

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



URŠKA HAJDINJAK

**ANALIZA POLIMORFIZMOV V89L IN A49T V  
GENU *SRD5A2* PRI BOLNIKI Z BENIGNO  
HIPERPLAZIJO PROSTATE**

**ANALYSIS OF POLYMORPHISMS V89L AND A49T  
IN THE *SRD5A2* GENE WITH BENIGN PROSTATIC  
HYPERPLASIA PATIENTS**

Magistrska naloga

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Barbare Ostanek. Vse analize genotipizacije so bile opravljene na katedri za klinično biokemijo.

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Ostanek za pomoč in vodenje pri opravljanju diplomskega dela. Zahvala gre tudi prof. dr. Janji Marc in mag. Klemnu Jagodiču dr. med. iz SB Celje za zbrane vzorce in podatke o bolnikih.

Zahvaljujem se tudi vsem, ki so me polnili z energijo v času mojega študija, še posebej fantu Dinu in mami Metki za potrpežljivost ter moralno in finančno podporo med študijem.

### **Izjava**

**Izjavljam, da sem izdelala magistrsko delo samostojno pod vodstvom mentorice doc. dr. Barbare Ostanek.**

Urška Hajdinjak

Ljubljana, 2013

## VSEBINA

POVZETEK.....	V
ABSTRACT.....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VII
SEZNAM SLIK.....	IX
SEZNAM TABEL.....	IX
SEZNAM GRAFOV.....	X
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1 PROSTATA .....	1
1.2 BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE - BHP .....	1
1.3 ZDRAVLJENJE BHP .....	3
1.3.1 ZAVIRALCI $\alpha$ 1-ADRENERGIČNIH RECEPTORJEV .....	4
1.3.2 INHIBITORJI 5 $\alpha$ -REDUKTAZE (5ARI).....	4
1.3.3 KOMBINACIJE ZDRAVIL .....	5
1.4 FINASTERID.....	5
1.5 DUTASTERID .....	6
1.6 PRIMERJAVA OBEH UČINKOVIN.....	7
1.7 ANDROGENI IN NJIHOV VPLIV NA BHP .....	8
1.8 RAK PROSTATE.....	11
1.9 ENCIM 5A-REDUKTAZA (5AR) .....	12
1.9.1 POLIMORFIZEM V89L.....	13
1.9.2 POLIMORFIZEM A49T .....	14
1.10 FARMAKOGENETIKA SRD5A2 .....	15
<b>2 NAMEN DELA .....</b>	<b>16</b>
<b>3 EKSPERIMENTALNO DELO .....</b>	<b>17</b>
3.1 OPIS VZORCEV .....	17
3.2 MATERIALI IN METODE .....	17
3.2.1 AVTOKLAVIRANJE .....	20
3.2.2 IZOLACIJA DNA.....	20

3.2.3	<i>MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI IZOLIRANE DNA</i> .....	21
3.2.4	<i>VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO - PCR</i> .....	21
3.2.5	<i>AGARozNA GELSKA ELEKTROFOREZA</i> .....	23
3.2.6	<i>ANALIZA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV - RFLP</i> .....	25
3.2.7	<i>POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA - PAGE</i> .....	26
3.2.8	<i>STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV</i> .....	27
<b>4</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>29</b>
4.1	IZOLACIJA DNA .....	29
4.2	VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO - PCR .....	29
4.2.1	<i>OPTIMIZACIJA PCR-REAKCIJE ZA POLIMORFIZEM V89L</i> .....	31
4.2.2	<i>OPTIMIZACIJA PCR-REAKCIJE ZA POLIMORFIZEM A49T</i> .....	34
4.3	ANALIZA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV - RFLP .....	36
4.3.1	<i>OPTIMIZACIJA RFLP ANALIZE ZA POLIMORFIZEM V89L</i> .....	36
4.3.2	<i>OPTIMIZACIJA RFLP ANALIZE ZA POLIMORFIZEM A49T</i> .....	37
4.4	REZULTATI GENOTIPIZACIJE.....	38
4.5	PRIMERJAVA ZDRAVLJENJA BHP S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM.....	39
4.6	VPLIV ZDRAVLJENJA NA IZBRANE PARAMETRE NEODVISNO OD GENOTIPOV .....	41
4.6.1	<i>UGOTAVLJANJE USPEŠNOSTI ZDRAVLJENJA NA PODLAGI SPREMEMB V VOLUMNU PROSTATE, SERUMSKI KONCENTRACIJI DHT IN SKUPNEM SEŠTEVKU TOČK PRI REŠEVANJU IPSS VPRAŠALNIKA</i> .....	41
4.6.2	<i>ANALIZA SERUMSKIH KONCENTRACIJ TESTOSTERONA</i> .....	44
4.6.3	<i>ANALIZA SERUMSKIH KONCENTRACIJ SHBG IN ALBUMINOV</i> .....	46
4.6.4	<i>ANALIZA SERUMSKIH KONCENTRACIJ ESTRADIOLA</i> .....	46
4.7	VPLIV ZDRAVLJENJA NA IZBRANE PARAMETRE V ODVISNOSTI OD GENOTIPOV .....	47
4.7.1	<i>REZULTATI ZA POLIMORFIZEM V89L</i> .....	47
4.7.2	<i>REZULTATI ZA POLIMORFIZEM A49T</i> .....	50
<b>5</b>	<b>SKLEP</b> .....	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>VIRI, LITERATURA</b> .....	<b>55</b>

<b>7</b>	<b>PRILOGE.....</b>	<b>59</b>
7.1	IPSS VPRAŠALNIK .....	59
7.2	REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI DNA .....	61
7.3	REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM V89L.....	64
7.4	REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM A49T.....	65

## POVZETEK

Benigna hiperplazija prostate je kronična, s staranjem povezana, napredujoča bolezen. Pomembno vlogo pri razvoju in napredovanju bolezni ima encim 5 $\alpha$ -reduktaza tipa II (gen *SRD5A2*), ki v prostati pretvarja testosteron v dihidrotestosteron. Ker nismo zasledili nobene *in vivo* študije, ki bi raziskovala farmakogenetiko *SRD5A2*, smo ugotavljali vpliv polimorfizmov V89L in A49T na zdravljenje bolnikov z benigno hiperplazijo prostate s finasteridom in dutasteridom. Iz 70 vzorcev periferne krvi smo izolirali genomsko DNA, s pomočjo ustreznih oligonukleotidnih začetnikov željeni odsek DNA pomnožili z verižno reakcijo s polimerazo, in nato določili genotipe posameznega polimorfizma z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov. S statističnimi metodami smo najprej ugotavljali, ali obstaja razlika med zdravljenjem z eno ali drugo učinkovino in nato analizirali od genotipov neodvisne in od genotipov odvisne vplive na serumske koncentracije hormonov testosterona, dihidrotestosterona in estradiola, vplive na serumske koncentracije albuminov in spolne hormone vezočih globulinov ter vplive na volumen prostate ter točkovno ovrednoteni IPSS vprašalnik. Zdravljenje smo spremljali eno leto. Analiza ni pokazala nobenih statističnih razlik med obema učinkovinama, smo pa potrdili, da je bilo zdravljenje uspešno. Tekom spremljanja se je namreč volumen prostate v povprečju zmanjšal za 34,9 %, serumska koncentracija dihidrotestosterona pa se je v povprečju zmanjšala za 84,1 %. Za 50,0 % se je po enem letu zmanjšal tudi seštevek točk IPSS vprašalnika, ki ocenjuje bolnikovo subjektivno oceno izraženosti simptomov bolezni. Serumska koncentracija testosterona se je po pol leta zvišala, nato pa je nekoliko upadla, posledično pa se je povečal tudi delež prostega testosterona. Pričakovano se je povišala tudi serumska koncentracija estradiola, koncentracija spolne hormone vezočih globulinov in albuminov pa je ostala konstantna. Pri polimorfizmu V89L smo določili frekvenco genotipov V/V 34,3 %, V/L 50,0 % in L/L 15,7 %. Frekvenca genotipov pri polimorfizmu A49T pa je bila A/A 95,7 % in A/T 4,3 %. Pri nobenem izmed analiziranih parametrov nismo uspeli dokazati statistično pomembnih razlik med genotipi. Na osnovi naših rezultatov lahko zaključimo, da polimorfizma V89L in A49T verjetno ne prispevata pomembno k uspešnosti zdravljenja benigne hiperplazije prostate s finasteridom in dutasteridom.

**Ključne besede:** prostata, benigna hiperplazija, farmakogenetika, zdravljenje, *SRD5A2*

## ABSTRACT

Benign prostatic hyperplasia is a chronic, age-related progressive disease. Enzyme 5 $\alpha$ -reductase type II (*SRD5A2* gene) converts testosterone to dihydrotestosterone in the prostate and plays an important role in the development and progression of the disease. Since we could not find any *in vivo* studies about *SRD5A2* pharmacogenetics in the literature, we studied the possible effect of polymorphisms V89L and A49T on finasteride and dutasteride treatment efficacy of the benign prostatic hyperplasia. Extraction of genomic DNA from 70 peripheral blood samples was followed by a polymerase chain reaction using the appropriate primers and finally the genotypes were determined by restriction fragment length polymorphism analysis. With the use of statistical methods we assessed whether there was any difference between treatment with the two drugs and then we analyzed the genotype independent and genotype dependent effects on serum levels of hormones testosterone, dihydrotestosterone and estradiol, effects on serum albumins and sex hormone binding globuline and effects on prostate volume and IPSS questionnaire. Treatment was monitored for a year. The analysis showed no statistically significant differences between the two drugs, but we were able to confirm that the treatment was successful. The prostate volume decreased by 34,9 % and serum dihydrotestosterone levels decreased by 84,1 % during the monitoring of the treatment. An important reduction of 50,0 % was also observed in the IPSS questionnaire, which gives us patients subjective assessment of the severity of disease symptoms. Serum testosterone levels increased after first six months and then slightly declined, consequently the proportion of free testosterone also increased. As expected serum estradiol levels increased and concentrations of SHBG and albumine remained unchanged. The frequencies of V89L polymorphism were 34,3 % for the V/V, 50,0 % for the V/L and 15,7 % for the L/L genotypes. The frequencies of A49T polymorphism were 95,7 % for the A/A and 4,3 % for the A/T genotypes. None of the analyzed parameters showed any statistically significant differences between the genotypes. Based on our results we can conclude that the V89L and A49T polymorphisms are unlikely to significantly contribute to the success of the treatment of benign prostatic hyperplasia with finasteride and dutasteride.

**Key words: prostate, benign hyperplasia, pharmacogenetics, treatment, *SRD5A2***

## SEZNAM OKRAJŠAV

5ARI	inhibitorji 5 $\alpha$ -reduktaze ( <i>5 Alpha-Reductase Inhibitors</i> )
ACTH	adrenokortikotropni hormon
ANOVA	analiza variance
AR	androgenski receptor
ARE	na androgene odzivni elementi ( <i>Androgene Response Elements</i> )
AUR	akutna retenca urina ( <i>Acute Urinary Retention</i> )
BHP	benigna hiperplazija prostate
BSA	goveji serumski albumin ( <i>Bovine Serum Albumine</i> )
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHT	dihidrottestosteron
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid-trifosfat
E2	estradiol
EDTA	etilendiamintetraocetna kislina
ER	estrogenski receptor
ERE	na estrogene odzivni elementi ( <i>Estrogene Response Elements</i> )
F-AI	delež biorazpoložljivega testosterona ( <i>Free Androgene Index</i> )
IPSS	mednarodni vprašalnik za vrednotenje simptomov BHP ( <i>International Prostate Symptom Score</i> )
LH	luteinizirajoči hormon
LHRH	luteinizirajoči hormon sproščajoči hormon
LUTS	simptomi spodnjih sečil ( <i>Low Urinary Tract Symptoms</i> )
PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza



PCR	verižna reakcija s polimerazo ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PSA	prostatični specifični antigen
RFLP	analiza dolžin restrikcijskih fragmentov ( <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i> )
SHBG	spolne hormone vezoči globulini ( <i>Sex Hormone-Binding Globulines</i> )
T	testosteron
TURP	transuretralna resekcija prostate
VP	volumen prostate

## SEZNAM SLIK

Slika 1: Razlika med zdravo prostato in prostato pri benigni hiperplaziji. ....	2
Slika 2: Strukturna formula finasterida. ....	5
Slika 3: Strukturna formula dutasterida. ....	6
Slika 4: Uravnavanje biosinteze androgenov v testisih in nadledvični žlezi. ....	9
Slika 5: Presnova dihidrotestosterona v prostati. ....	10
Slika 6: Nepovratna redukcija testosterona do dihidrotestosterona. ....	13
Slika 7: Elektroforeza gradientne PCR-reakcije za polimorfizem V89L. ....	32
Slika 8: Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za polimorfizem V89L. ....	33
Slika 9: Optimizacija koncentracije magnezija za polimorfizem V89L. ....	34
Slika 10: Elektroforeza gradientne PCR-reakcije za polimorfizem A49T. ....	35
Slika 11: Optimizacija koncentracije magnezija za polimorfizem A49T. ....	35
Slika 12: Prva stopnja optimizacije RFLP analize za polimorfizem V89L. ....	36
Slika 13: Druga stopnja optimizacije RFLP analize za polimorfizem V89L. ....	37
Slika 14: Rezultati RFLP analize za polimorfizem A49T. ....	38

## SEZNAM TABEL

Tabela I: Primerjava dutasterida in finasterida. ....	7
Tabela II: Frekvence genotipov (v %) polimorfizma V89L po svetu. ....	13
Tabela III: Frekvence genotipov (v %) polimorfizma A49T po svetu. ....	14
Tabela IV: Reakcijska zmes za PCR-reakcijo enega vzorca za polimorfizem V89L. ...	22
Tabela V: Pogoji poteka reakcije PCR za polimorfizem V89L. ....	23
Tabela VI: Reakcijska zmes za PCR-reakcijo enega vzorca za polimorfizem A49T. ...	23
Tabela VII: Pogoji poteka reakcije PCR za polimorfizem A49T. ....	23

Tabela VIII: Sestava agaroznega gela glede na koncentracijo agaroze.....	24
Tabela IX: Sestava restrikcijske zmesi za polimorfizem V89L. ....	26
Tabela X: Sestava restrikcijske zmesi za polimorfizem A49T.....	26
Tabela XI: Sestava zmesi za 12 % poliakrilamidni gel. ....	26
Tabela XII: Frekvence genotipov pri polimorfizmu V89L. ....	38
Tabela XIII: Frekvence genotipov pri polimorfizmu A49T.....	39
Tabela XIV: Analiza kliničnih parametrov v odvisnosti od obeh učinkovin. ....	40
Tabela XV: Analiza kliničnih parametrov v odvisnosti od časa. ....	42
Tabela XVI: Analiza razlik posameznih vrednosti kliničnih parametrov med različnimi časovnimi odvzemi. ....	43
Tabela XVII: Analiza kliničnih parametrov glede na genotip polimorfizma V89L. ....	48
Tabela XVIII: Analiza razlik posameznih vrednosti kliničnih parametrov med različnimi časovnimi odvzemi glede na genotip polimorfizma V89L. ....	49
Tabela XIX: Analiza kliničnih parametrov glede na genotip polimorfizma A49T.....	50
Tabela XX: Analiza razlik posameznih vrednosti kliničnih parametrov med različnimi časovnimi odvzemi glede na genotip polimorfizma A49T. ....	51

## **SEZNAM GRAFOV**

Graf 1: Klinični parametri, ki odražajo učinkovitost zdravljenja.....	44
Graf 2: Spreminjanje serumskih koncentracij testosterona tekom zdravljenja. ....	45
Graf 3: Spreminjanje F-AI (delež prostega testosterona) tekom zdravljenja. ....	45
Graf 4: Spreminjanje serumskih koncentracij estradiola tekom zdravljenja. ....	47

## **1 UVOD**

V zadnjih letih je zdravljenje benigne hiperplazije prostate napredovalo od večinoma kirurškega zdravljenja do pretežno zdravljenja z zdravili. Ker se življenjska doba podaljšuje, se povečuje tudi pojavnost bolezni, s tem pa so stroški zdravljenja čedalje višji. Zato je zelo pomembno raziskovanje morebitnih mehanizmov, ki bi lahko bili vpleteni v razvoj in napredovanje bolezni, saj bo pripomoglo k izboljšanju možnosti preventivnega zdravljenja in zgodnjemu odkrivanju bolezni.

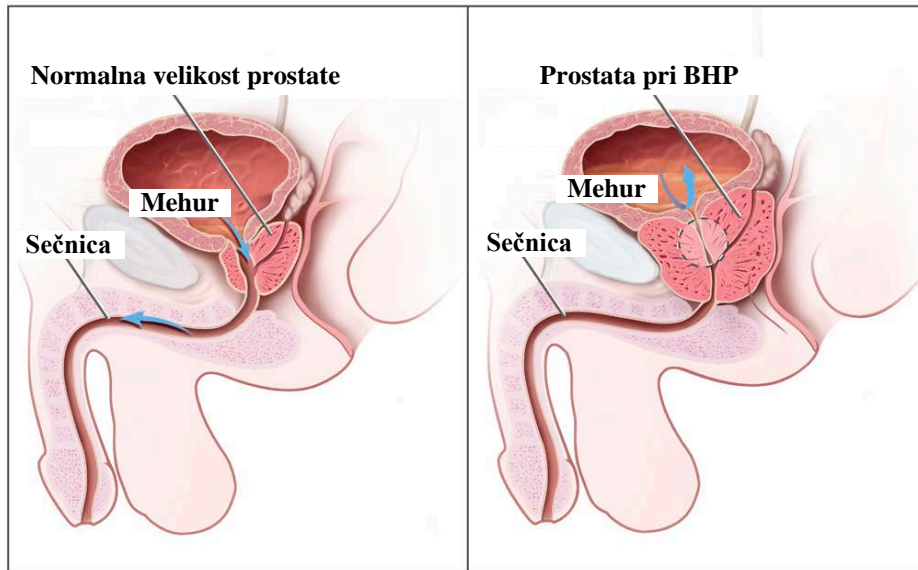
### **1.1 PROSTATA**

Prostata ali obsečnica je sekundarni moški spolni organ. V puberteti pod vplivom testosterona dozori in je velika okrog 3 cm ter težka okrog 20 g. Kot žleza z zunanjim izločanjem prispeva do 30 % svojih izločkov k semenski tekočini, za ohranitev vitalnosti in gibljivosti semenčic [1]. Razdeljena je v štiri cone. V periferni coni se nahaja 70 % žleznega tkiva in je najpogostejše območje razvoja raka. Centralna cona vsebuje 25 % žleznega tkiva. Prehodna cona ima le 5 % žleznega tkiva, nahaja se okrog sečnice, s starostjo pa je podvržena procesom hiperplazije. Spredaj je vezivno-mišični del, kjer pride do prepletanja mišic prostate in mišic mehurja - detruzorja. Žlezo ovija ovojnica iz čvrstih vezivno-mišičnih vlaken, ki pri hiperplaziji žleznega tkiva preprečuje širjenje v okolico, zato se poveča pritisk na prostatični del sečnice [2].

### **1.2 BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE - BHP**

Benigna hiperplazija prostate je kronična napredujoča bolezen, kjer gre za makroskopsko povečanje prehodne cone prostate. Natančneje, pride do prekomerne postopne hiperplazije epiteljskih, stromalnih in žleznih celic ter vezivno-mišičnega tkiva [3]. Zaradi razraščanja tkiva pride do zožitve in povečanega upora v prostatičnem delu sečnice, s tem pa tudi do težav povezanih z uriniranjem, ki jih imenujemo simptomi spodnjih sečil (LUTS) (Slika 1).

Ker je sečnica stisnjena, se mišica mehurja začne krepiti in debeliti, da lahko seč popolnoma iztisne iz mehurja. Benigna hiperplazija je najpomembnejši, ne pa tudi edini vzrok pojava LUTS pri starejših moških [1]. Prostata je povečana kar pri polovici moških, starejših od 50 let, in skoraj pri vseh moških, starejših od 80 let, medtem ko je delež moških z izraženimi kliničnimi znaki nižji. Po 40. letu ima izražene klinične znake le 18 %, po 70. letu pa le 56 % moških obolelih za benigno hiperplazijo prostate [4].



Slika 1: Razlika med zdravo prostato in prostato pri benigni hiperplaziji.

Prerejeno po [5].

Znaki LUTS-a nastopijo počasi, neopazno in nato postopoma napredujejo. Na to vplivata dinamični in statični del obstrukcije. Dinamični del je posledica povečane aktivnosti  $\alpha$ 1-adrenoreceptorjev, statični del pa je hormonsko pogojena hiperplazija. Simptome spodnjih sečil delimo na obstruktivne in iritabilne. Med obstruktivne znake prištevamo: zmanjšano moč curka urina, težave z začetkom uriniranja, prekinjajoč tok urina, kapljanje urina po končanem uriniranju, občutek nepopolno izpraznjenega mehurja in zapora urina. Obstruktivne težave so posledica predvsem zapore zaradi hiperplazije prostate ali pa skrčenja mišičnih vlaken v prostati in na vratu mehurja. Iritabilni znaki pa so: pogosto uriniranje podnevi in ponoči, nujna potreba po uriniranju, uriniranje z malo urina, inkontinenca urina in tiščanje v predelu nad sramnico. Te težave pa lahko imajo več različnih vzrokov, eden izmed njih je na primer aktivacija  $\alpha$ 1-adrenoreceptorjev, ki so v detruzorju, kar povzroči krčenje mišice [1].

