

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242924 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442000**

(22) Data zgłoszenia: **2020.05.14**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2021.11.15 BUP 33/21**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.05.15 WUP 20/2023**

(51) MKP:

G01N 33/84 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2018.01)

(62) Numer zgłoszenia, z którego nastąpiło
wydzielenie:

433946

(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

ANNA JAKUBOWSKA, Szczecin, PL

WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL

RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL

(54) Tytuł:

Test diagnostyczny wczesnego wykrywania raków jelita grubego u kobiet oparty o ocenę stężeń arsenu we krwi i wybranych genotypów

PL 242924 B1

Opis wynalazku

Arsen (As)

Bez wątpienia arsen i jego związki są jednymi z najbardziej rozpoznawalnych trucizn. Według klasyfikacji międzynarodowej agencji do badań nad rakiem (IARC, ang. International Agency for Cancer Research) arsen i jego związki zostały określone jako bezwzględne ludzkie karcynogeny – grupa 1 (strona internetowa: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php; data wejścia 2017-08-26).

Bardzo ważnym problemem onkologicznym jest nie tylko ekspozycja na karcynogeny i zwiększone ryzyko raków, ale i jak najwcześniejsze wykrywanie nowotworów złośliwych, ponieważ wiąże się z to ze znacznie zwiększoną skutecznością leczenia.

W pracy postanowiono ocenić, czy występowanie raków jest powiązane ze zmianami stężenia arsenu we krwi.

Ryzyko rozwoju nowotworów jest zależne także od wybranych mutacji, jak również wybranych funkcjonalnych polimorfizmów DNA. Do polimorfizmów związanych ze zwiększonym ryzykiem raków należą polimorfizmy w genach zaangażowanych w proces karcinogenezy, metabolizm ksenobiotyków czy też stres oksydacyjny. Do takich polimorfizmów należą między innymi polimorfizmy SOD2, CRTC3, GPX1, MT1B, GSTP1, ERCC2 oraz ABCB1.

GPX1 rs1050450

Jednym z ważniejszych enzymów antyoksydacyjnych jest peroksydaza glutationowa typu I (GPX1). Jej skuteczność w obronie przed stresem oksydacyjnym jest około 14-krotnie większa w porównaniu do innych enzymów z grupy antyoksydantów np. katalaz (Haan JB, 2003). Polimorfizm Pro200Leu (rs 1050450) w genie GPX1 związany jest ze zmianą aktywności enzymu. Badania wykazały, że polimorfizm ten może mieć związek z ryzykiem raków o różnorodnej lokalizacji (Hu YJ, 2003; Ravn-Haren G, 2006; Kucukgergin C, 2011; Erdem O, 2012; Raaschou-Nielsen O, 2007; *Ratnasinghe D. 2000; Ichimura Y.2004; Méplan C. 2010; Hu YJ 2004*). Metaanaliza 35 badań oceniająca związek zmiany GPX1 Pro200Leu z ryzykiem raka wskazała, że obecność wariantu 200Leu wiąże się z ok. 20% zwiększeniem ryzyka raka (Zhigiang Hong, 2013).

Nieoczekiwanie stwierdzono silną korelację pomiędzy występowaniem raka jelita grubego u kobiet (nie u mężczyzn) a stężeniem arsenu we krwi i genotypem GPX1 (rs1050450).

Częstość występowania raka jelita grubego była zwiększona przy **obniżonym** stężeniu arsenu we krwi. Korelacje te nasilały się bardzo znacznie w genotypie GPX1.

Protokół badań

Grupa badana

Do badań włączono 201 pacjentów Kliniki Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Samodzielnych Publicznych Szpitali Klinicznych nr 1/2 ze zdiagnozowanym i potwierdzonym histopatologicznie rakiem jelita grubego. Od każdego z pacjentów włączonych do badania uzyskano świadomą zgodę na udział w badaniu, pobrano próbkę krwi oraz uzyskano dane rodowodowo-kliniczne. Próbkę krwi były pobierane od pacjentów przed leczeniem, a pacjenci byli poinformowani o konieczności bycia na czczo przez co najmniej 4 godziny przed pobraniem. Dla każdego pacjenta z rakiem jelita grubego została przyporządkowana/sparowana jedna osoba zdrowa zarejestrowana w Międzynarodowym Centrum Nowotworów Dziedzicznych Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie. Osoby zdrowe były częścią populacyjnego badania 1,3 miliona mieszkańców Polski, mającego na celu identyfikację rodzinnych agregacji raka przeprowadzoną przez nasz ośrodek. Uczestnicy badania zostali dobrani pod względem roku urodzenia (± 3 lata), płci, statusu palenia (paczkolata $\pm 20\%$) oraz łącznej liczba nowotworów jelita grubego i innych nowotworów wśród krewnych pierwszego stopnia.

