

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**



MAJA ZUPANČIČ

MAGISTRSKA NALOGA

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA**

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



MAJA ŽUPANČIČ

FARMAKOGENETSKA ANALIZA POLIMORFIZMOV
V GENIH ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1,
ANDROGENI RECEPTOR IN CITOKROM P450-
OKSIDAZO 19A1 PRI ZDRAVLJENJU Z ZAVIRALCI
TESTOSTERON 5-ALFA-REDUKTAZE

PHARMACOGENETIC ANALYSIS OF
POLYMORPHISMS IN ESTROGEN RECEPTOR 1,
ANDROGEN RECEPTOR AND CYTOCHROME P450-
OXIDASE 19A1 GENES IN TREATMENT WITH
TESTOSTERONE 5-ALPHA-REDUCTASE INHIBITORS

Magistrska naloga

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. Vse genetske analize so bile izvedene na katedri za klinično biokemijo. Nabor bolnikov, klinične preglede pred, med in po enem letu zdravljenja je opravil dr. Klemen Jagodic, SB Celje, merjenje koncentracij DHT so opravili v Laboratoriju za analizo hormonov, KIKKB , meritve kostnih kazalcev pa v laboratoriju SB Celje.

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem in somentorici asist. dr. Simoni Mencej Bedrač, mag. farm. za vso pomoč in nasvete pri opravljanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji družini za vso podporo in vzpodbudne besede, ki so mi jih namenili tekom študija.

Člani komisije za oceno in zagovor naloge:

1. Predsednik : prof. dr. Samo Kreft
2. Mentorica : prof. dr. Janja Marc
3. Somentorica : asist. dr. Simona Mencej Bedrač
4. Član : doc. dr. Stane Pajk

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorice prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem in somentorice asist. dr. Simone Mencej Bedrač, mag. farm.

Maja Zupančič

Ljubljana, 2015

VSEBINA

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
SEZNAM SLIK	VIII
SEZNAM PREGLEDNIC	IX
SEZNAM GRAFOV	X
1. UVOD	1
1.1 BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE	1
1.2 SINTEZA TESTOSTERONA TER TESTOSTERON 5-ALFA-REDUKTAZA	2
1.3 AROMATAZA	3
1.4 DIHIDROTESTOSTERON IN ANDROGENI RECEPTOR	4
1.5 ESTRADIOL IN ESTROGENSKA RECEPTORJA	4
1.6 ZDRAVLJENJE BENIGNE HIPERPLAZIJE PROSTATE	7
1.6.1 ZAVIRALCI TESTOSTERON 5-ALFA-REDUKTAZE	8
1.6.1.1 FINASTERID	8
1.6.1.2 DUTASTERID	9
1.6.2 KIRURŠKO ZDRAVLJENJE BENIGNE HIPERPLAZIJE PROSTATE	10
1.7 FARMAKOGENETIKA FINASTERIDA/DUTASTERIDA PRI BENIGNI HIPERPLAZIJI PROSTATE	10
2. NAMEN DELA	12
3. EKSPERIMENTALNO DELO	14
3.1 OPIS VZORCEV	14
3.2 METODE	14
3.2.1 AVTOKLAVIRANJE	14
3.2.2 UPORABA KVANTITATIVNE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA DOLOČITEV GENOTIPOV PRI PREISKOVANCIH ZA POLIMORFIZMA <i>XbaI</i> in <i>PvuII</i> V GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1	14
3.2.3 UPORABA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO IN ANALIZE DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV	

