

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237085**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **422917**

(51) Int.Cl.
G01N 33/84 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **21.09.2017**

(54) **Sposób określania ryzyka zachorowania na raka w populacji polskiej**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
25.03.2019 BUP 07/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
08.03.2021 WUP 05/21

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

(72) Twórca(y) wynalazku:
WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL
RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL
JAN LUBIŃSKI, Szczecin, PL
MAGDALENA MUSZYŃSKA, Szczecin, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Rafał Witek

PL 237085 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu określania ryzyka zachorowania na raka u pacjentki należącej do populacji polskiej, który to sposób bazuje na badaniach genetycznych i jednoczesnym ustalaniu poziomu kadmu we krwi.

Wiadomo, że do czynników karcynogennych należą między innymi metale ciężkie takie jak kadm (Cd), ołów (Pb) czy rtęć (Hg). Według klasyfikacji międzynarodowej agencji do badań nad rakiem (IARC, ang. International Agency for Cancer Research) kadm i jego związki zostały określone jako bezwzględnie ludzkie karcynogeny – grupa 1 [1].

Niekorzystne działanie kadmu i jego związków może prowadzić do chorób nerek, sercowo-naczyniowych, nadciśnienia, anemii, uszkodzeń wątroby, zaburzeń funkcjonowania narządów płciowych, zaburzeń układu immunologicznego, niedoborów żelaza, miedzi i cynku, a także rozwinięcia choroby nowotworowej [2]. Toksyczne działanie kadmu wynika z jego wpływu na wiele procesów: zaburzenie przepływu elektronów w łańcuchu oddechowym [3], wypieranie i zastępowanie innych metali w metaloenzymach oddziałujących na metabolizm białek, kwasów tłuszczowych, fosfolipidów, węglowodanów i kwasów nukleinowych [4, 5], osłabianie działania mechanizmów antyoksydacyjnych [6], a także wchodzenie w reakcje z grupami tiolowymi białek enzymatycznych [7]. Karcynogenne działanie kadmu jest także konsekwencją indukcji stresu oksydacyjnego [8]. Kadm może bezpośrednio uszkadzać nici DNA, hamować naprawę DNA, wiązać się z zasadami kwasu nukleinowego, zaburzać podział komórki, hamować syntezę glutationu oraz hamować metylację [8]. Liczne prace opisują zwiększone stężenia kadmu w materiale biologicznym osób, które zachorowały na nowotwór złośliwy prostaty [9, 10], nerki [11], pęcherza moczowego [12, 13], trzustki [14, 15] i piersi [16, 17]. Ponadto, należy nadmienić iż kadm zaliczany jest do grupy związków nazywanych metaloestrogenami. Szereg prac wykazuje zdolność kadmu do aktywacji receptora estrogenowego zarówno *in vitro* jak i *in vivo* [18]. Jak dotąd, nie opublikowano prac prospektywnych, w których oceniano by stężenie kadmu jako czynnika ryzyka u kobiet z mutacją w genie BRCA1.

Celem wynalazku jest dostarczenie testu diagnostycznego, który pozwalałby na zróżnicowanie grupy nosicielek mutacji genu BRCA1, a zwłaszcza wyodrębnienie grupy pacjentek, u których ryzyko zachorowania na raka jest wyjątkowo wysokie, nawet w porównaniu z innymi nosicielkami mutacji genu BRCA1. Kolejnym celem wynalazku jest dostarczenie testu diagnostycznego, który pozwalałby na wyodrębnienie podgrupy pacjentek, u których ryzyko zachorowania na raka jest względnie niskie, w porównaniu z innymi nosicielkami mutacji genu BRCA1. Nieoczekiwanie okazało się, że stężenia kadmu we krwi jest markerem ryzyka raków u kobiet, nosicielek mutacji w obrębie genu BRCA1. Wartość tego ryzyka jest różna w zależności od wieku badanej kobiety.

