

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

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*, *CRTC3*, *GPX1*, *MT1B*, *GSTP1*, *ERCC2* oraz *ABCBI*.

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*).

CRTC3 rs12915189

Gen CRTC3 należy do rodziny genów koaktywatora transkrypcji CREB (białko wiążące element odpowiedzi cAMP). Białko kodowane przez gen CRTC3 może indukować biogenezę mitochondriów, osłabiać sygnalizację katecholaminową w tkance tłuszczowej a także indukować nowotwory. (*Birkeland AC, 2017*).

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

GPX1 rs1050450

Jednym z ważniejszych enzymów antyoksydacyjnych jest peroksydaza glutationowa typu I (GPX1). Jej skuteczność w obronie przed stresem oksydacyjnym jest około 14-krotnie większa w porównaniu do innych enzymów z grupy antyoksydantów np. katalaz (Haan JB, 2003). Polimorfizm Pro200Leu (rs1050450) w genie GPX1 związany jest ze zmianą aktywności enzymu. Badania wykazały, że polimorfizm ten może mieć związek z ryzykiem raków o różnorodnej lokalizacji (*Hu YJ, 2003; Ravn-Haren G, 2006; Kucukgergin C, 2011; Erdem, O, 2012; Raaschou-Nielsen O, 2007; Ratnasinghe D. 2000; Ichimura Y. 2004; Méplan C. 2010; Hu YJ 2004*). Metaanaliza 35 badań oceniająca związek zmiany GPX1 Pro200Leu z ryzykiem raka wskazała, że obecność wariantu 200Leu, wiąże się z ok. 20% zwiększeniem ryzyka raka (*Zhigiang Hong, 2013*).

MT1B rs 7191779

Białko kodowane przez gen MT1B odgrywa kluczową rolę w metabolizmie metali oraz chroni komórki przed toksycznymi skutkami promieniowania. Bierze udział również w regulacji homeostazy cynku i miedzi, a jego polimorfizm rs7191779 opisano jako skorelowany z ryzykiem płaskonabłonkowego raka jamy ustnej (*Zavras AI, 2011*).

GSTP1 rg1695

Polimorfizmy zmieniające aktywności w genie GSTP1 mogą być potencjalnymi modyfikatorami ryzyka rozwoju raka płuca (*Ritchie KJ, 2007*). rs1695 w genie GSTP1 biorący udział w procesie metabolizmu II fazy wielu substratów, w tym ksenobiotyków, uznawany jest za czynnik ryzyka raka płuca (*Kudhair BK, 2020*).

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*).

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

ABCB1 rs2032582

Polimorfizm rs2032582 w genie transportera ABCB1 (znanego też jako „multidrug resistance gene”) jest rozpoznany jako regulator stężeń metali ciężkich we krwi, chociaż jego rola w metabolizmie metali pozostaje niejasna (Llop S, 2014).

W pracy oceniono korelację pomiędzy występowaniem raków piersi i raków jelita grubego a stężeniami arsenu we krwi i genotypami w genach *SOD2*, *CTRT3*, *GPX1*, *MTIB*, *GSTP1*, *ERCC2*, *ABCB1*.

Nieoczekiwanie stwierdzono silną korelację pomiędzy występowaniem raka piersi i raka jelita grubego u kobiet (nie u mężczyzn) a stężeniem arsenu we krwi i wybranymi genotypami. Częstość występowania raka piersi była zwiększona przy **podwyższonym** stężeniu arsenu a częstość występowania raka jelita grubego była zwiększona przy **obniżonym** stężeniu arsenu we krwi. Korelacje te nasilały się bardzo znacznie w wybranych genotypach dla raka piersi w *GSTP1*, *SOD2*, *GPX1*, *ERCC2*, *ABCB1* a dla raka jelita grubego w *SOD2*, *CTRC3*, *GPX1*, *MTIB* oraz *ERCC2*.