	ZA DOLOČITEV GENOTIPOV PRI PREISKOVANCIH ZA POLIMORFIZEM <i>g.6754G>A</i> V GENU ZA ANDROGENI RECEPTOR	16
3.2.4	UPORABA ALELNO SPECIFIČNE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA DOLOČITEV GENOTIPOV PRI PREISKOVANCIH ZA POLIMORFIZEM <i>g.132810C>T</i> V GENU ZA AROMATAZO	19
3.2.5	SEKVENCIRANJE	20
3.3	MATERIALI, REAGENTI IN OPREMA	24
3.3.1	MATERIALI.....	24
3.3.2	REAGENTI	24
3.3.3	OPREMA	26
4	REZULTATI IN RAZPRAVA	28
4.1	OPTIMIZACIJA ANALIZE POLIMORFIZMOV <i>XbaI</i> IN <i>PvuII</i> V GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1 S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO	29
4.2	OPTIMIZACIJA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO IN ANALIZE DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV ZA DOLOČITEV POLIMORFIZMA <i>g.6754G>A</i> V GENU ZA ANDROGENI RECEPTOR	31
4.3	OPTIMIZACIJA ALELNO SPECIFIČNE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA DOLOČITEV POLIMORFIZMA <i>g.132810C>T</i> V GENU ZA AROMATAZO	34
4.4	SEKVENCIRANJE ZA POTRDITEV USTREZNOSTI ANALIZE POLIMORFIZMA V GENU ZA AROMATAZO	39
4.5	POGOSTOST ANALIZIRANIH GENOTIPOV V SKUPINI BOLNIKOV Z BENIGNO HIPERPLAZIJO PROSTATE.....	42
4.6	FARMAKOGENETSKA ANALIZA POLIMORFIZMOV V GENIH ZA ESTROGENSKI IN ANDROGENI RECEPTOR TER AROMATAZO PRI ZDRAVLJENJU Z ZAVIRALCI TESTOSTERON 5-ALFA-REDUKTAZE	45
4.7	GENETSKO OZADJE BENIGNE HIPERPLAZIJE PROSTATE.....	48

4.8	UČINKI ZDRAVLJENJA BENIGNE HIPERPLAZIJE PROSTATE S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM	50
4.9	OCENA VPLIVA POLIMORFIZOV <i>XbaI</i> IN <i>PvuII</i> V GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1 NA UČINKE ZDRAVLJENJA S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM.....	56
4.10	OCENA VPLIVA POLIMORFIZMA <i>g.6754G>A</i> V GENU ZA ANDROGENI RECEPTOR NA UČINKE ZDRAVLJENJA S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM.....	57
4.11	OCENA VPLIVA POLIMORFIZMA <i>g.132810C>T</i> V GENU <i>CYP19A1</i> NA UČINKE ZDRAVLJENJA S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM	57
4.12	OCENA VPLIVA TERAPIJE NA KOSTNE ZAPLETE	58
5	SKLEP	60
6	LITERATURA	62
7	PRILOGE	67
7.1	REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM <i>XbaI</i> V GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1	67
7.2	REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM <i>PvuII</i> V GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1	68
7.3	REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM <i>g.6754G>A</i> V GENU ZA ANDROGENI RECEPTOR	69
7.4	REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM <i>g.132810C>T</i> V GENU ZA CITOKROM P450 - OKSIDAZO 19A1	70

POVZETEK

Izhodišče. Benigna hiperplazija prostate (BHP) je kronično napredujoča bolezen, ki poslabša kakovost življenja moških po 50. letu in pri 10% bolnikov lahko preide v raka prostate. Za zdravljenje BHP se uporabljajo tudi zaviralci testosteron 5-alfa-reduktaze.

Namen. Proučevali smo vpliv polimorfizmov *XbaI* in *PvuII* v genu za estrogenski receptor 1, polimorfizma *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor ter polimorfizma *g.132810C>T* v genu za aromatazo na razvoj BHP, na učinkovitost enoletnega zdravljenja s finasteridom in dutasteridom ter povezanost teh polimorfizmov z morebitnimi neželenimi učinki na kosti, ki bi lahko bili posledica znižane koncentracije dihidrotestosterona.

