

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243310 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **425602**

(22) Data zgłoszenia: **2018.05.17**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.07.31 WUP 31/2023**

(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
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:
Rafał Witek, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Sposób określenia ryzyka raków u kobiet nie będących nosicielkami mutacji w genie BRCA1 i BRCA2 w zależności od stosunku stężeń we krwi arsenu i selenu

PL 243310 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu określania ryzyka raków u kobiet. Opisany wynalazek opiera się na ustaleniu, że istnieje korelacja między stosunkiem stężeń selenu do 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 (Hoppenhayn-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).

W organizmie selen działa poprzez białka, do których jest wbudowany w postaci selenocysteiny. Jako składnik selenobiałek selen odgrywa rolę enzymatyczną, jak i strukturalną. Do jednych z ważniejszych funkcji selenobiałek należy udział w produkcji hormonów tarczycy, pobudzanie układu immunologicznego, oraz ochrona przed stresem oksydacyjnym (Combs GF, 2001). Zarówno niedobór jak i nadmiar tego pierwiastka może mieć niekorzystny wpływ na organizm. Jednakże, wydaje się, że znacznie poważniejsze konsekwencje są związane z niedoborem selenu. Prowadzą one do m.in. zaburzeń pracy serca, zwrodnienia serca i wątroby, zwiększenia ryzyka choroby nadciśnieniowej, ograniczenia sprawności układu odpornościowego, zaburzenia funkcji tarczycy, zaburzenia mineralizacji kości i prawidłowego wykształcenia zębów oraz zwiększenia ryzyka chorób nowotworowych (Reddy VN, 2001). Wyniki badań eksperymentalnych przeprowadzonych na modelach zwierzęcych (Kim JH, 2011; Yang H, 2011) jak i prób klinicznych u ludzi wskazują na związek pomiędzy stężeniem tego pierwiastka w organizmie, a zachorowaniem na nowotwory (Schrauzer GN, 1977; Pourmand G, 2008; Vand den Brandt PA, 1993; Knekt P, 1998; Mark SD, 2000; Borawska MH, 2009; Jabłońska E, 2008; Duffield-Lillico AJ, 2002; Duffield-Lillico AJ, 2003; Reid ME, 2002; Reid ME, 2006; Lippman SM, 2009; Klein EA, 2011). Większość badań wykazała odwrotną zależność między stężeniem selenu a zachorowaniem na nowotwory bądź ryzykiem wystąpienia choroby. Jednak u kobiet stwierdzano nieoczekiwane, że wysokie stężenie selenu zwiększało ryzyko raków (Duffield-Lillico AJ, 2002). W piśmiennictwie można znaleźć prace dotyczące antagonistycznego działania selenu i arsenu. Stwierdzono między innymi, że u osób z wysokimi stężeniami selenu we krwi istnieje obniżone ryzyko wystąpienia przednowotworowych zmian skórnych charakterystycznych dla zatrucia arsenem (Chen Y, 2007).

Przedmiotem wynalazku jest sposób określenia ryzyka raka u kobiety nie będącej nosicielką mutacji założycielskich w genie BRCA1/2 typowych dla populacji polskiej, charakteryzujący się tym, że obejmuje ilościową ocenę stosunku stężenia selenu do arsenu w próbce krwi pochodzącej od badanej pacjentki, przy czym określone stężenie wskazuje na znacząco obniżone ryzyko rozwoju raka w przypadku występowania wartości stosunku stężeń selenu do arsenu powyżej 160, 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 oraz selenu w próbce krwi oznacza się przez bezpośredni pomiar tych pierwiastków we krwi pełnej.

Materiał biologiczny do oceny stosunku selenu do arsenu u osoby badanej może być również pobierany z jakiegokolwiek tkanki lub wydzieliny, korzystnie z krwi, moczu, włosów lub paznokci, a poziom stosunku selenu do arsenu u osoby badanej jest oznaczany przez bezpośredni pomiar arsenu, selenu lub stosunku selenu do arsenu lub pośrednio przez ocenę metabolitu arsenu oraz selenu lub jakiegokolwiek innego metabolitu lub produktu genowego takiego jak białko lub RNA, którego stężenie jest skorelowane ze stężeniem ww. metali.

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. Próbki 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, kadmu, cynku oraz selenu.

