

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245252 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **438040**

(22) Data zgłoszenia: **2021.06.01**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.12.05 BUP 49/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.06.10 WUP 24/2024**

(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
CEZARY CYBULSKI, Wołczkowo, PL
JACEK GRONWALD, Szczecin, PL
TOMASZ HUZARSKI, Szczecin, PL
RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL
WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL
ANNA JAKUBOWSKA, Szczecin, PL

(54) Tytuł:

Stężenie manganu w surowicy jako marker prognostyczny u chorych z rakiem piersi

PL 245252 B1

Opis wynalazku

Mangan (Mn) jest niezbędnym składnikiem odżywczym biorącym udział w prawidłowym funkcjonowaniu układu odpornościowego, regulacji poziomu cukru we krwi i energii komórkowej, rozmnażania, trawienia, wzrostu kości, krzepnięcia krwi i homeostazy oraz obrony przed reaktywnymi formami tlenu. Funkcje pełnione przez metaloproteiny manganu obejmują oksydoreduktazy, transferazy, hydrolazy, liazy, izomerazy oraz ligazy. [1] Działa jako kofaktor dla różnych enzymów, w tym arginazy, syntetazy glutaminy (GS), karboksylazy pirogronianowej i dysmutazy ponadtlenkowej Mn (Mn-SOD) [2]. Mangan ma tendencję do odkładania się w wątrobie, trzustce, kościach oraz mózgu [2].

Głównym źródłem manganu dla ludzi jest pożywienie. Najwyższą zawartością tego pierwiastka charakteryzują się następujące produkty: ryż, orzechy (laskowe, migdały, pekan), zboża (kiełki pszenicy, owies, otręby), czekolada, herbata, małe, rośliny strączkowe, owoce, szpinak, nasiona (siemę lniane, sezam, pestki dyni, słonecznik, orzeszki pini) oraz przyprawy takie jak chili, czosnek, goździki czy szafran [1,2].

W literaturze można znaleźć badania opisujące korelację pomiędzy stężeniem Mn w surowicy a ryzykiem raka piersi oraz jelita grubego. Rihwa Choi i wsp. wykazali, że u pacjentek z rakiem piersi, jest istotnie wyższe stężenie manganu w surowicy w porównaniu do kobiet zdrowych [3]. W innym badaniu przeprowadzonym przez Milde i wsp. wykazano, że chorzy z rakiem jelita grubego mają również wyższe stężenia Mn w surowicy w porównaniu do osób zdrowych [4]. Przytoczone badania mają jednak charakter retrospektywny, co powoduje, że nie są one wiarygodne dla stwierdzenia, że mangan jest markerem ryzyka zachorowania na raka.

Aktualnie nie ma natomiast żadnych opublikowanych prac odnoszących się do korelacji pomiędzy stężeniem Mn w surowicy a przeżyciami chorych kobiet z rakiem piersi.

Protokół badań

Grupa badana

Do badań włączono 538 pacjentek (283 pacjentki Samodzielnych Publicznych Szpitali Klinicznych nr 1/2 oraz 255 pacjentek Zachodniopomorskiego Centrum Onkologii) ze zdiagnozowanym i potwierdzonym histopatologicznie rakiem piersi. Od każdej pacjentki włączonej do badania uzyskano świadomą zgodę na udział w badaniu, pobrano próbkę krwi oraz uzyskano dane rodowodowo-kliniczne. Krew została zebrana w latach 2009–2015 w momencie diagnozy raka piersi jednak przed rozpoczęciem leczenia. Pacjentki były poinformowane o konieczności bycia na czczo przez co najmniej 4 godziny przed pobraniem. W 2020 roku zebrano informację o zgonach w trakcie obserwacji prospektywnej. Użytkano ją z Departamentu Ewidencji Państwowych Ministerstwa Cyfryzacji. Średni okres obserwacji dla pacjentek żyjących wyniósł 9 lat (zakres 5–12 lat). Charakterystyka grupy została przedstawiona w Tabeli 1.