Težave z uriniranjem lahko pomembno vplivajo na kakovost življenja posameznika, saj se s starostjo stopnjujejo in tako prispevajo k višji pojavnosti nespečnosti, spolnih motenj, anksioznih motenj ali depresij in infekcij urinarnega trakta [6]. Resnost težav ocenjujemo s pomočjo mednarodnega vprašalnika IPSS za vrednotenje simptomov BHP. Na podlagi seštevka točk imajo bolniki z rezultatom 0 - 7 blage težave, 8 - 19 točk zmerne težave in 20 - 35 točk hude težave s simptomi spodnjih sečil [1] (Priloga 7.1).

Če boleznim ne zdravimo se prostata povečuje in lahko pride do kroničnega zastajanja seča v mehurju, saj stena sečnega mehurja sčasoma oslabi in ni več zmožna iztisniti vsega seča iz mehurja. Seč lahko začne uhajati ali pride do akutne zapore seča ter v končni fazi tudi do ledvičnega popuščenja [1]. Da bi lahko bolezen pravočasno odkrili, urologi priporočajo preventivne preglede pri moških starejših od 30 let, po 50. letu pa naj bi bili ti pregledi redni, še posebej če je pridružena debelost, sladkorna bolezen ali družinska obremenjenost z boleznimi prostate [7].

### **1.3 ZDRAVLJENJE BHP**

Namen zdravljenja BHP je predvsem izboljšati kakovost bolnikovega življenja, povečati pretok seča, zmanjšati težave povezane z uriniranjem in s tem zmanjšati možnosti za akutno zaporo seča, zmanjšati volumen prostate in potrebo po kirurškem zdravljenju. Načine zdravljenja delimo po evropskih smernicah [7] v štiri skupine glede na stopnjo izraženosti boleznim: aktivno opazovanje, fitoterapijo [8], zdravljenje z zdravili in kirurško zdravljenje. Pri izbiri posameznega načina zdravljenja imajo pomembno vlogo vrednost PSA, velikost prostate, stopnja izraženosti simptomov spodnjih sečil in seštevka točk po IPSS vprašalniku [1, 4]. Zaradi tematike magistrske naloge se bomo v nadaljevanju osredotočili predvsem na zdravljenje z zdravili.

Najpogosteje uporabljamo zdravila kemijskega izvora. Zdravljenje je usmerjeno tako v zmanjšanje velikosti prostate, kot v izboljšanje simptomov spodnjih sečil ter pretoka seča. Bolnike z zmernimi in hudimi simptomi zdravimo glede na velikost prostate z dvema skupinama zdravil, lahko posamezno ali pa v kombinaciji [1, 4, 9].

### 1.3.1 ZAVIRALCI $\alpha$ 1-ADRENERGIČNIH RECEPTORJEV

Predpišemo jih v primeru, ko je volumen prostate < 30 mL, PSA pod 2 ng/mL in so simptomi spodnjih sečil zmerno izraženi (IPSS > 8). Znižajo tonus gladkih mišic prostate in izboljšajo pretok seča ter s tem olajšajo mokrenje in povzročijo olajšanje LUTS-a, kar potrjujejo mnoge študije [10, 11]. Učinek zdravljenja je viden po dveh do štirih tednih. Na voljo so neselektivni zaviralci kot sta terazosin in doksazosin, ki hkrati znižujeta tudi krvni tlak pri hipertenzivnih bolnikih in selektivni tamsulozin, ki se uporablja izključno za zdravljenje BHP. S pomočjo študije MTOPS (*Medical Therapy of Prostatic Symptoms*), kjer so primerjali učinkovitost zdravljenja med doksazosinom in finasteridom posamezno ter v kombinaciji, so dokazali, da zaviralci receptorjev  $\alpha$ 1 ne preprečujejo napredovanja bolezni in ne zmanjšujejo velikosti prostate, prav tako pa ne zmanjšajo tveganja za akutno zaporo seča ali kirurški poseg [9, 10]. Najbolj pogosti neželeni učinki, ki se pojavijo med zdravljenjem, so omotica, ortostatska hipotenzija in retrogradni izlivi, ker lahko pride do motenj v zapiranju vratu mehurja pri ejakulaciji, zato semenska tekočina potuje v mehur. Učinki zdravljenja z  $\alpha$ 1-adrenergičnimi antagonisti so reverzibilni in izzvenijo v nekaj dneh po prenehanju jemanja [1, 4, 9].

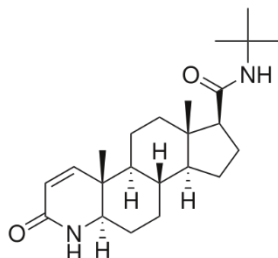
### 1.3.2 INHIBITORJI $5\alpha$ -REDUKTAZE (5ARI)

V prostati zavirajo pretvorbo testosterona (T) v dihidrotestosteron (DHT) tako, da inhibirajo encim  $5\alpha$ -reduktazo. Smernice priporočajo predpis 5ARI pri volumnu prostate > 30 mL in zmerno do hujše izraženih simptomih LUTS-a [7]. Trenutno sta na voljo dve učinkovini, ki zavirata delovanje omenjenega encima, finasterid in dutasterid. Obe povzročita zmanjšanje volumna prostate za 20 do 30 % in tako vplivata na statično komponento obstrukcije. Izboljšajo se simptomi spodnjih sečil ter pretok seča in zmanjša se tveganje za kirurški poseg [9]. Učinek zdravljenja s 5ARI se pokaže šele po nekaj mesecih zdravljenja, zato je priporočljiva neprekinjena terapija vsaj pol leta. Pri manjšem odstotku bolnikov se lahko v prvih šestih mesecih zdravljenja pojavijo neželeni učinki, kot so zmanjšan libido in nekoliko slabše erekcije, pa tudi impotenca. V zadnjih letih se poleg za zdravljenje hormonsko pogojene hiperplazije, 5ARI klinično testirajo še v povezavi s preventivo raka prostate in zdravljenjem krvavitev iz prostate [1, 4, 9, 11].

### 1.3.3 KOMBINACIJE ZDRAVIL

MTOPS študija je dokazala, da je po več letih zdravljenja kombinacija zdravil 5ARI in inhibitorjev  $\alpha 1$  receptorjev uspešnejša pri olajšanju simptomov LUTS-a in pri zmanjšanju možnosti za napredovanje bolezni, kot zdravljenje s posamezno učinkovino [9, 10]. Pri kombiniranem zdravljenju pride do hitrega izboljšanja pretoka seča in olajšanja težav povezanih z uriniranjem zaradi delovanja zaviralcev  $\alpha 1$  receptorjev ter do dolgotrajnega zmanjšanja prostate zaradi inhibicije encima  $5\alpha$ -reduktaze. S tem se učinkovito zmanjša tveganje, tako za akutno zaporo seča, kot tudi za operativni poseg [1, 4, 9].

### 1.4 FINASTERID



Slika 2: Strukturna formula finasterida.

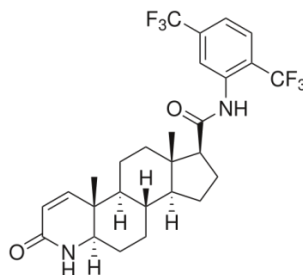
Povzeto po [12].

Finasterid (Slika 2), v odmerku 5mg/dan, je indiciran za zdravljenje bolnikov z BHP, za preprečitev uroloških zapletov, za zmanjšanje tveganja za akutno retenco urina (AUR) in za zmanjšanje potrebe po kirurških posegih. Zmanjšuje povečano prostato, izboljša pretok urina in izboljša simptome, ki so povezani z BHP [13]. V štiri leta trajajoči študiji PLESS (*Proscar Long-Term Efficacy and Safety Study*), ki je prva dolgo trajajoča in s placebom nadzorovana študija inhibicije  $5\alpha$ -reduktaze pri bolnikih z BHP, so uspeli dokazati, da redna uporaba finasterida za 57 % zmanjša tveganje za AUR in za 55 % zmanjša tveganje za kirurško zdravljenje v primerjavi s placebom. Razlike med skupinama so bile vidne že po 4 mesecih. Povprečni volumen prostate (VP) se je pri skupini, ki je prejela finasterid, v prvem letu zmanjšal za 18 %, pri skupini, ki je prejela placebo, pa je VP kontinuirano naraščal za kar 14 % [14]. Finasterid prav tako učinkovito zniža tako serumske (za 70 %), kot tudi intraprostatske (za 85 - 90 %) koncentracije DHT [15]. Podobne ugotovitve so pridobili tudi v MTOPS študiji. Pri bolnikih, ki so prejeli finasterid pet let, se je tveganje za napredovanje bolezni zmanjšalo za 34 % v primerjavi s placebom [10].



Finasterid spada med 4-azasteroide in je specifični kompetitivni zaviralec encima  $5\alpha$ -reduktaza tipa II. Odobren je bil leta 1992. Klinične študije, ki so na voljo danes, dokazujejo, da se z rednim jemanjem finasterida po 3 letih VP zmanjša za okrog 27 %. Biološka uporabnost je približno 80 %, največjo koncentracijo v krvi pa doseže po 2 urah. V 93 % je vezan na plazemske proteine. Presnavlja se v jetrih z encimom CYP3A4 v dva metabolita, ki imata šibko delovanje na encim  $5\alpha$ -reduktazo. Izloča se v obliki presnovkov z urinom (39 %) in blatom (57 %) [13].

## 1.5 DUTASTERID



Slika 3: Strukturna formula dutasterida.

Povzeto po [16].

Dutasterid (Slika 3), v odmerku 0,5 mg/dan, je indiciran za zdravljenje zmernih do hudih simptomov benigne hiperplazije prostate, za zmanjševanje tveganja za AUR in potrebe po kirurškem posegu. Odobren je bil leta 2002. Dutasterid prav tako spada v skupino 4-azasteroidov, inhibira pa oba izoencima  $5\alpha$ -reduktaze, tako tip I kot tip II. Učinek na zmanjšanje koncentracije DHT je opazen že po 2 tednih, po pol leta pa se serumska koncentracija zmanjša za kar 94 % [17]. Učinek na zmanjšanje VP je lahko opazen že po enem mesecu, nadaljuje pa se do dveh let. Tako se skupni VP v povprečju zmanjša za 26 %, volumen prehodne cone prostate pa se v povprečju zmanjša za 17,8 %. Vsi ti učinki vodijo do izboljšanja simptomov in po dveh letih zmanjšajo tveganje za AUR za 57 % ter potrebo po operativnem posegu za 48 % v primerjavi s placebom [18, 19]. Neželeni učinki se lahko pojavijo predvsem v prvem letu zdravljenja, vezani pa so predvsem na reproduktivni sistem. Opaženi so bili pri 10 % bolnikov. Pojavi se lahko impotenca, zmanjšan libido in motnje ejakulacije [17, 18, 19]. Študije, ki so bile narejene ob uporabi dutasterida, so pokazale, da se pojavnost neželenih učinkov zmanjšuje z daljšanjem časa zdravljenja. Načeloma bolniki zdravljenje dobro prenašajo [20].

Biološka uporabnost dutasterida je približno 60 %, skoraj ves pa je vezan na plazemske proteine. Do 11,5 % dutasterida lahko prehaja iz seruma v semensko tekočino. Presnavlja se z encimoma CYP3A4 in CYP3A5 v štiri metabolite. V povprečju se 5,4 % prejetega odmerka izloči v nespremenjeni obliki z blatom, preostalo pa se izloči prav tako z blatom v obliki štirih glavnih in šestih manj pomembnih presnovkov [18].

## 1.6 PRIMERJAVA OBEH UČINKOVIN

Vse zgoraj omenjene študije so primerjale zgolj eno ali drugo učinkovino s placebom in na podlagi tega dokazale, da sta obe učinkoviti pri zdravljenju BHP (Tabela I). Iz teh podatkov sicer lahko sklepamo, da bi dutasterid lahko imel zaradi inhibicije obeh tipov encima nekoliko večjo učinkovitost, vendar pa kakšnih pomembnih razlik ali podobnosti med učinkovinama ne moremo podati, zaradi različnega starostnega, zdravstvenega in rasnega izbora zdravljenih bolnikov ter tudi zaradi različno dolgega trajanja študij.

Tabela I: Primerjava dutasterida in finasterida.

Povzeto po [11].

	<b>Dutasterid</b>	<b>Finasterid</b>
Odmerek (mg/dan)	0,5	5,0
Razpolovni čas (dan)	35	0,3
Zmanjšanje serumske koncentracije DHT po 1 letu (%)	90	70
Zmanjšanje volumna prostate po 2 letih (%)	27	20
Zmanjšanje točk IPSS vprašalnika po 2 letih	3,8	3,1
Zmanjšanje tveganja za AUR po 4 letih (%)	57	57
Pojav neželenih učinkov (%)	10–15	10–15

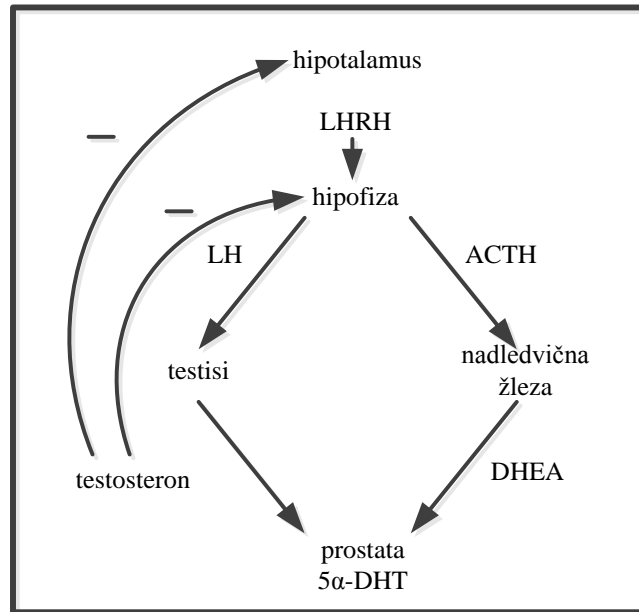
Študije, ki so primerjale obe učinkovini med sabo, pa do danes niso uspele potrditi kakšnih pomembnih razlik v zdravljenju med njima. V študiji II. faze preizkušanja zdravil so sicer dokazali, da dutasterid povzroči zaradi inhibicije obeh tipov  $5\alpha$ -reduktaze, v primerjavi s finasteridom, večje zmanjšanje serumske koncentracije DHT. V povprečju se je serumska koncentracija DHT pri skupini, ki je prejela dutasterid, znižala za 94,7 %, pri skupini, ki je prejela finasterid, pa za 70,8 %. Pri zmanjšanju volumna prostate in izboljšanju simptomov ter zmanjšanju tveganja za napredovanje bolezni, AUR ter operativni poseg pa niso uspeli dokazati pomembnih razlik med učinkovinama. Prav tako niso dokazali pomembnih razlik pri pojavu neželenih učinkov med obema [21].

Podobne rezultate so pridobili tudi v študiji EPICS (*Enlarged Prostate International Comparator Study*), kjer so prav tako primerjali učinkovitost in varnost dutasterida ter finasterida. V raziskavo je bilo vključenih 1630 bolnikov z volumnom prostate > 30 mL, od tega jih je 1454 uspešno končalo 12-mesečno opazovanje (735 bolnikov je prejelo finasterid, 719 pa dutasterid). Po enem letu opazovanja sta obe učinkovini uspešno zmanjšali volumen prostate, a brez signifikantnih razlik med njima, prav tako pa ni bilo nobenih razlik v pojavu neželenih učinkov [22]. Pomembno je omeniti še dejstvo, da obe učinkovini ob uspešnem znižanju koncentracij DHT znotraj prostate, posledično povzročita še dvig serumskih koncentracij testosterona za 10 - 20 % [11].

## 1.7 ANDROGENI IN NJIHOV VPLIV NA BHP

Androgeni omogočajo spolno diferenciacijo in razvoj moških spolnih organov v embrionalnem obdobju ter razvoj moških spolnih znakov in spermatogenezo v puberteti. Danes je znano, da so androgeni, ki jih izločajo testisi, odgovorni za normalno rast in pravičen razvoj prostate [3].

Približno 95 % testosterona proizvedejo Leydigove celice v testisih pod vplivom luteinizirajočega hormona (LH), ki se sprošča iz hipofize, ta pa je pod nadzorom LHRH (luteinizirajoči hormon sproščajoči hormon), ki se sprošča iz hipotalamusa. Preko negativne povratne zanke lahko sintezo uravnava tudi testosteron (Slika 4). Testosteron se v krvi veže na spolne hormone vezoče globuline (SHBG) (44 %) in albumine (54 %), nekaj pa ga je tudi v prosti obliki (1 - 2 %). Iz testosterona v prostati nastane DHT, ki je najpomembnejši prostatični androgeni hormon. Tako T kot tudi DHT se vežeta na androgeni receptor (AR), s tem, da ima DHT dvakrat večjo afiniteto od T, medtem ko T disocira petkrat hitreje od receptorja kot DHT. AR spada v skupino od liganda odvisnih jedrnih receptorjev. Vezava DHT ali T na receptor v citoplazmi inducira nastanek dimera dveh DHT-AR kompleksov, ki se nato prenese v jedro celice in se veže na androgensko odzivne elemente (ARE), ti pa nato uravnavajo izražanje različnih genov in posledično sintezo proteinov. Pride do sinteze PSA in raznih regulatornih proteinov [3].

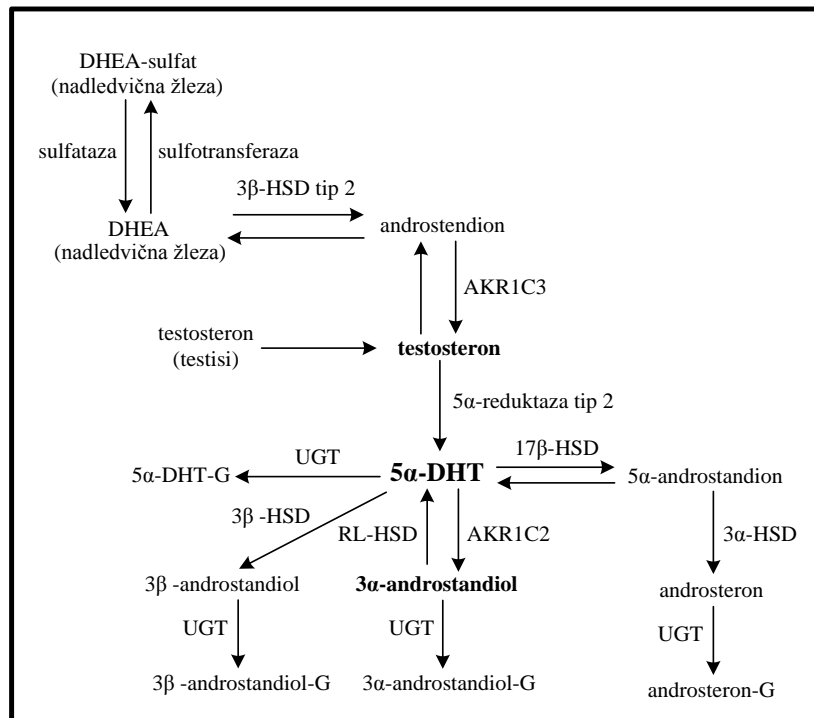


Slika 4: Uravnavanje biosinteze androgenov v testisih in nadledvični žlezi.

(LHRH-luteinizirajoči hormon sproščajoči hormon, LH-luteinizirajoči hormon, ACTH-adrenokortikotropni hormon, DHEA-dehidroepiandrosteron, 5 $\alpha$ -DHT-dihidrottestosteron).

Prirejeno po [3].

V prostati poteka metabolizem DHT do 5 $\alpha$ -androstan-3 $\alpha$ ,17 $\beta$ -diola (3 $\alpha$ -diola), ki je manj aktiven androgen z nizko afiniteto vezave do androgenega receptorja, prav tako pa poteka metabolizem do 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diola (3 $\beta$ -diola), ki je dober ligand estrogenskega receptorja  $\beta$  (ER- $\beta$ ). DHT se lahko oksidira tudi do 5 $\alpha$ -androstan-3,17-diona (5 $\alpha$ -diona), ta pa se naprej reducira do androsterona. Ob prisotnosti androgenske UDP-glukuronozil-transferaze se nadalje lahko DHT, androsteron, 3 $\alpha$ - in 3 $\beta$ -diol pretvorijo v vodotopne glukuronide ter se na ta način izločijo iz telesa (Slika 5) [3].



Slika 5: Presnova dihidrotestosterona v prostati.

(DHEA-dehidroepiandrosteron, 3 $\beta$ -HSD tip 2-3 $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza, AKR1C3-17 $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza (17 $\beta$ -HSD) tip 5, UGT-UDP-glukuronozil-transferaza, RL-HSD-oksidativna 3 $\alpha$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza, AKR1C2-3 $\alpha$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza). Prirejeno po [3].

