

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 243864 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437898**

(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:  
**JAN LUBIŃSKI, Szczecin, PL**  
**CEZARY CYBULSKI, Wołczkowo, PL**  
**JACEK GRONWALD, Szczecin, PL**  
**TOMASZ HUZARSKI, Szczecin, PL**  
**RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL**  
**WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL**  
**ANNA JAKUBOWSKA, Szczecin, PL**

(54) Tytuł:

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

**PL 243864 B1**

## Opis wynalazku

W organizmie selen działa poprzez białka, do których jest wbudowany w postaci selenocysteiny. Jako składnik selenobiałek selen odgrywa rolę enzymatyczną, jak i strukturalną. Do jednych z ważniejszych funkcji selenobiałek należy udział w produkcji hormonów tarczycy, pobudzanie układu immunologicznego oraz ochrona przed stresem oksydacyjnym [1]. Zarówno niedobór jak i nadmiar tego pierwiastka może mieć niekorzystny wpływ na organizm. Jednakże wydaje się, że znacznie poważniejsze konsekwencje są związane z niedoborem selenu. Prowadzą one do m.in. zaburzeń pracy serca, zwyrodnienia serca i wątroby, zwiększenia ryzyka choroby nadciśnieniowej, ograniczenia sprawności układu odpornościowego, zaburzenia funkcji tarczycy, zaburzenia mineralizacji kości i prawidłowego wykształcenia zębów oraz zwiększenia ryzyka chorób nowotworowych [2].

Wyniki badań eksperymentalnych przeprowadzonych na modelach zwierzęcych [3, 4], jak i prób klinicznych u ludzi wskazują na związek pomiędzy stężeniem tego pierwiastka w organizmie a zachowaniem na nowotwory [5–17].

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

### 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. Próbkę 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 selenu.

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)    |
| <b>Palenie papierosów</b> |              |               |
| -obecnie                  | 42 (29,17%)  | 829 (29,48%)  |
| -w przeszłości            | 55 (38,19%)  | 975 (34,67%)  |
| -nigdy                    | 47 (32,64 %) | 1008 (35,85%) |
| <b>Lokalizacja raka</b>   |              |               |
| - 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%)    | -             |
| - tarczycy                | 4 (2,78%)    | -             |

|             |           |   |
|-------------|-----------|---|
| - trzustka  | 2 (1,39%) | - |
| - żołądek   | 2 (1,39%) | - |
| - pierś     | 1 (0,69%) | - |
| - przcłyk   | 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 selenu. Po pobraniu materiał przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do momentu oznaczenia stężenia selenu.

## Metoda oznaczania zawartości selenu we krwi

### 1.1 Aparat

Do określenia zawartości selenu 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 nieeksponowanej zawodowo na metale i ich związki, czułość aparatury odgrywa kluczową rolę.

### 1.2 Przygotowanie do pomiaru

Zebrane próby krwi zostały rozmrożone z temperatury  $-80^{\circ}\text{C}$  do temperatury pokojowej, w dniu wykonywania analiz. Każda próbka została dokładnie wymieszana przy użyciu wortexu w celu uzyskania możliwie największej homogenności materiału. Próbkę krwi zostały rozcieńczone w stosunku 1 : 30 (50  $\mu\text{l}$  krwi : 1450  $\mu\text{l}$  buforu).

Z uwagi na specyfikę pomiaru do rozcieńczeń zastosowano roztwór wodorotlenku tetrametyloamoniowego (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 istotną zależność między ryzykiem zachorowania wśród mężczyzn, w zależności od palenia oraz wieku a stężeniem selenu we krwi.