Tabela 1 Charakterystyka grupy

	Zgony	
Średnia wieku (zakres)	55,87 (25-85)	61,07 (28-91)
Palenie papierosów		
-obecnie	89 (21,3%)	26 (21,5%)
-w przeszłości	112 (26,9%)	27 (22,3%)
-nigdy	206 (49,4%)	65 (30,7%)
-brak danych	10 (2,4%)	3 (1,4%)
Receptor estrogenowy		
-dodatni	287 (68,8%)	79 (65,3%)
-ujemny	114 (27,3%)	32 (26,4%)
-brak danych	16 (3,8%)	10 (8,26%)
Leczenie		
-chemioterapia	211 (50,6%)	65 (53,7%)
-radioterapia	244 (58,5%)	56 (46,3%)
-tamoxifen	282 (67,6%)	79 (65,3%)
Mutacja w genie BRCA1	50 (12%)	11 (9,1%)
Rodzaj operacji		
-mastektomia	261 (62,6%)	82 (67,8%)
-lumpektomia	131 (31,4%)	17 (14%)
-brak danych	25 (6%)	22 (18,2%)

Material

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

Metoda oznaczania zawartości manganu w surowicy

1.1 Aparat

Do określenia zawartości manganu wykorzystana została technika spektrometrii mas z wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (ICP-MS). Do wykonania pomiaru wykorzystano spektrometr mas 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 surowicy, 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. Próbki krwi zostały rozcieńczone w stosunku 1:30 (50 μl surowicy : 1450 μl buforu).

Z uwagi na specyfikę pomiaru do rozcieńczeń zastosowano roztwór wodorotlenku tetrametyloamoniowego (TMAH). W celu lepszej dyspersji rozpuszczonych składników surowicy 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 (103Rh). 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 KED (ang. Kinetic Energy Discrimination) aparatu NexION 350D (PerkinElmer) z amoniakiem jako gazem reakcyjnym. Laboratorium jest członkiem programu zewnętrznej kontroli jakości (QMEQAS) organizowanym przez Centre du Toxicologie de Quebec.

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

Do analizy przeżycia zastosowano metodę regresji Cox'a oraz krzywą Kaplan-Meier.

Wyniki

Analiza otrzymanych wyników wykazała korelację między stężeniem manganu w surowicy a ryzykiem zgonu kobiet z rakiem piersi.

Kobiety ze zdiagnozowanym rakiem piersi, u których stężenie manganu w surowicy zawiera się **w przedziale 0,36–0,97 $\mu\text{g/l}$** , wykazują istotnie **ponad 1,5 krotnie zwiększone** ryzyko zgonu w porównaniu do pozostałych kobiet (p.value: 0,01; HR: 1,66; 95%CI: 1,13–2,45) (Tabela 2). Kobiety ze zdiagnozowanym rakiem piersi, u których stężenie manganu w surowicy zawiera się **w przedziale 1–10 $\mu\text{g/l}$** , wykazują istotnie **ponad 1,5 krotnie zmniejszone** ryzyko zgonu w odniesieniu do pozostałych kobiet (p.value: 0,01; HR: 1,55; 95%CI: 1,09–2,20) (Tabela 2).

Tabela 2. Częstość zgonów w zależności od stężenia manganu w surowicy u kobiet z rakiem piersi.

Grupa	Zakres Mn $\mu\text{g/l}$	Zycie	Zgony	HR	p value	95% CI
I	0,36-0,80	96	39	1,57	0,08	0,95-2,6
II	0,81-0,97	96	42	1,72	0,03*	1,05-2,83
III	0,98-1,21	105	25	Ref.	Ref.	Ref.
IV	1,22-33,73	104	30	1,27	0,38	0,74-2,15
Grupy I-II vs. III-IV						
I	0,36-0,97	192	81	1,65	0,01*	1,13-2,45
II	0,98-33,73	209	55	Ref.	Ref.	Ref.
Wybrane zakresy						
I	1,0-10,0	197	49	Ref.	Ref.	Ref.
II	<1 & > 10	204	87	1,55	0,01*	1,09-2,20

*wynik istotny statystycznie

Kobiety powyżej 50 roku życia, u których zdiagnozowano nowotwór złośliwy piersi, wykazują istotnie **ponad 1,5 krotnie zmniejszone** ryzyko zgonu, jeśli ich stężenie manganu w zawiera się w przedziale **0,97–33,73 $\mu\text{g/l}$** (p.value: 0,01; HR: 1,66; 95%CI: 1,12–2,45) (Tabela 3). Kobiety powyżej 50 roku życia, u których zdiagnozowano nowotwór złośliwy piersi, wykazują **blisko 2 krotnie obniżone** ryzyko zgonu w przypadku, gdy ich stężenie manganu znajduje się **w przedziale 1–10 $\mu\text{g/l}$** (p.value: 0,005; HR: 1,79; 95%CI: 0,37–0,84) (Tabela 3).

