

Opbevaring og håndtering af cfDNA fra hund

Projektansvarlige: Sophie Agger, Dyrlæge, PhD studerende
Forskningsgruppe: Maja Arendt, Dyrlæge, PhD, ECVIM-CA, lektor
Monica Nielsen, Dyrlæge, PhD studerende
Institution: Københavns Universitet, Institut For Klinisk Veterinærmedicin

Baggrund

Vi leder altid efter nye, bedre og mere sikre metoder til at diagnosticere og behandle kræft hos hund, da mange af de undersøgelser vi rutinemæssigt foretager, er invasive og har en relativt lav sensitivitet. En af disse potentielle metoder er at lede efter kræft-markører i blodbanen, så man kan nøjes med en blodprøve i stedet for undersøgelser som kræver anæstesi.

Det været kendt igennem længere tid at der findes cellefrit DNA i blodbanen (cfDNA), som frigives til blodet fra kroppens celler. I mennesker giver det bl.a. mulighed for at undersøge for udviklingsanomalier hos fostre. På samme måde ved man også at cancerceller kan frigive DNA til blodbanen. Denne DNA har forandringer som er specifikt for den pågældende tumor og kan derved bruges som markør for kræften. Metoden er under udvikling hos mennesker og vi ønsker at give hunde de samme muligheder for non-invasiv udredning. Dog er der helt basale ting som skal undersøges før det bliver muligt. En af udfordringerne er, at vi ikke ved hvordan forskellige præanalytiske variable påvirker koncentrationen af cfDNA. Da cfDNA findes i meget lave koncentrationer kan forkert håndtering af prøverne føre til forkerte resultater, primært i form af falsk negative resultater. Derfor ønsker vi at undersøge effekten af forskellige variable.

Hypoteser:

1. Den samlede centrifugeringskraft og ikke max hastighed afgør prøvens renhed.
2. Koncentrationen af cfDNA er stabil ved frysning ved -80° i op til 2 år.
3. Forskellige typer af cryorør påvirker ikke koncentration af cfDNA.
4. Prøverne kan tøj op til 5 gange uden koncentrationen af cfDNA påvirkes.

Hypotese 1: Den samlede centrifugeringskraft og ikke max hastighed afgør prøvens renhed.

Når cfDNA skal isoleres fra det perifære blod centrifugeres blodet for at fjerne større partikler. Det er bred enighed om at blodet centrifugeres 2 gange, første gang for at fjerne celler og store molekyler og anden gang for at fjerne mindre DNA-molekyler som frigives løbende fra cellerne. Der er dog ingen enighed hastighed eller længde af disse centrifugeringsmetoder. I øjeblikket benytter vi den centrifugeringsprotokol som er foreslået af producenten af vores ekstraktionskit. Der er dog den udfordring af denne protokol kræver en meget høj hastighed som der kun er få centrifuger der kan levere. Derfor ønsker vi at undersøge om en tilsvarende effekt kan opnås ved længere centrifugering ved lavere hastighed som de fleste centrifuger, som findes i praksis, kan levere. Hvis dette er tilfældet, vil det lette behandlingen af prøverne og derved udvide vores muligheder for at udtage prøverne.

Hypotese 2: Koncentrationen af cfDNA er stabil ved frysning ved -80° i op til 2 år.

Ekstraktion af cfDNA er tidskrævende og kan med fordel foretages i batches, hvor mange prøver ekstraheres samtidigt. Dog kan der gå lang tid før man har det nødvendige antal prøver og derfor vil de prøver som udtages først, være frosset i længere tid end de som udtages sidst. I et igangværende pilotstudie er der mere end 6 måneders forskel i frysetid. Derfor er det vigtigt at undersøge hvorvidt længden af perioden, hvor prøverne er frosset, påvirker mængden eller kvaliteten af cfDNA i prøven. Derfor ønsker vi at undersøge om mængden af cfDNA falder i perioden. Der er allerede lavet lignende studier humant, men over kortere perioder og disse kan derfor ikke svare på vores spørgsmål, grundet de unikke arbejdsforhold som vi har i Familiedyrspraksis.

Hypotese 3: Forskellige typer af cryorør påvirker ikke koncentration af cfDNA.