Kot lahko vidimo na sliki 4, sinteza androgenov ne poteka samo v testisih, saj pod vplivom adrenokortikotropnega hormona (ACTH) v nadledvični žlezi nastaja še dehidroepiandrosteron sulfat (DHEA-sulfat), ki se pretvori do DHEA, ta pa se s pomočjo encima 3 $\beta$ -hidroksisteroid-dehidrogenaza tipa 2 (3 $\beta$ -HSD) v prostati pretvori do androstendiona. Nadalje poteče redukcija androstendiona do T (Slika 5). DHT torej v prostati nastaja tudi posredno iz neaktivnih androgenov nadledvične žleze, katerih serumske koncentracije so višje od T. Ker začne s starostjo biosinteza T v testisih upadati, imajo androgeni iz nadledvične žleze pri starejših moških pomembno vlogo, saj je pri 65-letnem moškem kar 40 % DHT posrednega izvora. S tem lahko delno pojasnimo, zakaj se koncentracije DHT v prostati ne spreminjajo s starostjo. Konstantne koncentracije DHT pa si lahko razlagamo tudi s povratno reakcijo 3 $\alpha$ -diola nazaj do DHT, saj kar 50 % 3 $\alpha$ -diola oksidira nazaj do DHT in tako vzdržuje njegovo koncentracijo. V prostati je tako razmerje med DHT in T približno 10:1 v prid DHT [3, 11].

Glede na to, da se v primeru uporabe finasterida in dutasterida koncentracija DHT v serumu zniža za 70,8 % oziroma 94,7 %, volumen prostate pa se zmanjša le za 20 % oziroma 27 %, lahko predvidevamo, da kljub inhibiciji 5AR (tip I v primeru finasterida in oba tipa v primeru dutasterida) lokalna sinteza DHT še vedno poteka, verjetno prav na račun povratne reakcije  $3\alpha$ -diola nazaj do DHT [3].

Androgeni so potrebni, a ne zadostni pogoj za začetek in vzdrževanje BHP. O tem pričajo recimo dokazi, da nadomestna terapija z androgeni ne poveča tveganja za pojav BHP, medtem ko anti-androgena terapija povzroči hitro zmanjšanje volumna prostate [23, 24]. Sam mehanizem nastanka benigne hiperplazije še ni povsem pojasnjen, saj kljub temu, da je normalen razvoj prostate odvisen od androgenov, to še ne pomeni, da bi nenaden dvig serumskih koncentracij rezultiral v povečani proliferaciji. Testosteron je do neke meje nujen za pravilno rast in razvoj, vendar pa nad to mejo nima več učinka na prostato. To si lahko razlagamo z raziskavami, ki so ugotovile, da administracija testosterona pri starejših moških diagnosticiranih s hipogonadizmom sicer poveča volumen prostate v povprečju za 15 %, vendar pa je končni volumen še vedno v mejah normale. Če je prostata normalne velikosti, nadomestna terapija s testosteronom ne stimulira proliferacije, saj se v primeru izpostavljenosti moških z normalno veliko prostato koncentracijam testosterona, ki so bile višje od normalnih serumskih vrednosti, volumen prostate ni zaznavno povečal [25, 26].

## 1.8 RAK PROSTATE

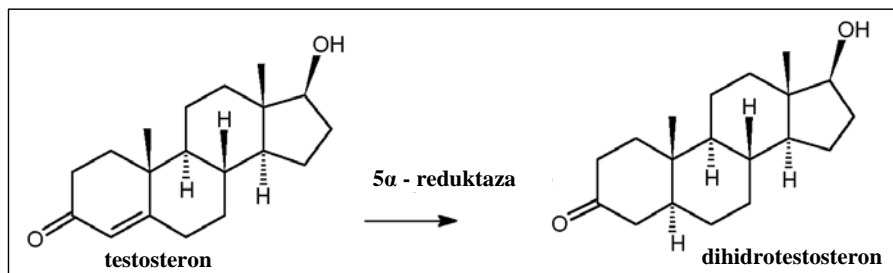
Androgeni se vpletajo v mnoge reakcije v organizmu, pomembno pa je, da omenimo še njihovo vlogo v patogenezi raka prostate. Točni mehanizmi po katerih poteka razvoj, še niso povsem pojasnjeni, da pa imajo androgeni pomembno vlogo, lahko sklepamo iz dejstva, da je rak prostate velikokrat občutljiv na hormonsko terapijo. Tako se za zdravljenje napredovalih oblik raka najpogosteje uporabljajo agonisti LHRH, antagonist AR ali kombinacije obeh [3]. Na povečano tveganje za razvoj raka prostate naj bi vplivala predvsem povečana sinteza T v testisih, za kar bi lahko bili odgovorni polimorfizmi v genih za encime, ki sodelujejo v biosintezi, vendar pa znanstveniki še vedno nimajo enotnega mnenja o povezavi med androgeni in razvojem raka. Kljub temu, da so androgeni vpleteni tako v patogenezo BHP, kot tudi v razvoj raka, pa obolelost za hiperplazijo ne vodi do razvoja raka, saj se bolezni pojavljata v različnih conah prostate [27].

Znano je, da se obolelost za BHP in pojav raka na prostati razlikuje med različnimi rasnimi/etnično antropološkimi skupinami. Večina raziskav se je osredotočila predvsem na obolelost za rakom prostate, BHP pa je posledično manj raziskana. Tako so ugotovili, da imajo najmanjše tveganje za pojav raka prostate Azijci, najbolj izpostavljeni tej bolezni so Afroameričani, Kavkazijci pa so po pojavnosti raka na prostati nekje vmes [23].

## 1.9 ENCIM $5\alpha$ -REDUKTAZA (5AR)

Najpomembnejši mejnik v preteklosti, ki je vplival na razvoj zdravil za zdravljenje bolezni prostate, je bilo odkritje moških pseudohermafroditov (»guevedoces«) v Dominikanski Republiki pred približno 40. leti. Beseda »guevedoces« dobesedno pomeni »penis pri dvanajstih letih«, označuje pa moške, ki so se rodili z zunanjimi genitalijami podobnimi ženskim, zaradi pomanjkanja delovanja DHT v embrionalnem razvoju. Razvoj moških zunanjih genitalij se je zgodil komaj v puberteti, pod vplivom T, prostata pa je celo življenje ostala majhna zaradi prirojenega pomanjkanja delovanja encima 5AR tipa II [11].

Encim  $5\alpha$ -reduktaza je lipofilen membranski encim, ki reducira T v DHT (Slika 6). Obstajata dva izoencima, tip I in tip II. Tip I (gen *SRD5A1*) se prednostno izraža izven prostate, v jetrih in koži, nekaj pa ga najdemo tudi znotraj prostate, tip II (gen *SRD5A2*) pa se izraža v epitelijskih in stromalnih celicah prostate, nekaj pa ga je tudi v jetrih. Gen *SRD5A2* je velik 58,6 kbp in sestavljen iz petih eksonov ter štirih intronov. Encim  $5\alpha$ -reduktazo sestavlja 254 aminokislin. DHT, ki nastane pod vplivom tipa I, s pomočjo sistemske cirkulacije doseže prostato. Če pride v genu *SRD5A2* do mutacij, lahko pride do zmanjšane delovanja encima in posledično do pojava prej omenjenega pseudohermafrodizma. Lahko pa ob pojavu mutacij v genu pride tudi do povečanega delovanja encima in s tem povezane hiperplazije prostate. Oba tipa encima se razlikujeta v vrednosti pH, ki je potrebna za optimalno aktivnost (pH 5,5 za tip I in pH 7,0 za tip II) ter tudi v lokaciji kromosomov, na katerih ležijo geni, ki kodirajo izražanje encima (kromosom 5 za tip I in kromosom 2 za tip II) [11].



Slika 6: Nepovratna redukcija testosterona do dihidrottestosterona.

Prirejeno po [28].

Dejavniki tveganja za razvoj BHP so okoljski in genetski. Med genetskimi so polimorfizmi genov, ki so vključeni v biosintezo androgenov in se lahko odražajo v prekomerni proliferaciji epitelijskega tkiva in strome [3]. Polimorfizmi se pojavljajo v vseh petih eksonih gena *SRD5A2*, izražajo pa se kot substitucije aminokislin, delecije in nesmiselne mutacije. Do danes so uspeli odkriti 29 polimorfizmov, od tega jih je 10 (C5R, P30L, P48R, A49T, A51T, V89L, T187M, F194L, R227Q, F234L), ki so se izkazali kot pomembni dejavniki pri razvoju BHP. Nekateri so bolj, drugi pa manj raziskani, saj je večina polimorfizmov relativno redkih, s frekvenco manj kot 2 % [23, 29]. Pri tako nizki frekvenci obstaja možnost, da ti polimorfizmi, gledano na širšo populacijo, ne igrajo tako pomembne vloge pri razvoju bolezni. Najbolj raziskana polimorfizma v genu *SRD5A2* sta V89L in A49T, ki se oba nahajata v prvem eksonu. Od odkritja naprej (oba je odkril Makridakis s sodelavci) pa so si rezultati študij glede vpliva obeh na razvoj BHP in raka prostate kontradiktorni.

### 1.9.1 POLIMORFIZEM V89L

Polimorfizem V89L (rs523349) je v svetu med populacijami zastopan zelo raznoliko, odvisno od rasne/etnično antropološke pripadnosti (Tabela II). Največja zastopanost genotipa V/V je med Afričani (52,4 %), sledijo Evropejci in Američani (50,1 % in 48,1 %) ter nazadnje Azijci (27,6 %). Obratni vrstni red je pri genotipu L/L, kjer je največja zastopanost pri Azijcih (25,9 %) in najmanjša pri Afričanih (4,1 %) [30].

Tabela II: Frekvence genotipov (v %) polimorfizma V89L po svetu.

	V/V	V/L	L/L
<b>Afričani</b>	52,4	43,5	4,1
<b>Evropejci</b>	50,1	40,9	9,0
<b>Američani</b>	48,1	39,2	12,7
<b>Azijci</b>	27,6	46,5	25,9



Pri polimorfizmu pride do substitucije ene aminokisljine, kjer levcin zamenja valin v kodonu 89, kar je posledica zamenjave nukleotida C z G. Študije dokazujejo za 30 % zmanjšano aktivnost 5AR *in vitro*, pri posameznikih z genotipom L/L. Glede na to, da je največja frekvenca homozigotov L/L pri azijski populaciji, lahko sklepamo, da bi alel L lahko bil povezan z manjšim tveganjem za razvoj raka prostate pri tej populaciji [23, 29]. Ugotovili so tudi, da imajo homozigoti L/L nižje serumske koncentracije 3 $\alpha$ -diol glukuronida (metabolit DHT) ter višje serumske koncentracije T kot homozigoti V/V. To predpostavlja nižjo aktivnost 5AR, saj se potem v prostati manj T reducira v DHT, presežek T pa s pasivno difuzijo potuje nazaj v krvni obtok [3, 31]. Moški z vsaj enim alelom V (V/V ali V/L) naj bi bili izpostavljeni dvakrat večjemu tveganju za razvoj raka na prostati [3, 32]. Obstaja tudi študija, ki nakazuje na povezavo med alelom L in povečanim tveganjem za razvoj raka, predvsem pri moških, ki so jim bolezen diagnosticirali pred 63. letom starosti [33]. Najpogosteje pa rezultati raziskav niso pokazali nobenih povezav med različnimi genotipi polimorfizma V89L in tveganjem za razvoj raka prostate. To so uspeli dokazati z meta analizo HuGE (*Human Genome Epidemiology review*), kjer so pod drobnogled vzeli 24 raziskav opravljenih med leti 1997 - 2007, ki so analizirale omenjeni polimorfizem v povezavi z rakom na prostati [23].

V literaturi smo zasledili samo eno raziskavo, kjer so iskali povezave med polimorfizmom in pojavom BHP pri Japoncih, vendar niso dokazali nobenih razlik med genotipi [32]. Zaradi pomanjkanja raziskav bi bilo dobro, da se v bodoče te usmerijo v pojav BHP, saj je bolezen prisotna pri vedno več starejših moških in pomembno vpliva na kakovost življenja.

### 1.9.2 POLIMORFIZEM A49T

Polimorfizem A49T (rs9282858) je redek pri vseh populacijah, odraža pa se s petkrat povečano aktivnostjo 5AR *in vitro* (Tabela III) [23]. Največja frekvenca pojavljanja heterozigotov A/T je pri Evropejcih (7,1 %), sledijo Američani (3,3 %), Afričani (1,6 %) in nazadnje Azijci (0,7 %). Za frekvenco pojava mutiranih homozigotov T/T ni podatka [30].

Tabela III: Frekvence genotipov (v %) polimorfizma A49T po svetu .

	A/A	A/T
<b>Evropejci</b>	92,9	7,1
<b>Američani</b>	96,7	3,3
<b>Afričani</b>	98,4	1,6
<b>Azijci</b>	99,3	0,7

Gre za substitucijo ene aminokisljine, kjer treonin zamenja alanin v kodonu 49, kar je posledica zamenjave nukleotida G v A. Obstaja študija, ki dokazuje povezavo med alelom T in povečanim tveganjem za razvoj raka prostate, oziroma, da je mutacija pogosto prisotna pri napredovalih oblikah tumorjev s slabo prognozo [34]. Vendar pa si rezultati študij tudi glede tega polimorfizma niso enotni, saj v večji meri povezav med pojavnostjo alela T in povečanim tveganjem za razvoj raka prostate niso uspeli ugotoviti, kar so potrdili z meta analizo HuGE [23]. Pri večini opravljenih raziskav je bila frekvenca alela T prenizka, ali pa je bil ta popolnoma odsoten, zato primerjalnih analiz niso mogli opraviti [31, 32]. Prav tako še niso uspeli dokazati nobenih povezav med polimorfizmom A49T in pojavom BHP [3].

### **1.10 FARMAKOGENETIKA *SRD5A2***

Do danes je bila opravljena samo ena farmakogenetska raziskava, in še ta samo *in vitro*, kjer je Makridakis ugotavljal povezavo med polimorfizmi v genu *SRD5A2* in inhibicijo encima 5AR s finasteridom in dutasteridom. Analizirali so več polimorfizmov, ki bi lahko pomembno vplivali na zdravljenje s finasteridom in dutasteridom, tako v normalnem, kot tudi v rakavem tkivu prostate. Izbrani so bili polimorfizmi, ki bi lahko tekom zdravljenja pomembno znižali ali pa zvišali aktivnost encima in tako posledično zmanjšali ali pa povečali inhibicijo encima s katerokoli od učinkovin. Med vsemi obravnavanimi polimorfizmi sta bila tudi polimorfizma A49T in V89L.

Za obe učinkovini so dokazali, da sta počasna, časovno odvisna kompetitivna inhibitorja, a se je v tej analizi dutasterid izkazal za uspešnejšega, saj je bila konstanta inhibicije pri vseh analiziranih polimorfizmih veliko nižja kot pri finasteridu.

Večina analiziranih polimorfizmov se je odzivala na obe učinkovini, tudi V89L, vendar je bila v tem primeru inhibicija encima z dutasteridom 100 krat močnejša. Polimorfizem A49T pa je tudi ob delovanju obeh učinkovin povečal aktivnost encima, s spet več kot 100 krat šibkejšo aktivnostjo ob uporabi dutasterida. V primeru prisotnosti alela T torej lahko pride tudi ob maksimalnem učinku zdravila še vedno do prekomerne aktivnosti encima 5AR, vendar je v tem primeru kot zdravilo boljše uporabiti dutasterid [35].

## 2 NAMEN DELA

Polimorfizmi v genu *SRD5A2* lahko z zvišanjem ali znižanjem aktivnosti encima 5 $\alpha$ -reduktaza vplivajo na intraprostatično in serumsko koncentracijo DHT. V dosedanjih študijah so polimorfizma V89L in A49T v genu *SRD5A2* proučevali predvsem v povezavi z razvojem raka prostate in bistveno manj z razvojem benigne hiperplazije prostate. Prav tako nismo uspeli zaslediti še nobene *in vivo* študije, v kateri bi proučevali farmakogenetiko gena *SRD5A2*.

Namen magistrske naloge bo zato določiti pogostost polimorfizmov V89L in A49T v skupini bolnikov z benigno hiperplazijo prostate in ugotoviti vpliv obeh polimorfizmov na uspešnost zdravljenja z zdravilnima učinkovinama finasteridom in dutasteridom.

V ta namen bomo:

- iz 70 vzorcev periferne krvi, odvzetih bolnikom z benigno hiperplazijo prostate, izolirali genomsko DNA,
- izbrali ustrezne oligonukleotidne začetnike in z njimi pomnožili željeni odsek DNA z verižno reakcijo s polimerazo,
- produkte reakcije PCR inkubirali z restrikcijskima encimoma *RsaI* oziroma *MwoI* in nato s pomočjo agarozne gelske elektroforeze ali poliakrilamidne elektroforeze z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov določili genotipe,
- s statističnimi primerjalnimi metodami bomo najprej ugotavljali, ali obstaja razlika med zdravljenjem z eno ali drugo zdravilno učinkovino in
- analizirali od genotipa neodvisne in od genotipa odvisne vplive na serumске koncentracije hormonov testosterona, dihidrotestosterona in estradiola, vplive na serumsko koncentracijo albuminov in spolne hormone vezočih globulinov ter vplive na volumen prostate ter točkovno ovrednoteni IPSS vprašalnik.

### **3 EKSPERIMENTALNO DELO**

#### **3.1 OPIS VZORCEV**

Osnova za našo analizo so bili vzorci periferne krvi z dodanim EDTA odvzeti pri 70 bolnikih z benigno hiperplazijo prostate. Kri je bila bolnikom odvzeta v Splošni bolnišnici Celje, kjer je bila narejena tudi biokemijska analiza izbranih parametrov. Vsi bolniki so podpisali izjavo o privoljenju v sodelovanje v raziskavi. Raziskavo je odobrila Komisija RS za medicinsko etiko (št. 81/02/12). Bolniki so bili stari od 51 do 79 let s povprečno starostjo in standardnim odklonom  $67 \pm 7$  let. Vsi bolniki so imeli izmerjeni volumen prostate vsaj 30 mL. Polovica bolnikov je bila zdravljena s finasteridom (5 mg/dan) in polovica z dutasteridom (0,5 mg/dan).

#### **3.2 MATERIALI IN METODE**

##### **MATERIALI**

- Nastavki za polavtomatske pipete za različne volumne
- Epruvice (1,5 mL, 0,5 mL, 0,2 mL)
- Centrifugirke
- Polavtomatske pipete Eppendorf Research Plus za različne volumne
- Kadičke za pripravo agaroznega gela
- Glavnički za pripravo agaroznega gela
- Stojala za pripravo agaroznega gela
- Parafilm »M«
- Kadičke za barvanje gela

## OPREMA

- Avtoklav Steriltechnik AG Laboklav 25
- Sušilnik Heraens
- Nanodrop ND-1000
- Hladilnik H4 (Gorenje) za shranjevanje izolirane DNA in redčenih vzorcev DNA
- Hladilnik H3 (Liebherr Profiline) za shranjevanje reagentov za elektroforezo
- Hladilnik H1 (Gorenje) za shranjevanje reagentov za reakcijo PCR
- Mikrovalovna pečica (Optimo Moulinex)
- ELGA (Kemomed); aparatura za pridobivanje ultračiste vode
- Centrifuga Eppendorf 5804R
- Centrifuga Centric 150
- Vodna kopel Waterbath-Thermostat WB-4MS (Biosan)
- Vrtinčasto mešalo Biovortex V1 (Biosan)
- Mini centrifuga MCF-2360
- Tehnica Kern EW 620-3NM
- Digestorij
- Mešalnik Vibromix 314EVT
- Elektroforezne kadičke priključene na aparaturo PowerPac (Biorad)
- Naprava za slikanje gela G-BOX (Syngene)
- Kadička za poliakrilamidno gelsko elektroforezo s pripadajočimi stojali, nosilci, distančniki in glavnički (Mini-protean, Biorad)
- Ciklični pomnoževalnik C1000 Thermal Cycler (Biorad)
- Delovne komore DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-M-AR
- Centrifuga Combi-Spin FUL-2400N (Biosan)
- Zamrzovalnik (-20° C) (Liebherr Profiline) za shranjevanje vzorcev venske krvi in produktov PCR za oba polimorfizma
- Zamrzovalnik Z5 (-28° C) (Liebherr Profiline) za shranjevanje reagentov za RFLP analizo
- pH meter (Mettler Toledo)

## REAGENTI

- 3 % natrijev hipoklorit za razkuževanje površin (Gram-Mol)
- 70 % etanol in aceton za čiščenje (Merck)
- Deionizirana in ultračista voda
- Pripravljen pufer 50×TAE (tris/acetat/EDTA) za redčenje na 1×TAE
- Izopropanol (Merck)
- Agaroz (Sigma)
- Barvilo Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH)
- Pripravljen barvilo ksilencianol
- Pripravljen barvilo bromofenol modro
- DNA Molecular Weight Marker II (Promega)
- PCR Marker (Promega)
- FlexiGene DNA kit s pripadajočimi pufri in reagenti (Qiagen)
- Raztopine oligonukleotidnih začetnikov za oba polimorfizma *SRD5A2-V89L-F* in *R* ter *SRD5A2-A49T-F* in *R* (osnovne 100 μM in delovne 5 μM) (Sigma)
- Reagenti za izvedbo PCR-reakcije:
  - PCR Buffer 10× Without MgCl<sub>2</sub> (Roche)
  - Zmes dNTP (2 mM) (Roche)
  - MgCl<sub>2</sub> (25 mM) Stock Solution (Roche)
  - GC Rich Solution 5× (Roche)
  - FastStart Taq DNA Polymerase 5 U/μL (Roche)
- Reagenti za izvedbo RFLP analize:
  - NEBuffer 4 10× (New England Biolabs)
  - RsaI* 10 U/μL (New England Biolabs)
  - Buffer C 10× (Promega)
  - BSA - Bovine Serum Albumine Acetylated 10 mg/mL (Promega)
  - RsaI* 10 U/μL (Promega)
  - Buffer 3 10× (New England Biolabs)
  - MwoI* 5 U/μL (New England Biolabs)
- Pripravljen pufer 5×TBE (tris/borat/EDTA) za redčenje na 1×TBE
- Pripravljen 40 % akrilamid/bisakrilamid (37:1)
- Pripravljen 10 % amonijev persulfat (APS)
- Pripravljen N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED)

### 3.2.1 AVTOKLAVIRANJE

Pred začetkom katerega koli dela analize smo morali ves material, ki smo ga med delom potrebovali (epruvetke, nastavke za polavtomatske pipete), sterilizirati. Sterilizacijo smo izvajali pri 121° C in 1 baru nadtlaka, po končani sterilizaciji pa smo epruvetke in nastavke za polavtomatske pipete še posušili v sušilniku.