W biobanku zgromadzono próbki od 33062 osób, które nigdy wcześniej przed pobraniem próbek 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 próbek 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 raka	Liczba osób	Procentowy udział w całej grupie chorych
Pierś	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

Tarczycza	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

Materiał

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

Metoda oznaczania zawartości As, Cd, Zn oraz Se 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 $<0,1 \mu\text{g/l}$. 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 worktesku 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 wypukiwania próbki z układu wprowadzenia spektrometru. Do korekcji efektu matrycy oraz dryfu aparatu użyty został standard wewnętrzny w postaci rodu (^{105}Rh). 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 stabilnego produktu w postaci jonu $^{75}\text{As}^{16}\text{O}^+$. 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 ^{114}Cd stanowi tlenek molibdenu $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}$. Zastosowanie tlenu pozwala na uzyskanie ditlenku molibdenu $^{98}\text{Mo}^{16}\text{O}_2$, niwelując tym samym problem nakładania się tych dwóch mas. Obecnie jest to najbardziej czuła technika oznaczeń dla materiału biologicznego.

W przypadku Zn tlen pozostaje inertny.

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 selenu do arsenu oraz we krwi.

Wartości stężeń badanych mikro- i makroelementów skorelowane z istotnie obniżonym ryzykiem rozwoju raków

Stosunek stężeń selen do arsenu

Kobiety z wysokimi wartościami stosunku stężeń selenu do arsenu (Se/As), szczególnie powyżej 160, wykazują blisko 10-krotnie niższe ryzyko wystąpienia raka w porównaniu do kobiet ze stosunkiem stężeń Se/As poniżej 160 (OR=9,50; $p < 0,0001$; 95%CI:3,50-26,00) (Tabela 2).

Tabela 2
Częstość występowania raków w zależności od stosunku stężenia selenu do stężenia arsenu we krwi wśród kobiet

Grupa	Zakres stężeń $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	>160	4	420
II	<160	106	1168

Literatura

Al-Nasser I.A. Cadmium hepatotoxicity and alterations of the mitochondrial function. *Journal of Toxicology and Clinical Toxicology* 2000, 38(4):407–413.

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., Guarner L., Real F.X., Malats N. Pancreatic cancer risk and levels of trace elements. *GUT*. 2012, 61(11): 1583–1588.

Bertin G., Averbek D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). *Biochimie* 2006, 88(11): 1549–1559.

Borawska M.H., Socha K., Łazarczyk B., Czyżewska E., Markiewicz R., Darewicz B. The effects of diet on selenium concentration in serum in patients with cancer, *Nutr Cancer*. 2009;61 (5): 629–33.

Casalino E., Calzaretti 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.

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.

Chen Y., Hall M., Graziano JH., Slavkovich V., van Geen A., Parvez F., Ahsan H. A prospective study of blood selenium levels and the risk of arsenic-related premalignant skin lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007, 16(2):207–213.

Combs GF, Clark LC, Turnbull BW, An analysis of cancer prevention by selenium. *BioFactors* 14 2001; 153–9.

Darbre PD. Metalloestrogens: an emerging class of inorganic xenoestrogens with potential to add to the oestrogenic burden of the human breast. *J Appl Toxicol*. 2006, 26(3): 191–197.

Duffield-Lillico A.J., Dalkin B.L., Reid M.E., Turnbull B.W., Slate E.H., Jacobs E.T., Marshall J.R., Clark L.C., Selenium supplementation, baseline plasma selenium status and incidence of prostate cancer: an analysis of the complete treatment period of the Nutritional Prevention of Cancer Trial, *BJU Int*. 2003; 91 (7): 608–12.

Duffield-Lillico A.J., Reid M.E., Turnbull B.W., Combs G.F.J.r, Slate E.H., Fischbach L.A., Marshall J.R., Clark L.C., Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report 5 of the Nutritional Prevention of Cancer Trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11: 630–9.

Duffield-Lillico A.J., Reid M.E., Turnbull B.W., Combs G.F.J.r, Slate E.H., Fischbach L.A., Marshall J.R., Clark L.C., Baseline characteristics and the effect of selenium supplementation on cancer incidence in a randomized clinical trial: a summary report of the Nutritional Prevention of Cancer Trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002; 11: 630–9.

El-Ahmady O, et al.: Serum copper, zinc, and iron in patients with malignant and benign pulmonary diseases. *Nutrition.* 1995; 11(5 Suppl):498–501.

