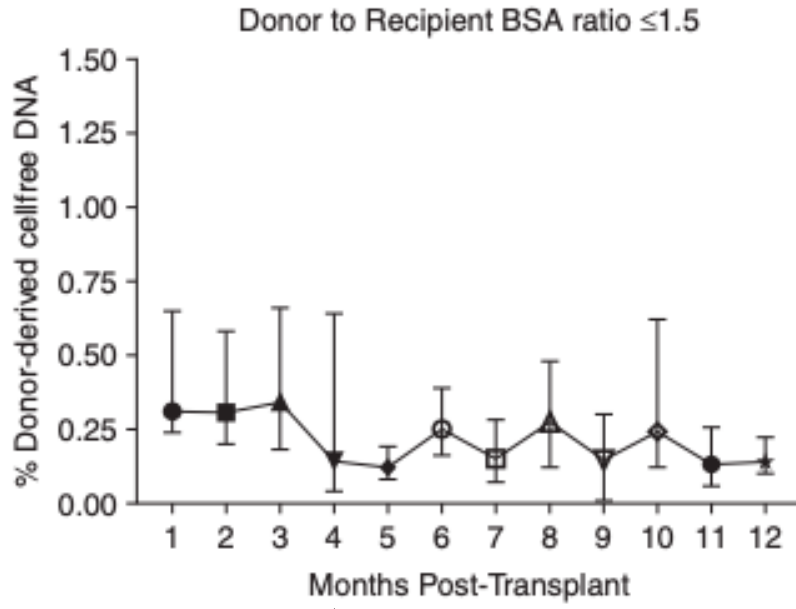
$$\frac{\text{dd-cfDNA}}{\text{dd-cfDNA} + \text{alıcı-cfDNA}} \times 100$$

Allograft ile alıcı arasındaki boyut eşitsizliği % dd-cfDNA?

n=57 çocuktan

Post tx ilk 12 aylık kan ve idrar örneği

Recipient sex, n (%)	
Boys	32 (56)
Girls	25 (44)
Recipient age, yr	
Median (25–75 percentile)	14 (7.5–16)
Recipient BSA	
Median (25–75 percentile)	0.86 (0.5–1.4)
Race, n (%)	
White	45 (79)
Black	9 (16)
Other	3 (5)
Donor source, n (%)	
Deceased	42 (74)
Living	15 (26)
Prior transplant, n (%)	
Yes	1 (2)
Primary kidney disease, n (%)	
Glomerular disease	23 (40)
Nonglomerular disease	30 (53)
Unknown	4 (7)
Donor age, yr	
Median (25–75 percentile)	27 (20–34)
Donor sex, n (%)	
Boys	33 (58)
Girl	24 (42)
Donor BSA	
Median (25–75 percentile)	1.1 (0.78–1.6)



Verici-alıcı VYA oranı < 1.5
ortalama dd-cfDNA %
nakilden > 4 ay < 0.3

Verici-alıcı VYA oranı > 1.5
Medyan dd-cfDNA %
nakilden > 8 ay kadar 0.3 'e ulaşmamış

Utilization of donor-derived Cell-Free DNA in pediatric kidney transplant recipients: A single center study

Pediatric Transplantation. 2023;00:e14582.