Mężczyźni niepalący w przeszłości oraz obecnie mający stężenie selenu we krwi **powyżej 112,92  $\mu\text{g/l}$**  wykazują **5 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka w porównaniu do mężczyzn z niskim stężeniem selenu we krwi ( $<93,2 \mu\text{g/l}$ ) (p.value: 0,002; OR: 5,04; 95% CI: 1,69–15,04). Mężczyźni w wyżej wymienionej podgrupie wykazują **blisko 4 krotnie** obniżone ryzyko zachorowania na raka w porównaniu do pozostałych mężczyzn (Se  $<95 \mu\text{g/l}$ ) w przypadku występowania selenu we krwi w przedziale 100–110  $\mu\text{g/l}$ . (Tabela 2)

**Tabela 2**  
Częstość występowania raków w zależności od stężenia selenu we krwi u mężczyzn niepalących (n = 1051)

| Grupa                  | Zakres Se µg/l | Chorzy | Zdrowi | OR   | p.value | 95%CI      |
|------------------------|----------------|--------|--------|------|---------|------------|
| I                      | 43,12-93,20    | 19     | 244    | 5,04 | 0,002*  | 1,69-15,04 |
| II                     | 92,20-101,96   | 10     | 253    | 2,56 | 0,17    | 0,79-8,27  |
| III                    | 102-112,84     | 4      | 259    | Ref. | Ref.    | Ref.       |
| IV                     | 112,92-234,84  | 13     | 249    | 3,38 | 0,03*   | 1,09-10,51 |
| <b>Wybrane zakresy</b> |                |        |        |      |         |            |
| I                      | 100-110        | 5      | 260    | Ref. | Ref.    | Ref.       |
| II                     | <95            | 20     | 291    | 3,6  | 0,008*  | 1,3-9,7    |

\*wynik istotny statystycznie

Mężczyźni, którzy palili w przeszłości bądź obecnie, wykazują 3 krotnie obniżone ryzyko zachorowania na raka, jeśli stężenie selenu we krwi zawiera się w przedziale 115–130 µg/l, w porównaniu do mężczyzn, których stężenie selenu we krwi jest niższe niż 90 µg/l (p.value: 0,016; OR: 3; 95% CI: 1,2–7,9). (Tabela 3)

**Tabela 3**  
Częstość występowania raków w zależności od stężenia selenu we krwi u mężczyzn palących (n = 1884)

| Grupa                  | Zakres Se µg/l | Chorzy | Zdrowi | OR   | p.value | 95%CI     |
|------------------------|----------------|--------|--------|------|---------|-----------|
| I                      | 43,28-89,97    | 30     | 441    | 1,82 | 0,072   | 0,99-3,42 |
| II                     | 90,00-99,87    | 25     | 446    | 1,50 | 0,27    | 0,8-2,81  |
| III                    | 99,88-110,19   | 26     | 445    | 1,56 | 0,21    | 0,83-2,92 |
| IV                     | 110,20-260,17  | 17     | 454    | Ref. | Ref.    | Ref.      |
| <b>Wybrane zakresy</b> |                |        |        |      |         |           |
| I                      | 115-130        | 5      | 223    | Ref. | Ref.    | Ref.      |
| II                     | <90            | 30     | 441    | 3    | 0,016*  | 1,2-7,9   |

Mężczyźni powyżej 60 roku życia, którzy palili papierosy w przeszłości bądź obecnie, wykazują blisko 11 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na nowotwór złośliwy, w przypadku występowania stężenia selenu we krwi >115 µg/l, w porównaniu do mężczyzn ze stężeniem selenu we krwi <115 µg/l.

**Tabela 4**  
Częstość występowania raków w zależności od stężenia selenu we krwi u mężczyzn palących powyżej 60 roku życia (n = 567)

| Grupa                  | Zakres Se µg/l | Chorzy | Zdrowi | OR   | p.value | 95%CI      |
|------------------------|----------------|--------|--------|------|---------|------------|
| I                      | 43,28-87,44    | 16     | 126    | 3,45 | 0,02*   | 1,23-9,71  |
| II                     | 87,44-97,35    | 17     | 125    | 3,7  | 0,01*   | 1,33-10,33 |
| III                    | 97,39-107,66   | 19     | 123    | 4,2  | 0,005*  | 1,52-11,6  |
| IV                     | 107,68-236,14  | 5      | 136    | Ref. | Ref.    | Ref.       |
| <b>Wybrane zakresy</b> |                |        |        |      |         |            |
| I                      | >115           | 1      | 83     | Ref. | Ref.    | Ref.       |
| II                     | <115           | 56     | 427    | 10,9 | 0,0013* | 1,5-79,8   |

Mężczyźni palący, poniżej 60 roku życia, nie wykazują korelacji pomiędzy stężeniem selenu we krwi a ryzykiem zachorowania na raka (Tabela 5).