Ældre studier (1998-2010) har vist at forskellige typer af plast binder DNA forskelligt og det er derfor muligt at valget af opbevaringsrør kan ændre den mængde af cfDNA som kan ekstraheres. De rør som tidligere er vist at have en lav bindingsevne koster betydeligt mere end standardrør og er derfor en begrænsende faktor for vores studier. Derfor ønsker vi at undersøge om fundene fra de ældre studier stadigvæk er gældende, eller om kvaliteten af standardrør er forbedret tilstrækkeligt i de sidste 10 år.

Hypotese 4: Prøverne kan tøj op til 3 gange uden koncentrationen af cfDNA påvirkes.

Ved håndtering af prøverne kan det være svært at holde rørene tilstrækkeligt kolde grundet den lille mængde materiale. Det er derfor vigtigt at undersøge hvor stabilt cfDNA'et er overfor freeze-thaw cycles. Tidligere studier har vist at cfDNA'et er stabilt efter 3 freeze-thaw cycles undersøgt over en relativt kort periode. Vi ønsker at udvide disse undersøgelser og undersøge hvorvidt de samme gør sig gældende for cfDNA fra hund udtaget i K2-EDTA rør.

Materialer og metoder

Studiedesign: Prospektivt observationelt studie

Population: Hunde der præsenterer på Universitetshospitalet for Familiedyr med cancer.

Inklusionskriterier: Hunden skal veje over 10 kg og skal være mistænkt for, eller bekræftet med cancer. Der skal desuden være anden anledning til venipunktur (anlæggelse af venekateter eller blodprøvetagning).

Metode:

10 ml blod udtages i K2-EDTA rør i forbindelse med anden venipunktur. Efter indsamling vil blodet blive spundet ved 1900 g i 10 min, hvorefter supernatant afpipetteres og behandles videre afhængigt af testgruppe (se skema).

Etiske overvejelser:

Grundet den nødvendige mængde blod er det nødvendigt at udtage blod specifikt til formålet. Derfor er det valgt kun at udtage blod i forbindelse med anden venipunktur, mængden af blod vurderes ikke at påvirke hundens velfærd.

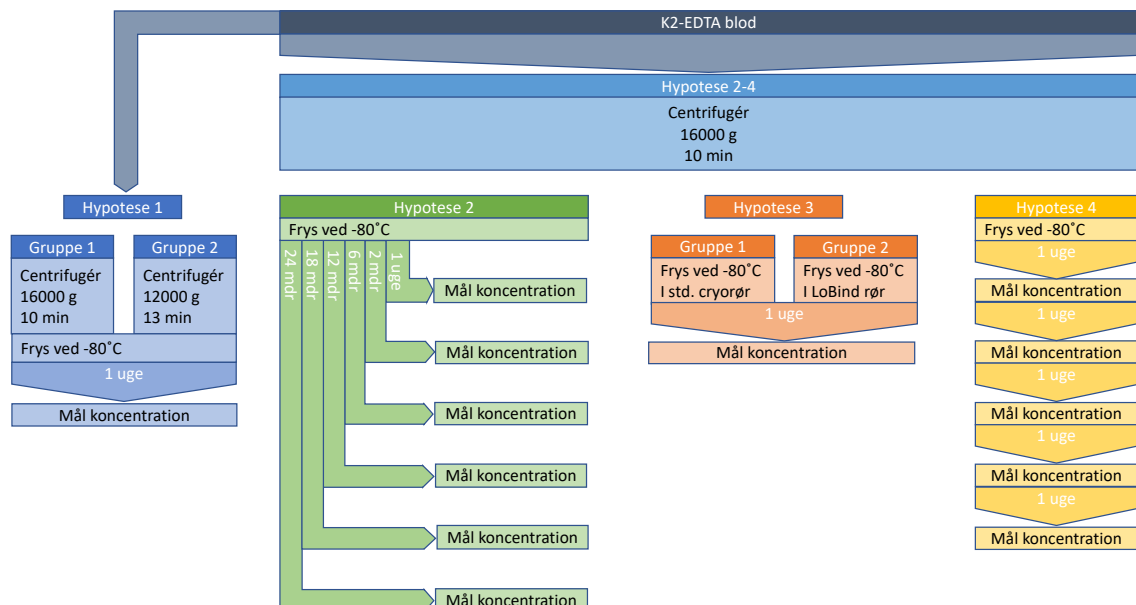
Inklusion af patienter vil først igangsættes når EAU godkendelse foreligger. Evt. kan blodprøven indsamles postmortem

Statistik:

Koncentrationerne vil blive sammenlignet med enten parrede t-test (2 grupper) eller ANOVA-test (mere end 2 grupper), for at undersøge om der er en signifikant forskel mellem de forskellige grupper med et signifikansniveau på 5 %. Al statistik vil blive foretaget i R.