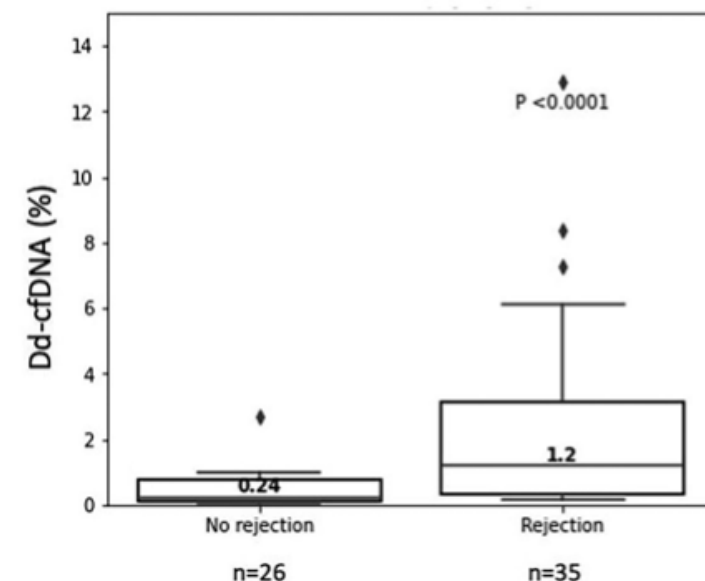
Daniel Ranch¹ | Mingwei Fei² | Elisabeth Kincade^{3,4} | Kim Piburn¹ |
Kelley Hitchman⁵ | Kelsey Klein^{3,4}

n=42, 61 allograft bx (n=44 endikasyon, n=17 protokol)

Bx/AR tedavisi öncesinde ve sonrasında dd-cfDNA

AR tedavisinden sonra dd-cfDNA'daki medyan değışiklik **-%0.57**

dd-cfDNA ≤%1'e geçen ort süre **8.5 gün**



Protokol bx'lerde, **4/17** TCMR AR (+) & (-) median dd-cfDNA $\emptyset$

AR - hepsi dd-cfDNA <1%

AR + sadece n=1 dd-cfDNA >1%

≤%1 dd-cfDNA hastaların protokol biyopsilerinde AR olmaması

Bu biyopsi sayısını azaltabilir

Donor-derived Cell-free DNA as a Noninvasive Biomarker of Kidney Allograft Rejection in Pediatric Kidney Transplantation

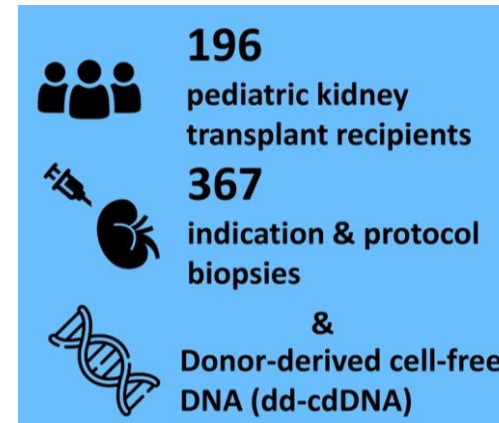
Transplantation. 2025 Apr 9.

Julien Hogan^{1 2 3}, Roshan George⁴, Carissa Hayes⁴, Olivier Aubert¹, Véronique Baudouin², Elodie Cheyssac², Charlotte Duneton², Chris Fan⁴, Margret Kamel⁴, Marion Rabant⁵, Hong Yin⁶, Alexandre Loupy¹, Rouba Garro⁴