### 3.2.2 IZOLACIJA DNA

Genomsko DNA smo izolirali iz 2 mL polne krvi s pomočjo FlexiGene DNA kita, ki omogoča hitro in preprosto izolacijo DNA. Celoten postopek poteka v eni centrifugirki, kar zmanjša količino odpadnih snovi, prav tako pa se zmanjša možnost napak in zamenjav med vzorci. Komplet vsebuje lizirni pufer, denaturacijski pufer z dodanim gvanidinijevim hidrokloridom in hidratacijski pufer ter encim QIAGEN proteazo [36].

Pred začetkom izolacije smo encim QIAGEN proteazo raztopili v hidratacijskem pufru in si pripravili mešanico denaturacijskega pufra in encima (za 1 mL krvi smo zmešali 500 µL denaturacijskega pufra in 5 µL proteaze). Zamrznjeno kri smo odtalili v vodni kopeli na 37° C in homogenizirali. Vse postopke centrifugiranja smo izvajali pri 4° C.

#### **Delali smo po naslednjem postopku:**

1. Pipetiramo 5 mL lizirnega pufra v centrifugirko, dodamo 2 mL krvi in močno obračamo centrifugirko vsaj 20×, da zagotovimo čim bolj uspešno lizo celic.
2. Centrifugirke vstavimo v centrifugo in centrifugiramo 9 minut pri 2500×g. Pazljivo odlijemo supernatant in pazimo, da ne izgubimo peletke.
3. Dodamo 1 mL mešanice denaturacijski pufer/proteaza in takoj premešamo na vrtnčastem mešalu toliko časa, da se peletka čisto homogenizira.
4. Obrnemo centrifugirko 3× in inkubiramo 16 minut na 65° C pri čemer pride do spremembe barve iz rdeče v temno zeleno. V tem koraku se znebimo proteinov.
5. Dodamo 1 mL izopropanola in obračamo centrifugirko 40×, da se DNA obori.
6. Centrifugiramo 6 minut pri 2500×g in nato pazljivo odstranimo supernatant.
7. Dodamo 1 mL 70 % etanola, da speremo DNA, in mešamo na vrtnčastem mešalu, da se peletka odlepi.
8. Centrifugiramo 6 minut pri 2500×g, odstranimo supernatant in pustimo obrnjeno centrifugirko na čistem papirju, da ves etanol izpari.

9. Dodamo 400  $\mu\text{L}$  hidrationskega pufra, zmešamo na vrtnčastem mešalu na majhni hitrosti, da se peletka odlepi, in inkubiramo čez noč na  $65^\circ\text{C}$ , da se DNA raztopi.
10. Naslednji dan prestavimo centrifugirke v hladilnik za nekaj dni in nato izmerimo koncentracijo in čistost izolirane DNA.

### 3.2.3 MERJENJE KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI IZOLIRANE DNA

Koncentracijo in čistost izolirane DNA smo merili s pomočjo Nanodrop ND-1000 UV/VIS spektrofotometra. Nanodrop ND-1000 izmeri že 1  $\mu\text{L}$  vzorca z visoko točnostjo in natančnostjo. Tako majhna količina vzorca se zadrži na spodnjem podstavku zaradi njegove površinske napetosti. Območje merjenja je od 220 nm do 750 nm. Merimo lahko tudi visoko koncentrirane vzorce brez predhodnega redčenja [37].

#### **Postopek:**

1. Vsak vzorec smo najprej premešali na vrtnčastem mešalu, nato pa še centrifugirali, da smo zagotovili homogeno porazdelitev DNA.
2. Pred in po merjenju smo zgornjo ročico in spodnji podstavek aparature vedno očistili z deionizirano vodo, prav tako pa smo deionizirano vodo uporabili za merjenje absorbance slepe raztopine.
3. 1,5  $\mu\text{L}$  vsakega vzorca smo po vrsti pipetirali na spodnji podstavek, zaprli ročico in preko računalnika zagnali merjenje.
4. Po končanem merjenju smo ročico spet dvignili in obrisali spodnji ter zgornji del. S tem smo preprečili kontaminacijo med vzorci.

Dobili smo podatke o absorbanci vzorcev pri 260 nm in 280 nm, razmerje absorbanc 260/280 in 260/230 ter podatek o koncentraciji posameznega vzorca. Razmerje 260/280 nam da podatek o čistosti DNA, mora pa biti v mejah med 1,7 in 1,9 [37].

### 3.2.4 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO - PCR

PCR je *in vitro* metoda za sintezo nukleinskih kislin, s katero lahko v kratkem času sintetiziramo veliko število kopij želenega odseka DNA s pomočjo encima DNA-polimeraza. Zaradi tega za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca, kar pomeni bistveno prednost PCR pred klasičnimi tehnikami molekularne biologije, kjer analiziramo nepomnoženo DNA oziroma RNA in potrebujemo večje količine celic ali tkiv [38].



Izvajali smo PCR z vročim začetkom, kjer smo uporabili DNA-polimerazo, ki se je aktivirala šele v stopnji začetne denaturacije. Tako smo preprečili nespecifično pomnoževanje pri nižjih temperaturah.

**Za uspešen potek reakcije PCR potrebujemo:**

- vzorec DNA, ki služi kot matrica,
- dva oligonukleotidna začetnika,
- zmes enakih koncentracij deoksinukleozid-trifosfatov (dNTP),
- ione magnezija,
- reakcijski pufer in
- termostabilno DNA-polimerazo.

Reakcija poteka verižno. Vsak cikel je sestavljen iz denaturacije pri 94° C, prileganja oligonukleotidnih začetnikov in izgrajevanja komplementarne verige pri temperaturi 72° C, ki je optimalna temperatura za delovanje encima. Pred prvim ciklom izvedemo še začetno denaturacijo pri 95° C in po zadnjem ciklu še zaključno podaljševanje pri 72° C, da se vsi produkti sintetizirajo do konca. Pri vsaki ponovitvi cikla se število kopij pomnoževanega odseka podvoji. PCR izvajamo v natančnih cikličnih pomnoževalnikih, ki jih je mogoče programirati. Določimo lahko temperaturo, trajanje inkubiranja in število ponovitev ciklov. Po končani reakciji produkte analiziramo z elektroforezo na 2 % agaroznem gelu [38].

Reakcijsko zmes smo pripravljali v delovni komori, da smo se izognili kontaminaciji reagentov in vzorcev (Tabeli IV in VI). PCR-reakcijo smo izvajali s pomočjo cikličnega pomnoževalnika C1000 Thermal Cycler (Tabeli V in VII).

Tabela IV: Reakcijska zmes za PCR-reakcijo enega vzorca za polimorfizem V89L.

Sestavina (začetna koncentracija)	V (µL)	Končna koncentracija
Voda	6,33	
PCR Buffer Without MgCl <sub>2</sub> (10×)	2,00	1×
Zmes dNTP (2 mM)	2,00	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> Stock Sol. (25 mM)	1,60	2,0 mM
<i>SRD5A2</i> -V89L-F (5 µM)	1,60	0,4 µM
<i>SRD5A2</i> -V89L-R (5 µM)	1,60	0,4 µM
GC Rich Sol. (5×)	4,00	1×
FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/µL)	0,20	1 U/µL
DNA (100 ng/µL)	0,67	3,35 ng/µL
SKUPAJ	20	

Tabela V: Pogoji poteka reakcije PCR za polimorfizem V89L.

Temperatura (° C)	Čas	Ponovitve	Stopnja reakcije
95	4 min	1×	Začetna denaturacija
94	30 s	36×	Denaturacija v posameznih ciklih
66	30 s		Prileganje oligonukleotidnih začetnikov
72	30 s		Podaljševanje
72	7 min	1×	Zaključno podaljševanje

Tabela VI: Reakcijska zmes za PCR-reakcijo enega vzorca za polimorfizem A49T.

Sestavina (začetna koncentracija)	V (μL)	Končna koncentracija
Voda	5,93	
PCR Buffer Without MgCl <sub>2</sub> (10×	2,00	1×
Zmes dNTP (2 mM)	2,00	0,2 mM
MgCl <sub>2</sub> Stock Sol. (25 mM)	2,00	2,5 mM
<i>SRD5A2</i> -A49T-F (5 μM)	1,60	0,4 μM
<i>SRD5A2</i> -A49T-R (5 μM)	1,60	0,4 μM
GC Rich Sol. (5×	4,00	1×
FastStart Taq DNA Polymerase (5 U/μL)	0,20	1 U/μL
DNA (100 ng/μL)	0,67	3,35 ng/μL
SKUPAJ	20	

Tabela VII: Pogoji poteka reakcije PCR za polimorfizem A49T.

Temperatura (° C)	Čas	Ponovitve	Stopnja reakcije
95	4 min	1×	Začetna denaturacija
94	30 s	36×	Denaturacija v posameznih ciklih
64	30 s		Prileganje oligonukleotidnih začetnikov
72	30 s		Podaljševanje
72	7 min	1×	Zaključno podaljševanje

### 3.2.5 AGAROSNA GELSKA ELEKTROFOREZA

Je metoda za ločevanje DNA ali RNA molekul glede na njihovo velikost. Ker imajo molekule nukleinskih kislin negativen naboj, se premikajo skozi gel v električnem polju proti pozitivno nabiti elektrodi (anodi). Krajše molekule potujejo hitreje in dlje od daljših, saj se lažje premikajo skozi pore v gelu in imajo manjši upor. Na hitrost potovanja vpliva še oblika molekule in koncentracija agaroze v gelu. Tako lahko pri večji koncentraciji agaroze lažje ločimo manjše molekule, saj se hitrost potovanja zmanjša. Pri poteku elektroforeze moramo spremljati tudi napetost v električnem polju, saj DNA potuje hitreje ob višji napetosti, prav tako pa pri višji napetosti lahko pride tudi do segrevanja gela [39].

Agarozno elektroforezo smo uporabili za detekcijo izolirane DNA, za produkte PCR pri obeh polimorfizmih in za analizo fragmentov RFLP analize pri polimorfizmu V89L.

### Priprava agaroznega gela:

Agaroz je linearni polisaharid, topen v vroči vodi oziroma ustreznem puftru, ki pri ohlajanju polimerizira in tvori gel. Pri delu smo uporabili 2, 3 in 4 % gel (Tabela VIII).

Tabela VIII: Sestava agaroznega gela glede na koncentracijo agaroze.

	2 %	3 %	4 %
AGAROZA	1,50 g	2,25 g	3,00 g
1×TAE PUFER	75 mL	75 mL	75 mL
BARVILO MIDORI GREEN	2 μL	3 μL	Barvamo naknadno

Gel smo pripravljali v digestoriju s pomočjo posebno oblikovanih nosilcev, kadičk in glavničkov. V erlenmajerici smo zmešali predpisano količino agaroze in 1×TAE pufr ter zmes segrevali v mikrovalovni pečici do vrenja, oziroma toliko časa, da smo dobili bistro in homogeno raztopino. Nato smo dodali barvilo Midori Green, raztopino vlili v pripravljeno kadičko ter vstavili glavničke in pustili pol ure, da se je gel strdil. Barvilo lahko dodamo pred strjevanjem gela ali pa gel po končani elektroforezi naknadno barvamo v pripravljeno raztopino barvila, da lahko nato detektiramo lise DNA v gelu s pomočjo UV svetlobe. Midori Green namreč pod ultravijolično svetlobo fluorescira.

Za barvanje po končani elektroforezi smo si pripravili raztopino barvila z 20 μL barvila Midori Green in 100 mL 1×TAE pufr. Gel smo postavili v plastično kadičko, ga prelili z raztopino barvila in zaščitili pred svetlobo ter vse skupaj stresali 30 minut, nato pa slikali.

### Nanos vzorcev na gel:

Strjen gel smo položili v elektroforezno kadičko in ga prelili s pufrom 1×TAE. Vse vzorce smo pred nanosom premešali na vrtinčastem mešalu in centrifugirali. Vzorce smo nanašali s pomočjo dveh nanašalnih barvil; pri detekciji izolirane DNA smo uporabili nanašalni pufer bromofenol modro, pri analizi produktov PCR-reakcije za oba polimorfizma in RFLP

analizi polimorfizma V89L pa smo uporabili nanašalni pufer ksilencianol. Nanašalni pufri so uporabni, ker so vidni pod naravno svetlobo, se vežejo v DNA verigo in z njo kosedimentirajo, kar pomeni, da se premikajo z enako hitrostjo kot DNA določene dolžine. Tako bromofenol modro potuje enako hitro kot fragmenti v velikosti 300 bp, ksilencianol pa potuje enako hitro kot fragmenti v velikosti 5000 bp. Velikost fragmentov izolirane DNA smo določili s pomočjo DNA Molecular Weight Markerja II, velikost fragmentov pri analizi produktov PCR-reakcije in RFLP analize pa smo določili s pomočjo PCR Markerja, ki razlikuje med fragmenti velikostnih redov 1000 - 750 - 500 - 300 - 150 - 50.

Na parafilmu smo si pripravili kapljice nanašalnega pufra, nato pa smo na vsako kapljico dodali še 2  $\mu$ L našega vzorca, premešali in previdno nanесли v žepke na gelu. Pri analizi produktov RFLP analize smo v žepke nanесли celotno količino vzorca. V zadnji žepki smo dodali še označevalec velikosti, prav tako pomešan z nanašalnim barvilom.

#### **Pogoji poteka elektroforeze:**

Vse elektroforeze so potekale po enakem postopku, spreminjali smo le napetost v električnem polju in čas potovanja. Za vse vzorce izolirane DNA je elektroforeza potekala pri napetosti 100 V 30 minut. Za analizo produktov PCR-reakcije obeh polimorfizmov smo izvajali elektroforezo pri 90 V 20 minut, za detekcijo fragmentov RFLP analize polimorfizma V89L pa smo elektroforezo izvajali pri napetosti 90 V 90 minut.

#### **Slikanje gela:**

Po končani elektroforezi smo odstranili gel iz elektroforezne kadičke in ga odcedili ter vstavili v aparat G-BOX, ki nam je s pomočjo izbrane osvetlitve »Transiluminator« fotografiral gel. Pri slikanju smo spreminjali le željeno število slik in čas osvetlitve.

#### **3.2.6 ANALIZA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV - RFLP**

RFLP je metoda za ugotavljanje že znanih sprememb v nukleotidnem zaporedju. Po predhodni pomnožitvi odseka DNA, ki obsega restrikcijsko mesto, kot rezultat cepitve molekule DNA, nastanejo fragmenti različnih dolžin. Nastale fragmente ločimo na agaroznem ali poliakrilamidnem gelu obarvanim z barvilom, ki nam omogoča vizualizacijo lis [40]. Sestava restrikcijske zmesi za oba polimorfizma je opisana v tabelah IX in X.

Tabela IX: Sestava restrikcijske zmesi za polimorfizem V89L.

Sestavina (začetna koncentracija)	V ( $\mu$ L)	Končna koncentracija
Voda	8,85	
Buffer C (10 $\times$ )	1,50	1 $\times$
BSA (10 mg/mL)	0,15	0,1 mg/mL
<i>Rsa</i> I (10 U/ $\mu$ L)	0,50	5 U/ $\mu$ L
PCR produkt	4,00	
SKUPAJ	15	

Tabela X: Sestava restrikcijske zmesi za polimorfizem A49T.

Sestavina (začetna koncentracija)	V ( $\mu$ L)	Končna koncentracija
Voda	8,5	
NEBuffer 3 (10 $\times$ )	1,5	1 $\times$
<i>Mwo</i> I (5 U/ $\mu$ L)	1,0	5 U/ $\mu$ L
PCR produkt	4,0	
SKUPAJ	15	

### 3.2.7 POLIAKRILAMIDNA GELSKA ELEKTROFOREZA - PAGE

PAGE uporabljamo za ločevanje manjših fragmentov DNA (5 - 500 bp). S to metodo lahko dosežemo zelo veliko ločljivost fragmentov in ločimo celo molekuli, ki se razlikujeta za 1 bp. Osnovni gradnik poliakrilamidnih gelov je akrilamid. Polimerizacija akrilamida poteče v prisotnosti prostih radikalov, katerih vir je običajno 10 % amonijev persulfat, stabilizira pa jih TEMED. Če v polimerizacijsko reakcijo vključimo bifunkcionalni reagent N,N'-metilenbisakrilamid, se poliakrilamidne verige prečno povežejo in tvorijo gel [39]. Rezultate RFLP analize smo detektirali na 12 % gelu z debelino 1,5 mm, brez dodanega barvila, ki ima eno molekulo bisakrilamida na 37 molekul akrilamida (Tabela XI).

Tabela XI: Sestava zmesi za 12 % poliakrilamidni gel.

Sestavina	Volumen
40 % akrilamid/bisakrilamid (37:1)	3,0 mL
5 $\times$ TBE pufer	1,0 mL
Ultračista voda	do 10 mL
10 % APS	85 $\mu$ L
TEMED	4 $\mu$ L

Gel smo vlili med stekleni plošči, vzorce pa smo nanašali z vrha. Za določitev velikosti posameznih fragmentov smo uporabili PCR Marker. Elektroforeza je potekala v 0,5×TBE pufri pri napetosti 200 V 60 minut. Po končani elektroforezi smo gel naknadno barvali 20 minut z raztopino barvila Midori Green (20 µL barvila in 100 mL 1×TAE pufra).

### 3.2.8 STATISTIČNA ANALIZA PODATKOV

Vsi podatki so bili analizirani s programom IBM SPSS verzija 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, Illinois). Dobljene frekvence genotipov obeh polimorfizmov smo najprej testirali, ali so v skladu z Hardy-Weinbergovim ravnotežjem, nato pa še s  $\chi^2$  testom preverili ali se naši dobljeni rezultati statistično pomembno razlikujejo od evropskega povprečja.

Da bi ovrednotili morebitni vpliv polimorfizmov V89L in A49T na zdravljenje, smo si za analizo izbrali naslednje klinične parametre: serumske koncentracije hormonov DHT, T in estradiola, volumen prostate, serumske koncentracije albuminov in SHBG ter s točkami ovrednoteni IPSS vprašalnik, izračunali pa smo še delež prostega testosterona (F-AI) po enačbi:

$$F - AI = 100 \times \frac{T_{tot}}{SHBG}, \quad \text{Enačba 1,}$$

kjer  $T_{tot}$  pomeni celotno koncentracijo testosterona (biorazpoložljiv in vezan na proteine),  $SHBG$  pa pomeni serumsko koncentracijo spolne hormone vezočih globulinov. F-AI je brez enote. Prav tako smo izračunali še razlike posameznih vrednosti kliničnih parametrov med časi po enačbah:

$$\Delta X_{-1-2} = \frac{x_1 - x_2}{x_1}, \quad \text{Enačba 2 in}$$

$$\Delta X_{-1-3} = \frac{x_1 - x_3}{x_1} \quad \text{Enačba 3,}$$

kjer X pomeni posamezni izbrani parameter,  $x_1$  pomeni vrednost izbranega parametra izmerjeno pred začetkom zdravljenja,  $x_2$  pomeni vrednost izmerjeno po pol leta zdravljenja in  $x_3$  pomeni vrednost izmerjeno po enem letu zdravljenja.

Zdravljenje smo spremljali eno leto, tako da imamo za vsak parameter narejene tri meritve: pred začetkom zdravljenja, po pol leta in po enem letu zdravljenja. Vse skupine podatkov smo najprej testirali za normalnost porazdelitve s Shapiro-Wilkovim testom. Zaradi ne-normalne porazdelitve podatkov smo vse vrednosti izbranih parametrov logaritmirali. Nato smo v primeru normalne porazdelitve logaritmiranih vrednosti parametrov uporabili enostransko ANOVO ali t-test, v primeru ne-normalne porazdelitve logaritmiranih vrednosti pa smo uporabili ne-logaritmirane vrednosti parametrov in jih analizirali s Kruskal-Wallisovim oziroma Mann-Whitneyevim testom. Če je bila vrednost  $p < 0,05$ , je bila razlika med testiranimi parametri statistično značilna.

## **4 REZULTATI IN RAZPRAVA**

### **4.1 IZOLACIJA DNA**

Celoten postopek izolacije smo morali v več korakih optimizirati, saj je bila kri pred analizo dlje časa zamrznjena in smo le tako lahko zagotovili najboljši izkoristek izolacije. Da smo lahko zagotovili ustrezno razbitje membran v prvem koraku, kjer smo lizirali celice, smo morali centrifugirko obrniti 20× in ne 5×, kot je pisalo v osnovnem protokolu. Prav tako smo morali podaljšati čas inkubacije pri 65° C z 10 na 16 minut, da smo zagotovili optimalno delovanje proteaze. Optimizacija časa in obratov centrifugiranja ni bila potrebna, saj smo uspeli pridobiti stabilne peletke in smo lahko brez večjih težav odlili supernatant. Iz vseh vzorcev smo uspešno izolirali DNA in nato izmerili koncentracije na Nanodropu. Ker so bile koncentracije DNA v posameznih vzorcih zelo različne (v razponu od 46 do 590 ng/μL), smo vse vzorce redčili na približno enako koncentracijo 100 ng/μL in s tem zagotovili optimalno koncentracijo DNA za nadaljnje raziskave. Po redčenju vzorcev smo ponovili postopek merjenja koncentracije in čistosti DNA z Nanodropom. Vsi vzorci DNA, pred in po redčenju, so bili ustrezne čistosti, saj je bilo razmerje absorbanca 260/280 vedno v območju med 1,7 in 1,9 (Priloga 7.2).