Tabela 3. Częstość zgonów w zależności od stężenia manganu w surowicy u kobiet z rakiem piersi powyżej 50 roku życia.

Grupa	Zakres Mn $\mu\text{g/l}$	Zycie	Zgony	HR	p value	95% CI
I	0,36-0,80	67	32	1,72	0,06	0,98-3,01
II	0,81-0,97	67	34	1,83	0,03*	1,05-3,18
III	0,99-1,21	79	20	Ref.	Ref.	Ref.
IV	1,22-33,73	78	21	1,15	0,66	0,62-2,12
Grupy I-II vs. III-IV						
I	0,36-0,97	134	66	1,66	0,01*	1,12-2,45
I	0,98-33,73	157	41	Ref.	Ref.	Ref.
Wybrane zakresy						
I	1,0-10,0	148	36	1,79	0,005*	0,37-0,84
II	<1 & > 10	143	71	Ref.	Ref.	Ref.

*wynik istotny statystycznie

Figura 1 i 2 stanowiące załączniki do opisu zgłoszenia patentowego.

Figura 1. Prawdopodobieństwo przeżycia kobiet chorych na raka piersi w obserwacji ponad 10-letniej (wybrane zakresy stężeń manganu w surowicy: < 1; 1–10; > 10 $\mu\text{g/l}$).

Figura 2. Prawdopodobieństwo przeżycia kobiet powyżej 50 roku życia, chorych na raka piersi w obserwacji ponad 10-letniej (wybrane zakresy stężeń manganu w surowicy: < 1; 1–10; > 10 $\mu\text{g/l}$).

Literatura

1. Aschner, M.; Erikson, K. Manganese. *Adv Nutr* **2017**, *8*, 520–521, doi:10.3945/an-117.015305.
2. Chen, P. Manganese Metabolism in Humans. *Front Biosci* **2018**, *23*, 1655–1679, doi:10.2741/4665.
3. Choi, R.; Kim, M.-J.; Sohn, I.; Kim, S.; Kim, I.; Ryu, J.M.; Choi, H.J.; Kim, J.-M.; Lee, S.K.; Yu, J.; et al. Serum Trace Elements and Their Associations with Breast Cancer Subgroups in Korean Breast Cancer Patients. *Nutrients* **2019**, *11*, 37, doi:10.3390/nu11010037.
4. Milde, D.; Novák, O.; Stuka, V.; Vysloužil, K.; Macháček, J. Serum Levels of Selenium, Manganese, Copper, and Iron in Colorectal Cancer Patients. *Biol Trace Elem Res* **2001**, *79*, 107–114, doi:10.1385/bter:79:2:107.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka zgonu u kobiet chorych na raka piersi, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia manganu w próbce surowicy osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na istotnie 1,65 krotnie zwiększone ryzyko zgonu pacjentki przy stężeniu manganu w próbce surowicy w przedziale 0,36–0,97 $\mu\text{g/l}$, w stosunku do pozostałych kobiet ze stężeniem $>0,97 \mu\text{g/l}$.
2. Sposób określenia ryzyka zgonu u kobiet chorych na raka piersi, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia manganu w próbce surowicy osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na 1,55 krotnie zmniejszone ryzyko zgonu pacjentki w stosunku do podgrupy ze stężeniem manganu w próbce surowicy $< 1 \mu\text{g/l}$ lub $>10 \mu\text{g/l}$, w przypadku występowania wartości stężenia manganu w próbce surowicy w przedziale 1–10 $\mu\text{g/l}$.
3. Sposób określenia ryzyka zgonu u kobiet chorych na raka piersi powyżej 50 roku życia, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia manganu w próbce surowicy osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na 1,66 krotnie zwiększone ryzyko zgonu pacjentki przy stężeniu manganu w próbce surowicy w przedziale 0,36–0,97 $\mu\text{g/l}$, w stosunku do pozostałych kobiet ze stężeniem $>0,97 \mu\text{g/l}$.
4. Sposób określenia ryzyka zgonu u kobiet chorych na raka piersi powyżej 50 roku życia, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia manganu w próbce surowicy osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na 1,79 krotnie zmniejszone ryzyko zgonu pacjentki w stosunku do podgrupy ze stężeniem manganu w próbce surowicy $< 1 \mu\text{g/l}$ lub $> 10 \mu\text{g/l}$, w przypadku występowania wartości stężenia manganu w próbce surowicy w przedziale 1–10 $\mu\text{g/l}$.
5. Sposób wg zastrzeżenia 1–4, **znamienny tym**, że stężenie Mn w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar Mn w próbce surowicy.