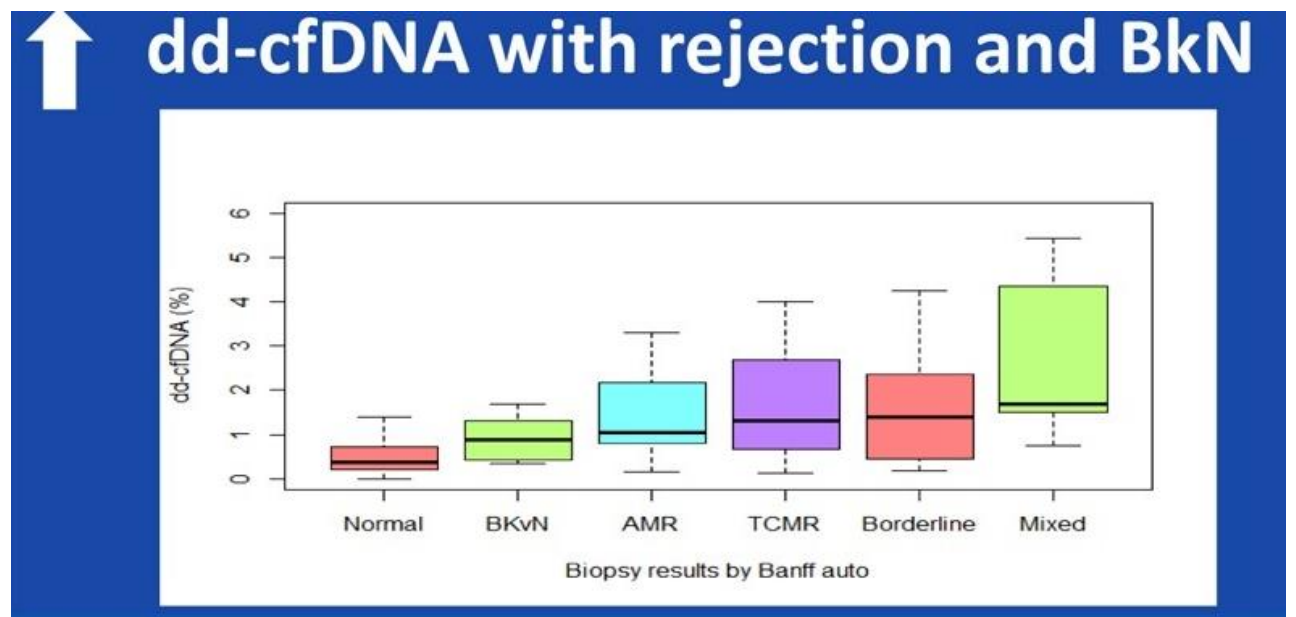
Pediatric böbrek nakli alıcıları (pKTR'ler)

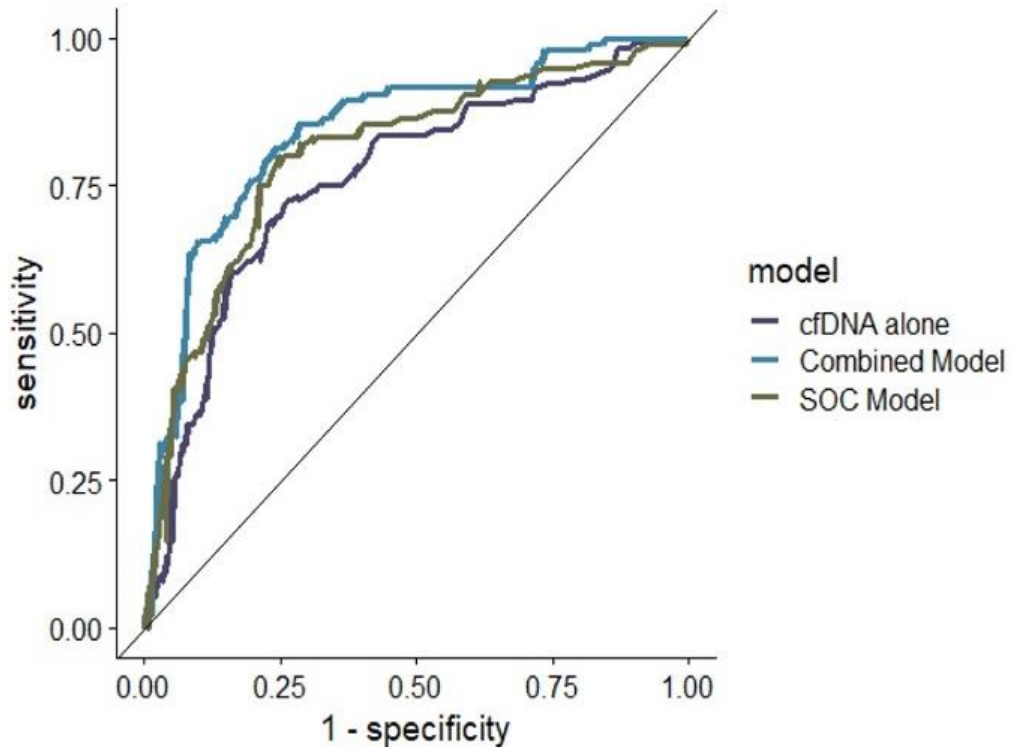
- ✓ Standart izlem
- ✓ Tek başına dd-cfDNA'ya göre izlem
- ✓ Standart izlem + dd-cfDNA

