

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243832 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437571**

(22) Data zgłoszenia: **2021.04.14**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.10.17 BUP 42/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.10.16 WUP 42/2023**

(51) MKP:

G01N 33/84 (2006.01)

G01N 33/50 (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
KATARZYNA BIAŁKOWSKA, Szczecin, PL
RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL
WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL
ANNA JAKUBOWSKA, Szczecin, PL

(54) Tytuł:

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

PL 243832 B1

Opis wynalazku

Cynk jest niezbędnym dla zdrowia mikroelementem. Jest składnikiem ok. 300 enzymów i jeszcze większej liczby innych białek. [1] Będąc składnikiem tzw. palców cynkowych, domen białkowych występujących w białkach wiążących DNA, ma wpływ na procesy życiowe komórek. Cynk spełnia rolę ochronną przed wolnymi rodnikami, między innymi wchodząc w skład dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Bierze udział w wielu przemianach metabolicznych, będąc składnikiem takich enzymów jak np. dehydrogenaza jabłczanowa, anhydraza węglanowa, dehydrogenaza mleczanowa bądź dehydrogenaza alkoholowa. Mikroelement ten zaangażowany jest w procesy immunologiczne, warunkuje prawidłową funkcję skóry oraz błon śluzowych, bierze udział w magazynowaniu i wydzielaniu insuliny z trzustki, utrzymuje równowagę jonową innych mikroelementów, w tym selenu, magnezu czy miedzi, a także spełnia rolę detoksykacyjną w stosunku do metali ciężkich. Cynk jest antyoksydantem, biorącym udział w obronie przed stresem oksydacyjnym. Cynk uznawany jest za nietoksyczny metal. Niedobór tego pierwiastka prowadzi do poważnych zaburzeń, takich jak niedobory immunologiczne, nieprawidłowe gojenie ran, obniżenie płodności czy problemy ze wzrokiem. [2]

Zaobserwowano że poziom cynku ulega zmianom w komórkach nowotworowych. Prawidłowe komórki nabłonkowe prostaty akumulują cynk, zaś w komórkach rakowych poziom tego pierwiastka jest znacząco obniżony. [3] Uważa się, że cynk ma działanie przeciwnowotworowe, hamując wzrost komórek nowotworowych i aktywując apoptozę. Znane są badania oceniające związek między stężeniem cynku a ryzykiem raków, ich wyniki są jednak rozbieżne. Niektóre z tych badań mówią, iż stężenie cynku w surowicy jest wyższe u osób z nowotworem [4, 5, 6], natomiast inne, że poziom ten jest niższy. [7] Wyniki przeprowadzonych do tej pory badań sugerują również, że odpowiednia ilość cynku w diecie działa chemoprewencyjnie. Osoby, których dieta jest bogata w cynk, wykazują niższe ryzyko raka płuc niż osoby stosujące dietę ubogocynkową (OR 0,71; 95% CI 0,5–0,99). [8] Również ryzyko raka jelita grubego i odbytu jest niższe przy stosowaniu diety bogatocynkowej (RR 0,86; 95% CI 0,73–1,02). [9] Natomiast suplementacja cynkiem w bardzo wysokich dawkach powyżej 100 mg/dzień (gdy zalecane dzienne spożycie cynku wynosi 8 mg/dzień dla kobiet a 12 mg/dzień dla mężczyzn) odnosi odwrotny efekt, znacząco zwiększając ryzyko wystąpienia raka prostaty (RR 2,29; 95% CI 1,06–4,95, p=0,03). [10]

Powyższe dane dotyczą znaczenia cynku jako czynnika ryzyka zachorowania na nowotwory, jednak są one niejednoznaczne. W niniejszej pracy postanowiono ocenić korelację pomiędzy stężeniem cynku w surowicy a ryzykiem zachorowania na raka dla Polek, u których nie stwierdzono mutacji w genie *BRCA1*.

Protokół badań

Grupa badana

Grupa obserwacyjna została wybrana spośród osób, których materiał znajduje się w biobanku naszego ośrodka. Pacjenci, którzy zgłosili się w latach 2010–2019 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 cynku.

Do kohorty prospektywnej włączono zdrowych 2957 kobiet, które zostały poddane średnio 42 miesięcznej obserwacji, w trakcie której u 148 kobiet zdiagnozowano nowotwór złośliwy. Każda z uczestniczek badania wypełniła ankietę o stanie zdrowia oraz stylu życia. Charakterystykę grupy prospektywnej przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1
Charakterystyka grupy

	Chore	Zdrowe
Średnia wieku (zakres)	56,46 (35-82)	53 (33-84)
Palenie papierosów		
-obecnie	40 (27,03%)	605 (21,54%)
-w przeszłości	34 (22,97%)	747 (26,59%)
-nigdy	74 (50 %)	1457 (51,87%)
Hormony		
-nie	93 (62,84%)	1464 (52,12%)
-tak	54 (36,49%)	1314 (46,78%)
-brak danych	1 (0,67%)	31 (1,1%)
Adnexectomia		
-nie	135 (91,22%)	2627 (93,52%)
-tak	9 (6,08%)	174 (6,19%)
-brak danych	4 (2,7%)	8 (0,29%)

Material

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

Metoda oznaczania zawartości cynku we krwi

1.1 Aparat

Do określenia zawartości cynku wykorzystana została technika spektrometrii mas ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnie sprzężonej (1CP-MS). Do wykonania pomiaru wykorzystano spektrometr mas ELAN DRC-e (PerkinElmer) oraz NexION 350D (PerkinElmer). Wykorzystanie 1CP-MS pozwala uzyskać limity detekcji $< 0,1 \mu\text{g/l}$. Podczas prowadzenia oznaczeń populacji nieeksponowanej zawodowo ma 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 krwi : 1450 μl bufom).

