

Foreløbig titel:

TIDLIG LYMFOM- OG LEUKÆMIDIAGNOSTIK - en undersøgelse af biomarkører i plasma fra donorer, som deltager i Det Danske Bloddonorstudie

Førsteforfatter/ medforfattere/ sidsteforfatter:

Ole B Pedersen / ?? / Kirsten Grønbæk

(Udfyldes når beslutning er truffet af styregruppen)

Synopse *(Kort beskrivelse af baggrund, formål, metode og evt. forventede resultater)*

På trods af mange års intensiv forskning er kræft fortsat et stort helbredsproblem og er årsag til mere end 15.000 dødsfald i Danmark om året. For de fleste dødelige kræftformer gælder det, at de opdages for sent til at kunne kureres ved operation. Det vil derfor være et stort fremskridt, hvis der kunne findes biomarkører i blodet, som med høj sikkerhed kan stille kræftdiagnoser tidligt og som derfor kan bruges til screening af raske eller af patienter med uklare symptomer.

Selvom donorer skal være raske for at donere blod, udvikler de sygdomme ligesom alle andre danskere. Som eksempel har vi set på forekomsten af tyktarmskræft hos danske bloddonorer. Blandt de 255.738 bloddonorer, som havde doneret mindst en gang i perioden fra 1999 til 2003, var der 187, som fik diagnosen tyktarmskræft inden 1. jan 2003. Det svarer til en incidens på 18/100.000 personår, hvilket kun er ganske lidt lavere (25 %) end den aldersstandardiserede incidensrate i den danske befolkning. Bloddonorer udvikler altså kræft ligesom alle andre danskere, selvom de på det tidspunkt de donerer blod opfatter dem selv som raske.

Med den forventede inklusionsrate til DBDS vil vi have 100.000 personårs opfølgning ved udgangen af 2012. På det tidspunkt vil vi forvente at finde ca. 17 tilfælde af lymfom eller leukæmi. Da bloddonorerne donerer blod op til 4 gange årligt vil vi have op til 10 plasma-prøver og 3 års opfølgning for de først inkluderede donorer ved udgangen af 2012. I gennemsnit vil vi have 1½ års opfølgning og ca. 4-5 plasmaprøver for hver donor.

FORMÅL

Med udgangspunkt i kendte miRNA, som er associeret til de hyppigste former for lymfom og leukæmi nemlig kronisk lymfatisk leukæmi og diffust storcellet B-celle lymfom, at undersøge, om der findes biomarkører, som kan bruges diagnostisk forud for, at sygdommene giver symptomer.

Herunder skal der sammensættes et diagnostisk panel af udvalgte miRNA.

De ovennævnte miRNA resultater skal sammenholdes med histone-complexed DNA fragments (hcDNA), som udtryk for cellehenfald (tumorbyrde). Derudover skal bestemmes, om der findes metyleringsforskelle i DNA, som forudsiger udvikling af disse sygdomme.

METODE

Den grundlæggende metode er et case-control studie af cirkulerende biomarkører hos syge sammenlignet med raske kontroller, samt brug af historisk materiale til at fastlægge, hvor tidligt de cirkulerende biomarkører kan findes hos donorer, som udvikler sygdom.

Plan for projektets udførelse

Fase 1: Patientprøver og prøver fra matchede kontroller analyseres på Exicon miRCURY 11.0 arrays for at finde egnede markører.

Fase 2: donorprøver fra donorer som udvikler CLL eller diffust storcellet B-celle lymfom og kontroller testes for anvendelighed af diagnostisk panel af udvalgte miRNA. Gøres vha. udvalgte primere og SYBRGreen på LightCycler 480 II.

Materiale

Personer der skal indgå i studiet:

Fase 1: Rigshospitalets hæmatologiske afdeling vil for de hæmatologiske cancere skaffe EDTA plasma fra nydiagnosticerede patienter med CLL eller DLBCL til validering af, hvilke miRNA der kan bruges til at skelne mellem syge og raske (vha. microarray). Der bruges tilsvarende antal alders- og kønsmatchedede bloddonorkontroller.

Fase 2: Det udvalgte miRNA panel testes på arkiverede EDTA plasmaprøver fra DBDS donorer, som udvikler cancer igen med brug af det dobbelte antal alders- og kønsmatchedede raske bloddonorkontroller. Identificering af donorer som udvikler cancer vil ske ved registersamkøring mellem DBDS og sundhedsstyrelsens registre (cancerregisteret). Plasmaprøver er nedfrosset for hver donation (mindst siden indgang i DBDS).

Variabler der skal indgå i studiet:

(inkl. angivelse af om data allerede findes eller skal indsamles/måles)

Identificering af personer med cancer vha. udtræk fra cancerregisteret.

Der isoleres total RNA inkl. miRNA fra plasma. RNA oprensnes på søjle fra Exicon (Exicon miRCURY RNA isolation kit), som isolerer både miRNA og almindeligt RNA. Totalt RNA mærkes og hybridiseres til Exiqon miRCURY 6th gen arrays eller qPCR, som anbefalet af producenten. Der konstrueres specifikke primere til identificering af miRNA ved qPCR. qPCR prøverne køres på LightCycler 480 II med SYBRGreen til kvantisering.

Derudover skal bestemmes methyleringsgrad af DNA (udvalgte SNP's vha. lightcycler assay).

Alle data ovenfor er nye og skal bestemmes som en del af undersøgelsen.

Statistiske analyser:

Ekspressionsdata analyseres ved hjælp af R og Bioconductor. Normalisering af data gøres v.h.a. LOWESS. Differentielt udtrykte gener identificeres v.h.a. lineære modeller i Limma og signifikansniveau bestemmes ud fra volcanoplots / Benjamini-Hochberg. Der foretages efterfølgende clusteranalyse af arraydata.

Sygdomsprediktion af miRNA panel vil blive bedømt vha. ROC kurver. Ud fra specifikke tærskelværdier beregnes odds ratio for prædiktion af udvikling af leukæmi eller lymfom. Signifikansniveau for miRNA panelet sættes til $< 0,05$.

Tidsperspektiv:

2012: Finansiering af projektet og indsamling af prøver på nydiagnosticerede patienter med lymfom eller leukæmi.

2013: Identificering af DBDS donorer som har udviklet lymfom eller leukæmi. Fremskaffelse af plasmaprøver på cases og kontroller fra frysehus. miRNA oprensning og analyse af Exiqon miRCURY 11.0 arrays / qPCR. Databearbejdning og publicering af resultater.

Persons ansvarlig for udformning af synopsis/kontaktperson(er):

Ole B. V. Pedersen

Finansiering (allerede opnået / skal søges / finansieres af DBDS midler):

Finansieres vha. fonde. Der er allerede indsamlet 50.000 DKK fra Fabrikant Einar Wilumsens Mindefond. Derudover søges fra Region Sjællands Forskningsfond.

Godkendt af styregruppen (dato):

Yderligere kommentarer: