

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243865 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437899**

(22) Data zgłoszenia: **2021.05.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.11.21 BUP 47/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.10.23 WUP 43/2023**

(51) MKP:

G01N 33/84 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:
READ-GENE SPÓŁKA AKCYJNA, Szczecin, PL

(72) Twórca(-y) wynalazku:
MARCIN LENER, Lipiany, PL
JAN LUBIŃSKI, Szczecin, PL
JACEK GRONWALD, Szczecin, PL
CEZARY CYBULSKI, Wołczkowo, PL
TOMASZ HUZARSKI, Szczecin, PL
ANNA JAKUBOWSKA, Szczecin, PL
WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL
RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL

(54) Tytuł:

Sposób określenia ryzyka raków u mężczyzn w zależności od stężenia ołowiu we krwi

PL 243865 B1

Opis wynalazku

Zanieczyszczenie środowiska ołowiem stanowi nieustający problem dla rozwijających się społeczeństw. Toksyczne działanie ołowiu dotyczy głównie jego wpływu na układ krwiotwórczy [1], obwodowy i ośrodkowy układ nerwowy [2], przewód pokarmowy [3] oraz narządy mięszone [4]. Ze względu na wszechobecność ołowiu praktycznie każdy człowiek narażony jest na kontakt z tym pierwiastkiem. Toksyczność ołowiu objawia się wieloma mechanizmami działania. Prowadzi między innymi do zmiany aktywności wielu enzymów oraz zaburzeń funkcji wolnych i strukturalnych białek w komórce [5]. Wiele badań sugeruje, że ważnym molekularnym mechanizmem toksyczności ołowiu jest jego udział w powstawaniu wolnych rodników tlenowych, które odgrywają dużą rolę w powstawaniu uszkodzeń wewnątrzkomórkowych oraz w patogenezie wielu schorzeń, w tym nowotworów złośliwych [6]. Według klasyfikacji karcynogenów IARC, ołów i jego związki należą do grupy 2a i 2b tj, potencjalnie karcynogennych.

W niniejszej pracy postanowiono ocenić korelację pomiędzy stężeniem ołowiu we krwi a ryzykiem zachorowania na raka u mężczyzn. Nieoczekiwanie ustalono, że istnieje korelacja wśród mężczyzn w zależności od wieku oraz historii palenia.

Protokół badań

Grupa badana

Grupa obserwacyjna została wybrana spośród osób, których materiał znajduje się w biobanku naszego ośrodka. Pacjenci, którzy zgłosili się w latach 2010–2019 do Onkologicznej Poradni Genetycznej przy Szpitalu Klinicznym Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, byli zapraszani do oddania próbki krwi w celu biobankowania i podpisywali zgodę na przechowywanie i wykorzystywanie materiału w celach naukowych. Próbki krwi były pobierane w godzinach 8–14, a pacjenci byli poinformowani o konieczności bycia na czczo przez co najmniej 4 godziny przed pobraniem. Dla większości pacjentów próbka była pobrana tylko raz, ale w niektórych przypadkach również więcej razy przy okazji kolejnych wizyt. Próbkę krwi przechowywano w -80°C do momentu oznaczenia stężenia ołowiu.

Do kohorty prospektywnej włączono zdrowych 2956 mężczyzn, którzy zostali poddani średnio 76,37 miesięcznej obserwacji, w trakcie której u 144 mężczyzn zdiagnozowano nowotwór złośliwy. Każdy z uczestników badania wypełnił ankietę o stanie zdrowia oraz stylu życia. Charakterystykę grupy prospektywnej przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1
Charakterystyka grupy

	Chorzy	Zdrowi
Średnia wieku (zakres)	60,5 (36-76)	52 (31-87)
Palenie papierosów		
-obecnie	42 (29,17%)	829 (29,48%)
-w przeszłości	55 (38,19%)	975 (34,67%)
-nigdy	47 (32,64 %)	1008 (35,85%)
Lokalizacja raka		
- prostata	58 (40,28%)	-
- skóra	16 (11,11%)	-
- nerka	13 (9,03%)	-
- jelito	13 (9,03%)	-
- pęcherz moczowy	12 (8,33%)	-
- krew	9 (6,25%)	-
- płuca	6 (4,17%)	-
- wątroba	4 (2,78%)	-
- tarczycyca	4 (2,78%)	-
- trzustka	2 (1,39%)	-
- żołądek	2 (1,39%)	-

- pierś	1 (0,69%)	-
- przełyk	1 (0,69%)	-
- przysadka	1 (0,69%)	-
- ślinianki	1 (0,69%)	-
- jądra	1 (0,69%)	-

Materiał

Od każdej osoby włączonej do badania pobrano próbkę krwi w celu pomiaru stężenia ołowiu. Po pobraniu materiał przechowywano w -80°C do momentu oznaczenia stężenia ołowiu.