Z uwagi na specyfikę pomiaru do rozcieńczeń zastosowano roztwór wodorotlenku tetrametyloamoniowego (TMAH). 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. Uwzględniając efekt matrycy oraz dryf 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 kwadrupolowej celi reakcyjnej, spektrometru w tzw. trybie DRC (ang. Dynamie Reaction Cell), aparatu Elan DRC-e oraz NexION 350D (PerkinElmer) z tlenem jako gazem reakcyjnym.

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

Różnice w częstościach pomiędzy analizowanymi grupami oceniano poprzez test Fishera.

Wyniki

Analiza otrzymanych wyników wykazała istotną zależność między ryzykiem zachorowania wśród kobiet ze zdiagnozowanym rakiem, powyżej 50 roku życia oraz niepalących a stężeniem cynku we krwi pełnej.

Tabela 2 przedstawia częstość występowania raków wśród kobiet powyżej 50 roku życia, które nigdy nie paliły papierosów. Wśród tej podgrupy kobiety ze stężeniem cynku we krwi w przedziale **5600–6100 µg/l** wykazują **ponad 6 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka w porównaniu do Grupy 1 (< 5600 µg/l Zn we krwi) (p.value: 0,0008; OR: 6,5; 95% CI: 1,9–22,1) oraz wykazują **ponad 3 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka w porównaniu do Grupy 3 (> 6100 µg/l Zn we krwi) (p.value: 0,029; OR: 3,5; 95% CI: 1,0–12,0).

Powyższy efekt zanika w przypadku wykonania analizy na całej grupie, bez wyodrębnienia kobiet powyżej 50 roku życia oraz nigdy niepalących (Tabela 3).

Tabela 2.
Częstość występowania raków w zależności od stężenia cynku we krwi u kobiet niepalących powyżej 50 roku życia (n = 834)

Grupa	Zakres Zn µg/l	Chore	Zdrowe	OR	p.value
I	3470,56-5573,63	19	189	5,15	0,001*
II	5578,21-6107,35	4	205	Ref.	Ref.
III	6109,19-6541,84	9	199	2,32	0,17
IV	6541,88-68037,51	13	196	3,4	0,45
Optymalny zakres dla Zn we krwi					
1	<5600	20	198	6,5	0,0008*
2	5600-6100	3	192	Ref.	Ref.
3	>6100	22	399	3,5	0,029*

*wynik istotny statystycznie

Tabela 3.
Częstość występowania raków w zależności od stężenia cynku we krwi u kobiet (cała grupa n = 2957)

Grupa	Zakres Zn µg/l	Chore	Zdrowe	OR	p.value
I	590,97-5 569,26	44	702	1,42	0,16
II	5570,94-6027,34	31	702	Ref.	Ref.
III	6027,34-6468,16	36	702	1,16	0,62
IV	6468,59-68037,51	37	703	1,19	0,54

Literatura

1. Plum LM, et al.: The essential toxin: impact of zinc on human health, *Int J Environ Res Public Health*. 2010 Apr; 7(4): 1342–65.
2. Puzanowka-Tarasiewicz H, et al.: Funkcje biologiczne wybranych pierwiastków. Cynk – składnik i aktywator enzymów, *Polski Merkuriusz Lekarski: organ Polskiego Towarzystwa Lekarskiego*. T. 27, nr 161 (2009), s. 419–422.
3. Zaichick VY, et al.: Zinc in the human prostate gland: normal, hyperplastic and cancerous. *Int Urol Nephrol*. 1997; 29(5): 565–74.
4. Siddiqui MK, et al.: Comparison of some trace elements concentration in blood, tumor free breast and tumor tissues of women with benign and malignant breast lesions: an Indian study. *Environ Int*. 2006 Jul; 32(5): 630–7.
5. 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.

6. 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.
7. 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.
8. Zhou W, et al.: Dietary iron, zinc, and calcium and the risk of lung cancer. *Epidemiology*. 2005 Nov; 16(6): 772–9.
9. 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.
10. Leitzmann MF, et al.: Zinc supplement use and risk of prostate cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Jul 2; 95(13).

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u kobiet powyżej 50 roku życia, niepalących, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia cynku we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na ponad 6 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy o niższym stężeniu cynku we krwi (<5600 µg/l), w przypadku występowania wartości stężenia cynku we krwi w przedziale 5600–6100 µg/l.
2. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u kobiet powyżej 50 roku życia, niepalących, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia cynku we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na ponad 3 krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy o wyższym stężeniu cynku we krwi (>6100 µg/l), w przypadku występowania wartości stężenia cynku we krwi w przedziale 5600–6100 µg/l.
3. Sposób wg zastrz. 1 i 2 **znamienny tym**, że próbkę materiału biologicznego stanowi krew pełna.
4. Sposób wg zastrz. 1, 2 i 3 **znamienny tym**, że stężenie Zn w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar Zn we krwi pełnej.