Charakterystyka grupy badanej została przedstawiona w Tabeli 1.

Tabela 1 Charakterystyka grupy badanej

Rak jelita grubego		
	Chorzy	Zdrowi
Liczba osób	201	201
-kobiety	92	92
-mężczyźni	109	109
Średnia wieku	63,93	63,59
-kobiety	64,30	64,21
-mężczyźni	63,89	63,37

Materiał

Od każdej osoby włączonej do badania pobrano próbkę krwi w celu izolacji DNA oraz pomiaru stężenia arsenu. Krew pełną po pobraniu przechowywano w -80°C do momentu oznaczenia stężenia arsenu; DNA przechowywano w temperaturze 4°C do momentu wykonania oceny genotypów.

Metoda oznaczania zawartości arsenu we krwi pełnej

1.1 Aparat

Do określenia zawartości arsenu 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°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 tetrametyloammonowego (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.

1.3 Warunki pomiaru

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

1.4 Walidacja pomiarów

Do walidacji pomiarów zastosowano następujący materiał referencyjny ClinCheck (Recipe, Niemcy). Są to standardy odniesienia powszechnie stosowane w spektrometrii, pozwalające na potwierdzenie precyzji, czułości i specyfiki pomiaru.

Ocena genotypu

Analizy molekularne zostały wykonane za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy DNA z analizą ilości produktu w czasie rzeczywistym („real-time PCR”) z użyciem aparatu LightCycler 480, Roche. W badaniach wykorzystano sondy molekularne typu „Taqman” w postaci mieszaniny TaqMan Assay zawierającej sondy oraz startery reakcji PCR zakupione w firmie Applied Biosystem. System do analizy GPX1 rs1050450 wykonany został na zamówienie indywidualne. Każda analiza wykonana była w objętości 5 µl według proporcji przedstawionej w tabeli 2.

Tabela 2 Skład mieszaniny reakcyjnej do analizy wybranego SNP techniką „real-time PCR”

Mieszanina	
Probe qPCR MMx 2x (Promega)	2,5 µl
TaqMan Assay 40x (App. Biosys)	0,125 µl
Woda	1,375 µl
DNA (25 ng/ µl)	1 µl

Analiza została przeprowadzona na aparacie LightCycler 480, Roche w warunkach przedstawionych w tabeli 3.

Tabela 3 Warunki analizy wybranych SNP-ów techniką „real-time PCR” w aparacie LightCycler 480, Roche

Program	Nazwa cyklu	Temperatura °C	Czas	Liczba cykli	Odczyt danych
Inkubacja	HotStart	95	10 min	1	-
Amplifikacja i gromadzenie danych	Denaturacja	95	10 sek	50-55	-
	Annealing	52	30 sek		jednorazowo
	Wydłużanie	72	10 sek		-
Chłodzenie	Chłodzenie	40	30 sek	-	-
Kompresja kolorów	Denaturacja	95	1 sek	-	-
	Chłodzenie	40	30 sek	-	-
	Hybrydyzacja	80	-	1 odczyt/°C	Przez cały czas
	Chłodzenie	40	45 sek	-	-
Chłodzenie	Chłodzenie	40	30 sek	-	-

Statystyka

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

Grupy I-IV utworzono w zależności od stężeń arsenu we krwi poprzez podział na ćwiartki (o bardzo zbliżonej liczebności) osób zdrowych tworzących dla danego narządu i płci grupę kontrolną.

Wyniki

Analiza otrzymanych wyników wykazała istotną zależność między prawdopodobieństwem wystąpienia jelita grubego u kobiet a stężeniem arsenu we krwi oraz oceną genotypu GPX1 (rs 1050450).