Metode. Vključili smo 70 moških z BHP, od katerih je 35 moških 1 leto prejelo finasterid (5 mg/dan), 35 pa dutasterid (0,5 mg/dan). Za določitev genotipov pri preiskovancih smo uporabili kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo, verižno reakcijo s polimerazo in analizo dolžin restrikcijских fragmentov ter alelno specifično verižno reakcijo s polimerazo. Vpliv genetskih polimorfizmov smo ocenjevali pred, med in po enoletni terapiji glede na povezanost s kliničnimi znaki kot so: volumen prostate, koncentracija prostatično specifičnega antigena, dihidrotestosterona, testosterona, estradiola ter koncentracije kostnih kazalcev: CTX, P1NP in osteokalcina.

Rezultati. Zdravljenje je bilo ne glede na genotip pri vseh uspešno, saj so se volumen prostate, koncentracija prostatično specifičnega antigena in dihidrotestosterona znižali. Statistično značilnih razlik med obema učinkovinama nismo ugotovili. Volumen prostate se je v povprečju znižal za 33,1%, koncentraciji prostatično specifičnega antigena za 50,7% in dihidrotestosterona za 76,9%. Koncentraciji estrogena in testosterona sta se pričakovano povišali: koncentracija estrogena v povprečju za 24,2%, koncentracija testosterona pa za 12,8%. Koncentracije kostnih označevalcev so se po 6. mesecih povišale, nato pa zopet znižale: po enem letu zdravljenja je ostala povišana koncentracija C-terminalnega telopeptida (za 25,1%). Statistična analiza naših rezultatov je pokazala značilne razlike v koncentracijah testosterona v serumu po enoletnem zdravljenju med različnimi genotipskimi podskupinami le pri polimorfizmu v genu *CYP19A1*.

Zaključek. Zaključimo, da omenjeni polimorfizmi v genih za estrogenski receptor 1 in androgeni receptor nimajo pomembnega vpliva na rezultate enoletnega zdravljenja s finasteridom in dutasteridom. Nakazan je bil vpliv polimorfizma v genu *CYP19A1*.

Ključne besede: benigna hiperplazija prostate, farmakogenetika, *ESR1*, *AR*, *CYP19A1*

ABSTRACT

Background. Benign prostatic hyperplasia is a chronic progressive disease which gets worse the quality of life of men over 50 years and at 10% of patients can enter prostate cancer. Testosterone 5-alpha-reductase inhibitors are also used for treatment of BPH.

Purpose. We investigate the effect of *XbaI* and *PvuII* polymorphisms in estrogen receptor 1 gene, polymorphism *g.6754G>A* in androgen receptor gene and polymorphism *g.132810C>T* in aromatase gene on the development of BPH. We were also interested in the effectiveness of one year treatment with finasteride and dutasteride according these polymorphisms and the potential side effects on bone, which may be due to decreased levels of dihydrotestosterone.

Methods. 70 men suffering for BPH were included in the one year study: 35 men were receiving 5 mg finasteride daily and 35 men were receiving 0,5 mg dutasteride daily. Genotypes were determined by quantitative polymerase chain reaction, polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism and allele specific polymerase chain reaction. The influence of genetic polymorphisms were evaluated before, during and after one year of therapy with finasteride or dutasteride according to clinical signs: prostate volume, concentration of prostatic specific antigen, dihydrotestosterone, testosterone, estradiol and bone indicators concentration: CTX, P1NP and osteocalcin.

Results. Treatment with testosterone 5-alpha-reductase inhibitors irrespective of the genotype was successful: prostate volume decreased by 33,1%, concentration of prostatic specific antigen by 50,7% and concentration of dihydrotestosterone by 76,9%. There were no statistical significant differences between drugs. Increase of estrogen and testosterone concentration was expected: estrogen raised by 24,2% and testosterone raised by 12,8%. Bone markers concentration increased in a half of a year and then it decreased: in one year concentration of C-terminal telopeptide was increasing all the time (by 25,1%). Statistical analysis of our results showed significant differences in serum testosterone concentrations in one year treatment between genotype subgroups in *CYP19A1* gene polymorphism.