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* 2016, 5(1):37–47

Farzin L., Moassesi M.E., Sajad F., Faghih M.A.A. Evaluation of trace elements in pancreatic cancer patients in Iran. *Middle East Journal of Cancer* 2013, 4(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.

Hopenhayn-Rich C., Biggs M.L., Fuchs A., Begoglio R., Tello E.E., Nicolli FL, Smith A.H. Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina. *Epidemiology* 1996; 7(2):117–124

Jabłońska E., Gromadzińska J., Sobala W., Reszka E., Wąsowicz W., Lung cancer risk associated with selenium status is modified in smoking individuals by Sep15 polymorphism, *Eur J Nutr.* 2008; 47 (1): 47–54.

Kabuto M., Imai H., Yonezawa C., Neriishi K., Akiba S., Kato H., Suzuki T., Land C.E., Blot W.J. Prediagnostic serum selenium and zinc levels and subsequent risk of lung and stomach cancer in Japan. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994 Sep;3(6):465–9.

Karagas M.R., Stukel T.A., Morris J.S., Tosteson T.D., Wei J.E., Spencer S.K., Greenberg E.R. Skin cancer risk in relation to toenail arsenic concentration in a US population-based case-control study. *A. J. Epidemiol.* 2001; 153(6).

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.

Kim J.H., Hue J.J., Kang B.S., Park H., Nam S.Y., Yun Y.W., Kim J.S., Lee B.J., Effects of selenium on colon carcinogenesis induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate in mouse model with high-iron diet, *Lab Anim Res.* 2011; 27 (1): 9–18.

Klein E.A., Thompson I.M., Tangen C.M., Crowley J.J., Lucia M.S., Goodman P.J., Minasian L.M., Ford L.G., Parnes H.L., Gaziano J.M., Karp D.D., Lieber M.M., Walther P.J., Klotz L., Parsons J.K., Chin J.L., Darke A.K., Lippman S.M., Goodman G.E., Meyskens F.L., Baker L.H., Vitamin E and the risk of prostate cancer: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT). *JAMA.* 2011; 306: 1549–56.

Knekt P., Marniemi J., Teppo L., Heliövaara M., Aromaa A., Is low selenium status a risk factor for lung cancer?, *Am J Epidemiol.* 1998; 148 (10): 975–82.

Kuo HW, et al.: Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol Trace Elem Res.* 2002 Oct;89(1):1–11.

Leitzmann MF, et al.: Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Jul 2;95(13).

Lamm S.H., Engel A., Kruse M.B., Feinleib M., Byrd D.M., Lai S., Wilson R. Arsenic in drinking water and bladder cancer mortality in the United States: an analysis 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).

Lippman S.M., Klein E.A., Goodman P.J., Lucia M.S., Thompson I.M., Ford L.G., Parnes H.L., Minasian L.M., Gaziano J.M., Hartline J.A., Parsons J.K., Bearden J.D., Crawford E.D., Goodman G.E., Claudio J., Winkquist E., Cook E.D., Karp D.D., Walther P., Lieber M.M., Kristal A.R., Darke A.K., Arnold K.B., Ganz P.A., Santella R.M., Albanes D., Taylor P.R., Probstfield J.L., Jagpal T.J., Crowley J.J., Meyskens F.L., Baker L.H., Coltman C.A., Effect of selenium and vitamin E on risk of prostate cancer

and other cancers: the Selenium and Vitamin E Cancer Prevention Trial (SELECT), *JAMA*. 2009; 301 (1): 39–51.

Mark S.D., Qiao Y.L., Dawsey S.M., Wu Y.P., Katki H., Gunter E.W., Fraumeni J.F.Jr., Blot W.J., Dong Z.W., Taylor P.R., Prospective study of serum selenium levels and incident esophageal and gastric cancers, *J Natl Cancer Inst*. 2000; 92 (21): 1753–63.

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.

Nersesyan A., Kundi M., Waldherr M., Setayesh T., Misik M., Wultsch G., Filipie 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.

Pasha Q., et al.: Statistical analysis of trace metals in the plasma of cancer patients versus controls. *J Hazard Mater*. 2008; May 30;153(3):1215–21.

Pirinicii N., Gecit T, 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.

Pourmand G., Salem S., Moradi K., Nikoobakht M.R., Tajik P., Mehrsai A., Serum selenium level and prostate cancer: a case-control study, *Nutr Cancer*. 2008; 60 (2): 171–6.