Protokół badań

Grupa badana

Do badań włączono 201 pacjentów Kliniki Chirurgii Ogólnej i Onkologicznej Samodzielnych Publicznych Szpitali Klinicznych nr 1/2 ze zdiagnozowanym i potwierdzonym histopatologicznie rakiem jelita grubego oraz 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 i jelita grubego 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), płci, statusu palenia (paczkolata $\pm 20\%$) oraz łącznej liczba nowotworów piersi/jelita grubego i innych nowotworów wśród krewnych pierwszego stopnia.

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

Charakterystyka obu grup została przedstawiona w Tabeli 1.

Tabela 1 Charakterystyka grup

	Rak jelita grubego		Rak piersi	
	<i>Chorzy</i>	<i>Zdrowi</i>	<i>Chorzy</i>	<i>Zdrowi</i>
Liczba osób	201	201	305	305
-kobiety	92	92	305	305
-mężczyźni	109	109	-	-
Średnia wieku	63,93	63,59	57,19	57,89
-kobiety	64,30	64,21	57,19	57,89
-mężczyźni	63,89	63,37	-	-

Material

Od każdej osoby włączonej do badania pobrano próbkę krwi w celu izolacji DNA oraz pomiaru stężenia arsenu. Krew pełną po pobraniu przechowywano w -80C do momentu oznaczenia stężenia arsenu; DNA przechowywano w temperaturze 4C do momentu wykonania oceny genotypów.

Test diagnostyczny wczesnego wykrywania raków u kobiet oparty o ocenę stężeń arsenu we krwi i wybranych 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 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 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 (^{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

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.

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

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. System do analizy GPX1 rs1050450 wykonany został na zamówienie indywidualne. Każda analiza wykonana była w objętości 5µl według proporcji przedstawionej w tabeli 2.

Tabela 2 Skład mieszaniny reakcyjnej do analizy wybranego SNP techniką „real-time PCR”

Mieszanina	
Probe 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 3 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	-	-

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

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 liczebności) osób zdrowych tworzących dla danego narządu i płci grupę kontrolną.

Wyniki

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

Rak jelita grubego

Stwierdzono istotną statystycznie zależność pomiędzy stężeniem arsenu a prawdopodobieństwem wystąpienia raka jelita grubego u kobiet (już bez dodatkowej oceny wybranych genotypów).

Nie stwierdzono istotnej statystycznie zależności pomiędzy stężeniem arsenu a prawdopodobieństwem wystąpienia raka jelita grubego u mężczyzn. Wyniki przedstawiono w poniższych tabelach.

Tabela 4 Częstość występowania raka jelita grubego u kobiet w zależności od stężenia arsenu we krwi

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$\leq 0,65$	38	21
II	0,66-0,84	15	20
III	0,85-1,3	18	21
IV	$> 1,3$	21	24

38 i 21 vs 54 i 65

OR= 2,2, p= 0,018, 95%CI: 1,1-4,1

Tabela 5 Częstość występowania raka jelita grubego u mężczyzn w zależności od stężenia arsenu we krwi

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$< 0,55$	25	19
II	0,55-0,69	22	16
III	0,70-1,19	30	20
IV	$> 1,2$	30	15

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

Stwierdzono istotny związek między występowaniem genotypu nGG w genie **CRTC3** rs12915189 i stężeniem arsenu we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka jelita grubego u kobiet. Kobiety ze stężeniem arsenu we krwi $\leq 0,65 \mu\text{g/l}$ oraz z genotypem nGG w genie **CRTC3** wykazują istotnie około 5 krotnie zwiększoną częstość występowania raka jelita grubego (ćwiartka I vs II-IV: OR=4,9, $p=0,0022$; 95%CI: 1,8-13,7).