### **4.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO - PCR**

Pred izvedbo PCR smo morali izbrati ustrezne oligonukleotidne začetnike. Za čim bolj uspešno pomnoževanje obstajajo določeni napotki glede izbora začetnikov, ki smo jih poskušali čim bolj upoštevati. Oba začetnika se morata prilegati matrici DNA, med sabo pa ne smeta biti komplementarna. Najbolj ugodno za pomnoževanje je, če sta dolžine med 18 in 24 nukleotidov, razlika v temperaturi prileganja med obema pa naj ne bi bila večja od 5° C, saj le tako lahko dosežemo učinkovito prileganje obeh pri enaki temperaturi. Priporočljiva vsebnost GC nukleotidov je med 40 in 60 %, vendar moramo paziti, da ni treh zaporednih G ali C nukleotidov med zadnjimi petimi nukleotidi na 3' koncu, da se



izognemo nespecifičnemu prileganju. Prav tako se moramo izogibati več kot štirim dinukleotidnim ponovitvam kjer koli v zaporedju. Za učinkovito pomnoževanje naj bi bil zadnji nukleotid na 3' koncu G ali C, zaradi trojne vodikove vezi. Ker je učinkovitost pomnoževanja večja za krajše produkte, izbiramo začetnike tako, da PCR produkt ni daljši od 1000 bp. Navadno jih prejmemo v liofilizirani obliki in nato redčimo do koncentracije 100  $\mu$ M, iz te raztopine pa pripravimo delovne raztopine, ki so navadno 5  $\mu$ M [38].

Za izbiro ustreznih oligonukleotidnih začetnikov smo si pomagali s štirimi različnimi raziskavami, kjer so prav tako že proučevali oba polimorfizma [32, 33, 34, 41]. Izločili smo raziskavi, ki so ju opravili Cicek in sodelavci [33] ter Jaffe in sodelavci [34], saj so pri obeh za izvedbo PCR uporabili zaporedje začetnikov, ki je ob pomnožitvi odseka DNA zajelo oba polimorfizma skupaj, prav tako pa so pri uporabi restriksijskih encimov dobili zelo kratke fragmente, ki bi jih na elektroforezi težko ločili.

Za polimorfizem V89L smo tako izbrali zaporedje začetnikov, ki so ga uporabili Peters in sodelavci [41]. Za naše potrebe smo dolžino obratnosmernega začetnika skrajšali za dva nukleotida in s tem zmanjšali razliko v temperaturi prileganja med obema ter tako zagotovili uspešnejše pomnoževanje odseka DNA.

Zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje odseka s polimorfizmom V89L:

Smerni začetnik - 5'-GTGAAGGCGGCGTCTGTG-3'

Obratnosmerni začetnik - 5'-GGGCCACCTGGGACGGTA-3'

Z njima smo pomnožili zaporedje dolgo 273 baznih parov (bp):

GTGAAGGCGGCGTCTGTGccgcagccgcttgcactctctagcgtccaagccccggccccggccccgccag gtgcgccaggcaggctggcctccgcgttctcacagcgcgccacgctgcctccttggcgttctcggcgcgcgtctacgctgcg ctcctggacgccgggagcagggcagtgctgcactggcgcgccgcaagggaaaaacgtacctgtggaagtaatgtaSgca gaagaggccccagaagTACCGTCCCAGGTGGCCC
---

S črko S je označen proučevani polimorfizem. Produkt vsebuje 69,96 % GC.

Za polimorfizem A49T pa smo izbrali zaporedje začetnikov, ki so ga uporabili Li in sodelavci [32]. Ker sta obe zaporedji ustrezali, ni bilo potrebno nič spreminjati.

Zaporedje oligonukleotidnih začetnikov za pomnoževanje odseka s polimorfizmom A49T:

Smerni začetnik - 5'-ACCCTTGGGGCACTGGCCTTG-3'

Obratnosmerni začetnik - 5'-GTCAGCTCCTGCAGGAACCAG-3'

Z njima smo pomnožili zaporedje dolgo 121 baznih parov (bp):

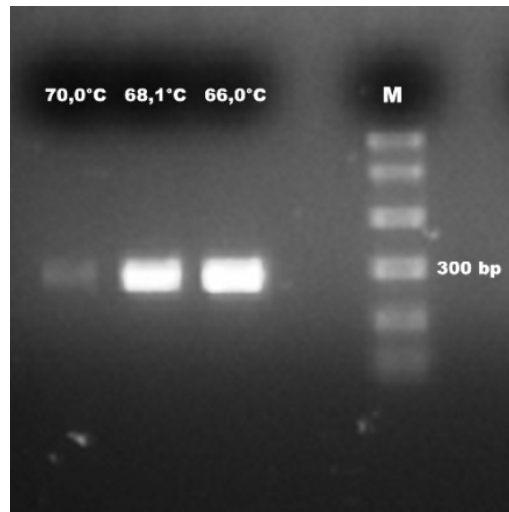
```
gCCCTTGGGGCACTGGCCTTgtacgtcgcgaagcctccggctacgggaagcacacggagagcctgaagccg  
gcggctaccgcctgccarcccgcgccgCTGGTTCCTGCAGGAGCTGcC
```

Zaporedje oligonukleotidnih začetnikov sicer v primeru dveh nukleotidov ni komplementarno z izbranim odsekom DNA (označeno z majhnimi črkami), vendar ta neskladnost ni vplivala na uspešnost pomnoževanja. S črko R je označen proučevani polimorfizem. Produkt vsebuje 71,90 % GC.

#### 4.2.1 OPTIMIZACIJA PCR-REAKCIJE ZA POLIMORFIZEM V89L

Za uspešen potek vsake PCR-reakcije moramo sestavine reakcijske zmesi in stopnje ciklov optimizirati. Najpogosteje optimiziramo koncentracijo magnezija in temperaturo prileganja začetnikov. Ker imamo velik % GC nukleotidov v obeh izbranih odsekih DNA, moramo pri pomnoževanju uporabiti še pospeševalec PCR. Odseki bogati z GC, so problematični zaradi neučinkovite denaturacije DNA ali nastanka sekundarnih struktur začetnikov, kar zmanjša učinkovitost prileganja. Kot pospeševalec v primeru odsekov, bogatih z GC, lahko uporabimo betain, dimetilsulfoksid (DMSO), formamid ali sečnino [38]. V našem primeru smo kot pospeševalec uporabili komercialno dostopno mešanico - »GC rich solution« in tako zagotovili ustrezno pomnoževanje ter zadostno količino produkta.

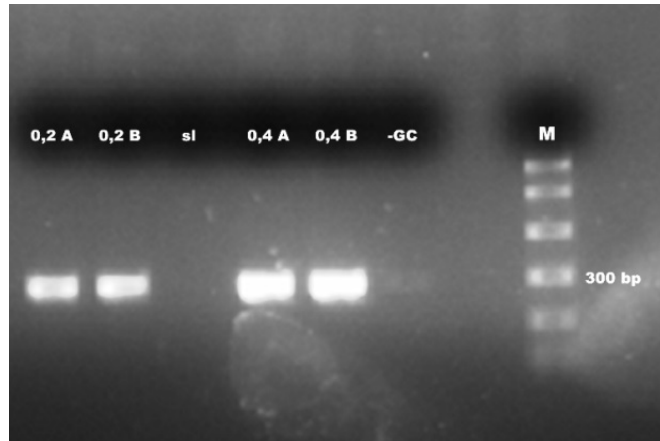
- Najprej smo izvedli gradientno PCR-reakcijo s pomočjo cikličnega pomnoževalnika C1000 Thermal Cycler, da smo lahko določili najbolj ustrezno temperaturo prileganja oligonukleotidnih začetnikov. Izbrali smo naslednje temperature prileganja: 65° C, 63,3° C, 59° C in 55,7° C. Ker pri izbranih temperaturah ni bilo vidnih razlik med lisami in so bile vse zelo močne, smo enak postopek ponovili pri treh višjih temperaturah, kar prikazuje slika 7. Kot lahko vidimo, je najnižja temperatura, pri kateri smo še dobili zadostno količino produkta in dovolj jasne lise 66° C. Vse nadaljnje reakcije smo zato izvajali pri tej temperaturi. V tej stopnji optimizacije smo dokazali tudi, da je 36 ponovitev cikla dovolj za uspešen potek reakcije. Pogoji za potek reakcije so bili enaki, kot so opisani na strani 23 in jih nismo spreminjali v nobeni stopnji optimizacije. V reakcijski zmesi smo uporabili koncentracijo magnezija 2,5 mM, vse ostale koncentracije pa so bile enake, kot so opisane na strani 22.



Slika 7: Elektroforeza gradientne PCR-reakcije za polimorfizem V89L.

(2 % agarozna, 90 V 20 minut).

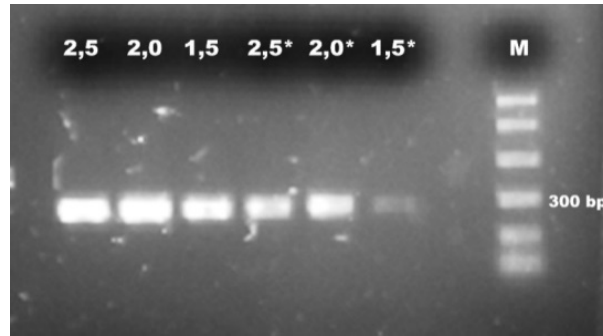
- V naslednjem koraku smo poskušali optimizirati koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov. Pri visokih koncentracijah začetnikov se namreč poveča možnost nespecifičnega prileganja, pri prenizkih koncentracijah pa se močno zmanjša izkoristek reakcije [38]. Zanimalo nas je, ali bi lahko namesto 0,4  $\mu\text{M}$  uporabili koncentracijo začetnikov 0,2  $\mu\text{M}$ . V istem koraku smo preverili še, če bi lahko reakcijo izvajali brez dodatka pospeševalca »GC rich solution«, ki je dodan med reagentne reakcijske zmesi zaradi visokega % GC nukleotidov v pomnoženem odseku DNA. Rezultat pomnoževanja je prikazan na sliki 8. Koncentracija magnezija je bila 2,5 mM, ostale koncentracije pa so bile enake, kot so opisane na strani 22. Kot lahko vidimo na sliki 8, smo pri nižji koncentraciji začetnikov dobili slabši izkoristek reakcije in posledično tudi manj produkta. Odločili smo se, da bomo nadaljnje reakcije izvajali pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov 0,4  $\mu\text{M}$ . Dokazali smo tudi, da se reakcije brez dodatka pospeševalca »GC rich solution« ne da izpeljati, saj v tej reakcijski zmesi nismo dobili nobenega produkta.



Slika 8: Optimizacija koncentracije oligonukleotidnih začetnikov za polimorfizem V89L.

Uporabili smo dva različna vzorca DNA in ju pomnožili pri koncentracijah začetnikov 0,2  $\mu\text{M}$  in 0,4  $\mu\text{M}$  (2 % agarozna, 90 V 20 minut).

- Nazadnje smo izvedli še optimizacijo koncentracije magnezijevega klorida. Ioni magnezija delujejo kot kofaktor encima, saj omogočajo sintezo verige DNA s stabilizacijo interakcije med encimom DNA-polimerazo in matrico. Če je koncentracija magnezija prenizka, dobimo slabši izkoristek reakcije, če pa je previsoka, pa encim deluje manj specifično [38]. Reakcijo smo izvajali pri koncentracijah magnezijevega klorida 2,5 mM, 2,0 mM in 1,5 mM, pri obeh koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov (0,2  $\mu\text{M}$  in 0,4  $\mu\text{M}$ ), da bi preverili, ali bi morda ob nižji koncentraciji začetnikov z drugačno koncentracijo magnezija dobili boljše rezultate. Rezultati so prikazani na sliki 9. V reakcijski zmesi smo spreminjali koncentracijo magnezija in začetnikov, ostale koncentracije pa so bile enake, kot so opisane na strani 22. Koncentracije magnezija označene z \* označujejo reakcijo PCR izvedeno s koncentracijo začetnikov 0,2  $\mu\text{M}$ . Vidimo lahko, da je bila pri nižji koncentraciji začetnikov količina produkta še vedno slabša, ne glede na spreminjanje koncentracije magnezija. Torej smo še enkrat potrdili, da moramo za nadaljnje pomnoževanje uporabljati višjo koncentracijo začetnikov. Na podlagi slike 9 smo se odločili, da bomo za vse nadaljnje PCR-reakcije uporabljali koncentracijo magnezijevega klorida 2,0 mM, saj smo v tem primeru dobili najbolj jasno in še vedno dovolj močno liso produkta.



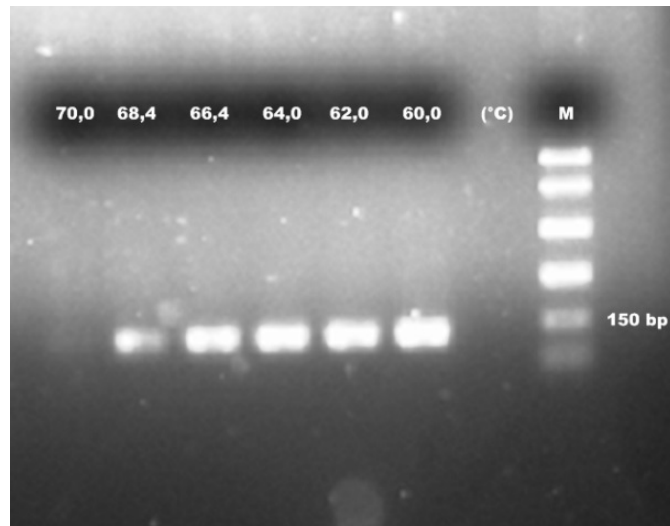
Slika 9: Optimizacija koncentracije magnezija za polimorfizem V89L.

Koncentracije magnezija označene z \* označujejo reakcijo PCR izvedeno s koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov  $0,2 \mu\text{M}$  (2 % agaroz, 90 V 20 minut).

Končni postopek poteka reakcije PCR in sestava reakcijske zmesi sta opisana na straneh 22 in 23. Uspešno smo pomnožili vseh 70 vzorcev in jih nadalje uporabili za RFLP analizo.

#### 4.2.2 OPTIMIZACIJA PCR-REAKCIJE ZA POLIMORFIZEM A49T

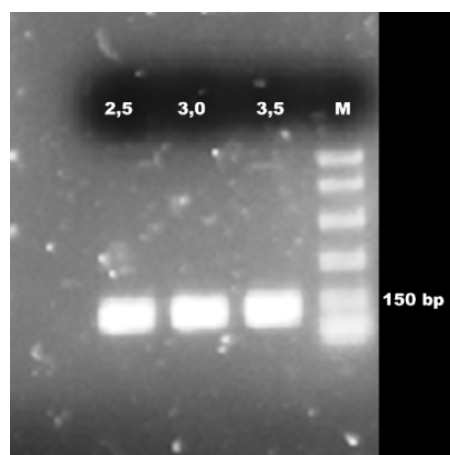
- Pri prvi izvedbi PCR smo izbrali enako koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov ( $0,4 \mu\text{M}$ ) in magnezijevega klorida ( $2,0 \text{ mM}$ ) kot smo jo uporabili pri polimorfizmu V89L, ostale koncentracije pa so bile enake, kot je opisano na strani 23. Izvedli smo gradientno PCR-reakcijo s pomočjo cikličnega pomnoževalnika C1000 Thermal Cycler, da smo lahko določili najbolj ustrezno temperaturo prileganja začetnikov. Izbrali smo naslednje temperature prileganja:  $70^\circ \text{ C}$ ,  $68,4^\circ \text{ C}$ ,  $66,4^\circ \text{ C}$ ,  $64^\circ \text{ C}$ ,  $62^\circ \text{ C}$  in  $60^\circ \text{ C}$ . Na podlagi slike 10 smo se odločili, da je najprimernejša temperatura za izvajanje reakcije  $64^\circ \text{ C}$ . Tudi tukaj smo dokazali, da po 36 ponovitvah cikla dobimo dovolj produkta. Pogoji za potek reakcije so bili enaki kot so opisani na strani 23 in jih nismo spreminjali v nobeni stopnji optimizacije.



Slika 10: Elektroforeza gradientne PCR-reakcije za polimorfizem A49T.

(2 % agarosa, 90 V 20 minut).

- V drugi stopnji pa smo se lotili še optimizacije koncentracije magnezija in preverili, ali bi ob višji koncentraciji dobili boljši rezultat pomnoževanja. Reakcijo smo izvedli pri koncentracijah magnezija 2,5 mM, 3,0 mM in 3,5 mM, ostale koncentracije pa so bile enake, kot so opisane na strani 23. Na sliki 11 lahko vidimo, da smo pri višji koncentraciji magnezija dobili več produkta in bolj jasne lise. Ker smo že pri najnižji izbrani koncentraciji dobili dovolj produkta, smo se odločili za slednjo. Vse nadaljnje reakcije smo zato izvajali pri koncentraciji magnezija 2,5 mM.



Slika 11: Optimizacija koncentracije magnezija za polimorfizem A49T.

(2 % agarosa, 90 V 20 minut).

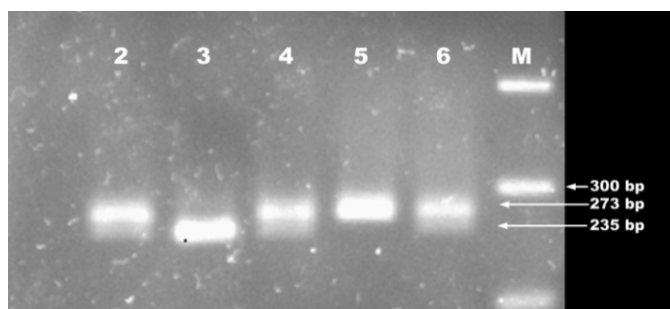
Končni postopek poteka reakcije PCR in sestava reakcijske zmesi sta opisana na strani 23. Uspešno smo pomnožili vseh 70 vzorcev in jih nadalje uporabili za RFLP analizo.

### 4.3 ANALIZA DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV - RFLP

RFLP analizo smo izvajali ločeno za vsak polimorfizem posebej. Ustrezne produkte PCR reakcije smo pred analizo odmrznili in centrifugirali, da smo zagotovili homogenost vzorcev. Za polimorfizem V89L smo uporabili restriksijsko endonukleazo *RsaI*, ki prepozna restriksijsko mesto gt/ac. V našem primeru je encim torej prepoznal nemutirano aminokislino valin (nukleotid C), tako da smo v primeru nemutiranega homozigota dobili fragment v velikosti 235 bp. V primeru mutacije na mestu 89 pa je prišlo do spremembe aminokislina valin v levcin (nukleotid C → nukleotid G) in posledično do ukinitve restriksijskega mesta, tako da smo dobili samo en fragment dolžine 273 bp. V primeru heterozigota V/L smo dobili dva fragmenta v velikosti 235 in 273 bp.

#### 4.3.1 OPTIMIZACIJA RFLP ANALIZE ZA POLIMORFIZEM V89L

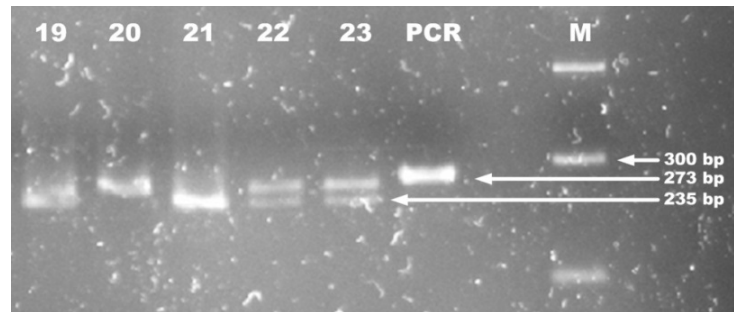
- V prvem koraku smo RFLP analizo izvedli z reagenti proizvajalca New England Biolabs (NEB). Celotno zmes smo inkubirali čez noč na vodni kopeli pri 37° C in naslednji dan analizirali na 3 % agarozni elektroforezi. Rezultat analize je prikazan na sliki 12. Uporabili smo 1,5 µL NEBuffer 4 10×, brez dodanega BSA. Dobili smo zelo nejasno sliko s slabo ločenimi fragmenti, zato smo se odločili, da bomo za nadaljnje analize uporabljali 4 % agarozni gel. Ker pa smo v tej stopnji uporabili nekoliko starejši encim, rezultati niso bili željene kakovosti, zato smo se odločili, da preizkusimo še encim drugega proizvajalca.



Slika 12: Prva stopnja optimizacije RFLP analize za polimorfizem V89L.

(3 % agarozna, 90 V 90 minut).

- V naslednjem koraku smo se odločili, da bomo uporabili reagente proizvajalca Promega, kjer je bil v reakcijsko zmes dodan še BSA za večjo stabilizacijo. Sestava reakcijske zmesi je opisana na strani 26. Na sliki 13 lahko vidimo, da smo v tem primeru dobili bolj jasne in lepše ločene posamezne fragmente, zato smo za nadaljnje analize uporabljali reagente proizvajalca Promega.