Rysunki

Figura 1

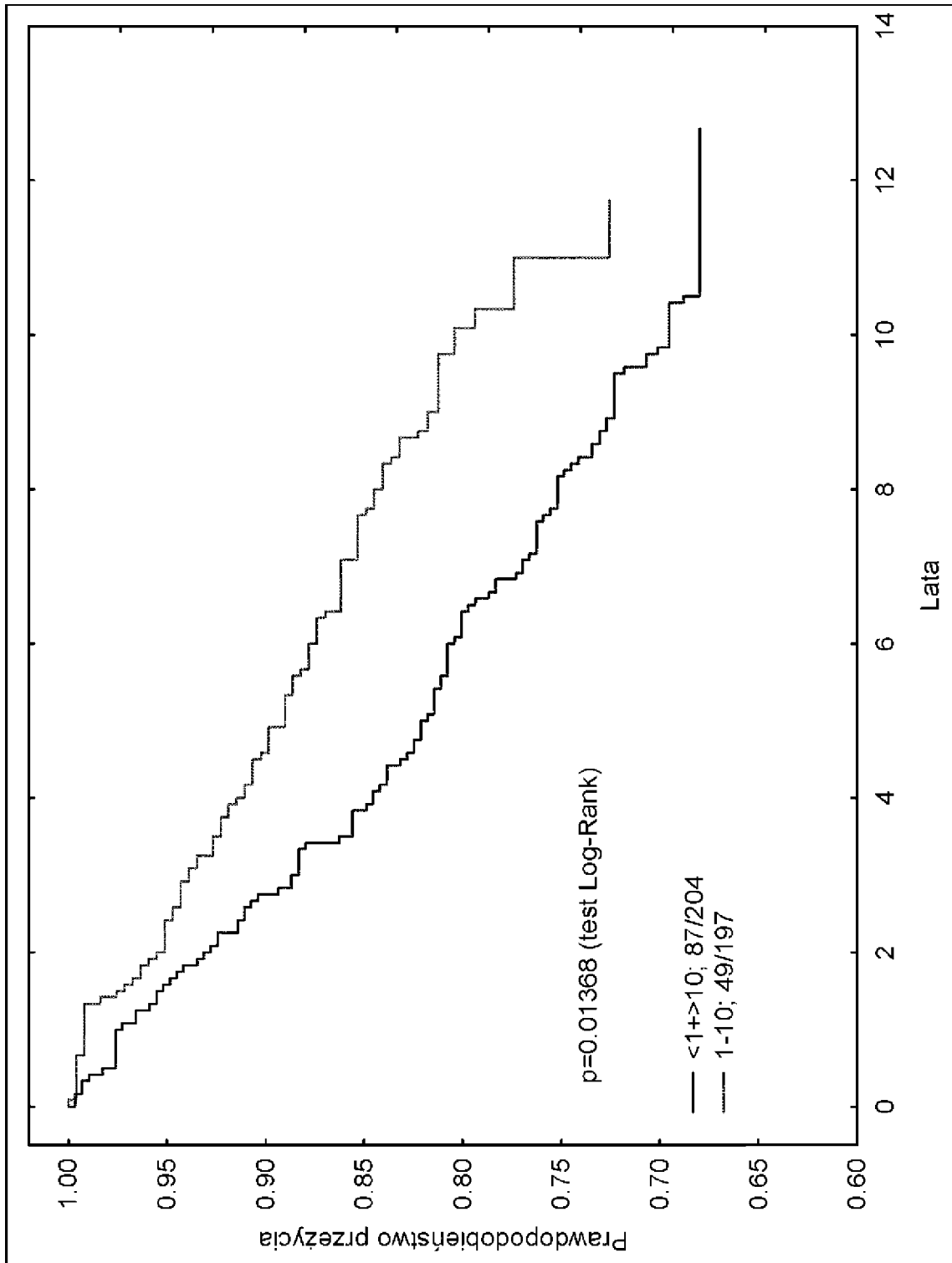


Figura 2