Tabela 6 Częstość występowania raka jelita grubego u kobiet w zależności od stężenia As dla genotypu nGG w genie CRTC3

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$\leq 0,65$	21	7
II	0,66-0,84	4	11
III	0,85-1,3	8	8
IV	$>1,3$	7	12

21 i 7 vs 19 i 31

OR=4,9, $p=0,0022$; 95%CI: 1,8-13,7

Stwierdzono istotny związek między występowaniem genotypu CC w genie **GPX1** rs1050450 i stężeniem arsenu we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka jelita grubego u kobiet. Kobiety ze stężeniem arsenu we krwi $\leq 0,65 \mu\text{g/l}$ oraz z genotypem CC w genie **GPX1** wykazują istotnie ponad 15 krotnie zwiększoną częstość występowania raka jelita grubego (ćwiartka I vs II-IV: OR=15,2, $p<0,0001$; 95%CI: 3,2-72,4).

Tabela 7 Częstość występowania raka jelita grubego u kobiet w zależności od stężenia As dla genotypu CC w genie GPX1

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$\leq 0,65$	19	2
II	0,66-0,84	5	10
III	0,85-1,3	6	9
IV	$>1,3$	9	13

19 i 2 vs 20 i 32

OR=15,2, $p<0,0001$; 95%CI: 3,2-72,4

Stwierdzono istotny związek między występowaniem genotypu CC w genie **MT1B** rs7191779 i stężeniem arsenu we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka jelita grubego u kobiet. Kobiety ze stężeniem arsenu we krwi $\leq 0,65 \mu\text{g/l}$ oraz z genotypem CC w genie **MT1B** wykazują istotnie 10 krotnie zwiększoną częstość występowania raka jelita grubego (ćwiartka I vs II-IV: OR=10, $p=0,0273$; 95%CI: 1,1-92,0).

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

Tabela 8 Częstość występowania raka jelita grubego u kobiet w zależności od stężenia As dla genotypu CC w genie MT1B

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$\leq 0,65$	10	1
II	0,66-0,84	2	4
III	0,85-1,3	4	2
IV	$> 1,3$	5	5

10 i 1 vs 11 i 11

OR=10, $p=0,0273$; 95%CI: 1,1-92,0

Stwierdzono istotny związek między występowaniem genotypu GG w genie ERCC2 rs13181 i stężeniem arsenu we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka jelita grubego u kobiet. Kobiety ze stężeniem arsenu we krwi $\leq 0,65 \mu\text{g/l}$ oraz z genotypem GG w genie ERCC2 wykazują istotnie ponad 12 krotnie zwiększoną częstość występowania raka jelita grubego (ćwiartka I vs II-IV: OR=12,4, $p=0,0022$; 95%CI: 2,2-69,2).

Tabela 9 Częstość występowania raka jelita grubego u kobiet w zależności od stężenia As dla genotypu GG w genie ERCC2

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$\leq 0,65$	11	2
II	0,66-0,84	2	9
III	0,85-1,3	2	5
IV	$> 1,3$	4	4

11 i 2 vs 8 i 18

OR=12,4, $p=0,0022$; 95%CI: 2,2-69,2

Dla kobiet bez żadnego z opisanych w powyższych tabelach genotypów (tabela 10) stwierdzono odwrotną korelację w ryzyku raków w zależności od stężenia arsenu. Przy stężeniu arsenu $\leq 0,65 \mu\text{g/l}$ stwierdzono ponad 6 krotnie mniejsze ryzyko występowania raka jelita grubego (ćwiartka I vs II-IV: OR= 6,4, $p=0,023$, 95%CI: 1,2-33,9).

Tabela 10 Częstość występowania raka jelita grubego u kobiet w zależności od stężenia As dla pozostałych genotypów

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$\leq 0,65$	2	12
II	0,66-0,84	6	4
III	0,85-1,3	6	5
IV	$> 1,3$	3	5

2 i 12 vs 15 i 14

OR= 6,4, $p=0,023$, 95%CI: 1,2-33,9

Test diagnostyczny wczesnego wykrywania raków u kobiet oparty o ocenę stężeń arsenu we krwi i 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. $<0,55 \mu\text{g/l}$ wykazały blisko 2,5 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi (niezależnie od badanych genotypów). Wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 11 Częstość występowania raka piersi u kobiet w zależności od stężenia arsenu we krwi