Slika 13: Druga stopnja optimizacije RFLP analize za polimorfizem V89L.

(4 % agarosa, 90 V 90 minut).

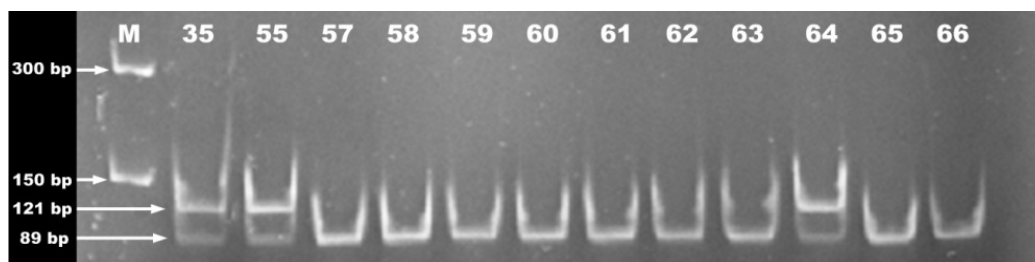
Uspešno smo določili genotip vsem 70 vzorcem (Priloga 7.3).

#### 4.3.2 OPTIMIZACIJA RFLP ANALIZE ZA POLIMORFIZEM A49T

Za polimorfizem A49T pa smo uporabili restriksijsko endonukleazo *MwoI*, ki prepozna restriksijsko mesto gcnnnnn/nngc. V našem primeru je encim torej prepoznal nemutirano aminokislino alanin (nukleotid G), tako da smo v primeru nemutiranega homozigota dobili fragment v velikosti 89 bp. V primeru mutacije na mestu 49, pa je prišlo do ukinitve restriksijskega mesta zaradi spremembe aminokislinske alanin v treonin (nukleotid G → nukleotid A), tako da smo dobili samo en fragment dolžine 121 bp. V primeru heterozigota A/T smo dobili dva fragmenta v velikosti 89 in 121 bp.

Celotno zmes smo inkubirali čez noč na vodni kopeli pri temperaturi 60° C, nato pa smo vzorce analizirali s pomočjo poliakrilamidne gelske elektroforeze. Restriksijski fragmenti pri analizi tega polimorfizma so namreč nekoliko krajši in jih zaradi tega na agarozni ne bi mogli dovolj dobro ločiti. Sestava reakcijske zmesi je opisana na strani 26. RFLP analizo smo izvajali z reagenti proizvajalca New England Biolabs in že pri prvi analizi dobili ustrezno ločene fragmente, zato optimizacija postopka ni bila potrebna (Slika 14).





Slika 14: Rezultati RFLP analize za polimorfizem A49T.

(12 % poliakrilamid, predelektroforeza: 200 V 5 minut, elektroforeza: 200 V 60 minut).

Pri vseh analiziranih vzorcih smo lahko brez težav določili genotip (Priloga 7.4).

#### 4.4 REZULTATI GENOTIPIZACIJE

Tabela XII: Frekvence genotipov pri polimorfizmu V89L.

Podatki o evropskem povprečju povzeti po [30].

GENOTIP	ŠT. VZORCEV	%	% v Evropi
NEMUTIRANI HOMOZIGOT V/V	24	34,3	50,1
HETEROZIGOT V/L	35	50,0	40,9
MUTIRANI HOMOZIGOT L/L	11	15,7	9,0

Frekvence genotipov so v skladu z Hardy-Weinbergovim ravnotežjem ( $p = 0,899$ ). Če primerjamo naše dobljene frekvence s tistimi, ki veljajo v povprečju za Evropo, lahko vidimo, da smo dobili za 9,1 % večji delež heterozigotov V/L in za 6,7 % večji delež mutiranih homozigotov L/L ter posledično za 15,8 % manjši delež nemutiranih homozigotov V/V (Tabela XII). Razlike med frekvencami genotipov so bile statistično značilno različne ( $\chi^2$  test,  $p = 0,012$ ). Glede na to, da so podatki o evropskem povprečju podani na splošno za zdravo populacijo, mi pa smo naše rezultate pridobili na vzorcu moških obolelih za benigno hiperplazijo prostate, smo pričakovali, da bo pri primerjavi prišlo do določenega odstopanja. Obstaja tudi možnost, da je polimorfizem V89L bolj pogosto prisoten pri obolelih za benigno hiperplazijo prostate, vendar tega nismo mogli preveriti, saj nismo imeli kontrolne skupine zdravih moških za primerjavo. Na odstopanja bi prav tako lahko vplival tudi številčno majhen vzorec.

Tabela XIII: Frekvence genotipov pri polimorfizmu A49T.

Podatki o evropskem povprečju povzeti po [30].

<b>GENOTIP</b>	<b>ŠT. VZORCEV</b>	<b>%</b>	<b>% v Evropi</b>
NEMUTIRANI HOMOZIGOT A/A	67	95,7	92,9
HETEROZIGOT A/T	3	4,3	7,1
MUTIRANI HOMOZIGOT T/T	0	0	/

Frekvence genotipov niso v skladu z Hardy-Weinbergovim ravnotežjem ( $p = 0,009$ ), kar je bilo pričakovano, saj smo dobili samo tri heterozigote. Pri primerjavi z evropskim povprečjem vidimo, da imamo za 2,8 % večji delež nemutiranih homozigotov A/A in za isti % manjši delež heterozigotov A/T (Tabela XIII), vendar v tem primeru razlike med frekvencami genotipov niso bile statistično značilno različne ( $\chi^2$  test,  $p = 0,353$ ).

#### **4.5 PRIMERJAVA ZDRAVLJENJA BHP S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM**

Pri volumnu prostate, koncentraciji albuminov in IPSS vprašalniku po logaritmiranju vrednosti še vedno nismo dobili normalnega porazdeljevanja, zato smo za analizo uporabili ne-logaritmirane vrednosti in Kruskal-Wallisov test, pri ostalih parametrih pa smo analizirali logaritmirane vrednosti z enostransko ANOVO. Pri analizi razlik posameznih vrednosti parametrov pa smo pri koncentraciji DHT, SHBG in estradiola ter pri IPSS vprašalniku zaradi ne-normalnega porazdeljevanja vrednosti uporabili Mann-Whitneyev test, ostale parametre pa smo analizirali s t-testom.

Najprej nas je zanimalo, ali obstajajo značilne razlike med učinkovinama. Vse parametre smo analizirali glede na to, ali so bolniki prejeli finasterid ali dutasterid, saj bi v primeru razlik med učinkovinama, skupini potem razdelili še glede jemanja določenega zdravila. Glede na že opravljene raziskave smo pričakovali, da bo pri bolnikih zdravljenih z dutasteridom, zmanjšanje serumske koncentracije DHT nekoliko večje [21, 35]. Vendar pa naša analiza ni pokazala nobenih statistično značilnih razlik med učinkovinama ( $p > 0,05$  pri vseh parametrih), tako po pol leta zdravljenja, kot tudi po enem letu (Tabela XIV).

Tabela XIV: Analiza kliničnih parametrov v odvisnosti od obeh učinkovin.

(FI-finasterid, DU-dutasterid, VP-volumen prostate, DHT-koncentracija dihidrotestosterona, IPSS-vprašalnik, T-koncentracija testosterona, F-AI-delež prostega testosterona, SHBG-koncentracija spolne hormone vezočih globulinov, ALB-koncentracija albuminov, E-koncentracija estradiola, 1-izmerjena vrednost parametra pred začetkom zdravljenja, 2- po pol leta zdravljenja, 3-po enem letu zdravljenja).

Parameter	Mediana		25. percentil		75. percentil		p vrednost
	FI	DU	FI	DU	FI	DU	
VP 1	44,5	40,0	40,0	35,0	50,0	54,0	0,532
VP 2	35,0	30,0	28,0	28,0	39,3	37,5	0,281
VP 3	30,0	28,0	25,0	25,0	35,3	35,0	0,639
DHT 1	1,126	1,380	0,660	0,942	1,678	1,896	0,134
DHT 2	0,251	0,258	0,159	0,149	0,497	0,698	0,548
DHT 3	0,236	0,189	0,132	0,112	0,374	0,397	0,973
IPSS 1	14,5	14,0	10,8	11,0	18,3	18,5	0,654
IPSS 2	10,5	10,0	7,0	6,0	14,0	12,5	0,309
IPSS 3	8,0	6,0	5,8	4,0	10,0	11,0	0,333
T 1	14,2	15,4	12,0	13,3	18,6	19,3	0,178
T 2	16,5	17,8	12,8	14,7	19,6	24,4	0,105
T 3	16,0	17,3	12,7	14,7	21,1	23,4	0,102
F-AI 1	31,7	32,6	28,5	25,8	41,6	42,4	0,383
F-AI 2	36,0	38,7	33,2	31,1	43,5	53,2	0,856
F-AI 3	39,7	40,5	32,8	32,5	47,4	50,2	0,616
SHBG 1	43,3	43,0	33,7	37,1	59,3	59,7	0,086
SHBG 2	41,9	44,1	34,2	36,0	56,1	60,3	0,204
SHBG 3	42,1	45,7	35,4	36,5	51,8	58,7	0,348
ALB 1	46,0	47,0	43,8	44,0	47,0	48,0	0,084
ALB 2	46,0	47,0	44,0	46,0	48,0	48,0	0,468
ALB 3	45,0	45,0	43,8	43,5	47,0	46,0	0,770
E 1	0,08	0,07	0,07	0,06	0,09	0,09	0,520
E 2	0,10	0,11	0,08	0,08	0,11	0,14	0,207
E 3	0,13	0,13	0,10	0,11	0,15	0,15	0,836

Vrednosti nobenega izmed izbranih kliničnih parametrov se niso pomembno razlikovale glede jemanja finasterida ali dutasterida. Z analizo torej nismo uspeli potrditi, da se inhibicija obeh tipov encima z dutasteridom izkaže za bolj učinkovito, zato skupine nismo delili še glede jemanja določene učinkovine. Pri volumnu prostate lahko potegnemo vzporednice s študijo EPICS [22] in s študijo II. faze preizkušanja zdravil [21], kjer prav tako niso dobili nobenih razlik med učinkovinama. Ostalih parametrov do sedaj še niso analizirali v nobeni študiji, ki bi primerjala obe učinkovini med sabo, zato naših rezultatov ne moremo primerjati z drugimi raziskavami.

Glede na to, da je BHP heterogena in napredujoča bolezen, verjetno eno leto opazovanja in spremljanja zdravljenja ni dovolj za podajanje kakršnih koli pomembnih ugotovitev glede razlik med učinkovinama. V kliničnih študijah, ki so trajale več let [10, 14, 19], so ugotovili, da se lahko izboljšanje tekom spremljanja zdravljenja še nadaljuje. Tako lahko na podlagi tega predpostavimo možnost, da se morebitne razlike v zdravljenju z eno ali drugo učinkovino izrazijo šele po več kot enem letu opazovanja.

#### **4.6 VPLIV ZDRAVLJENJA NA IZBRANE PARAMETRE NEODVISNO OD GENOTIPOV**

##### **4.6.1 UGOTAVLJANJE USPEŠNOSTI ZDRAVLJENJA NA PODLAGI SPREMENB V VOLUMNU PROSTATE, SERUMSKI KONCENTRACIJI DHT IN SKUPNEM SEŠTEVKU TOČK PRI REŠEVANJU IPSS VPRAŠALNIKA**

Glavni parametri, iz katerih lahko razberemo morebitno učinkovito zdravljenje (primarni izidi zdravljenja), so zmanjšanje volumna prostate, zmanjšanje serumske koncentracije DHT ter subjektivna ocena izboljšanja LUTS simptomov po IPSS vprašalniku. Ostale izbrane klinične parametre smo obravnavali kot sekundarne izide zdravljenja.

Pri vseh izbranih parametrih smo najprej primerjali izmerjene vrednosti parametrov v vseh treh časovnih točkah (pred začetkom zdravljenja, po pol leta zdravljenja in po enem letu zdravljenja), nato pa smo na enak način analizirali še izračunane razlike posameznih vrednosti izbranih parametrov med časi in tako preverili, za kakšen količnik se spreminjajo vrednosti parametrov po pol leta in po enem letu zdravljenja. Vsi parametri so bili analizirani neodvisno od genotipov določenega polimorfizma (Tabeli XV in XVI).

Tabela XV: Analiza kliničnih parametrov v odvisnosti od časa.

(VP-volumen prostate, DHT-koncentracija dihidrotestosterona, IPSS-vprašalnik, T-koncentracija testosterona, F-AI-delež prostega testosterona, SHBG-koncentracija spolne hormone vezočih globulinov, ALB-koncentracija albuminov, E-koncentracija estradiola, 1-izmerjena vrednost parametra pred začetkom zdravljenja, 2-po pol leta zdravljenja, 3-po enem letu zdravljenja).

Parameter	Mediana	25. percentil	75. percentil	p vrednost
VP 1	43,0	36,0	50,0	< 0,001
VP 2	34,0	28,0	38,0	
VP 3	28,0	25,0	35,0	
DHT 1	1,334	0,753	1,720	< 0,001
DHT 2	0,255	0,162	0,546	
DHT 3	0,212	0,126	0,370	
IPSS 1	14,0	11,0	18,0	< 0,001
IPSS 2	10,0	7,5	13,0	
IPSS 3	7,0	5,0	10,0	
T 1	14,7	12,4	18,6	0,022
T 2	17,3	14,7	20,5	
T 3	16,2	13,2	23,2	
F-AI 1	32,4	26,9	42,0	0,002
F-AI 2	37,6	32,1	45,8	
F-AI 3	40,0	33,5	48,2	
SHBG 1	43,0	36,4	58,7	0,697
SHBG 2	43,4	35,6	56,5	
SHBG 3	43,6	36,2	55,4	
ALB 1	46,0	44,0	47,0	0,083
ALB 2	47,0	45,0	48,0	
ALB 3	45,0	44,0	47,0	
E 1	0,08	0,06	0,09	< 0,001
E 2	0,10	0,08	0,13	
E 3	0,13	0,11	0,15	

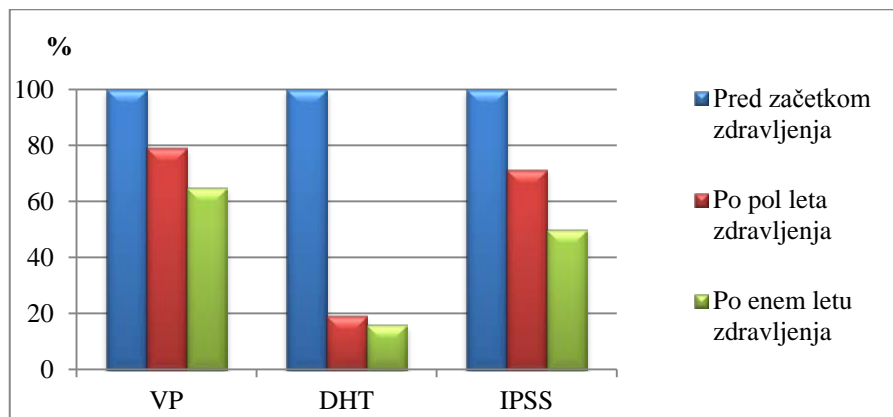
Tabela XVI: Analiza razlik posameznih vrednosti kliničnih parametrov med različnimi časovnimi odvzemi.

(VP-volumen prostate, DHT-koncentracija dihidrotestosterona, IPSS-vprašalnik, T-koncentracija testosterona, F-AI-delež prostega testosterona, SHBG-koncentracija spolne hormone vezočih globulinov, ALB-koncentracija albuminov, E-koncentracija estradiola,  $\Delta$ 1-2-razlika med posameznimi vrednostmi pred začetkom zdravljenja in po pol leta zdravljenja,  $\Delta$ 1-3-pred začetkom zdravljenja in po enem letu zdravljenja).

Parameter	Mediana	25. percentil	75. percentil	p vrednost
$\Delta$ VP_1-2	0,240	0,146	0,325	< 0,001
$\Delta$ VP_1-3	0,333	0,243	0,409	
$\Delta$ DHT_1-2	0,760	0,458	0,860	< 0,001
$\Delta$ DHT_1-3	0,831	0,609	0,899	
$\Delta$ IPSS_1-2	0,368	0,200	0,500	0,001
$\Delta$ IPSS_1-3	0,471	0,292	0,643	
$\Delta$ T_1-2	0,228	0,068	0,408	0,500
$\Delta$ T_1-3	0,176	0,060	0,338	
$\Delta$ F-AI_1-2	0,207	0,122	0,429	0,002
$\Delta$ F-AI_1-3	0,231	0,102	0,450	
$\Delta$ SHBG_1-2	0,075	0,041	0,162	0,813
$\Delta$ SHBG_1-3	0,088	0,030	0,130	
$\Delta$ ALB_1-2	0,043	0,021	0,063	0,474
$\Delta$ ALB_1-3	0,042	0,022	0,049	
$\Delta$ E_1-2	0,222	0,143	0,667	< 0,001
$\Delta$ E_1-3	0,667	0,333	1,000	

Inhibitorji 5 $\alpha$ -reduktaze pomembno znižajo serumsko koncentracijo DHT, kar se posledično odraža tudi na zmanjšanju volumna prostate [11, 21, 22]. Obe učinkovini sta pomembno zmanjšali volumen prostate, saj se je po šestih mesecih zdravljenja volumen v povprečju zmanjšal za 20,9 %, po enem letu pa za 34,9 %. Prav tako se je po pol leta zdravljenja serumsko koncentracija DHT zmanjšala v povprečju za 80,9 %, po enem letu pa za 84,1 %. Tretji dokaz o uspešnem zdravljenju pa je subjektivna ocena bolnikov glede izboljšanja LUTS simptomov, vrednotena preko IPSS vprašalnika. Skupni seštevek točk se je namreč po pol leta v povprečju zmanjšal za 4 točke (28,6 %), po enem letu pa za 7 točk

(50,0 %). Bolniki so prešli iz zmernih težav s simptomi spodnjih sečil na blage. Izmerjene vrednosti parametrov med različnimi časovnimi odvzemi so bile pri teh parametrih statistično značilne (Tabela XV), prav tako pa so bile statistično značilne tudi izračunane razlike posameznih vrednosti med časovnimi intervali (Tabela XVI). Po enem letu opazovanja in spremljanja bolnikov lahko na podlagi teh rezultatov (Graf 1) sklepamo, da je bilo zdravljenje z obema učinkovinama uspešno.



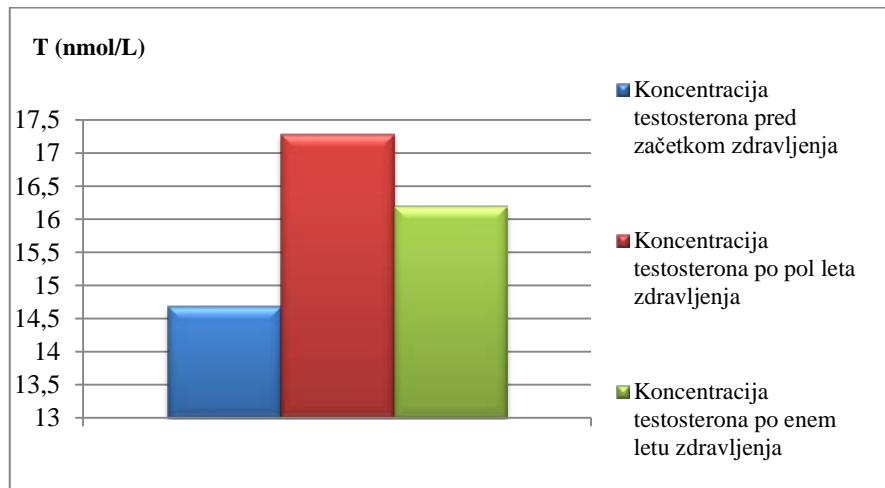
Graf 1: Klinični parametri, ki odražajo učinkovitost zdravljenja.

(VP-volumen prostate, DHT-koncentracija dihidrotestosterona, IPSS-vprašalnik).

Poleg učinkovitosti zdravljenja nas je zanimalo še, kako se s časom spreminjajo ostali analizirani klinični parametri (sekundarni izidi zdravljenja).