3 modeli, AR tanısı ile ilişkisi için karşılaştırmışlar



dd-cfDNA,
AR varlığıyla güçlü ve bağımsız bir şekilde ilişkili
odds ratio: 1.89
(confidence interval 1.40-2.60)





	AUC
dd-cfDNA tek başına	0.76 (CI 0.69-0.81)
Standart izlem	0.80 (CI 0.71-0.85)
Standart izlem + dd-cfDNA	0.84 (CI 0.79-0.90)
	p=0.01

dd-cfDNA, standart bakımla birleştirildiğinde pKTR'lerde AR öngörüsünü iyileştirir



Donor-derived cell-free DNA testing in pediatric kidney transplant recipients: indications and clinical utility

Pediatric Nephrology (2025) 40:2669–2678

Jayanthi Chandar^{1,2} · Vaka Sigurjonsdottir^{1,2} · Marissa Defreitas^{1,2} · Tara Gavcovich¹ · Mingming Zhou³

Klinik bir endikasyon için (dd-cfDNA) testinin gerçekleştirilmesindeki tek merkezli deneyim

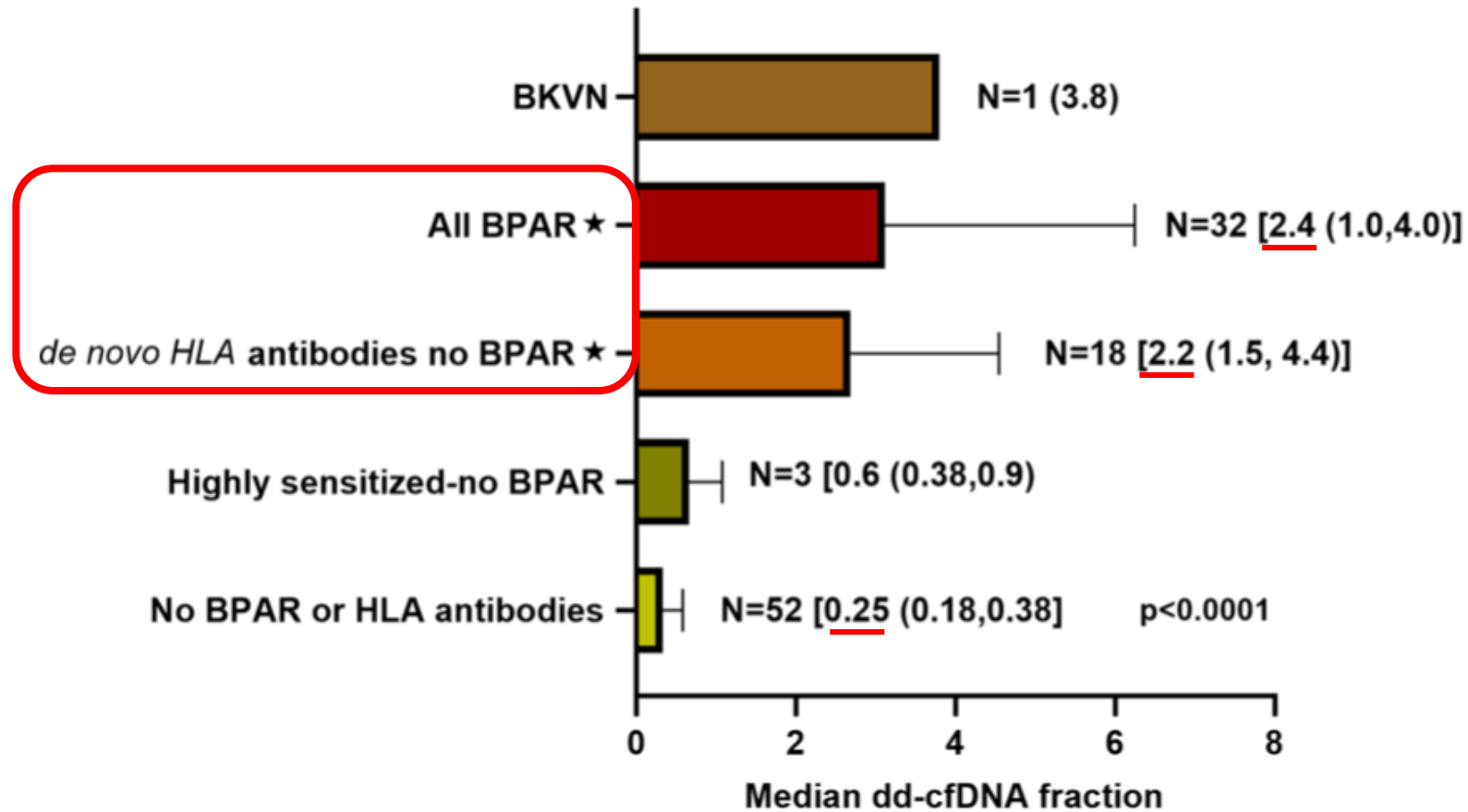
Yöntem Kreatinin ↑
de novo anti-HLA antikorlarının (dnHLAab) +
Bir klinik endikasyon