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	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 genotypu AA w genie **SOD2** rs4880 i stężeniem arsenu we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka piersi u kobiet. Kobiety ze stężeniem arsenu we krwi $< 0,55 \mu\text{g/l}$ oraz z genotypem AA w genie **SOD2** wykazują istotnie ponad 8 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi w stosunku do podgrupy ze stężeniem arsenu $>1,2 \mu\text{g/l}$ (ćwiartka I vs IV: OR=8,17, $p=0,0002$; 95%CI: 2,54-26,29) i ponad 5 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi w porównaniu do wszystkich podgrup (ćwiartka I vs II-IV: OR=5,25, $p=0,0007$; 95%CI: 1,87-14,75).

Tabela 12 Częstość występowania raka piersi u kobiet w zależności od stężenia As dla genotypu AA w genie SOD2

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$<0,55$	5	22
II	0,55-0,79	16	20
III	0,8-1,2	26	23
IV	$>1,2$	26	14

5 i 22 vs 26 i 14

OR=8,17, $p=0,0002$; 95%CI: 2,54-26,29

5 i 22 vs 68 i 57

OR=5,25, $p=0,0007$; 95%CI: 1,87-14,75

Stwierdzono istotny związek między występowaniem równocześnie genotypu nGG w genie **GSTP1** rs1695 i genotypu AA w genie **SOD2** rs4880 oraz stężeniem arsenu we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka piersi u kobiet. Kobiety ze stężeniem arsenu we krwi $< 0,55 \mu\text{g/l}$ oraz z genotypem nGG w genie **GSTP1** i genotypem AA w genie **SOD2** wykazują istotnie ponad 9 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi w stosunku do podgrup ze stężeniem arsenu $> 1,2 \mu\text{g/l}$ (ćwiartka I vs IV: OR=9,2, $p=0,0001$; 95%CI: 2,8-30,1) i blisko 6 krotnie zmniejszoną częstość występowania

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

raka piersi w porównaniu do wszystkich podgrup (ćwiartka I vs II-IV: OR=5,6, p=0,0005; 95%CI: 2,00-15,9).

Tabela 13 Częstość występowania raka piersi u kobiet w zależności od stężenia As dla genotypu nGG w genie GSTP1 oraz genotypu AA w genie SOD2

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	<0,55	5	22
II	0,55-0,79	16	16
III	0,8-1,2	23	22
IV	>1,2	25	12

5 i 22 vs 25 i 12

OR=9,2, p=0,0001; 95%CI: 2,8-30,1

5 i 22 vs 64 i 50

OR=5,6, p=0,0005; 95%CI: 2,00-15,9

Stwierdzono istotny związek między występowaniem równocześnie genotypu nTT w genie **GPX1** rs1050450 i genotypu AA w genie **SOD2** rs4880 oraz stężeniem arsenu we krwi a prawdopodobieństwem wystąpienia raka piersi u kobiet. Kobiety ze stężeniem arsenu we krwi < **0,55 $\mu\text{g/l}$** oraz z genotypem nTT w genie **GPX1** i genotypem AA w genie **SOD2** wykazują istotnie blisko 10 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi w stosunku do podgrup ze stężeniem arsenu > 1,2 $\mu\text{g/l}$ (ćwiartka I vs IV: OR=9,9, p=0,0002; 95%CI: 2,8-35,6) i ponad 6 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi w porównaniu do wszystkich podgrup (ćwiartka I vs II-IV: OR=6,4, p=0,0005, 95%CI: 2,1-20,1).