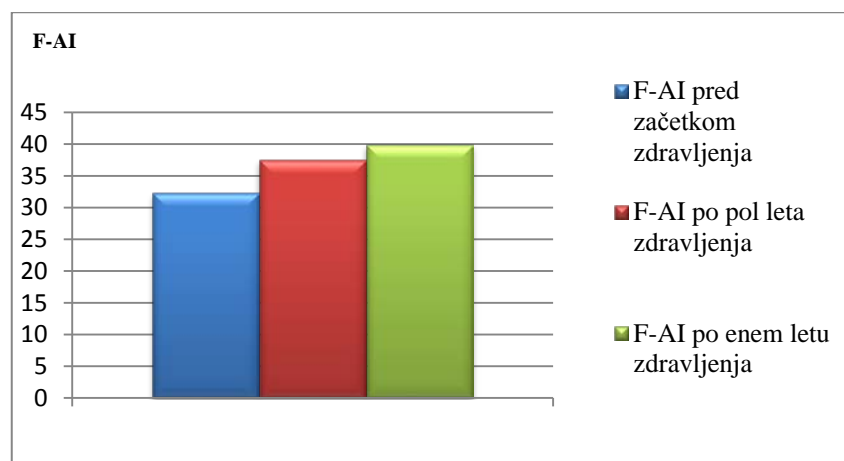
#### 4.6.2 ANALIZA SERUMSKIH KONCENTRACIJ TESTOSTERONA

Na grafu št. 2 lahko vidimo, da se je serumska koncentracija testosterona v prvih šestih mesecih zdravljenja v povprečju povišala za 17,7 %, nato pa je nekoliko upadla. Vrednosti izmerjenih parametrov med časovnimi obdobji so bile statistično značilne (Tabela XV), medtem ko pri izračunanih razlikah posameznih vrednosti ni bilo pomembnih razlik med koncentracijami izmerjenimi po pol leta in po enem letu (Tabela XVI), kar je bilo pričakovano, saj je znižanje koncentracije T med 6. in 12. mesecem majhno. Pri zdravljenju z inhibitorji  $5\alpha$ -reduktaze je normalno, da se serumska koncentracija testosterona v začetku zdravljenja poviša za 10 - 20 % zaradi intraprostaticne inhibicije pretvorbe v DHT. Znotraj prostate pride tako zaradi inhibicije encima 5AR do povišanja koncentracije testosterona, ki nato s pasivno difuzijo prehaja nazaj v krvni obtok. Če zdravljenje traja dlje časa se koncentracija uravnovesi in ne niha več [11, 31].



Graf 2: Spreminjanje serumskih koncentracij testosterona tekom zdravljenja.

Zanimalo nas je še, kako se ob spremembah v koncentraciji testosterona spreminja delež prostega testosterona (F-AI), saj samo ta vstopa v reakcije. Ugotovili smo, da se tekom zdravljenja vrednosti F-AI v povprečju značilno povečujejo. Tudi ta podatek dokazuje zmanjšano aktivnost 5AR, saj se ob povečani serumski koncentraciji testosterona, posledično zviša tudi delež prostega testosterona v krvnem obtoku. Normalne vrednosti F-AI se gibljejo med 30 in 150, torej so v povprečju vsi bolniki znotraj normalnega območja vrednosti in ne izkazujejo s starostjo povezanega hipogonadizma.



Graf 3: Spreminjanje F-AI (delež prostega testosterona) tekom zdravljenja.



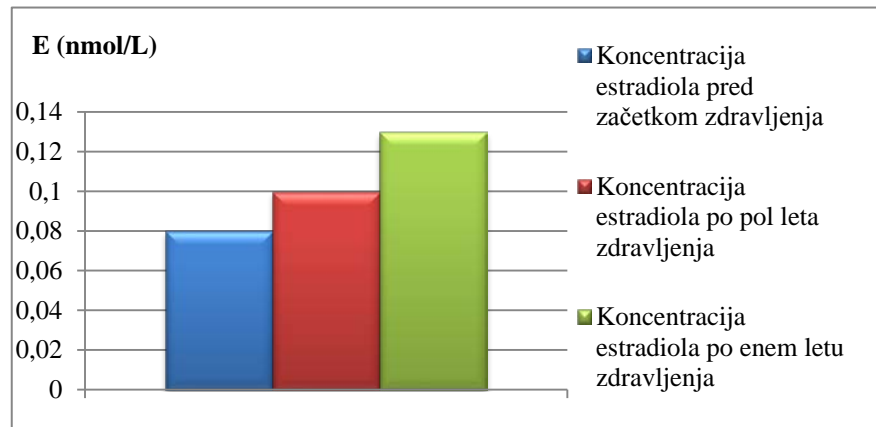
#### 4.6.3 ANALIZA SERUMSKIH KONCENTRACIJ SHBG IN ALBUMINOV

Kot smo že omenili, se testosteron po sprostitvi iz Leydigovih celic močno veže na transportne SHBG globuline in šibko na albumine. Normalna koncentracija SHBG pri odraslem moškem se giblje med 20 in 60 nmol/L. Iz tabel XV in XVI lahko razberemo, da med koncentracijami SHBG tekom zdravljenja ni bilo značilnih razlik, saj so bile bolj ali manj konstantne, s povprečjem 43,3 nmol/L. Prav tako tekom zdravljenja ni bilo značilnih razlik med koncentracijami albuminov, v povprečju pa so znašale 46,0 g/L. Ker se koncentracije transportnih proteinov ne spreminjajo, lahko predvidevamo, da se torej delež prostega testosterona povečuje le na račun zvišanja serumskih koncentracij testosterona.

#### 4.6.4 ANALIZA SERUMSKIH KONCENTRACIJ ESTRADIOLA

Prostata je tarčno tkivo tudi za estrogene, tako da lahko tudi ti vplivajo na diferenciacijo celic in rast prostate. Testosteron se po drugi poti s pomočjo encima CYP19/aromataza presnavlja v močan estrogen estradiol-17 $\beta$  (E2), ta pa se nato naprej vpleta v različne procese kot so mineralizacija kosti in presnova lipidov. Večji del estradiola nastane z aromatizacijo testosterona, predvsem v maščobah in mišicah, do 20 % pa ga izločijo tudi Leydigove celice v modih. Dodatno poteka še lokalna produkcija estrogenov v prostati, kjer nastajata poleg estradiola še 5 $\alpha$ -androstan-3 $\beta$ ,17 $\beta$ -diol (3 $\beta$ -diol) in 7 $\alpha$ -hidroksi-DHEA (7HD). Estrogeni se vežejo na estrogenski receptor (ER), ki je, tako kot androgenski receptor, iz skupine jedrnih receptorjev, aktiviranih z ligandom. Vezava povzroči konformacijske spremembe, ki rezultirajo v dodatni vezavi ko-aktivatorjev in ko-represorjev ter v dimerizaciji kompleksa. Nato pride do vezave dimera na estrogensko odzivne elemente (ERE) v tarčnih genih, kar povzroči izražanje proteinov. Glede tega, kakšna je dejanska vloga estrogenov pri razvoju BHP, si znanstveniki niso enotni. Znano je, na primer, da lahko z inhibitorji aromataze zmanjšamo z estrogeni povzročeno proliferacijo prostatičnega tkiva. Serumske koncentracije estradiola so sicer bolj ali manj konstantne skozi celotno življenje, medtem ko nivo androgenov s starostjo začne upadati, kar rezultira v povišanem razmerju E2/T, to pa je lahko povezano z razvojem BHP [24].

Nas je zanimalo, kako se je koncentracija estradiola spreminjala s časom. Iz tabel XV in XVI lahko razberemo, da se je koncentracija E2 s časom statistično značilno višala, kar lahko pripisujemo dvigu serumskih koncentracij testosterona zaradi zmanjšane aktivnosti encima 5 $\alpha$ -reduktaza.



Graf 4: Spreminjanje serumskih koncentracij estradiola tekom zdravljenja.

Rezultati študij, ki nakazujejo na povezavo med povišanjem koncentracije estrogenov in večjim volumnom prostate, so si do danes še vedno zelo nasprotujoči [24], tako da z gotovostjo ne moremo postaviti nobene trditve. Glede na to, da smo uspeli dokazati uspešnost zdravljenja ter zmanjšanje volumna prostate za 34,9 %, lahko torej predpostavimo, da je v našem primeru dvig koncentracij estradiola le posledica inhibicije encima 5AR in verjetno ne rezultira v povečanem tveganju za napredovanje BHP.

#### 4.7 VPLIV ZDRAVLJENJA NA IZBRANE PARAMETRE V ODVISNOSTI OD GENOTIPOV

##### 4.7.1 REZULTATI ZA POLIMORFIZEM V89L

V naslednjem sklopu statističnih analiz smo želeli ovrednotiti še vpliv proučevanih polimorfizmov V89L in A49T na izbrane klinične parametre. Analize smo se lotili na enak način, kot v primerih neodvisno od genotipov. Tako smo najprej analizirali izmerjene vrednosti parametrov v treh različnih odvzemih glede na dobljene genotipe obeh polimorfizmov, nato pa smo enako analizo ponovili še pri izračunanih razlikah posameznih vrednosti kliničnih parametrov med časi.

Najprej smo analizirali polimorfizem V89L, kjer smo iskali razlike med tremi različnimi genotipi, ki bi pomembno vplivale na vrednosti izbranih parametrov. Zanimalo nas je, ali se lahko razlike med genotipi tudi klinično izrazijo (Tabeli XVII in XVIII).

Tabela XVII: Analiza kliničnih parametrov glede na genotip polimorfizma V89L.

(V/V, V/L in L/L-različni genotipi, VP-volumen prostate, DHT-koncentracija dihidrotestosterona, IPSS-vprašalnik, T-koncentracija testosterona, F-AI-delež prostega testosterona, SHBG-koncentracija spolne hormone vezočih globulinov, ALB-koncentracija albuminov, E-koncentracija estradiola, 1-izmerjena vrednost parametra pred začetkom zdravljenja, 2-po pol leta zdravljenja, 3-po enem letu zdravljenja).

Parameter	Mediana			25. percentil			75. percentil			p vrednost
	V/V	V/L	L/L	V/V	V/L	L/L	V/V	V/L	L/L	
VP 1	44,5	42,0	41,0	36,5	35,8	35,0	50,0	56,3	53,0	0,921
VP 2	35,0	34,0	32,0	28,0	27,0	30,0	38,0	44,3	35,0	0,672
VP 3	28,0	28,5	28,0	25,0	25,0	24,0	35,0	38,3	35,0	0,961
DHT 1	1,190	1,341	1,380	0,745	0,700	0,861	1,627	1,762	2,234	0,667
DHT 2	0,286	0,219	0,451	0,159	0,143	0,189	0,558	0,527	1,140	0,710
DHT 3	0,206	0,205	0,240	0,121	0,156	0,081	0,328	0,321	0,977	0,882
IPSS 1	16,5	13,0	14,0	11,0	11,0	10,0	21,3	16,3	19,0	0,342
IPSS 2	11,5	8,5	12,0	7,8	4,8	8,0	16,3	11,3	13,0	0,232
IPSS 3	7,5	6,5	10,0	4,0	3,8	7,0	12,3	9,3	11,0	0,214
T 1	14,4	13,8	17,9	12,0	11,8	15,0	17,2	20,1	19,0	0,086
T 2	18,4	15,9	19,0	14,5	12,9	16,0	19,8	21,8	23,2	0,542
T 3	15,4	16,7	20,3	13,0	13,0	15,9	19,6	23,5	26,2	0,286
F-AI 1	33,0	29,5	32,4	30,1	25,3	29,4	43,8	39,8	42,0	0,706
F-AI 2	41,0	34,2	34,6	35,2	30,1	31,9	47,8	40,7	48,9	0,209
F-AI 3	40,3	38,2	40,2	34,1	30,0	29,9	49,1	47,4	51,9	0,880
SHBG 1	38,8	42,9	48,4	30,1	36,8	36,4	57,4	57,7	67,4	0,440
SHBG 2	39,6	42,8	47,2	31,1	36,0	38,1	52,9	59,6	56,5	0,448
SHBG 3	38,8	47,0	43,5	30,1	37,0	39,6	51,6	56,8	65,4	0,286
ALB 1	46,0	45,5	46,0	45,0	44,0	44,0	47,0	48,0	47,0	0,793
ALB 2	47,0	46,0	48,0	44,8	45,0	46,0	48,0	48,0	49,0	0,255
ALB 3	45,0	45,0	45,0	44,0	43,0	43,0	47,0	46,0	48,0	0,692
E 1	0,08	0,07	0,09	0,06	0,06	0,08	0,09	0,09	0,13	0,082
E 2	0,10	0,09	0,14	0,08	0,08	0,11	0,11	0,12	0,15	0,103
E 3	0,13	0,13	0,15	0,11	0,10	0,12	0,14	0,15	0,15	0,143

Tabela XVIII: Analiza razlik posameznih vrednosti kliničnih parametrov med različnimi časovnimi odvzemi glede na genotip polimorfizma V89L.

(V/V, V/L in L/L-različni genotipi, VP-volumen prostate, DHT-koncentracija dihidrotestosterona, IPSS-vprašalnik, T-koncentracija testosterona, F-AI-delež prostega testosterona, SHBG-koncentracija spolne hormone vezočih globulinov, ALB-koncentracija albuminov, E-koncentracija estradiola,  $\Delta$ 1-2-razlika med posameznimi vrednostmi izmerjenimi pred začetkom zdravljenja in po pol leta zdravljenja,  $\Delta$ 1-3-pred začetkom zdravljenja in po enem letu zdravljenja).

Parameter	Mediana			25. percentil			75. percentil			p vrednost
	V/V	V/L	L/L	V/V	V/L	L/L	V/V	V/L	L/L	
$\Delta$ VP_1-2	0,220	0,250	0,229	0,144	0,142	0,146	0,338	0,329	0,289	0,724
$\Delta$ VP_1-3	0,293	0,354	0,333	0,237	0,250	0,260	0,402	0,437	0,425	0,889
$\Delta$ DHT_1-2	0,741	0,785	0,719	0,281	0,565	0,447	0,883	0,862	0,780	0,404
$\Delta$ DHT_1-3	0,852	0,833	0,759	0,524	0,751	0,648	0,908	0,879	0,903	0,548
$\Delta$ IPSS_1-2	0,225	0,420	0,222	0,154	0,259	0,200	0,466	0,591	0,429	0,183
$\Delta$ IPSS_1-3	0,523	0,547	0,316	0,281	0,369	0,182	0,652	0,667	0,444	0,072
$\Delta$ T_1-2	0,308	0,214	0,067	0,089	0,083	0,021	0,421	0,401	0,385	0,661
$\Delta$ T_1-3	0,166	0,194	0,120	0,043	0,075	0,067	0,357	0,324	0,318	0,509
$\Delta$ F-AI_1-2	0,256	0,232	0,165	0,151	0,096	0,054	0,460	0,380	0,498	0,252
$\Delta$ F-AI_1-3	0,244	0,218	0,262	0,105	0,043	0,187	0,451	0,405	0,501	0,496
$\Delta$ SHBG_1-2	0,074	0,078	0,072	0,040	0,037	0,035	0,149	0,144	0,174	0,574
$\Delta$ SHBG_1-3	0,087	0,078	0,093	0,039	0,033	0,022	0,114	0,135	0,186	0,301
$\Delta$ ALB_1-2	0,022	0,043	0,063	0,000	0,022	0,023	0,044	0,063	0,091	0,508
$\Delta$ ALB_1-3	0,023	0,042	0,044	0,022	0,022	0,023	0,045	0,062	0,064	0,416
$\Delta$ E_1-2	0,236	0,191	0,571	0,138	0,138	0,111	0,500	0,777	0,750	0,463
$\Delta$ E_1-3	0,613	0,857	0,667	0,333	0,302	0,154	1,000	1,188	0,750	0,272

Kot lahko vidimo v tabelah XVII in XVIII, pri nobenem parametru nismo uspeli dokazati pomembnih statističnih razlik med genotipi, prav tako pa ni bilo nobenih razlik med izračunanimi razlikami posameznih vrednostih parametrov. Različni genotipi polimorfizma V89L v našem primeru niso vplivali na potek zdravljenja ter na izbrane klinične parametre. K temu je verjetno velik delež prispevala velika variabilnost vrednosti znotraj posamezne skupine genotipa, prav tako pa tudi številčno majhen vzorec bolnikov. Ker do danes ni bila opravljena še nobena farmakogenetska raziskava *in vivo*, ki bi proučevala omenjeni polimorfizem v povezavi z zdravljenjem, naših rezultatov ne moremo primerjati. Glede

razlik med genotipi lahko potegnemo vzporednice edino z raziskavo, ki so jo opravili Li in sodelavci pri analizi polimorfizma V89L v povezavi s pojavnostjo BHP pri japonski populaciji, kjer prav tako niso uspeli dobiti nobenih značilnih razlik [32].

#### 4.7.2 REZULTATI ZA POLIMORFIZEM A49T

Analizo genotipov smo želeli ponoviti še pri polimorfizmu A49T, vendar smo pri genotipizaciji dobili samo tri heterozigote (A/T). Statistično analizo smo sicer opravili enako kot pri polimorfizmu V89L, vendar rezultati prav tako v nobenem primeru niso bili statistično značilno različni (Tabeli XIX in XX).

Tabela XIX: Analiza kliničnih parametrov glede na genotip polimorfizma A49T.

(A/A in A/T- različna genotipa, VP-volumen prostate, DHT-koncentracija dihidrotestosterona, IPSS-vprašalnik, T-koncentracija testosterona, F-AI-delež prostega testosterona, SHBG-koncentracija spolne hormone vezočih globulinov, ALB-koncentracija albuminov, E-koncentracija estradiola, 1-izmerjena vrednost parametra pred začetkom zdravljenja, 2-po pol leta zdravljenja, 3-po enem letu zdravljenja).

Parameter	Mediana		25. percentil		75. percentil		p vrednost
	A/A	A/T	A/A	A/T	A/A	A/T	
VP 1	43,0	44,0	35,3	37,0	50,0	/	0,782
VP 2	34,5	27,0	29,3	27,0	38,8	/	0,217
VP 3	28,0	27,0	25,0	26,0	35,0	/	0,805
DHT 1	1,337	0,890	0,746	0,875	1,847	/	0,696
DHT 2	0,257	0,246	0,154	0,211	0,614	/	0,840
DHT 3	0,209	0,264	0,124	0,131	0,383	/	0,953
IPSS 1	14,0	13,0	11,0	9,0	18,8	/	0,330
IPSS 2	10,0	7,0	7,0	5,0	13,8	/	0,245
IPSS 3	7,0	3,0	5,0	2,0	10,8	/	0,140
T 1	14,6	21,9	12,5	12,0	18,5	/	0,243
T 2	17,2	18,5	14,5	16,2	20,4	/	0,133
T 3	16,1	24,4	13,1	16,0	22,3	/	0,109
F-AI 1	31,7	32,7	26,3	28,9	42,2	/	0,875
F-AI 2	36,7	44,0	31,9	39,4	45,6	/	0,428
F-AI 3	40,1	39,5	32,0	39,4	48,3	/	0,649
SHBG 1	42,9	55,5	36,3	36,7	58,1	/	0,507
SHBG 2	43,8	42,0	35,1	41,1	56,4	/	0,596
SHBG 3	43,6	50,6	36,0	40,6	55,0	/	0,302

ALB 1	46,0	45,0	44,0	41,0	47,0	/	0,270
ALB 2	47,0	43,0	46,0	43,0	48,0	/	0,070
ALB 3	45,0	45,0	44,0	43,0	46,8	/	0,894
E 1	0,08	0,10	0,06	0,07	0,09	/	0,116
E 2	0,10	0,15	0,08	0,10	0,13	/	0,062
E 3	0,13	0,15	0,10	0,13	0,15	/	0,092

Tabela XX: Analiza razlik posameznih vrednosti kliničnih parametrov med različnimi časovnimi odvzemi glede na genotip polimorfizma A49T.

(A/A in A/T-različna genotipa, VP-volumen prostate, DHT-koncentracija dihidrotestosterona, IPSS-vprašalnik, T-koncentracija testosterona, F-AI-delež prostega testosterona, SHBG-koncentracija spolne hormone vezočih globulinov, ALB-koncentracija albuminov, E-koncentracija estradiola,  $\Delta$ 1-2-razlika med posameznimi vrednostmi izmerjenimi pred začetkom zdravljenja in po pol leta zdravljenja,  $\Delta$ 1-3-pred začetkom zdravljenja in po enem letu zdravljenja).

Parameter	Mediana		25. percentil		75. percentil		p vrednost
	A/A	A/T	A/A	A/T	A/A	A/T	
$\Delta$ VP_1-2	0,234	0,386	0,144	0,270	0,319	/	0,341
$\Delta$ VP_1-3	0,333	0,409	0,240	0,270	0,400	/	0,817
$\Delta$ DHT_1-2	0,761	0,719	0,452	0,458	0,866	/	0,332
$\Delta$ DHT_1-3	0,836	0,776	0,586	0,703	0,899	/	0,244
$\Delta$ IPSS_1-2	0,351	0,222	0,200	0,154	0,500	/	0,978
$\Delta$ IPSS_1-3	0,423	0,667	0,290	0,308	0,632	/	0,311
$\Delta$ T_1-2	0,181	0,542	0,076	0,260	0,397	/	0,087
$\Delta$ T_1-3	0,166	0,333	0,056	0,114	0,333	/	0,297
$\Delta$ F-AI_1-2	0,210	0,347	0,123	0,001	0,426	/	0,330
$\Delta$ F-AI_1-3	0,233	0,222	0,094	0,205	0,452	/	0,120
$\Delta$ SHBG_1-2	0,074	0,144	0,038	0,051	0,156	/	0,830
$\Delta$ SHBG_1-3	0,089	0,088	0,031	0,023	0,133	/	0,293
$\Delta$ ALB_1-2	0,043	0,044	0,021	0,043	0,063	/	0,812
$\Delta$ ALB_1-3	0,042	0,044	0,022	0,022	0,050	/	0,550
$\Delta$ E_1-2	0,222	0,429	0,143	0,067	0,667	/	0,988
$\Delta$ E_1-3	0,691	0,500	0,314	0,333	1,107	/	0,902

Zaradi tako nizke frekvence heterozigotov in velikega sipanja rezultatov, smo predvidevali, da dobljeni rezultati ne bodo statistično značilni. Z enakimi težavami so se pri analizi tega polimorfizma že srečevali v preteklih raziskavah, saj zaradi odsotnosti alela T primerjav med genotipi sploh niso mogli opraviti [31, 32]. Analize, ki so bile narejene do danes, so bile večinoma usmerjene v raziskovanje pojava raka na prostati, rezultati pa so si zelo nasprotujoči. Tako je Jaffe s sodelavci ugotovil, da naj bi alel T bil odgovoren za razvoj in napredovanje raka na prostati [34], medtem ko meta analiza HuGE te povezave ni potrdila [23]. Ali je polimorfizem A49T dejansko povezan z večjo pojavnostjo raka, ter kakšen vpliv ima pri razvoju benigne hiperplazije prostate, je vprašanje, ki verjetno še nekaj časa ne bo razrešeno. Prav tako moramo upoštevati še možnost, da morda zaradi tako nizke frekvence pojavljanja gledano na celotno populacijo, polimorfizem A49T morda nima velikega vpliva na razvoj BHP.