Rak jelita grubego

Stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy stężeniem arsenu a prawdopodobieństwem wystąpienia raka jelita grubego u kobiet (już bez dodatkowej oceny wybranych genotypów).

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem arsenu a prawdopodobieństwem wystąpienia raka jelita grubego u mężczyzn. Wyniki przedstawiono w poniższych tabelach.

Tabela 4 Częstość występowania raka jelita grubego u kobiet w zależności od stężenia arsenu we krwi

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$\leq 0,65$	38	21
II	0,66-0,84	15	20
III	0,85-1,3	18	21
IV	$>1,3$	21	24

38 i 21 vs 54 i 65

OR= 2,2, p= 0,018, 95%CI: 1,1-4,1

Tabela 5 Częstość występowania raka jelita grubego u mężczyzn w zależności od stężenia arsenu we krwi

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$<0,55$	25	19
II	0,55-0,69	22	16
III	0,70-1,19	30	20
IV	$>1,2$	30	15

Stwierdzono istotny związek między występowaniem genotypu CC w genie **GPX1** rs1050450 i stężeniem **arsenu** we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka jelita grubego u kobiet. Kobiety ze stężeniem **arsenu** we krwi $\leq 0,65 \mu\text{g/l}$ oraz z genotypem CC w genie **GPX1** wykazują istotnie ponad 15-krotnie zwiększoną częstość występowania raka jelita grubego (ćwiartka I vs II-IV: OR = 15,2, $p < 0,0001$; 95%CI: 3,2-72,4).

Tabela 6 Częstość występowania raka jelita grubego u kobiet w zależności od stężenia As dla genotypu CC w genie GPX1

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$\leq 0,65$	19	2
II	0,66-0,84	5	10
III	0,85-1,3	6	9
IV	$>1,3$	9	13

19 i 2 vs 20 i 32

OR=15,2, $p < 0,0001$; 95%CI: 3,2-72,4

Literatura

Erdem O. et al.: Association of GPX1 polymorphism, GPX activity and prostate cancer risk. Hum. Exp. Toxicol, 2012; 31, 24–31.

Haan JB.: An imbalance in antioxidant defense affects cellular function: the pathophysiological consequence of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidase-1 (Gpx1) knockout mouse. Redox Rep., 8, 69–79 (2003).

Hu YJ, et al.: Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. Cancer Res, 2003; 63, 3347–3351.

Ichimura Y. et al.: Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. J Urol, 2004; 172, 728–732.

Kucukgergin C, et al. Association between genetic variants in glutathione peroxidase 1 (GPX1) gene, GPX activity and the risk of prostate cancer. Minerva. Urol. Nefrol, 2011; 63, 183–190.

Méplán C. et al.: Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. Carcinogenesis, 2010; 31, 1074–1079.

Raaschou-Nielsen O, et al.: GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption and risk for lung cancer. Cancer Lett, 2007; 247, 293–300.

Ratnasinghe D. et al.: Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. Cancer Res, 2000; 60, 6381–6383.

Ravn-Haren G, et al.: Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*, 2006; 27, 820–825.

Strona internetowa: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php. Data wejścia: 2017-08-26.

Zhigiang Hong: GPX1 gene Pro200Leu polymorphism erythrocyte GPX activity and cancer risk. *Mol Biol Rep*, 2013,40:1801–1812.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia prawdopodobieństwa wystąpienia raka jelita grubego u kobiet, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę zawartości **arsenu** we krwi pełnej oraz występowanie genotypu **GPX1** rs1050450 osoby badanej, przy czym kombinacja stężenia arsenu $\leq 0,65 \mu\text{g/l}$ z występowaniem genotypu CC w genie GPX1 wskazuje na **ponad 15-krotnie** podwyższoną częstość występowania raka jelita grubego.
2. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że próbkę materiału biologicznego stanowi krew żylna oraz DNA.
3. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że stężenie As w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar As we krwi żylniej.
4. Sposób wg zastrz. 1, **znamienny tym**, że testowanie DNA jest wykonywane przy pomocy konwencjonalnej techniki bezpośredniego wykrywania zmian takich jak sekwencjonowanie lub przy pomocy jakiegokolwiek konwencjonalnej techniki bezpośredniego wykrywania zmian wyselekcjonowanych.