Przedmiotem wynalazku jest sposób określania ryzyka zachorowania na raka charakteryzujący się tym, że w próbce krwi żyłnej pobranej od pacjentki będącej nosicielką konstytucyjnej mutacji BRCA1 skorelowanej z podwyższonym ryzykiem raka piersi, określa się zawartość kadmu, przy czym w przypadku pacjentki poniżej 51 roku życia:

- ryzyko zachorowania na raka uznaje się za znacząco podwyższone przy zawartości kadmu odpowiadającej wysokiemu stężeniu kadmu we krwi wynoszącemu powyżej 0,32 µg/l,
 - ryzyko zachorowania na raka uznaje się za znacząco obniżone przy zawartości kadmu odpowiadającej niskiemu stężeniu kadmu we krwi wynoszącemu poniżej 0,32 µg/l,
- przy czym ryzyko rozwoju raka u pacjentki ze znacząco podwyższonym ryzykiem jest ponad ośmiokrotnie zwiększone w porównaniu z ryzykiem u pacjentki ze znacząco obniżonym ryzykiem.

Korzystnie, próbkę materiału biologicznego stanowi krew żylna.

Korzystnie, stężenie kadmu w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar kadmu we krwi żyłnej.

Protokół badań

Grupa badana została wybrana spośród osób, których materiał znajduje się w biobanku naszego ośrodka. Pacjentki, które zgłosiły się w latach 2010–2016 do Onkologicznej Poradni Genetycznej przy Szpitalu Klinicznym Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie, były zapraszane do oddania próbki krwi w celu biobankowania i podpisywały zgodę na przechowywanie i wykorzystywanie materiału w celach naukowych. Próbkę krwi były pobierane w godzinach 8–14, a pacjentki były poinformowane o konieczności bycia na czczo przez co najmniej 4 godziny przed pobraniem. Dla większości pacjentek 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 kadmu.

Grupa badana liczyła 455 osób, u których oznaczono stężenie kadmu we krwi a następnie poddano obserwacji przez średnio 38 miesięcy (zakres: 12–78). Po upływie tego czasu powstała kohortę prospektywną poddano analizie pod względem częstości zachorowania na nowotwory złośliwe. Spośród grupy 455 wyjściowo zdrowych osób, po okresie obserwacji wyłoniono 32 kobiety z rakiem o różnej lokalizacji narządowej (rak piersi i/lub jajnika: 22, otrzewnej: 1, jajnika: 8, oraz szyjki macicy: 1). Charakterystykę obu grup przedstawiono w tabeli 1 [Tabela 1].

T a b e l a 1. Charakterystyka grupy badanych kobiet.

Średnia	Chorzy	Zdrowi
Wiek	42,75 lat	39,94 lat
Stężenie kadmu	0,75 µg/l	0,65 µg/l
Wykonany zabieg adneksktomii	6 osób (19,75%)	114 osób (26,95%)
Stosowana hormonalna antykoncepcja	11 osób (34,38%)	172osób (40,66%)
Stosowana hormonalna terapia zastępcza	5 osób (15,63%)	90 osób (21,28%)

Materiał

Materiał do badań stanowiła krew żylna pobrana na czczo od zdrowych nosicielek mutacji w genie BRCA1.

Pomiar stężenia kadmu

Stężenie Cd we krwi pełnej oceniano stosując technikę ICP-MS (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry). Pomiary były walidowane przez zastosowanie materiału referencyjnego (Sero-norm Trace Elements Whole Blood L-1, Sero™, Billingstad, Norway – liofilizowanej ludzkiej krwi pełnej). Materiał referencyjny mierzony był co 8 próbek, w celu zachowania jakości oznaczeń. Dokładność pomiaru wynosiła +/- 10% µg Cd. Do korekcji dryfu aparatu i wpływu matrycy stosowany był wzorzec wewnętrzny w postaci roztworu rodu. Do walidacji techniki 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 specyfikacji pomiaru.

Statystyka

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

Wyniki

Analiza otrzymanych wyników wykazała istnienie zależności między stężeniem Cd we krwi pełnej a ryzykiem raków wśród kobiet będących nosicielkami mutacji w genie BRCA1.