## 5 SKLEP

Z našo farmakogenetsko analizo smo dobili naslednje rezultate:

- Frekvence genotipov polimorfizma V89L so znašale V/V 34,3 %, V/L 50,0 % in L/L 15,7 %. Frekvence genotipov polimorfizma A49T so znašale A/A 95,7 % in A/T 3,4 %. Mutiranih homozigotov (T/T) nismo uspeli zaslediti.
- Pri primerjavi zdravljenja s finasteridom in dutasteridom nismo uspeli dobiti nobenih statistično značilnih razlik med izbranimi kliničnimi parametri tekom zdravljenja, zato skupine nismo razdelili še glede jemanja določenega zdravila. Vendar pa je potrebno poudariti, da odsotnost razlik med finasteridom in dutasteridom pri našem vzorcu bolnikov obolelih za benigno hiperplazijo prostate ne pomeni, da razlik dejansko ni, saj obstaja verjetnost, da se te izrazijo šele po več letih opazovanja in spremljanja zdravljenja.
- Dokazali smo, da je bilo po enem letu opazovanja zdravljenje uspešno, saj se je serumska koncentracija dihidrotestosterona znižala za 84,1 %, volumen prostate se je zmanjšal za 34,9 %, prav tako pa se je za 50,0 % zmanjšal tudi seštevek točk IPSS vprašalnika. Vse spremembe so bile statistično značilno različne od vrednosti izmerjenih pred začetkom zdravljenja, prav tako pa so bile statistično značilno različne tudi izračunane razlike posameznih vrednosti parametrov med časovnimi intervali. Serumska koncentracija testosterona se je po prvih šestih mesecih pričakovano povečala, v skladu s tem pa se je povečal tudi delež prostega testosterona. Serumska koncentracija spolne hormone vezočih globulinov in albuminov je bila konstantna, koncentracija estradiola pa se je prav tako pričakovano povečala. Vse spremembe so bile statistično značilno različne.
- Nasprotno pa nismo uspeli dokazati vpliva različnih genotipov polimorfizmov V89L in A49T na nobenega izmed proučevanih parametrov.



Naši rezultati torej ne kažejo na pomemben vpliv polimorfizmov V89L in A49T na uspešnost zdravljenja benigne hiperplazije prostate s finasteridom in dutasteridom. Zaradi pomanjkanja *in vivo* farmakogenetskih analiz omenjenih polimorfizmov, pa rezultatov ne moremo primerjati z rezultati drugih študij. Da bi ugotovili, ali imata izbrana polimorfizma res kakšen vpliv na zdravljenje benigne hiperplazije prostate, bi bilo smiselno, da bi v bodoče podobne analize izvedli na večjih skupinah bolnikov, saj bi s tem povečali zanesljivost rezultatov. Po naših izračunih bi bilo smiselno, da se ob 80 % moči testa in predpostavki, da bi dobili enake frekvence genotipov, kot v našem primeru, nadaljnje farmakogenetske analize izvajajo na vzorcih v velikosti vsaj 253 bolnikov obolelih za benigno hiperplazijo prostate.

## 6 VIRI, LITERATURA

- [1] A. Kmetec: *Benigna hiperplazija prostate*. Farmaceutvski vestnik 2011; 77-80
- [2] J. E. McNeal: *The zonal anatomy of the prostate*. Prostate 1981; 2(1): 35-49
- [3] T. Laninšek Rižner: *Androgeni, benigna hiperplazija prostate in rak prostate*. Medicinski razgledi 2008; 47: 73-85
- [4] M. Drešček: *Obravnava bolnika s simptomi spodnjih sečil zaradi BHP na primarni ravni*. Zbornik predavanj, Družinska medicina 2010; letnik 8, dodatek 1
- [5] <http://prostata.blog.siol.net/2010/09/14/benigna-hiperplazija-prostate/> 26.8.2013
- [6] K. S. Coyne, S. A. Kaplan, C. R. Chapple, C. C. Sexton, Z. S. Kopp, E. N. Bush et al: *Risk factors and comorbid conditions associated with lower urinary tract symptoms*. BJU International 2009; 3: 24-32
- [7] J. J. de la Rosette, G. Alivizatos, S. Madersbacher, M. Perachino, D. Thomas, F. Desgrandchamps et al: *EAU guidelines on benign prostatic hyperplasia (BPH)*. European association of urology 2001; 40(3): 256-263
- [8] B. Tršinar: *Zdravljenje bolnikov z LUTS/BHP z zdravili rastlinskega izvora*. Zbornik predavanj, Družinska medicina 2010; letnik 8, dodatek 1
- [9] M. Emberton, E. B. Cornel, P. F. Bassi, R. O. Fourcade, J. M. F. Gomez, R. Castro: *Benign prostatic hyperplasia as a progressive disease: a guide to the risk factors and options for medical management*. International journal of clinical practice 2008; 62(7): 1076-1086
- [10] J. D. McConnell, C. G. Roehborn, O. M. Bautista, G. L. Andriole, C. M. Dixon, J. W. Kusek et al: *The longterm effect of doxazosine, finasteride and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia*. New England journal of medicine 2003; 349: 2387-2398
- [11] L. S. Marks: *5 $\alpha$ -reductase: history and clinical importance*. Reviews in urology

- 2004; 6(9): 11–21
- [12] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Finasteride.svg> 4.9.2013
- [13] Krka d.d., *Finpros (finasterid), filmsko obložene tablete*, SmPC PIL012788/9, 2012
- [14] J. D. McConnell, R. Bruskewitz, P. Walsh, G. Andriole, M. Lieber, H. L. Holtgrewe et al: *The effect of finasteride on the risk of acute urinary retention and the need for surgical treatment among men with benign prostatic hyperplasia*. Finasteride long-term efficacy and safety study group. *New England journal of medicine* 1998; 338(9): 557-563
- [15] G. Bartsch, R. S. Rittmaster, H. Klocker: *Dihydrotestosterone and the concept of 5 $\alpha$ -reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia*. *European urology* 2000, 37(4): 367-380
- [16] <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dutasteride.svg> 4.9.2013
- [17] R. V. Clark, D. J. Hermann, G. R. Cunningham, T. H. Wilson, B. B. Morrill, S. Hobbs: *Marked suppression of dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia by dutasteride, a dual 5 $\alpha$ -reductase inhibitor*. *The journal of clinical endocrinology & metabolism* 2004; 89(5): 2179-2184
- [18] GlaxoSmithKline, GSK d.d., *Avodart (dutasterid), mehke kapsule*, SmPC 5363-I-1748/11, 2008
- [19] F. Debruyne, J. Barkin, P. van Erps, M. Reis, T. L. Tammela, C. Roehrborn: *Efficacy and safety of long-term treatment with the dual 5 $\alpha$ -reductase inhibitor dutasteride in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia*. *European urology* 2004; 46(4): 488-494
- [20] C. Schulman, P. Pommerville, K. Höfner, B. Wachs: *Long-term therapy with the dual 5 $\alpha$ -reductase inhibitor dutasteride is well tolerated in men with symptomatic benign prostatic hyperplasia*. *BJU International* 2006; 97(1): 73-79
- [21] C. J. Nickel: *Comparison of clinical trials with finasteride and dutasteride*. *Reviews in urology* 2004; 6(9): 31-39
- [22] C. J. Nickel, P. Gilling, T. L. Tammela, B. Morrill, T. H. Wilson, R. S. Rittmaster: *Comparison of dutasteride and finasteride for treating benign prostatic*

- hyperplasia: the enlarged prostate international comparator study (EPICS)*. BJU International 2011; 108: 388-394
- [23] J. Li, R. J. Coates, M. Gwinn, M. J. Khoury: *Steroid 5 $\alpha$ -reductase type II (SRD5A2) gene polymorphisms and risk of prostate cancer: a huge review*. American journal of epidemiology, 171(1): 1-13
- [24] T. M. Nicholson, W. A. Riche: *Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future*. Differentiation 2011; 82(4-5): 184-199
- [25] A. Morales: *Androgene replacement therapy and prostate safety*. European urology 2002; 41: 113-120
- [26] A. Morgentaler: *Testosterone replacement therapy and prostate risk: Where's the beef?* Division of urology, Harvard medical school, Boston, Massachusetts, USA
- [27] M. C. Bosland: *The role of steroid hormones in prostate carcinogenesis*. Journal national cancer institute monographs 2000; 27: 39-66
- [28] <http://www.google.com/patents/WO2009053857A2?cl=en> 28.8.2013
- [29] N. Makridakis, R. K. Ross, M. C. Pike, L. Chang, F. Z. Stanczyk, L. N. Kolonel et al: *A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 $\alpha$ -reductase*. Cancer research 1997; 57(6): 1020-1022
- [30] <http://www.ensembl.org/index.html> 5.8.2013
- [31] A. W. Hsing, C. Chen, A. P. Chokkalingam, Y. T. Gao, D. A. Dightman, H. T. Nguyen et al: *Polymorphic markers in the SRD5A2 gene and prostate cancer risk, A population-based case-control study*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention 2001; 10: 1077
- [32] Z. Li, T. Habuchi, K. Mitsumori, T. Kamoto, H. Kinoshita, T. Segawa et al: *Association of V89L SRD5A2 polymorphism with prostate cancer development in a Japanese population*. The journal of urology 2003; 169: 2378-2381
- [33] M. S. Cicek, D. V. Conti, A. Curran, P. J. Neville, P. L. Paris, G. Casey et al: *Association of prostate cancer risk and aggressiveness to androgen pathway genes: SRD5A2, CYP17 and the AR*. The prostate 2004; 59: 69-76
- [34] J. M. Jaffe, S. B. Malkowicz, A. H. Walker, S. MacBride, R. Peschel, J.

- Tomaszewski et al: *Association of SRD5A2 genotype and pathological characteristics of prostate tumors*. *Cancer research* 2000; 60: 1626
- [35] N. Makridakis, J. K. V. Reichardt: *Pharmacogenetic analysis of human steroid 5 $\alpha$ -reductase type II: comparison of finasteride and dutasteride*. *Journal of molecular endocrinology* 2005; 34: 617-623
- [36] *FlexiGene DNA Handbook*, Qiagen, 2010
- [37] *NanoDrop 1000 Spectrophotometer*, V3.7 User's Manual, Thermo Fisher Scientific Inc. 2008
- [38] D. Černe, B. Ostanek: *Biomedicinska analitika I*, učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, 2012
- [39] U. Pečar Fonovič, N. Obermajer, Z. Jevnikar, B. Mirkovič, M. Rojnik, J. Kos: *Vaje iz farmacevtske biokemije*. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Katedra za farmacevtsko biologijo, 2009
- [40] I. Mlinarič Raščan: *Farmakogenomika*. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, 2010
- [41] M. Peters, M. Saare, T. Kaart, K. Haller-Kikkatalo, A. K. Lend, M. Punab et al: *Analysis of polymorphisms in the SRD5A2 gene and semen parameters in estonian men*, *Journal of andrology* 2010; 31(4)

## 7 PRILOGE

### 7.1 IPSS VPRAŠALNIK

#### MEDNARODNI VPRAŠALNIK ZA TOČKOVNO VREDNOTENJE SIMPTOMOV BHP (IPSS)

Ime bolnika: _____ Datum: _____	Nikoli	zelo redko	občasno	pogosto	zelo pogosto	skoraj vedno	VAŠE TOČKE
<b>1. NEPOPOLNO IZPRAZNJENJE MEHURJA</b> Kako pogosto ste v preteklem mesecu imeli občutek nepopolnega izpraznjenja mehurja?	0	1	2	3	4	5	
<b>2. POGOSTEJŠE MOKRENJE</b> Kako pogosto ste v preteklem mesecu morali urinirati pogosteje kot vsaki dve uri?	0	1	2	3	4	5	
<b>3. PREKINITVE CURKA</b> Kako pogosto ste v preteklem mesecu opazili prekinitve v curku urina med uriniranjem?	0	1	2	3	4	5	
<b>4. URGENTNO MOKRENJE</b> Kako pogosto ste v preteklem mesecu imeli težave, da ste zadržali urin, potem ko ste začutili potrebo po uriniranju?	0	1	2	3	4	5	
<b>5. TANEK CUREK</b> Kako pogosto ste v preteklem mesecu opazili šibek curek urina?	0	1	2	3	4	5	
<b>6. POTREBNO PRITISNITI NA ZAČETKU</b> Kako pogosto ste se v preteklem mesecu morali napeti oz. pritisniti, da ste lahko začeli urinirati?	0	1	2	3	4	5	

	nikoli	enkrat	dvakrat	trikrat	štirikrat	petkrat ali več	
<b>7. NOČNO MOKRENJE</b> Kako pogosto ste se morali v preteklem mesecu med spanjem zbuditi, ker ste morali urinirati?	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	

**Skupni seštevek točk IPSS:** \_\_\_\_\_

BLAGE TEŽAVE

ZMERNE TEŽAVE

HUDE TEŽAVE

### **OCENA KAKOVOSTI ŽIVLJENJA BOLNIKOV Z BHP**

Odlično	Zadovoljen	V glavnem zadovoljujoče	Neodločen	V glavnem slabo	Nezadovoljujoče	Nevzdržno
<b>0</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>

**Ocena kakovosti življenja:** \_\_\_\_\_

**Žig ambulante:**

**Zdravnik:** \_\_\_\_\_

**Skupni seštevek IPSS:** 0-7 blage težave; 8-19 zmerne težave; 20-35 hude težave

## 7.2 REZULTATI MERJENJA KONCENTRACIJE IN ČISTOSTI DNA

ZAP. ŠT.	C (ng/ $\mu$ L)	A 260	A 280	260/280	260/230
1	123,6	2,472	1,331	1,86	1,37
2	232,3	4,646	2,536	1,83	1,70
3	349,8	6,995	3,786	1,85	2,13
4	320,2	6,403	3,503	1,83	1,85
5	297,2	5,943	3,351	1,77	1,52
6	455,6	9,111	5,116	1,78	1,46
7	522,0	10,440	5,692	1,84	2,05
8	208,5	4,171	2,207	1,89	1,70
9	223,1	4,461	2,396	1,86	1,63
10	324,3	6,485	3,509	1,85	1,68
11	452,1	9,041	4,950	1,83	1,80
12	355,0	7,099	3,829	1,86	1,69
13	186,0	3,721	2,019	1,85	1,49
14	147,4	2,948	1,642	1,80	1,37
15	287,1	5,742	3,193	1,80	1,48
16	592,4	11,848	6,631	1,79	1,90
17	165,4	3,308	1,849	1,79	1,33
18	196,8	3,936	2,166	1,82	1,43
19	211,5	4,230	2,332	1,82	1,62
20	282,9	5,658	3,061	1,85	1,76
21	193,1	3,863	2,136	1,81	1,58
22	315,1	6,302	3,437	1,84	1,75



23	160,9	3,217	1,753	1,84	1,57
24	162,2	3,245	1,779	1,83	1,45
25	308,0	6,159	3,444	1,79	1,80
26	301,7	6,035	3,346	1,81	1,72
27	120,3	2,406	1,345	1,79	1,20
28	247,0	4,939	2,767	1,79	1,57
29	229,0	4,580	2,531	1,81	1,68
30	229,6	4,593	2,571	1,79	1,56
31	195,6	3,911	2,145	1,82	1,69
32	213,6	4,272	2,382	1,79	1,58
33	298,2	5,963	3,359	1,78	1,67
34	315,2	6,303	3,495	1,81	1,68
35	257,8	5,156	2,815	1,83	1,67
36	347,7	6,954	3,795	1,83	1,77
37	158,9	3,178	1,728	1,84	1,54
38	146,0	2,919	1,610	1,82	1,57
39	257,9	5,159	2,808	1,84	1,75
40	210,4	4,207	2,315	1,82	1,66
41	232,0	4,639	2,361	1,85	1,70
42	187,7	3,753	2,172	1,73	0,92
43	130,4	2,608	1,431	1,82	1,56
44	187,8	3,757	2,142	1,76	1,37
45	73,6	1,489	0,874	1,70	0,97
46	46,9	1,938	0,558	1,76	0,92
47	191,2	3,824	2,173	1,76	1,32

48	75,2	1,504	0,861	1,75	0,93
49	128,3	2,566	1,444	1,78	1,38
50	107,4	2,147	1,214	1,77	1,26
51	119,0	2,379	1,340	1,78	1,28
52	453,2	9,004	4,971	1,81	1,82
53	82,5	1,649	0,907	1,82	1,29
54	357,9	7,158	3,912	1,83	1,76
55	171,9	3,438	1,859	1,85	1,65
56	208,3	4,165	2,296	1,82	1,55
57	307,9	6,158	3,399	1,82	1,72
58	174,1	3,481	1,905	1,82	1,55
59	494,2	9,884	5,513	1,80	2,00
60	259,3	5,186	2,834	1,83	1,77
61	198,1	3,962	2,190	1,81	1,54
62	229,3	4,585	2,570	1,78	1,65
63	306,3	6,126	3,443	1,78	1,72
64	160,7	3,214	1,805	1,78	1,48
65	235,4	4,703	2,662	1,77	1,51
66	140,0	2,605	1,601	1,75	1,18
67	304,0	6,079	3,352	1,82	1,94
68	140,1	2,801	1,538	1,82	1,51
69	108,0	2,159	1,194	1,81	1,35
70	209,8	4,195	2,298	1,83	1,72

### 7.3 REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM V89L

ŠT. PCR PRODUKTA	GENOTIP	OZNAKA
1	C/G	V/L
2	C/G	V/L
3	C/C	V/V
4	C/G	V/L
5	G/G	L/L
6	C/G	V/L
7	C/G	V/L
8	C/C	V/V
9	C/G	V/L
10	C/G	V/L
11	C/G	V/L
12	C/G	V/L
13	C/G	V/L
14	C/G	V/L
15	C/C	V/V
16	C/C	V/V
17	C/G	V/L
18	C/C	V/V
19	C/C	V/V
20	G/G	L/L
21	C/C	V/V
22	C/G	V/L
23	C/G	V/L
24	C/G	V/L
25	C/G	V/L
26	C/G	V/L
27	G/G	L/L
28	C/G	V/L
29	C/C	V/V
30	C/G	V/L
31	G/G	L/L
32	G/G	L/L
33	C/G	V/L
34	C/G	V/L

35	C/G	V/L
36	C/C	V/V
37	C/C	V/V
38	C/G	V/L
39	G/G	L/L
40	G/G	L/L
41	G/G	L/L
42	C/C	V/V
43	C/G	V/L
44	C/G	V/L
45	C/C	V/V
46	C/C	V/V
47	G/G	L/L
48	C/G	V/L
49	C/C	V/V
50	C/C	V/V
51	C/C	V/V
52	C/C	V/V
53	C/C	V/V
54	C/G	V/L
55	C/C	V/V
56	C/C	V/V
57	C/C	V/V
58	C/G	V/L
59	C/G	V/L
60	C/G	V/L
61	G/G	L/L
62	C/G	V/L
63	C/C	V/V
64	C/C	V/V
65	C/G	V/L
66	C/G	V/L
67	C/G	V/L
68	G/G	L/L
69	C/G	V/L
70	C/C	V/V

#### 7.4 REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM A49T

ŠT. PCR PRODUKTA	GENOTIP	OZNAKA
1	G/G	A/A
2	G/G	A/A
3	G/G	A/A
4	G/G	A/A
5	G/G	A/A
6	G/G	A/A
7	G/G	A/A
8	G/G	A/A
9	G/G	A/A
10	G/G	A/A
11	G/G	A/A
12	G/G	A/A
13	G/G	A/A
14	G/G	A/A
15	G/G	A/A
16	G/G	A/A
17	G/G	A/A
18	G/G	A/A
19	G/G	A/A
20	G/G	A/A
21	G/G	A/A
22	G/G	A/A
23	G/G	A/A
24	G/G	A/A
25	G/G	A/A
26	G/G	A/A
27	G/G	A/A
28	G/G	A/A
29	G/G	A/A
30	G/G	A/A
31	G/G	A/A
32	G/G	A/A
33	G/G	A/A
34	G/G	A/A
35	G/A	A/T

36	G/G	A/A
37	G/G	A/A
38	G/G	A/A
39	G/G	A/A
40	G/G	A/A
41	G/G	A/A
42	G/G	A/A
43	G/G	A/A
44	G/G	A/A
45	G/G	A/A
46	G/G	A/A
47	G/G	A/A
48	G/G	A/A
49	G/G	A/A
50	G/G	A/A
51	G/G	A/A
52	G/G	A/A
53	G/G	A/A
54	G/G	A/A
55	G/A	A/T
56	G/G	A/A
57	G/G	A/A
58	G/G	A/A
59	G/G	A/A
60	G/G	A/A
61	G/G	A/A
62	G/G	A/A
63	G/G	A/A
64	G/A	A/T
65	G/G	A/A
66	G/G	A/A
67	G/G	A/A
68	G/G	A/A
69	G/G	A/A
70	G/G	A/A