

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 244361 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439313**

(22) Data zgłoszenia: **2018.05.17**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2019.01.02 BUP 01/2019**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.01.15 WUP 03/2024**

(51) MKP:

G01N 33/84 (2006.01)

(62) Numer zgłoszenia, z którego nastąpiło
wydzielenie:
425602

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

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

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Rafał Witek, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób określenia ryzyka raków u kobiet w zależności od stężenia arsenu we krwi

PL 244361 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu określania ryzyka raków u kobiet. Opisany wynalazek opiera się na ustaleniu, że istnieje korelacja między stężeniem arsenu we krwi pełnej a ryzykiem raków u kobiet nie będących nosicielkami żadnej z mutacji założycielskich w genie BRCA1/2 typowych dla populacji polskiej. Prezentowany sposób powinien znaleźć zastosowanie w szeroko rozumianej diagnostyce i profilaktyce nowotworów, zwłaszcza u kobiet.

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*). Różnorodność objawów klinicznych wywołanych inhalacją związkami arsenu lub jego spożyciem jest bardzo duża. W zależności od stężenia, czasu ekspozycji i drogi zaabsorbowania skutki oddziaływania arsenu z tkankami są od stosunkowo niegroźnych na przykład hipopigmentacji, po zagrażające życiu nowotwory (*WHO*). W świetle istniejących danych literaturowych można stwierdzić, że wysokie stężenia arsenu mogą być przyczyną takich raków jak rak płuca (*Mostafa MG, 2008*), nerki (*Hopenhayn-Rich C, 1996*), skóry (*Karagas MR, 2001*), pęcherza (*Mostafa MG, 2008*), czy trzustki (*Liu Mares W, 2013*). Istnieją też prace wskazujące odwrotną korelację – np. Lamm i wsp. stwierdzili nieistotne zmniejszenie ryzyka zachorowania na raka pęcherza moczowego wraz z rosnącym narażeniem na arsen w wodzie pitnej, w zakresie 3,0–6,0 µg/l (*Lamm SH, 2004*).

Przedmiotem wynalazku jest sposób określenia ryzyka raka u kobiety nie będącej nosicielką mutacji założycielskich w genie BRCA1 typowych dla populacji polskiej, znamienne tym, że obejmuje ilościową ocenę stężenia arsenu w próbce krwi pochodzącej od badanej pacjentki, przy czym stężenie arsenu wskazuje na ponad 29-krotnie obniżone ryzyko rozwoju raka w przypadku występowania wartości stężenia arsenu we krwi poniżej 0,59 µg/l, przy czym badana pacjentka należy do populacji polskiej i nie jest nosicielką żadnej spośród następujących mutacji w genie BRCA1: 5382insC, C61G, 4153delA.

Korzystnie, stężenie arsenu w próbce krwi pełnej oznacza się przez bezpośredni pomiar tego pierwiastka.

Protokół badań

Grupa obserwacyjna została wybrana spośród osób, których materiał znajduje się w biobanku naszego ośrodka. Pacjenci, którzy zgłosili się w latach 2010–2016 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 przez 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 arsenu.

W biobanku zgromadzono próbki od 33062 osób, które nigdy wcześniej przed pobraniem próbki nie chorowały na nowotwór złośliwy. Na potrzeby badania grupę 1698 osób bez mutacji w genie BRCA charakterystycznych dla populacji polskiej tj. 5382insC, C61G, 4153delA poddano ponad 3-letniej obserwacji. Do grupy nie włączono osób z nowotworem złośliwym rozpoznany przed pobraniem próbki krwi. Następnie w trzech głównych ośrodkach onkologicznych w Szczecinie, sprawdzano która z osób wyjściowo zdrowych w momencie włączenia do biobanku, zachorowała. Spośród 1698 osób, w ciągu ponad 3 lat obserwacji, na nowotwór złośliwy zachorowało 110 kobiet. Pozostała część grupy stanowiła grupę kontrolną badania.