Tabela 14 Częstość występowania raka piersi u kobiet w zależności od stężenia As dla genotypu nTT w genie GPX1 oraz genotypu AA w genie SOD2

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	<0,55	4	19
II	0,55-0,79	17	17
III	0,8-1,2	23	19
IV	>1,2	25	12

4 i 19 vs 25 i 12

OR=9,9, p=0,0002; 95%CI: 2,8-35,6

4 i 19 vs 65 i 48

OR=6,4, p=0,0005, 95%CI: 2,1-20,1

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 $\mu\text{g/l}$** 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

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

> 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 15 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 µg/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

Stwierdzono istotny związek między występowaniem równocześnie genotypu nCC w genie ABCB1 rs2032582 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 nCC w genie ABCB1 i genotypem TT w genie ERCC2 wykazują istotnie blisko 9 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi w stosunku do podgrup ze stężeniem arsenu > 1,2 µg/l (ćwiartka I vs IV: OR=8,5, p=0,0005; 95%CI: 2,4-30,1) i ponad 6 krotnie zmniejszoną częstość występowania raka piersi w porównaniu do wszystkich podgrup (ćwiartka I vs II-IV: OR= 6,1, p=0,0014, 95%CI: 1,9-19,5).

Tabela 16 Częstość występowania raka piersi u kobiet w zależności od stężenia As dla genotypu nCC w genie ABCB1 oraz genotypu TT w genie ERCC2

Grupa	Stężenie As µg/l	Chore	Zdrowe
I	<0,55	4	17
II	0,55-0,79	13	15
III	0,8-1,2	21	14
IV	>1,2	28	14

4 i 17 vs 28 i 14

OR=8,5, p=0,0005; 95%CI: 2,4-30,1

4 i 17 vs 62 i 43

OR= 6,1, p=0,0014, 95%CI: 1,9-19,5

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

Kobiety bez żadnego z wyżej opisanych genotypów nie wykazują istotnego statystycznie zmniejszenia ryzyka raków przy stężeniu arsenu we krwi $< 0,55 \mu\text{g/l}$ (tabela 17). Kobiety bez występowania łącznie genotypu AA w genie SOD2 oraz połączenia genotypów TT w genie ERCC2 z genotypem nCC w genie ABCB1 nie wykazują statystycznie istotnego zmniejszenia ryzyka raków przy stężeniu arsenu $< 0,55 \mu\text{g/l}$ (ćwiartka I vs II-IV: OR= 1,4, $p=0,15$, 95%CI: 0,9-2,3).

Tabela 17 Częstość występowania raka piersi u kobiet bez występowania łącznie genotypu AA w genie SOD wraz z połączeniem genotypu TT w genie ERCC z genotypem nCC w genie ABCB1

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$<0,55$	40	51
II	0,55-0,79	48	44
III	0,8-1,2	51	41
IV	$>1,2$	47	45

40 i 51 vs 146 i 130

OR= 1,4, $p=0,15$, 95%CI: 0,9-2,3

Kobiety bez występowania łącznie genotypu AA w genie SOD2 i genotypu TT w genie ERCC2 nie wykazują statystycznie istotnego zwiększenia ryzyka raków przy stężeniu arsenu $> 1,2 \mu\text{g/l}$ (ćwiartka IV vs I-III: OR= 1,3, $p=0,16$, 95%CI: 0,92-1,9) (tabela 18).

Tabela 18 Częstość występowania raka piersi u kobiet bez występowania łącznie genotypu AA w genie SOD i genotypu TT w genie ERCC

Grupa	Stężenie As $\mu\text{g/l}$	Chore	Zdrowe
I	$<0,55$	37	75
II	0,55-0,79	78	64
III	0,8-1,2	79	71
IV	$>1,2$	86	70