**Tabela 5**  
**Częstość występowania raków w zależności od stężenia selenu we krwi u mężczyzn palących**  
**poniżej 60 roku życia (n = 1317)**

| Grupa                  | Zakres Se µg/l | Chorzy | Zdrowi | OR   | p.value | 95%CI     |
|------------------------|----------------|--------|--------|------|---------|-----------|
| I                      | 44,41-91,7     | 8      | 321    | Ref. | Ref.    | Ref.      |
| II                     | 91,73-100,97   | 9      | 320    | 1,13 | 1,0     | 0,43-2,96 |
| III                    | 100,99-111,27  | 13     | 316    | 1,65 | 0,38    | 0,67-4,04 |
| IV                     | 111,31-260,17  | 11     | 319    | 1,38 | 0,64    | 0,55-3,49 |
| <b>Wybrane zakresy</b> |                |        |        |      |         |           |
| I                      | 80-90          | 3      | 195    | Ref. | Ref.    | Ref.      |
| II                     | <80            | 4      | 87     | 3,0  | 0,21    | 0,7-13,6  |

#### Literatura

- [1] Combs G.F., Clark L.C., Turnbull B.W.: An analysis of cancer prevention by selenium. *BioFactors* (2001) 14, s. 153–159.
- [2] Reddy V.N., Giblin F.J., Lin L.R., Dang L., Unakar N.J., Musch D.C., Boyle D.L., Takemoto L.J., Ho Y. S., Knoernschild T., Juenemann A., Lutjen-Drecoll E.: Glutathione peroxidase-1 deficiency leads to increased nuclear light scattering, membrane damage, and cataract formation in gene-knockout mice. *Invest. Ophthal. Vis. Sci.* (2001); 42, s. 3247–3255.
- [3] Kim J.H., Hue J.J., Kang B.S., Park H., Nam S.Y., Yun Y.W., Kim J.S., Lee B.J.: Effects of selenium on colon carcinogenesis induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate in mouse model with high-iron diet. *Lab. Anim. Res.* (2011); 27(1), s. 9–18.
- [4] Yang H., Fang J., Jia X., Han C, Chen X., Yang C.S., Li N.: Chemopreventive effects of early-stage and late-stage supplementation of vitamin E and selenium on esophageal carcinogenesis in rats maintained on a low vitamin E/selenium diet. *Carcinogenesis* (2011); 32(3), s. 381–388.
- [5] Schrauzer G.N., White D.A., Schneider C.J.: Cancer mortality correlation studies-III: statistical associations with dietary selenium intakes. *Bioinorg Chem.* (1977); 7(1), s. 23–31.
- [6] Pourmand G., Salem S., Moradi K., Nikoobakht M.R., Tajik P., Mehraei A.: Serum selenium level and prostate cancer: a case-control study. *Nutr. Cancer* (2008); 60(2), s. 171–176.
- [7] van den Brandt P.A., Goldbohm R.A., van't Veer P., Bode P., Dorant E., Hermus R.J., Sturmans F.: A prospective cohort study on selenium status and the risk of lung cancer. *Cancer Res.* (1993); 53(20), s. 4860–4865.
- [8] Knekt P., Marniemi J., Teppo L., Heliövaara M., Aromaa A.: Is low selenium status a risk factor for lung cancer? *Am. J. Epidemiol.* (1998); 148(10), s. 975–982.
- [9] Mark S.D., Qiao Y.L., Dawsey S.M., Wu Y.P., Katki H., Gunter E.W, Fraumeni J.F.Jr., Blot W.J., Dong Z.W., Taylor P.R.: Prospective study of serum selenium levels and incident esophageal and gastric cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* (2000); 92(21), s. 1753–1763.
- [10] Borawska M.H., Socha K., Łazarczyk B., Czyżewska E., Markiewicz R., Darewicz B.: The effects of diet on selenium concentration in serum in patients with cancer. *Nutr. Cancer* (2009); 61(5), s. 629–33.
- [11] Jabłońska E., Gromadzińska J., Sobala W., Reszka E., Wąsowicz W.: Lung cancer risk associated with selenium status is modified in smoking individuals by Sep15 polymorphism. *Eur. J. Nutr.* (2008); 47(1), s. 47–54.
- [12] Duffield-Lillico A.J., Dalkin B.L., Reid M.E., Turnbull B.W., Slate E.H., Jacobs E.T., Marshall J.R., Clark L.C.: Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial, *BJU Int.* (2003); 91 (7), s. 608–612.
- [13] Duffield-Lillico A.J., Reid M.E., Turnbull B.W., Combs G.F.Jr, Slate E.H., Fischbach L.A., Marshall J.R., Clark L.C.: Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2002); 11, s. 630–639.