Metoda oznaczania zawartości ołowiu we krwi

1.1 Aparat

Do określenia zawartości ołowiu wykorzystana została technika spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS). Do wykonania pomiaru wykorzystano spektrometr mas ELAN DRC-e (PerkinElmer) oraz NexION 350D (PerkinElmer). Wykorzystanie ICP-MS pozwala uzyskać limity detekcji $<0,1 \mu\text{g/l}$. Podczas prowadzenia oznaczeń populacji nieekspozowanej zawodowo na metale i ich związki czułość aparatury odgrywa kluczową rolę.

1.2 Przygotowanie do pomiaru

Zebrane próby krwi zostały rozmrożone z temperatury -80°C do temperatury pokojowej, w dniu wykonywania analiz. Każda próbka została dokładnie wymieszana przy użyciu wortexu w celu uzyskania możliwie największej homogenności materiału. Próbki krwi zostały rozcieńczone w stosunku 1 : 30 (50 μl krwi : 1450 μl buforu).

Z uwagi na specyfikę pomiaru do rozcieńczeń zastosowano roztwór wodorotlenku tetrametyloamonowego (TMAH). W celu lepszej dyspersji rozpuszczonych składników krwi zastosowano dodatek niejonowego surfaktantu w postaci Trytonu X-100. Wykorzystanie tego związku nie tylko ułatwia rozpuszczanie m.in. białek ale także przyczynia się do szybszego wypłukiwania próbki z układu wprowadzenia spektrometru. Uwzględniając efekt matrycy oraz dryf aparatu, użyty został standard wewnętrzny w postaci rodu (105Rh). Do uzyskania stabilności jonów metali rozpuszczonych w roztworze zastosowany został dodatek kwasu wersenowego (EDTA). Dodatkowo, z racji zawartości związków zawierających węgiel, zastosowano dodatek butanolu do wszystkich roztworów w celu niwelacji efektu związanego ze znaczną ilością węgla w badanej próbce.

1.3 Warunki pomiaru

Wszystkie oznaczenia przeprowadzono z wykorzystaniem kwadropolowej celi reakcyjnej spektrometru w tzw. trybie DRC (ang. Dynamie Reaction Cell) aparatu Elan DRC-e oraz NexION 350D (PerkinElmer) z tlenem jako gazem reakcyjnym.

1.4 Walidacja pomiarów

Do walidacji pomiarów zastosowano materiał referencyjny ClinCheck (Recipe, Niemcy). Jest to standard odniesienia powszechnie stosowany w spektrometrii, pozwalający na potwierdzenie precyzji, czułości i specyfiki pomiaru.

Statystyka

Różnice w częstościach pomiędzy analizowanymi grupami oceniano poprzez test Fishera.

Wyniki

Analiza otrzymanych wyników wykazała korelację między stężeniem ołowiu we krwi a ryzykiem zachorowania wśród mężczyzn, w zależności od palenia oraz wieku.

Mężczyźni niepalący mający stężenie ołowiu we krwi **$<12,64 \mu\text{g/l}$** wykazują istotnie **blisko 4 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka w porównaniu do mężczyzn z wyższym stężeniem ołowiu we krwi (16,55–21,94 $\mu\text{g/l}$) (p.value: 0,04; OR: 3,94; 95% CI: 0,93–7,6). (Tabela 2)

Tabela 2
Częstość występowania raków w zależności od stężenia ołowiu we krwi u mężczyzn niepalących
(n = 863)

Grupa	Zakres Pb $\mu\text{g/l}$	Chorzy	Zdrowi	OR	p.value	95%CI
I	4,37-12,64	4	212	Ref.	Ref.	Ref.
II	12,66-16,51	11	205	2,84	0,11	0,9-9,08
III	16,55-21,94	13	203	3,94	0,04*	1,09-10,58
IV	22,07-136,25	7	208	1,78	0,38	0,51-6,19

