

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 245678 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440972**

(22) Data zgłoszenia: **2022.04.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.10.23 BUP 43/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.09.16 WUP 38/2024**

(51) MKP:

**G01N 33/84 (2006.01)**

- 
- (73) Uprawniony z patentu:  
**READ-GENE SPÓŁKA AKCYJNA, Szczecin, PL**
- (72) Twórca(-y) wynalazku:  
**JAN LUBIŃSKI, Szczecin, PL**  
**TADEUSZ DĘBNIAK, Mierzyn, PL**  
**CEZARY CYBULSKI, Wołczkowo, PL**  
**JACEK GRONWALD, Szczecin, PL**  
**TOMASZ HUZARSKI, Szczecin, PL**  
**ANNA JAKUBOWSKA, Szczecin, PL**  
**RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL**  
**WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL**
- 

(54) Tytuł:

**Sposób określenia ryzyka raków u kobiet w zależności od stosunku stężeń selenu do arsenu we krwi**

**PL 245678 B1**

## Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu określenia ryzyka raków u kobiet w zależności od stosunku stężeń selenu do arsenu we krwi. Opisany wynalazek opiera się na ustaleniu, że istnieje korelacja między stosunkami stężeń selenu do arsenu we krwi a ryzykiem zachorowania na raka u kobiet. Prezentowany sposób powinien znaleźć zastosowanie w szeroko rozumianej diagnostyce i profilaktyce nowotworów, zwłaszcza u kobiet.

W literaturze można znaleźć wiele eksperymentów opisujących interakcje pomiędzy selenem (Se) a arsenem (As). Se oraz As tworzą związek jonu seleno-bis(S-glutationylo)arsinium  $[(GS)_2AsSe]^-$ , który jest szybko wydzielany z żółcią. Zaobserwowano zdolność do znacznego zwiększenia wydalania Se do przewodu pokarmowego podczas iniekcji arseninu i seleninu w podostrych dawkach. Taką interakcję obserwowano również w innych badaniach z różnymi dawkami, formami As i Se, oraz czasami odstępów pomiędzy iniekcjami tych pierwiastków. W innych eksperymentach opisano również odwrotny mechanizm – selenit stymulował wydalanie As z przewodu pokarmowego [1,2].

W poprzednim zgłoszeniu patentowym Spółki [3] przedstawiono wyniki nieistotne statystycznie wskazujące na tendencję ku zmniejszonemu ryzyku raków przy uwzględnieniu stosunku stężeń selenu do arsenu, różnych czynników środowiskowych oraz stylu życia. Natomiast w innym zgłoszeniu patentowym [4] zaobserwowano, że stosunek stężeń we krwi Se do As zmniejsza ryzyko zachorowania na raka u kobiet. W niniejszych badaniach **nieoczekiwanie** ustalono, że stosunek stężeń we krwi selenu do arsenu jest niezmiernie istotny szczególnie wśród kobiet ze stężeniem arsenu we krwi  $< 0,8 \mu\text{g/l}$ .

Przedmiotem wynalazku jest sposób określenia ryzyka raka, charakteryzujący się tym, że obejmuje ilościową ocenę stężenia selenu oraz arsenu w próbce krwi badanej kobiety oraz określenie stosunku stężeń selenu do arsenu, przy czym w/w stosunek wskazuje na ponad 5,5-krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka wśród kobiet, nie będących nosicielkami mutacji w genie BRCA1, ze stężeniem arsenu we krwi  $< 0,8 \mu\text{g/l}$ , oraz przy stosunku Se/As w przedziale 170–240.

Korzystnie próbkę materiału stanowi krew pełna.

Korzystnie stężenie selenu oraz arsenu w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar tych pierwiastków we krwi pełnej.

### Przykład realizacji wynalazku

#### 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  $-80^\circ\text{C}$  do momentu oznaczenia stężenia arsenu.

Do kohorty prospektywnej włączono 2960 zdrowych kobiet, bez mutacji w genie *BRCA1*. Zostały one: poddane średnio 41 miesięcznej obserwacji, w trakcie której u 148 kobiet zdiagnozowano nowotwór złośliwy. Każda z uczestniczek badania wypełniła ankietę o stanie zdrowia oraz stylu życia. Charakterystykę grupy prospektywnej przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Charakterystyka grupy

	Chore (n=148)	Zdrowe (n=2812)
<b>Średnia wieku (zakres)</b>	56 (35-82)	53 (33-84)
<b>Palenie papierosów</b>		
-obecnie	40 (1,4%)	604 (20,4%)
-w przeszłości	34 (1,1%)	749 (25,3%)
-nigdy	74 (2,5%)	1459 (49,3%)
<b>Stosowanie doustnej antykoncepcji</b>		
-nie	119 (4,0%)	2080 (70,3%)
-tak	28 (0,9%)	733 (24,8%)
<b>Przyjmowanie hormonalnej terapii zastępczej</b>		
-nie	112 (3,8%)	2215 (74,8%)
-tak	35 (1,2%)	598 (20,2%)
<b>Adnexectomia</b>		
-nie	135 (4,6%)	2630 (88,9%)
-tak	9 (0,3%)	175 (5,9%)
-brak danych	4 (0,1%)	8 (0,3%)

**Materiał**

Od każdej osoby włączonej do badania w trakcie rekrutacji pobrano próbkę krwi do pomiaru stężenia arsenu.

