

(19)



URZĄD  
PATENTOWY  
RZECZYPOSPOLITEJ  
POLSKIEJ

(10) **PL 243833 B1**

(12)

## Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437894**

(22) Data zgłoszenia: **2021.05.19**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.10.16 WUP 42/2023**

(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**  
**KATARZYNA BIAŁKOWSKA, 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 cynku we krwi**

**PL 243833 B1**

## Opis wynalazku

Cynk jest niezbędnym dla zdrowia mikroelementem. Jest składnikiem ok. 300 enzymów i jeszcze większej liczby innych białek. [1] Będąc składnikiem tzw. palców cynkowych, domen białkowych występujących w białkach wiążących DNA, ma wpływ na procesy życiowe komórek. Cynk spełnia rolę ochronną przed wolnymi rodnikami, między innymi wchodząc w skład dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Bierze udział w wielu przemianach metabolicznych, będąc składnikiem takich enzymów jak np. dehydrogenaza jabłczanowa, anhydraza węglanowa, dehydrogenaza mleczanowa bądź dehydrogenaza alkoholowa. Mikroelement ten zaangażowany jest w procesy immunologiczne, warunkuje prawidłową funkcję skóry oraz błon śluzowych, bierze udział w magazynowaniu i wydzielaniu insuliny z trzustki, utrzymuje równowagę jonową innych mikroelementów, w tym selenu, magnezu czy miedzi, a także spełnia rolę detoksykacyjną w stosunku do metali ciężkich. Cynk jest antyoksydantem, biorącym udział w obronie przed stresem oksydacyjnym. Cynk uznawany jest za nietoksyczny metal. Niedobór tego pierwiastka prowadzi do poważnych zaburzeń, takich jak niedobory immunologiczne, nieprawidłowe gojenie ran, obniżenie płodności czy problemy ze wzrokiem. [2]

Zaobserwowano że poziom cynku ulega zmianom w komórkach nowotworowych. Prawidłowe komórki nabłonkowe prostaty akumulują cynk, zaś w komórkach rakowych poziom tego pierwiastka jest znacząco obniżony. [3] Uważa się, że cynk ma działanie przeciwnowotworowe, hamując wzrost komórek nowotworowych i aktywując apoptozę. Znane są badania oceniające związek między stężeniem cynku a ryzykiem raków, ich wyniki są jednak rozbieżne. Niektóre z tych badań mówią, iż stężenie cynku w surowicy jest wyższe u osób z nowotworem [4, 5, 6], natomiast inne, że poziom ten jest niższy. [7] Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań sugerują również, że odpowiednia ilość cynku w diecie działa chemoprewencyjnie. Osoby, których dieta jest bogata w cynk, wykazują niższe ryzyko raka płuc niż osoby stosujące dietę ubogocynkową (OR 0,71; 95% CI 0,5–0,99). [8] Również ryzyko raka jelita grubego i odbytu jest niższe przy stosowaniu diety bogatocynkowej (RR 0,86; 95% CI 0,73–1,02). [9] Natomiast suplementacja cynkiem w bardzo wysokich dawkach powyżej 100 mg/dzień (gdy zalecane dzienne spożycie cynku wynosi 8 mg/dzień dla kobiet a 12 mg/dzień dla mężczyzn) odnosi odwrotny efekt, znacząco zwiększając ryzyko wystąpienia raka prostaty (RR 2,29; 95% CI 1,06–4,95, p = 0,03). [10]

W niniejszej pracy postanowiono ocenić korelację pomiędzy stężeniem cynku 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. 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 miedzi.

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**

	<b>Chorzy</b>	<b>Zdrowi</b>
<b>Średnia wieku (zakres)</b>	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%)	-
- tarczyca	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%)	-

### **Material**

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

### **Metoda oznaczania zawartości cynku we krwi**

#### **1.1 Aparat**

Do określenia zawartości kadmu 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 µg/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°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 µl krwi : 1450 µl 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 kwadrupolowej 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 cynku we krwi a ryzykiem zachorowania wśród mężczyzn w zależności od palenia oraz wieku.

Wśród mężczyzn bez uwzględnienia podziału na wiek oraz historię palenia nie zaobserwowano istotnej korelacji pomiędzy stężeniem cynku we krwi a ryzykiem zachorowania na raka. (Tabela 2)

**Tabela 2.**  
Częstość występowania raków w zależności od stężenia cynku we krwi u mężczyzn (n = 2935)

Grupa	Zakres Zn µg/l	Chorzy	Zdrowi	OR	p.value	95%CI
I	3283,5-6047,21	30	704	Ref.	Ref.	Ref.
II	6048,3-6494,44	38	696	1,28	0,38	0,74-2,09
III	6496,88-6891,17	36	698	1,21	0,53	0,74-1,99
IV	6891,43-9241,44	40	693	1,35	0,22	0,83-2,2

Mężczyźni niepalący wykazują istotnie **blisko 4 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka, jeśli stężenie cynku we krwi zawiera się w przedziale **5600–6350 µg/l**, w porównaniu do mężczyzn, których stężenie cynku we krwi wynosi mniej niż 5600 µg/l bądź więcej niż 6350 µg/l (p.value: 0,0018; OR: 3,8; 95% CI: 1,5–9,7). (Tabela 3)