Charakterystykę kohorty prospektywnej przedstawiono w tabeli poniżej (Tabela 1)

Tabela 1. Charakterystyka grupy

Cecha	Chore	Zdrowe
Liczba osób	110 osób	1588 osób
Średni wiek w momencie zabezpieczenia materiału	55,60 lat	55,10 lat
Średni okres śledzenia stanu zdrowia (follow-up)	39,50 miesięcy	

Lokalizacja narządowa	Liczba osób	Procentowy udział w całej grupie chorych
raka		
Piers	68	61,81
Jajniki	6	5,45
Jelito grube	5	4,55
Szpiczak	5	4,55
Macica	5	4,55
Pęcherz moczowy	4	3,64
Białaczka/Chłoniak	4	3,64
Tarczyca	4	3,64
Szyjka macicy	2	1,81
Nerka	2	1,81
Skóra (czerniak)	2	1,81
Endometrium	1	0,91
Płuco	1	0,91
Centralny układ nerwowy	1	0,91

Material

Od każdej osoby włączonej do badania pobrano próbkę krwi do pomiaru stężenia arsenu, kadmu, cynku oraz selenu.

Metoda oznaczania zawartości As we krwi pełnej.

1.1 Aparat

Do określenia zawartości wskazanych metali 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 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 tetrametyloamonowego (TMAH). Alkaliczne pH zapewnia dobrą rozpuszczalność składników krwi, nie powodując tym samym precipitacji 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

Wszystkie oznaczenia 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. Tlen jest gazem z wyboru dla prowadzenia oznaczeń As i Cd. W przypadku oznaczeń As, wykorzystanie tlenu pozwala uzyskać na drodze reakcji chemicznej stabilny produkt w postaci jonu ⁷⁵As¹⁶O⁺. Jon ten posiada masę 91, która wolna jest od interferencji spektralnych. Rozwiązanie to zapewnia maksimum specyfiki pomiaru As. Podobne rozwiązanie dotyczy oznaczeń kadmu. W tym przypadku jednak dokonano transferu atomu tlenu na interferent a nie jak w przypadku As na pożądaną jon. Najpoważniejszą interferencją w oznaczeniach ¹¹⁴Cd stanowi tlenek molibdenu ⁹⁸Mo¹⁶O. Zastosowanie tlenu pozwala na uzyskanie ditlenku molibdenu ⁹⁸Mo¹⁶O₂, niwelując tym samym problem nakładania się tych dwóch mas. Obecnie jest to najbardziej czuła technika oznaczeń dla materiału biologicznego. W przypadku Zn tlen pozostaje inerty.

1.4 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 (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 zależność między ryzykiem raków u kobiet a stężeniem arsenu.

Kobiety ze stężeniem arsenu we krwi poniżej 0,59 µg/l wykazują istotne ponad 29 krotnie obniżone ryzyko rozwoju raka w porównaniu do kobiet ze stężeniem arsenu powyżej 0,59 µg/l (OR=29,50; p < 0,0001; 95% CI: 4,10–212,00) (Tabela 2).

Tabela 2. Częstość występowania nowotworów złośliwych w zależności od stężenia arsenu we krwi

Grupa	Zakres stężeń $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$<0,59$	1	28
II	$>0,59$	109	1250

Literatura

Lamm SH, Engel A, Kruse MB, Feinleib M, Byrd DM, Lai S, Wilson R. Arsenic in drinking water and bladder cancer mortality in the United States: an anylysis based on 133 U.S. counties and 30 years of observation. *J Occup Environ Med.* 2004, 45(3):298–306

Liu Mares W., Mackinnon J.A., Sherman R., Fleming L.E., Rocha-Lima C., Hu J.J., Lee D.J. Pancreatic cancer clusters and arsenic-contaminated drinking water wells in Florida. *BMC Cancer,* 2013; 13(111).

Mostafa M.G., McDonald J.C., Cherry N.M. Lung cancer and exposure to arsenic in rural Bangladesh. *Occup. Environ. Med.* 2008; 65(11) 765–768.

Strona internetowa: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php. Data wejścia: 2016-09-11

World Health Organization. Arsenic. *Environmental Health Criteria*, 18, Geneva.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka raka u kobiety nie będącej nosicielką mutacji założycielskich w genie BRCA1 typowych dla populacji polskiej, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia arsenu w próbce krwi pochodzącej od badanej pacjentki, przy czym stężenie arsenu wskazuje na ponad 29 krotnie obniżone ryzyko rozwoju raka w przypadku występowania wartości stężenia arsenu we krwi poniżej $0,59 \mu\text{g/l}$, przy czym badana pacjentka należy do populacji polskiej i nie jest nosicielką żadnej spośród następujących mutacji w genie BRCA1: 5382insC, C61G, 4153delA.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stężenie arsenu w próbce krwi pełnej oznacza się przez bezpośredni pomiar tego pierwiastka.