*wynik istotny statystycznie

Mężczyźni niepalący poniżej 60 roku życia wykazują istotnie **blisko 8 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka, jeśli stężenie ołowiu we krwi jest niższe niż **13,5 $\mu\text{g/l}$** , w porównaniu do mężczyzn, których stężenie ołowiu we krwi jest wyższe niż 13,5 $\mu\text{g/l}$ (p.value: 0,017; OR: 7,8; 95% CI: 1,02–59). (Tabela 3)

Tabela 3
Częstość występowania raków w zależności od stężenia ołowiu we krwi u mężczyzn niepalących
poniżej 60 roku życia (n = 691)

Grupa	Zakres Pb $\mu\text{g/l}$	Chorzy	Zdrowi	OR	p.value	95%CI
I	5,75-12,28	1	169	Ref.	Ref.	Ref.
II	12,28-16,07	3	167	3,04	0,62	0,31-29,5
III	16,1-21,18	8	162	8,35	0,04*	1,03-67,51
IV	21,21-136,25	5	176	4,8	0,22	0,55-41,55
Wybrane zakresy						
I	<13,5	1	217	Ref.	Ref.	Ref.
II	>13,5	16	447	7,8	0,017	1,02-59,0

*wynik istotny statystycznie

Mężczyźni niepalący powyżej 60 roku życia wykazują istotnie **ponad 4 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka, jeśli stężenie ołowiu we krwi zawiera się w przedziale **20–50 $\mu\text{g/l}$** , w porównaniu do mężczyzn, których stężenie ołowiu we krwi wynosi <20 $\mu\text{g/l}$ bądź > 50 $\mu\text{g/l}$ (p.value: 0,023; OR: 4,1; 95% CI: 1,1–14,8). (Tabela 4)

Tabela 4
Częstość występowania raków w zależności od stężenia ołowiu we krwi u mężczyzn niepalących
powyżej 60 roku życia (n = 182)

Grupa	Zakres Pb $\mu\text{g/l}$	Chorzy	Zdrowi	OR	p.value	95%CI
I	4,37-14,27	5	40	2,68	0,43	0,49-14,65
II	14,45-19,19	8	38	4,53	0,09	0,9-22,65
III	19,2-24,01	2	43	Ref.	Ref.	Ref.
IV	24,5-75,9	3	43	1,5	1,0	0,24-9,43
Wybrane zakresy						
I	20-50	3	74	Ref.	Ref.	Ref.
II	<20&>50	15	90	4,1	0,023*	1,1-14,8

*wynik istotny statystycznie

Literatura

1. Johnson F.M. The genetic effects of environmental lead. *Mutation Research* 1998, 410(2):123–140.
2. Marchetti C. Molecular targets of lead in brain neurotoxicity. *Neurotoxicity Research* 2003, 5(3): 221–236.
3. Tomczyk J., Lewczuk E., Andrzejak R. Ostre zatrucia organicznymi związkami ołowiu. *Medycyna Pracy* 1999, 50(3): 219–226.
4. Stokowska W. Ołów – toksyczność biologiczna. *Czas. Stom.* 1993, 46(9): 579–581.
5. Garza A., Vega R., Soto E. Cellular mechanisms of lead neurotoxicity. *Medical Science Monitor* 2006, 12(3): 57–65.
6. Nersesyan A., Kundi M., Waldherr M., Setayesh T., Misik M., Wultsch G., Filipic M., Barcelos G.F.M., Kansmueller S. Results of micronucleus assay with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cadmium. *Mutation Research, Review in Mutation Research* 2015.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u mężczyzn niepalących, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia ołowiu we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na blisko 4 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy ze stężeniem ołowiu we krwi w przedziale 16,55–21,94 µg/l, w przypadku występowania wartości stężenia ołowiu we krwi poniżej 12,64 µg/l.
2. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u mężczyzn niepalących poniżej 60 roku życia, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia ołowiu we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na blisko 8 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy ze stężeniem ołowiu we krwi wyższym niż 13,5 µg/l, w przypadku występowania wartości stężenia ołowiu we krwi poniżej 13,5 µg/l.
3. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u mężczyzn niepalących powyżej 60 roku życia, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia ołowiu we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na ponad 4 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy ze stężeniem ołowiu we krwi <20 µg/l lub >50 µg/l, w przypadku występowania wartości stężenia ołowiu we krwi w przedziale 20–50 µg/l.
4. Sposób wg zastrz. 1–3 **znamienny tym**, że próbkę materiału biologicznego stanowi krew pełna.
5. Sposób wg zastrz. 1–4 **znamienny tym**, że stężenie Pb w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar Pb we krwi pełnej.