Plum L.M., et al.: The essential toxin: impact of zinc on human health, *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Apr;7(4): 1342–6.

Puzanowka-Tarasiewicz H, et al.: Funkcje biologiczne wybranych pierwiastków. Cynk – składnik i aktywator enzymów.

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.

Reddy V.N., Giblin F.J., Lin L.R., Dang L., Unakar N.J., Musch D.C., Boyle D.L., Takemoto L.J., Ho Y.S., Knoernschild T., Juenemann A., Lutjen-Drecoll E., Glutathione peroxidase-1 deficiency leads to increased nuclear light scattering, membrane damage, and cataract formation in gene-knockout mice, *Invest. Ophthal. Vis. Sci*. 2001; 42: 3247–3255.

Reid M.E., Duffield-Lillico A.J., Garland L., Turnbull B.W., Clark L.C., Marshall J.R., Selenium supplementation and lung cancer incidence: an update of the nutritional prevention of cancer trial, *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002; 11 (11): 1285–91.

Reid M.E., Duffield-Lillico A.J., Sunga A., Fakih M., Alberts D.S., Marshal J.R., Selenium supplementation and colorectal adenomas: An analysis of the nutritional prevention of cancer trial, *Int. J. Cancer* 2006; 118: 1777–81.

Schrauzer G.N., White D.A., Schneider C.J., Cancer mortality correlation studies-III statistical associations with dietary selenium intakes, *Bioinorg Chem*. 1977; 7 (1): 23–31.

Siddiqui M.K., et al. Comparison of some trace elements concentration in blood, tumorfree breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study. *Environ Int*. 2006 Jul;32(5):630–7.

Song-Yi Park, Lynne R. Wilkens, J. Steven Morris, Brian E. Henderson, Laurence N. Kolonel. Serum zinc and prostate cancer risk in a nested case-control study: the Multiethnic Cohort, *Prostate*. 2013 Feb 15; 73(3): 261–266.

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

Van den Brandt P.A., Goldbohm R.A., van 't Veer P., Bode P., Dorant E., Hermus R.J., Sturmans F., A prospective cohort study on selenium status and the risk of lung cancer, *Cancer Res*. 1993; 53 (20): 4860–5.

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.

Waalkes M.P., Diwan B.A., Weghorst C.M., Bare R.M., Ward J.M., Rice J.M. Anticarcinogenic effects of cadmium in B6C3F1 mouse liver and lung. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1991, 110(2):327–335.

Waalkes M.P., Rehm S., Sass B., Konishi N., Ward J.M. Chronic carcinogenic and toxic effects of a single subcutaneous dose of cadmium in the male Fischer rat. *EnvironRes*. 1991, 55(1):40–50.

Waalkes M.P., Rehm S. Cadmium and prostate cancer. *J Toxicol Environ Health*. 1994, 43(3): 251–269.

Waisberg M., Joseph P., Hale B., Beyersmann D. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 2003, 192(2–3):95–117.

Walkes MP, Rehm S, Perantoni AO, Coogan TP. Cadmium exposure in rats and tumours of the prostate. *IARC Sci Publ*. 1992, 118:391–400.

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.

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

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.

Yang H., Fang J., Jia X., Han C., Chen X., Yang C.S., Li N., Chemopreventive effects of early-stage and late-stage supplementation of vitamin E and selenium on esophageal carcinogenesis in rats maintained on a low vitamin E/selenium diet, *Carcinogenesis*. 2011; 32 (3): 381–8.

Zaichick V.Y., et al.; Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *Int Urol Nephrol*. 1997;29(5):565–74.

Zhang X., et al.: A prospective study of intakes of zinc and heme iron and colorectal cancer risk in men and women. *Cancer Causes Control*. 2011 Dec;22(12): 1627–37.

Zhou W., et al.: Dietary iron, zinc, and calcium and the risk of lung cancer. *Epidemiology*. 2005 Nov;16(6):772–9.

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 stosunku stężenia selenu do arsenu w próbce krwi pochodzącej od badanej pacjentki, przy czym określone stężenie wskazuje na znacząco obniżone ryzyko rozwoju raka w przypadku występowania wartości stosunku stężeń selenu do arsenu powyżej 160, 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 albo 2, **znamienny tym**, że stężenie arsenu oraz selenu w próbce krwi oznacza się przez bezpośredni pomiar tych pierwiastków we krwi pełnej.