- [14] Klein E.A., Thompson I.M., Tangen C.M., Crowley J.J., Lucia M.S., Goodman P.J., Minasian L.M., Ford L.G., Parnes H.L., Gaziano J.M., Karp D.D., Lieber M.M., Walther P.J., Klotz L., Parsons J.K., Chin J.L., Darke A.K., Lippman S.M., Goodman G.E., Meyskens F.L., Baker L.H.: Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* (2011); 306, s. 1549–1556.
- [15] Lippman S.M., Klein E.A., Goodman P.J., Lucia M.S., Thompson I.M., Ford L.G., Parnes H.L., Minasian L.M., Gaziano J.M., Hartline J.A., Parsons J.K., Bearden J.D., Crawford E.D., Goodman G.E., Claudio J., Winquist E., Cook E.D., Karp D.D., Walther P., Lieber M.M., Kristal A.R., Darke A.K., Arnold K.B., Ganz P.A., Santella R.M., Albanes D., Taylor P.R., Probstfield J.L., Jagpal T.J., Crowley J.J., Meyskens F.L., Baker L.H., Coltman C.A.: Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA* (2009); 301(1), s. 39–51.
- [16] Reid M.E., Duffield-Lillico A.J., Garland L., Turnbull B.W., Clark L.C., Marshall J.R.: Selenium supplementation and lung cancer incidence: an update of the nutritional prevention of cancer trial, *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* (2002); 11(11), s. 1285–1291.
- [17] Reid M.E., Duffield-Lillico A.J., Sunga A., Fakhri M., Alberts D.S., Marshall J.R.: Selenium supplementation and colorectal adenomas: An analysis of the nutritional prevention of cancer trial. *Int. J. Cancer* (2006); 118, s. 1777–1781.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u mężczyzn niepalących, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia selenu we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na 5 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy o niskim stężeniu selenu we krwi (93,2 µg/l), w przypadku występowania wartości stężenia selenu we krwi >112,92 µg/l.
2. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u mężczyzn niepalących, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia selenu we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na blisko 4 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy o niskim stężeniu selenu we krwi (<95 µg/l), w przypadku występowania wartości stężenia selenu we krwi w zakresie 100–110 µg/l.
3. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u mężczyzn, palących, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia selenu we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na 3 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy o niskim stężeniu selenu we krwi (<90 µg/l), w przypadku występowania wartości stężenia selenu we krwi w zakresie 115–130 µg/l.
4. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u mężczyzn, palących powyżej 60 roku życia, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia selenu we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na ponad 10 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy o niskim stężeniu selenu we krwi (<115 µg/l), w przypadku występowania wartości stężenia selenu we krwi w zakresie >115 µg/l.
5. Sposób wg zastrzeżenia 1–4 **znamienny tym**, że próbkę materiału biologicznego stanowi krew pełna.
6. Sposób wg zastrzeżenia 1–5 **znamienny tym**, że stężenie Se w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar Se we krwi pełnej.