Kobiety posiadające wysokie stężenia kadmu odznaczały się ponad trzykrotnie wyższym ryzykiem wystąpienia nowotworu złośliwego: badanie kwartyli (kwartył II + kwartył III + kwartył IV vs. kwartył I +; OR=3,40; p=0,0346; 95%CI:1,014–11,377) [Tabela 2].

T a b e l a 2. Częstość raków w zależności od stężenia kadmu wśród kobiet

Kwartył	Zakres stężeń [$\mu\text{g/l}$]	Chorzy	Zdrowi
I	0,02-0,33	3	110
II	0,33-0,47	13	101
III	0,47-0,74	6	108
IV	0,75-4,61	10	104

Badanie zakresów: kobiety posiadające stężenie kadmu powyżej 0,32 wykazywały tendencję do znacząco podwyższonego ryzyka rozwoju raka w porównaniu do kobiet z niskimi stężeniami (OR=3,232; p=0,0520; 95%CI: 0,9647–10,8300) [Tabela 3].

T a b e l a 3. Częstość raków w zależności od stężenia kadmu wśród kobiet

Grupa	Zakres stężeń	Chorzy	Zdrowi
I	$\leq 0,32$	3	106
II	$> 0,32$	29	317

Kobiety poniżej 51 roku życia, posiadające stężenie kadmu powyżej 0,32 $\mu\text{g/l}$ odznaczały się ponad ośmiokrotnie zwiększonym ryzykiem rozwoju raka w porównaniu do kobiet z niskim stężeniem kadmu (OR=8,295; p=0,0125; 95%CI: 1,102–62,457) [Tabela 4].

T a b e l a 4. Częstość raków w zależności od stężenia kadmu wśród kobiet poniżej 50 roku życia

Grupa	Zakres stężeń [$\mu\text{g/l}$]	Chorzy	Zdrowi
I	$< 0,32$	1	92
II	$> 0,32$	22	244

Podsumowanie

Na podstawie otrzymanych wyników zwiększone ryzyko raków stwierdza się dla kobiet ze stężeniem kadmu we krwi powyżej 0,32 $\mu\text{g/l}$. Korelacja ta nasiloną jest u nosicielek mutacji w BRCA1 w wieku poniżej 51 lat.

Literatura

- [1] Strona internetowa: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php. Data wejścia: 2016-09-11
- [2] Fowler B.A.. Monitoring of human populations for early markers of cadmium toxicity: A review. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009, 238(3): 294–300
- [3] Al-Nasser I.A.. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology* 2000, 38(4): 407–413
- [4] Casalino E., Sblano C., Landriscina C.. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1997, 346(2): 171–179
- [5] Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D.. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003, 192(2-3): 95–117
- [6] Casalino E., Calzavetti G., Sblano C., Landriscina C.. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidants enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 2002, 179(1-2): 37–50
- [7] Bertin G., Averbeck D.. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 2006, 88(11): 1549–1559