**Tabela 3.**  
Częstość występowania raków w zależności od stężenia cynku we krwi u mężczyzn niepalących (n = 1051)

Grupa	Zakres Zn µg/l	Chorzy	Zdrowi	OR	p.value	95%CI
I	4073,26-6109,79	7	256	Ref.	Ref.	Ref.
II	6112,94-6543,12	10	253	1,45	0,62	0,54-3,86
III	6546,55-6909,21	16	247	2,37	0,09	0,96-5,86
IV	6909,67-8284,36	13	249	0,18	1,91	0,75-4,87
<b>Wybrane zakresy</b>						
I	5600-6350	5	318	Ref.	Ref.	Ref.
II	<5600&>6350	41	687	3,8	0,0018*	1,5-9,7

\*wynik istotny statystycznie

Mężczyźni niepalący powyżej 50 roku życia wykazują istotnie **ponad 7 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka, jeśli stężenie cynku we krwi zawiera się w przedziale **5700–6350 µg/l**, w porównaniu do mężczyzn, których stężenie cynku we krwi wynosi <5700 µg/l bądź >6350 µg/l (p.value: 0,0008; OR: 7,3; 95% CI: 1,7–31,0). (Tabela 4)

**Tabela 4.**  
Częstość występowania raków w zależności od stężenia cynku we krwi u mężczyzn niepalących powyżej 50 roku życia (n = 474)

Grupa	Zakres Zn µg/l	Chorzy	Zdrowi	OR	p.value	95%CI
I	4073,26-6109,79	6	112	1,01	1,0	0,32-3,22
II	6112,94-6543,12	6	113	Ref.	Ref.	Ref.
III	6546,55-6909,21	11	107	1,94	0,22	0,69-5,42
IV	6909,67-8284,36	12	107	2,12	0,22	0,77-5,83
<b>Wybrane zakresy</b>						
I	5700-6350	2	135	Ref.	Ref.	Ref.
II	<5700 & >6350	33	304	7,3	0,0008*	1,7-31,0

\*wynik istotny statystycznie

Mężczyźni palący nie wykazują istotnej korelacji pomiędzy stężeniem cynku we krwi a ryzykiem zachorowania na raka. (Tabela 5)

**Tabela 5.**  
Częstość występowania raków w zależności od stężenia cynku we krwi u mężczyzn palących (n = 1882)

Grupa	Zakres Zn µg/l	Chorzy	Zdrowi	OR	p.value	95%CI
I	3283,5-6031,19	23	448	0,95	1,0	0,52-1,74
II	6031,26-6477,58	25	444	0,77	1,1	0,61-1,96
III	6478,52-6898,25	22	449	Ref.	Ref.	Ref.
IV	6899,23-9241,44	26	445	0,77	1,14	0,64-2,03

#### Literatura

1. Plum LM, et al.: The essential toxin: impact of zinc on human health, *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Apr;7(4): 1342–65.
2. Puzanowka-Tarasiewicz H, et al.: Funkcje biologiczne wybranych pierwiastków. Cynk – składnik i aktywator enzymów, *Polski Merkuriusz Lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. T. 27, nr 161 (2009), s. 419–422.
3. Zaichick VY, et al.: Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *Int Urol Nephrol*. 1997; 29(5): 565–74.
4. Siddiqui MK, et al.: Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study. *Environ Int*. 2006 Jul; 32(5): 630–7.
5. Pasha Q, et al. Statistical analysis of trace metals in the plasma of cancer patients versus controls. *J Hazard Mater*. 2008; May 30; 153(3): 1215–21.
6. el-Ahmadly O, et al.: Serum copper, zinc, and iron in patients with malignant and benign pulmonary diseases. *Nutrition*. 1995; 11(5 Suppl): 498–501.
7. Kuo HW, et al.: Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol Trace Elem Res*. 2002 Oct; 89(1): 1–11.
8. Zhou W, et al.: Dietary iron, zinc, and calcium and the risk of lung cancer. *Epidemiology*. 2005 Nov; 16(6): 772–9.
9. Zhang X, et al.: A prospective study of intakes of zinc and heme iron and colorectal cancer risk in men and women. *Cancer Causes Control*. 2011 Dec; 22(12): 1627–37.
10. Leitzmann MF, et al.: Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Jul 2; 95(13).

### Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u mężczyzn niepalących, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia cynku we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na blisko 4 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy ze stężeniem cynku we krwi  $<5600 \mu\text{g/l}$  lub  $>6350 \mu\text{g/l}$ , w przypadku występowania wartości stężenia cynku we krwi w przedziale  $5600\text{--}6350 \mu\text{g/l}$ .
2. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u mężczyzn niepalących powyżej 50 roku życia, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia cynku we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na ponad 7 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy ze stężeniem cynku we krwi  $<5700 \mu\text{g/l}$  lub  $>6350 \mu\text{g/l}$ , w przypadku występowania wartości stężenia cynku we krwi w przedziale  $5700\text{--}6350 \mu\text{g/l}$ .
3. Sposób wg zastrzeżenia 1, 2 **znamienny tym**, że próbkę materiału biologicznego stanowi krew pełna.
4. Sposób wg zastrzeżenia 1–3 **znamienny tym**, że stężenie Zn w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar Zn we krwi pełnej.