**Metoda oznaczania zawartości arsenu we krwi pełnej****Aparat**

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

**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 wstrząsarki lub wortexu w celu uzyskania możliwie największej homogenności materiału. Proces ten został powtórzony bezpośrednio przed pobraniem objętości krwi do rozcieńczeń z uwagi na zjawisko rozwarstwiania się krwi. Stosując możliwie najprostszą technikę, 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). Alkaliczne pH zapewnia dobrą rozpuszczalność składników krwi, nie powodując tym samym precypitacji żadnej z frakcji. Dodatkowo 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. Do korekcji efektu matrycy oraz dryfu 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.

**Warunki pomiaru**

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

**Walidacja pomiarów**

Do walidacji pomiarów zastosowano następujące materiały referencyjne ClinCheck (Recipe, Niemcy), NIST 955c (National Institute of Standards and Technology, Stany Zjednoczone) oraz BCR 634/BCR635 (European Commission, Community Bureau of Reference). Są to standardy odniesienia powszechnie stosowane w spektrometrii, pozwalające na potwierdzenie precyzji, czułości i specyfiki pomiaru.

### Statystyka

Różnice w częstościach pomiędzy analizowanymi grupami oceniano przy pomocy Testu Zgodności Fishera.

### Wyniki

Analiza otrzymanych wyników wykazała istotną korelację między stosunkami stężeń selenu i arsenu we krwi a ryzykiem zachorowania na raka u kobiet.

Kobiety, ze stężeniem arsenu we krwi  $< 0,8 \mu\text{g/l}$ , mają ponad 5,5-krotnie obniżone ryzyko zachorowania na raka przy stosunku stężeń selenu do arsenu we krwi w przedziale 170–240, w porównaniu do kobiet z w/w stosunkiem poza wskazanym zakresem ( $p 0,0001$ ; OR 5,6; 95%CI: 2,0–15,7). – Tabela 2.

**Tabela 2.** Częstość występowania raków u kobiet ze stężeniem arsenu  $< 0,8 \mu\text{g/l}$  w zależności od stosunku stężeń selenu do arsenu we krwi.

Grupa	Stosunek Se/As	Osoby chore	Osoby zdrowe	p	OR	95%CI
I	$< 145,04$	18	337	0,004*	4,69	1,57-14
II	145,15-168,84	13	342	0,05*	3,34	1,08-10,33
III	168,84-199,87	4	351	Ref.	Ref.	Ref.
IV	$> 199,88$	6	350	0,75	1,5	0,42-5,38
<b>Wybrane zakresy</b>						
I	170-240	4	519	Ref.	Ref.	Ref.
II	$< 170 \& > 240$	37	861	0,0001*	5,6	2,0-15,7

\*wynik istotny statystycznie

Wśród kobiet, ze stężeniem arsenu we krwi  $\geq 0,8 \mu\text{g/l}$  nie wykazano zakresu dla stosunku stężeń selenu do arsenu we krwi, w którym ryzyko zachorowania na raka było zmniejszone/zwiększone. – Tabela 3.

**Tabela 3.** Częstość występowania raków u kobiet ze stężeniem arsenu  $\geq 0,8 \mu\text{g/l}$  w zależności od stosunku stężeń selenu do arsenu we krwi.

Grupa	Stosunek Se/As	Osoby chore	Osoby zdrowe	p	OR	95%CI
I	$< 60,61$	30	355	0,31	1,39	0,79-2,46
II	60,66-85,50	22	363	Ref.	Ref.	Ref.
III	85,52-108,28	30	355	0,31	1,39	0,79-2,46
IV	$> 108,29$	25	359	0,66	1,15	0,64-2,08

### Literatura

- Gailer, J.; George, G.N.; Pickering, I.J.; Prince, R.C.; Younis, H.S.; Winzerling, J.J. Biliary Excretion of [(GS)(2)AsSe](-) after Intravenous Injection of Rabbits with Arsenite and Selenate. *Chem Res Toxicol* **2002**, *15*, 1466–1471, doi:10.1021/tx025538s.
- Zeng, H.; Uthus, E.O.; Gerald, F.; Combs, Jr.; Mechanistic aspects of the interaction between selenium and arsenic. *Journal of Inorganic Chemistry* **2005**, *99* (6), 1269–1274, doi:10.1016/j.jinorgbio.2005.03.006.
- Read-Gene S.A.; Sposób określenia ryzyka raków u kobiet w zależności od ich wieku oraz stężeń wybranych mikroelementów. **2017**, Zgłoszenie patentowe nr P.422751.
- Read-Gene S.A.; Sposób określenia ryzyka raków u kobiet nie będących nosicielkami mutacji w genie BRCA1 i BRCA2 w zależności od stężeń we krwi arsenu, kadmu, cynku i/lub selenu. **2018**, Zgłoszenie patentowe nr P.425602.

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka raka, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia selenu oraz arsenu we krwi w próbce biologicznej osoby badanej oraz określenie stosunku selenu do arsenu, przy czym w/w stosunek wskazuje na ponad 5,5-krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka wśród kobiet, nie będących nosicielkami mutacji w genie BRCA1, ze stężeniem arsenu we krwi  $< 0,8 \mu\text{g/l}$  oraz przy stosunku Se/As w przedziale 170–240.
2. Sposób wg zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że próbkę materiału biologicznego stanowi krew pełna.
3. Sposób wg zastrzeżenia 1, 2, **znamienny tym**, że stężenie selenu oraz arsenu w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar tych pierwiastków we krwi pełnej.