

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 242925 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **442001**

(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

ANNA JAKUBOWSKA, Szczecin, PL

KATARZYNA BIAŁKOWSKA, Szczecin, PL

WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL

RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL

(54) Tytuł:

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

PL 242925 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, ERCC2, GPX1, MT1B, GSTP1, ERCC2 oraz ABCB1.

SOD2 rs4880

Dysmutaza ponadtlenkowa 2 (SOD2) może przekształcić toksyczny nadtlenek w nadtlenek wodoru oraz tlen ozonowy. Najczęstszym polimorfizmem jest zmiana typu missense – Val16Ala (rs4880). Zmiany w genie SOD2 związane są z rozwojem raków a także idiopatyczną kardiomiopatią i przedwczesnym starzeniem się (strona internetowa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6648>, data wejścia 2020-05-08).

ERCC2 rs13181

Polimorfizm genetyczny rs13181 w genie ERCC2 bierze udział w naprawie DNA. Związany jest między innymi ze zwiększonym ryzykiem raka płuca (Kiyohara C, 2012), glejakiem (McKean-Cowdin R, 2009), jajnika (Michalska MM, 2015), piersi oraz płaskonabłonkowego raka głowy i szyi (Mitra AK, 2009).

W pracy oceniono korelację pomiędzy występowaniem raków piersi a stężeniami arsenu we krwi i genotypami w genach SOD2, ERCC2.

Nieoczekiwanie stwierdzono silną korelację pomiędzy występowaniem raka u kobiet (nie u mężczyzn) a stężeniem arsenu we krwi i wybranymi genotypami. Częstość występowania raka piersi była zwiększona przy **podwyższonym** stężeniu we krwi. Korelacje te nasilały się bardzo znacznie w wybranych genotypach w genach SOD2 oraz ERCC2.

Protokół badań

Grupa badana

Do badań włączono 305 pacjentów Onkologicznej Poradni Genetycznej w SPSK1/2 ze zdiagnozowanym i potwierdzonym histopatologicznie rakiem piersi. 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 piersi 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), statusu palenia (paczkolata $\pm 20\%$) oraz łącznej liczby nowotworów piersi i innych nowotworów wśród krewnych pierwszego stopnia. Średnia wieku kobiet ze zdiagnozowanym rakiem piersi wynosiła 57,19 a u kobiet zdrowych 57,89.

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 tetrametyloamonowego (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. Każda analiza wykonana była w objętości 5 μl według proporcji przedstawionej w tabeli 2.

Tabela 1 Skład mieszaniny reakcyjnej do analizy wybranego SNP techniką „real-time PCR”

Mieszanina	
Probc 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 2 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 liczbie) osób zdrowych tworzących dla danego narządu grupę kontrolną.

Wyniki

Analiza otrzymanych wyników wykazała istotną zależność między prawdopodobieństwem wystąpienia raka piersi u kobiet a stężeniem arsenu we krwi oraz oceną wybranych genotypów.

Rak piersi

Stwierdzono istotny związek między stężeniem arsenu we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka piersi u kobiet. Kobiety z niskim stężeniem arsenu tj. **<0,55 µg/l** wykazały blisko 2,5 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi (niezależnie od badanych genotypów). Wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 3 Częstość występowania raka piersi u kobiet
w zależności od stężenia arsenu we krwi

Grupa	Stężenie As µg/l	Chore	Zdrowe
I	<0,55	37	78
II	0,55-0,79	79	74
III	0,80-1,2	94	79
IV	>1,2	21	24

37 i 78 vs 194 i 177

OR= 2,3, p=0,0002, 95%CI: 1,5-3,6

Stwierdzono istotny związek między występowaniem równocześnie genotypu AA w genie **SOD2** rs4880 i genotypu TT w genie **ERCC2** rs13181 oraz stężeniem arsenu we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka piersi u kobiet. Kobiety ze stężeniem arsenu we krwi **< 0,55 µg/l** oraz z genotypem AA w genie **SOD2** i genotypem TT w genie **ERCC2** wykazują istotnie 30 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi w stosunku do podgrup ze stężeniem arsenu >1,2 µg/l (ćwiartka I vs IV: OR=30, p=0,0063; 95%CI: 2,2-406,2) i blisko 9 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi w porównaniu do wszystkich podgrup (ćwiartka I vs II-IV: OR=8,8, p=0,041, 95%CI: 0,97-80,1). W tym genotypie u kobiet ze stężeniem arsenu >1,2 µg/l stwierdzono około 6,5 krotnie zwiększone prawdopodobieństwo występowania raka piersi (ćwiartka IV vs I-III: OR=6,6, p=0,021, 95%CI: 1,3-34,2).

**Tabela 2 Częstość występowania raka piersi u kobiet
w zależności od stężenia As dla genotypu AA
w genie SOD2 oraz genotypu TT w genie ERCC2**

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	<0,55	1	6
II	0,55-0,79	4	9
III	0,8-1,2	11	6
IV	>1,2	10	2

1 i 6 vs 10 i 2

OR=30, $p=0,0063$; 95%CI: 2,2-406,2

1 i 6 vs 25 i 17

OR= 8,8, $p=0,041$, 95%CI: 0,97-80,1

10 i 2 vs 16 i 21

OR=6,6, $p=0,021$, 95%CI: 1,3-34,2

Literatura

McKean-Cowdin R1, Barnholtz-Sloan J, Inskip PD, Ruder AM, Butler M, Rajaraman P, Razavi P, Patoka J, Wiencke JK, Bondy ML, Wrensch M. (2009), Associations between polymorphisms in DNA repair genes and glioblastoma., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Apr;18(4):1118-26. doi: 10.1158/1055-9965.EPI-08-1078. Epub 2009 Mar 24.

Michalska MM, Samulak D, Romanowicz H, Sobkowski M, Smolarz B. (2015), An Association between Single Nucleotide Polymorphisms of Lys751Gln ERCC2 Gene and Ovarian Cancer in Polish Women., *Adv Med.* 2015;2015:109593. doi: 10.1155/2015/109593. Epub 2015 Oct 7.

Mitra AK, Singh N, Garg VK, Chaturvedi R, Sharma M, Rath SK, (2009) Statistically significant association of the single nucleotide polymorphism (SNP) rs13181 (ERCC2) with predisposition to Squamous Cell Carcinomas of the Head and Neck (SCCHN) and Breast cancer in the north Indian population. *J Exp Clin Cancer Res.* 2009 Jul 18;28:104. doi: 10.1186/1756-9966-28-104.

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

Strona internetowa: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6648>. Data wejścia: 2020-05-08

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia prawdopodobieństwa wystąpienia raka piersi u kobiet, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę zawartości **arsenu** we krwi pełnej, występowanie genotypu **ERCC2** rs13181 oraz genotypu **SOD2** rs4880 u osoby badanej, przy czym kombinacja stężenia arsenu < **0,55 $\mu\text{g/l}$** z oceną genotypu TT w genie ERCC2 oraz występowaniem genotypu AA w genie SOD2 wskazuje na **30 krotnie zmniejszoną** częstość występowania raka piersi w stosunku do podgrupy ze stężeniem arsenu > 1,2 $\mu\text{g/l}$ i **blisko 9 krotnie zmniejszoną** częstość występowania raka piersi w porównaniu do wszystkich podgrup.
2. Sposób wg zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że próbkę materiału biologicznego stanowi krew żylna oraz DNA.
3. Sposób wg zastrzeżenia 1, **znamienny tym**, że stężenie As w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar As we krwi żylną.
4. Sposób wg zastrzeżenia 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.