

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 245087 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **439314**

(22) Data zgłoszenia: **2018.05.17**

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

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2024.05.13 WUP 20/2024**

(51) MKP:

G01N 33/84 (2006.01)

(62) Numer zgłoszenia, z którego nastąpiło
wydzielenie:
425602

(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:
rzecz. pat. Rafał Witek, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

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

PL 245087 B1

Opis wynalazku

Wynalazek dotyczy sposobu określania ryzyka raków piersi u kobiet. Opisany wynalazek opiera się na ustaleniu, że istnieje korelacja między stężeniem kadmu we krwi pełnej a ryzykiem raków piersi 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.

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 (*strona internetowa: http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/latest_classif.php; data wejścia 2017-08-26*).

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 (Fowler BA, 2009). Toksyczne działanie kadmu wynika z jego wpływu na wiele procesów: zaburzanie przepływu elektronów w łańcuchu oddechowym (Al.Nasser IA, 2000), wypieranie i zastępowanie innych metali w metaloenzymach oddziałujących na metabolizm białek, kwasów tłuszczowych, fosfolipidów, węglowodanów i kwasów nukleinowych (Casalino E, 1997; Waisberg M, 2003), osłabianie działania mechanizmów antyoksydacyjnych (Casalino E, 2002), a także wchodzenie w reakcje z grupami tiolowymi białek enzymatycznych (Bertin G, 2006). Karcynogenne działanie kadmu jest także konsekwencją wpływu na stres oksydacyjny (Nersesyan A, 2015). Kadm może bezpośrednio uszkadzać nici DNA, hamować naprawę DNA, wiązać się z zasadami kwasu nukleinowego, hamować syntezę glutationu oraz hamować metylację (Nersesyan A, 2015).

Badania eksperymentalne na zwierzętach jednoznacznie wykazują, że kadm może wywoływać nowotwory np. guzy wątroby, płuca, prostaty jak i hamować ich powstawanie np. białaczka. U zwierząt kadm działa w zależności od dawki i w sposób zależny od stanu hormonalnego (Waalkes MP, 1994; Waalkes MP, 1992; Waalkes MP, 1991; Waalkes MP, 1991).

Liczne prace opisują zwiększone stężenia kadmu we krwi pełnej osób, które zachorowały na nowotwór złośliwy prostaty (Vincetti M, 2007; Qayyum MA, 2014), nerki (Pirinicii N, 2013), pęcherza moczowego (Kellen E, 2007; Wolf C, 2009), trzustki (Farzin L, 2013; Amaral AF, 2012) i piersi (Wu HD, 2006; El-Deeb MMK, 2016). Kadm należy do grupy metaloestrogenów tj. metali posiadających zdolność bezpośredniego wiązania się z receptorem estrogenowym (Darbre PD, 2006). Nie ma dostępnej literatury, w której stwierdzono by zwiększone ryzyko nowotworów u ludzi związane z niskimi stężeniami kadmu.

Przedmiotem wynalazku jest sposób określenia ryzyka raka piersi, charakteryzujący się tym, że obejmuje ilościową ocenę stężenia kadmu w próbce krwi pełnej pochodzącej od badanej kobiety należącej do populacji polskiej, niepalącej papierosów oraz niebędącej nosicielką mutacji w genie BRCA1/2 wybranej spośród: 5382insC, C61G lub 4153delA, przy czym stężenie kadmu we krwi powyżej 0,59 µg/l wskazuje na 4-krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka piersi.

Korzystnie, stężenie kadmu w próbce oznacza się poprzez bezpośredni pomiar kadmu we krwi pełnej.

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. Próbkę 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 kadmu.

W biobanku zgromadzono próbki od 33062 osób, które nigdy wcześniej przed pobraniem próbki 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 próbki 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 |
|--------------------------------|-------------|--|
| Piers | 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 |
| Tarczycy | 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 kadmu.

Metoda oznaczania zawartości Cd 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 µg/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 precipitacji 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 (^{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 inerty.

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 kadmu we krwi.

Kadm

Kobiety niepalące tytoniu ze stężeniem kadmu we krwi powyżej $0,59 \mu\text{g/l}$ wykazują istotne ponad 4 krotnie obniżone ryzyko rozwoju raka piersi w porównaniu do nie palących kobiet ze stężeniami kadmu poniżej $0,59 \mu\text{g/l}$ (OR=4,20; $p=0,0319$; 95%CI:1,01–17,80) (Tabela 2).

Tabela 2. Częstość występowania raków piersi w zależności od stężenia kadmu wśród niepalących kobiet

| Grupa | Zakres stężeń $\mu\text{g/l}$ | Chore | Zdrowe |
|-------|-------------------------------|-------|--------|
| I | $>0,59$ | 2 | 199 |
| II | $<0,59$ | 36 | 845 |

Kobiety niepalące tytoniu ze stężeniem kadmu we krwi powyżej 0,59 µg/l nie wykazują istotnie obniżonego ryzyka rozwoju raka w porównaniu do niepalących kobiet ze stężeniem kadmu poniżej 0,59 µg/l (OR=1,73; p=0,4234; 95% CI:0,58–3,81) (Tabela 3).

Tabela 3. Częstość występowania raków w zależności od stężenia kadmu wśród niepalących kobiet

| Grupa | Zakres stężeń µg/l | Chore | Zdrowe |
|-------|--------------------|-------|--------|
| I | >0,59 | 17 | 848 |
| II | <0,59 | 6 | 202 |

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

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

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

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

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., Faghieh 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

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

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

Pirinicii N., Geeit 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):499–50

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

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

- 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 MP, Diwan BA, Weghorst CM, Bare RM, Ward JM, Rice JM. Anticarcinogenic effects of cadmium in B6C3F1 mouse liver and lung. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991, 110(2):327–335
- Waalkes MP, Rehm S, Sass B, Konishi N, Ward JM. Chronic carcinogenic and toxic effects of a single subcutaneous dose of cadmium in the male Fischer rat. *EnvironRes.* 1991, 55(1):40–50
- Waalkes MP, 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
- Waalkes 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
- 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.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób określenia ryzyka raka piersi, **znamienny tym**, że obejmuje ilościową ocenę stężenia kadmu w próbce krwi pełnej pochodzącej od badanej kobiety należącej do populacji polskiej, niepalącej papierosów oraz niebędącej nosicielką mutacji w genie BRCA1/2 wybranej spośród:
5382insC, C61G lub 4153delA, przy czym stężenie kadmu we krwi powyżej 0,59 µg/l wskazuje na 4-krotnie zmniejszone ryzyko zachorowania na raka piersi.
2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stężenie kadmu w próbce oznacza się poprzez bezpośredni pomiar kadmu we krwi pełnej.