dd-cfDNA

dd-cfDNA >%1
dd-cfDNA ≤%1

hastaların klinik özellikleri

Median dd-cfDNA according to Clinical Condition



★ In Dunn's multiple comparisons test, there is a significant difference between All BPAR (Borderline, TCMR 1A and 1B, ABMR) and *de novo* HLA antibodies from other indications.

İmmünolojik sessizlik durumlarında medyan <0.25

1. ABMR için oldukça hassas, invaziv olmayan biyobelirteç
2. Yüksek negatif öngörü değeri, gereksiz invaziv tanı biyopsisinden kaçınmaya yardımcı olur
3. Kısa bir $t_{1/2}$ sahiptir ve başarılı AR tedavisinden sonra seviyeleri hızla düşer
4. Yetersiz immünosupresyonun invaziv olmayan şekilde tespiti
5. Mutlak 'absolute' (copy/mL) dd-cfDNA, kesirli 'fractional' (%) dd-cfDNA'nın bir sınırlaması olan enfeksiyon ve AR ayrımını yapabilir
6. Erken greft kaybını ve yeniden nakilleri azaltmak için nakil alıcılarının maliyet-etkin gözetimi

Dezavantajlar

1. BK nefriti ve diğer organ hasarı nedenleri sırasında da artabilir
2. Farklı testlerin AR için farklı eşikleri vardır ve preanalitik faktörlerin standardizasyonun anlaşılması
3. Uzun süreli gözlemde test sıklığı ve zamanlaması? Seri ölçüm gerekli
4. Kronik rejeksiyon veya subklinik rejeksiyon konusunda veri eksikliği
5. Nakilden sonraki 4 hafta içerisinde yeterince test yapılmamış
6. dd-cfDNA %, efor, travma, VKI artışı gibi koşullarında artabilir; Eşik değer? Mutlak değer?
7. Testin maliyeti ve pediatrik hastalarda ihtiyaç duyulan nispeten büyük kan hacmi (5 mL)

Sonuç

dd-cfDNA'nın yorumlanması için klınık bağlam önemlidir ve bu da önemli bir sınırlamadır

dd-cfDNA tek başına bir test olarak kullanılamaz

dd-cfDNA ↑

- Enfeksiyonların varlığı
- Takrolimusun hasta içi değışkenliği
- Viral replikasyonun büyüklüğü
- Virüse özgü T hücresi izleme
- de novo antikorlar

gibi diğer klinik bilgiler ve
test kombinasyonlarıyla birlikte
yorumlanması gerekir

Zorluklara ve bilinmeyenlere rağmen AR tespiti için umut vaat etmektedir