

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 243866 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **437608**

(22) Data zgłoszenia: **2021.04.19**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2022.10.24 BUP 43/2022**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2023.10.23 WUP 43/2023**

(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
RÓŻA DERKACZ, Godziszewo, PL
WOJCIECH MARCINIAK, Szubin, PL
ANNA JAKUBOWSKA, Szczecin, PL

(54) Tytuł:

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

PL 243866 B1

Opis wynalazku

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 bezwzględne 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].

W literaturze wymienia się trzy główne źródła kadmu: dieta, palenie tytoniu oraz ryzyko zawodowe [19]. Stężenie kadmu w produktach spożywczych jest silnie zależne od zawartości tego pierwiastka w środowisku – powietrzu, glebie oraz wodzie [19]. Wysokie stężenie kadmu występuje w następujących produktach spożywczych: płatki, warzywa (w szczególności ziemniaki), podroby oraz nasiona oleiste. [20]. Stężenie kadmu we krwi jest mocno skorelowane z paleniem wyrobów tytoniowych. U osób niepalących stężenie Cd jest niższe ($0.83 \pm 4.23 \mu\text{g/l}$) w porównaniu do palaczy ($1.67 \pm 0.68 \mu\text{g/l}$) [21]. Grupę zawodową bardziej narażoną na działanie kadmu stanowią pracownicy przemysłu cynkowego, stalowego i miedziowego oraz przy produkcji baterii niklowo-kadmowych, ogniw, słonecznych i biżuterii [22].

Gaudet MM i wsp. [23] przeprowadzili badania na trzech prospektywnych grupach badawczych kobiet: Cancer Prevention Study-II (CPS-II), European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition – Italy (EPIC-Italy) oraz Northern Sweden Health and Disease Study (NSHDS). Analiza statystyczna nie wykazała żadnej istotnej korelacji pomiędzy ryzykiem zachorowania na raka a stężeniem kadmu we krwi.

W niniejszej pracy postanowiono ocenić korelację pomiędzy stężeniem kadmu we krwi a ryzykiem zachorowania na raka u Polek. Nieoczekiwanie ustalono, że istnieje korelacja wśród kobiet powyżej 50 roku życia, niepalących, 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 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 kadmu.

Do kohorty prospektywnej włączono zdrowych 2962 kobiet, które zostały poddane średnio 41,69 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 (21,50%)
-w przeszłości	34 (22,97%)	750 (26,65%)
-nigdy	74 (50 %)	1459 (51,84%)
Hormony		
-nie	93 (62,84%)	1467 (52,13%)
-tak	54 (36,49%)	1316 (46,77%)
-brak danych	1 (0,67%)	31 (1,1%)
Adnexectomia		
-nie	135 (91,22%)	2631 (93,50%)
-tak	9 (6,08%)	175 (6,22%)
-brak danych	4 (2,7%)	8 (0,28%)

Materiał

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

Metoda oznaczania zawartości kadmu we krwi

1.1 Aparat

Do określenia zawartości kadmu 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 nieekspozowanej 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 wortexu w celu uzyskania możliwie największej homogenności materiału. Próbkę 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). 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. Dynamic 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 kadmu 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 kadmu we krwi w przedziale **0,28–0,33 µg/l** wykazują **blisko 7 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka w porównaniu do Grupy 1 (<0,28 µg/l Cd we krwi) (p.value: 0,041; OR: 6,97; 95% CI: 0,9–53,92) oraz wykazują **ponad 9 krotnie obniżone** ryzyko zachorowania na raka w porównaniu do Grupy 3 (>0,33 µg/l Cd we krwi) (p.value: 0,009; OR: 9,01; 95% CI: 1,23–67,23).