- [8] Nersesyanyan A., Kundi M., Waldherr M., Setayesh T., Misik M., Wultsch G., Filipic M., Barcelos G.F.M., Kansmueller S.. Results of micronucleus assay with individuals who are occupationally and environmentally exposed to mercury, lead and cadmium. *Mutation Research, Review in Mutation Research* 2015
- [9] Vincetti M., Venturelli M., Trerotoli P., Bonvicini F., Ferrari A., Bianchi G., Serio G., Bergomi M., Vivoli G.. Case control study of toenail cadmium and prostate cancer risk in Italy. *The Science of the total environment* 2007, 373(1): 77–81
- [10] Qayyum M.A., Shah M.H.. Comparative study of trace elements in blood, scalp hair and nails of prostate cancer patients in relation to healthy donors. *Biological Trace Element Research* 2014, 162(1-3): 46–57
- [11] Pirinicij N., Gecit I., Gunes M., Kaba M., Tanik S., Yuksel M.B., Arslan H., Demir H.. Levels of serum trace elements in renal cell carcinoma cases. *Asian Pacific Journal of Cancer And Prevention* 2013, 14(1): 499–502
- [12] Kellen E., Zeegers M.P., Hond E.D., Buntinx F.. Blood cadmium may be associated with bladder carcinogenesis: the Belgian case-control study on bladder cancer. *Cancer Detection and Prevention* 2007, 31(1): 77–82
- [13] Wolf C., Strenziok R., Kyriakopoulos A.. Elevated metallothionein-bound cadmium concentration in urine from bladder carcinoma patients, investigated by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2009, 631(2): 218–222
- [14] Farzin L., Moassesi M.E., Sajad F., Faghieh M.A.A.. Evaluation of trace elements in pancreatic cancer patients in Iran. *Middle East Journal of Cancer* 2013, 4(2)
- [15] Amaral A.F., Porta M., Silverman D.T., Milne R.L., Kogevinas M., Rothman N., Cantor K.P., Jackson B.P., Pumarega J.A., Lopez T., Carrato A., Guamer L., Real F.X., Malats N.. Pancreatic cancer risk and levels of trace elements
- [16] Wu H.D., Chou S.Y., Chen D.R., Kuo H.W.. Differentiation of serum levels of trace elements in normal and malignant breast patients. *Biological Trace Elements Research* 2006, 113(1): 9–18
- [17] El-Deeb M.M.K., El-Sheredy H.G., Mohammed A.F.. The role of serum trace elements and oxidative stress in Egyptian breast cancer patients. *Advances in Breast Cancer Research* 5(1): 37–47
- [18] Adams S.V., Shafer M.M., Bonner M.R., LaCroix A.Z., Manson J.E., Meliker J.R., Neuhauser M.L., Newcomb P.A.. Urinary cadmium and risk of invasive breast cancer in the Women's Health Initiative. *American Journal of Epidemiology* 2015, 183(9): 815–823.
- [19] Nawrot T., Plusquin M., Hogervorst J., Roels H.A., Celis H., Thijs L., Vangronsveld J., Hecke E.V., Staessen J.A.. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncology* 2006, 7: 119–126
- [20] Platz E.A., Helzlsouer K.J., Hoffman S.C., Morris J.S., Baskett C.K., Comstock G.W.. Pre-diagnostic toenail cadmium and zinc and subsequent prostate cancer risk. *The Prostate* 2002, 52: 288–296.
- [21] Kelly R.S., Lundh T., Porta M., Bergdahl I.A., Palli D., Johanson A.S., Botsivali M., Vieneis P., Vermeulen R., Kyrotopoulos S.A., Chadeau-Hyam M.. Blood erythrocyte concentrations of cadmium and lead and the risk of B-cell Non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma: a nested case-control study. *PLoS ONE* 2013, 8(11)
- [22] Silva N., Peiris-John R., Wickremasinghe R., Senanayake H., Sathikumar N. *Journal of Applied Toxicology* 2012, 32: 318–322.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określania ryzyka zachorowania na raka w populacji polskiej, **znamienny tym**, że w próbce krwi żyłnej pobranej od pacjentki będącej nosicielką konstytucyjnej mutacji BRCA1 skorelowanej z podwyższonym ryzykiem raka piersi, określa się zawartość kadmu, przy czym w przypadku pacjentki poniżej 51 roku życia:
 - ryzyko zachorowania na raka uznaje się za znacząco podwyższone przy zawartości kadmu odpowiadającej wysokiemu stężeniu kadmu we krwi wynoszącemu powyżej 0,32 µg/l,

- ryzyko zachorowania na raka uznaje się za znacząco obniżone przy zawartości kadmu odpowiadającej niskiemu stężeniu kadmu we krwi wynoszącemu poniżej 0,32 $\mu\text{g/l}$, przy czym ryzyko rozwoju raka u pacjentki ze znacząco podwyższonym ryzykiem jest ponad ośmiokrotnie zwiększone w porównaniu z ryzykiem u pacjentki ze znacząco obniżonym ryzykiem.
- 2. Sposób wg zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że próbkę materiału biologicznego stanowi krew żylna.
- 3. Sposób wg zastrzeżenia 1 albo 2, **znamienny tym**, że stężenie kadmu w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar kadmu we krwi żyłnej.