Forsøgsopstilling

- Den samlede centrifugeringskraft og ikke max hastighed afgør prøvens renhed.
Gruppe 1: Prøverne spindes ved 16.000 g i 10 min
Gruppe 2: Prøverne spindes ved 12.000 g i 13 min
Supernatant afpipetteres og fryses ved -80° i 1 uge.
Koncentrationen af cfDNA i supernatant måles
- Koncentrationen af cfDNA er stabil ved frysning ved -80° i op til 2 år.
Prøverne spindes ved 16.000 g i 10 min og supernatant afpipetteres.
Supernatant aliquoteres i 5 rør og fryses ved -80°C.
Koncentrationen af cfDNA i supernatant måles efter 2, 6, 12, 18 og 24 mdr.
- Forskellige typer af cryorør påvirker ikke koncentration af cfDNA.
Prøverne spindes ved 16.000 g i 10 min og supernatant afpipetteres.
Supernatant fordeles i alm. cryorør og LoBind cryorør og fryses ved -80° i 1 uge.
- Prøverne kan tø op til 5 gange uden koncentrationen af cfDNA påvirkes.
Prøverne spindes ved 16.000 g i 10 min og supernatant afpipetteres.
Supernatant fryses ved -80°C i 1 uge.
Koncentrationen måles herefter 1 gang om ugen i 5 uger.



Referencer:

1. Lu, J.-L. & Liang, Z.-Y. Circulating free DNA in the era of precision oncology: Pre- and post-analytical concerns. *Chronic Dis. Transl. Med.* **2**, 223–230 (2016).
2. Fawzy, A., Sweify, K. M., El-Fayoumy, H. M. & Nofal, N. Quantitative analysis of plasma cell-free DNA and its DNA integrity in patients with metastatic prostate cancer using ALU sequence. *J. Egypt. Natl. Canc. Inst.* **28**, 235–242 (2016).
3. Gaillard, C. & Strauss, F. Eliminating DNA loss and denaturation during storage in plastic microtubes. *Am. Biotechnol. Lab.* **18**, 24 (2000).
4. ThermoFisher. Low DNA adsorption to Thermo Scientific Nunc Bank-It vials. (2010).
5. Lee, S. B., Crouse, C. A. & Kline, M. C. Optimizing storage and handling of DNA extracts. *Forensic DNA Anal. Curr. Pract. Emerg. Technol.* 19–38 (2013). doi:10.1201/b15361
6. Gaillard, C. & Strauss, F. Avoiding adsorption of DNA to polypropylene tubes and denaturation of short DNA fragments. *Tech. Tips Online* **3**, 63–65 (1998).
7. El Messaoudi, S., Rolet, F., Mouliere, F. & Thierry, A. R. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clinica Chimica Acta* **424**, 222–230 (2013).
8. Bronkhorst, A. J., Aucamp, J. & Pretorius, P. J. Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clin. Chim. Acta* **450**, 243–253 (2015).
9. Karachaliou, N., Mayo-de-Las-Casas, C., Molina-Vila, M. A. & Rosell, R. Real-time liquid biopsies become a reality in cancer treatment. *Ann. Transl. Med.* **3**, 36 (2015).
10. Bronkhorst, A. J., Aucamp, J. & Pretorius, P. J. Adjustments to the preanalytical phase of quantitative cell-free DNA analysis. *Data Br.* **6**, 326–329 (2016).
11. Rothwell, D. G. *et al.* Genetic profiling of tumours using both circulating free DNA and circulating tumour cells isolated from the same preserved whole blood sample. *Mol. Oncol.* **10**, 566–574 (2016).
12. Volik, S., Alcaide, M., Morin, R. D. & Collins, C. Cell-free DNA (cfDNA): Clinical Significance and Utility in Cancer Shaped By Emerging Technologies. *Mol. Cancer Res.* **14**, 898–908 (2016).