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 kadmu we krwi u kobiet niepalących powyżej 50 roku życia (n = 834)

Grupa	Zakres Cd µg/l	Chore	Zdrowe	OR	p.value	95%CI
I	0,03-0,25	12	199	2,68	0,12	0,85-8,47
II	0,26-0,34	4	178	Ref.	Ref.	Ref.
III	0,35-0,47	10	203	2,19	0,27	0,68-7,11
IV	0,48-7,48	19	211	4,0	0,009*	1,34-12
Optymalny zakres dla Cd we krwi						
1	<0,28	13	235	6,97	0,041*	0,9-53,92
2	0,28-0,33	1	126	Ref.	Ref.	Ref.
3	>0,33	31	430	9,01	0,009*	1,23-67,23

*wynik istotny statystycznie

Tabela 3
Czystość występowania raków w zależności od stężenia kadmu we krwi u kobiet (cała grupa n = 2962)

Grupa	Zakres Cd µg/l	Chore	Zdrowe	OR	p.value	95%CI
I	0,03-0,30	31	703	Ref.	Ref.	Ref.
II	0,30-0,44	32	703	1,03	1,0	0,62-1,71
III	0,44-0,76	43	704	1,36	0,19	0,86-2,22
IV	0,76-13,07	42	704	1,33	0,23	0,84-2,18

Literatura

- [1] Strona internetowa: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php. Data wejścia: 2021-04-01.
- [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., Calzaretti G., Sblano C., Ladriscina C. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidants enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology* 2002,179(1–2): 37–50.
- [7] 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.
- [8] Nersesyan A., Kundi M., Waldherr M., Setayesh T., Misik M., Wultsch G., Filipic M., Barcelos G.F.M., Kansmueller S. Results of micronucleus assays 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] Pirinicii 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 O., 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., Guarner 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 SV., Shafer MM., Bonner MR., LaCroix AZ., Manson JE., Meliker JR., Neuhauser ML., Newcomb PA. Urinary cadmium and risk of invasive breast cancer in the Women's Health Initiative. *American Journal of Epidemiology* 2015, 183(9): 815–823.
- [19] Sabir S, Akash MSH, Fiayyaz F, Saleem U, Mehmood MH, Rehman K. Role of cadmium and arsenic as endocrine disrupters in the metabolism of carbohydrates: Inserting the association into perspectives. *Biomed Pharmacother.* 2019; 114: 108802.
- [20] Programme UNE. Final Review of Scientific Information on Cadmium – Version of December 2010. 2010 [cited 2020 Dec 23]; Available from: <https://wedocs.unep.org/xmlui/handle/20.500.11822/27636>.
- [21] Lee JE, Kim HR, Lee Mh, Kim NH, Wang KM, Lee Sh, Park O, Hong EJ, Youn JW., Kim YY, Smoking-Related DNA Methylation is Differentially Associated with Cadmium Concentration in Blood, *Biochemical Genetics* (2020) 58: 617–630.
- [22] Bolam T, Bersuder P, Burden R, Shears G, Morris S, Warford L, Thomas B, Nelson P. Cadmium levels in food containing crab brown meat: A brief survey from UK retailers. *Journal of Food Composition and Analysis.* 2016; 54: 63–9.
- [23] Gaudet MM, Deubler EL, Kelly RS, Diver WR, Taras LR, Hodge JM, Levine KE, Haines LG, Lundh T, Lenner P, Palii D, Vineis P, Bergdahl IA, Gapstur SM, Kyrtopoulos SA, Blood levels of cadmium and lead in relations to breast cancer risk in three prospective cohorts, *Int J Cancer*, 2019 March 01; 144(5): 1010-1016, doi: 10.1002/ijc.31805.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u kobiet powyżej 50 roku życia, niepalących, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia kadmu we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na blisko 7-krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy o niższym stężeniu kadmu we krwi ($<0,28 \mu\text{g/l}$), w przypadku występowania wartości stężenia kadmu we krwi w przedziale $0,28\text{--}0,33 \mu\text{g/l}$.
2. Sposób określenia ryzyka zachorowania na raka u kobiet powyżej 50 roku życia, niepalących, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia kadmu we krwi osoby badanej, przy czym stężenie wskazuje na ponad 9-krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka w stosunku do podgrupy o wyższym stężeniu kadmu we krwi ($>0,33 \mu\text{g/l}$), w przypadku występowania wartości stężenia kadmu we krwi w przedziale $0,28\text{--}0,33 \mu\text{g/l}$.
3. Sposób wg zastrzeżenia 1 i 2 **znamienny tym**, że próbkę materiału biologicznego stanowi krew pełna.
4. Sposób wg zastrzeżenia 1, 2 i 3 **znamienny tym**, że stężenie Cd w próbce oznacza się przez bezpośredni pomiar Cd we krwi pełnej.