86 i 70 vs 194 i 210

OR= 1,3, $p=0,16$, 95%CI: 0,92-1,9

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

Literatura

- Birkeland AC, Foltin SK, Michmerhuizen NL, Hoesli RC, Rosko AJ, Byrd S, Yanik M, Nor JE, Bradford CR, Prince ME, Carey TE, McHugh JB, Spector ME, Brenner JC. (2017) Correlation of CRTC1/3-MAML2 fusion status, grade and survival in mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol* 68:5-8. [https://doi: 10.1016/j.oraloncology.2017.02.025](https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.02.025)
- Erdem,O. et al.: Association of GPX1 polymorphism, GPX activity and prostate cancer risk. *Hum. Exp. Toxicol*, 2012; 31, 24-31.
- Haan JB.:An imbalance in antioxidant defense affects cellular function: the pathophysiological consequence of a reduction in antioxidant defense in the glutathione peroxidases-1 (Gpx1) knockout mouse. *Redox Rep.*, 8, 69 – 79 (2003).
- Hu YJ, et al.: Allelic loss at the GPX-1 locus in cancer of the head and neck. *Biol. Trace Elem. Res*, 2004; 101, 97-106.
- Hu YJ, et al.: Role of glutathione peroxidase 1 in breast cancer: loss of heterozygosity and allelic differences in the response to selenium. *Cancer Res*, 2003; 63, 3347-3351.
- Ichimura Y. et al.: Increased risk of bladder cancer associated with a glutathione peroxidase 1 codon 198 variant. *J Urol*, 2004; 172, 728-732.
- Kucukgergin C, et al. Association between genetic variants in glutathione peroxidase 1 (GPX1) gene, GPX activity and the risk of prostate cancer. *Minerva. Urol. Nefrol*, 2011; 63, 183-190.
- Kudhair BK, Alabid NN, Taheri-Kafrani A, Lafta IJ (2020) Correlation of GSTP1 gene variants of male Iraqi waterpipe (Hookah) tobacco smokers and the risk of lung cancer. *Mol Biol Rep* 47(4):2677-2684. [https://doi:10.1007/s11033-020-05359-w](https://doi.org/10.1007/s11033-020-05359-w)
- Li N, Huang HQ, Zhang GS (2014) Association between SOD2 C47T polymorphism and lung cancer susceptibility: a meta-analysis. *Tumour Biol* 35(2):955-9. [https://doi:10.1007/s13277-013-1127-y](https://doi.org/10.1007/s13277-013-1127-y)
- Llop S, Engstrom K, Ballester F, Franforte E, Alhamedow A, Pisa F, Tratnik JS, Mazej D, Murcia M, Rebagliato M, Bustamante M, Sunyer J, Sofianou-Katsoulis A, Prasouli A, Antonopoulou E, Antoniadou I, Nakou S, Barbone F, Horvat M, Broberg K (2014) Polymorphisms in ABC transporter genes and concentrations of mercury in newborns--evidence from two Mediterranean birth cohorts. *PloS One* 9(5):e97172. [https://doi:10.1371/journal.pone.0097172](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097172)
- 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.
- Méplan C. et al.: Genetic variants in selenoprotein genes increase risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 2010; 31, 1074-1079.
- 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.

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

Raaschou-Nielsen O, et al.: GPX1 Pro198Leu polymorphism, interactions with smoking and alcohol consumption and risk for lung cancer. *Cancer Lett*, 2007; 247, 293-300.

Ratnasinghe D. et al.: Glutathione peroxidase codon 198 polymorphism variant increases lung cancer risk. *Cancer Res*, 2000; 60, 6381-6383.

Ravn-Haren G, et al.: Associations between GPX1 Pro198Leu polymorphism, erythrocyte GPX activity, alcohol consumption and breast cancer risk in a prospective cohort study. *Carcinogenesis*, 2006; 27, 820-825.

Ritchie KJ, Henderson CJ, Wang XJ, Vassieva O, Carrie D, Farmer PB, Gaskell M, Park K, Wolf CR (2007) Glutathione transferase pi plays a critical role in the development of lung carcinogenesis following exposure to tobacco-related carcinogens and urethane. *Cancer Res* 67(19):9248-57. <https://doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-1764>

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

Zavras AI, Yoon AJ, Chen MK, Lin CW, Yang SF (2011) Metallothionein-1 genotypes in the risk of oral squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 18(5):1478-83. <https://doi:10.1245/s10434-010-1431-3>

Zhigiang Hong: GPX1 gene Pro200Leu polymorphism erythrocyte GPX activity and cancer risk. *Mol Biol Rep*, 2013, 40:1801-1812.