Conclusion. We conclude that polymorphisms in estrogen receptor 1 and androgen receptor have no significant impact on one year treatment with finasteride and dutasteride. Implied was impact of *CYP19A1* gene polymorphism.

Key words: benign prostatic hyperplasia, pharmacogenetics, *ESR1*, *AR*, *CYP19A1*

SEZNAM OKRAJŠAV

5-AR	testosteron 5-alfa-reduktaza
BHP	benigna hiperplazija prostate
bp	bazni par
CTX	C-terminalni telopeptid
CYP19A1	aromataza oz. citokrom P450-oksidaza 19A1
DHEA	dehidroepiandrosteron
DHEAS	dehidroepiandrosteron sulfat
DHT	dihidrottestosteron
E	estrogen
ESR	estrogenski receptor
FSH	folikle stimulirajoči hormon
IPSS	mednarodni vprašalnik za točkovno vrednotenje simptomov benigne hiperplazije prostate
LH	luteinizirajoči hormon
LUTS	simptomi spodnjih sečil
OC	osteokalcin
P1NP	intaktni N-terminalni propeptid prokolagena tipa I
PSA	prostatični specifični antigen
qPCR	kvantitativna verižna reakcija s polimerazo
RFLP	analiza dolžin restrikcijskih fragmentov
SHBG	spolne hormone vezoči globulin
T	testosteron
Tm	temperatura tališča
VP	volumen prostate

SEZNAM SLIK

- Slika 1: Primerjava zdrave s povečano prostato pri benigni hiperplaziji prostate.
- Slika 2: Sintezna pot testosterona.
- Slika 3: Pretvorba testosterona v estradiol ali dihidrotestosteron (DHT).
- Slika 4: Sintezna pot estrogenov pri moških in ženskah v menopavzi.
- Slika 5: Kemijska struktura finasterida.
- Slika 6: Kemijska struktura dutasterida.
- Slika 7: Mehanizem delovanja TaqMan sond.
- Slika 8: Agarozna gelska elektroforeza po neuspešni verižni reakciji s polimerazo pri polimorfizmu v genu za androgeni receptor za vzorce 27, 44-50.
- Slika 9: Optimizacija časov pri 3% agarozni gelski elektroforezi po analizi dolžin restrikcijskih fragmentov.
- Slika 10: Agarozna gelska elektroforeza po verižni reakciji s polimerazo za določitev genotipa pri polimorfizmu $g.6754G>A$ v genu za androgeni receptor.
- Slika 11: Agarozna gelska elektroforeza po analizi dolžin restrikcijskih fragmentov.
- Slika 12: Princip alelna specifične verižne reakcije s polimerazo.
- Slika 13: Istosmerna in protismerna začetnika, ki smo jih uporabili pri alelna specifični verižni reakciji s polimerazo.
- Slika 14: Rezultati ugotavljanja ustrezne temperature za potek alelna specifične verižne reakcije s polimerazo.
- Slika 15: Rezultati ponovnega ugotavljanja ustrezne temperature pri alelna specifični verižni reakciji s polimerazo (vzorec št. 2).
- Slika 16: Optimizacija temperature za potek alelna specifične verižne reakcije s polimerazo za T alel.
- Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza po alelna specifični verižni reakciji s polimerazo.
- Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza po verižni reakciji s polimerazo za sekvenciranje.
- Slika 19: Prikaz dela sekvence, kjer je prisoten polimorfizem $g.132810C>T$: vzorec 9.
- Slika 20: Prikaz dela sekvence, kjer je prisoten polimorfizem $g.132810C>T$: vzorec 20.
- Slika 21: Prikaz dela sekvence, kjer je prisoten polimorfizem $g.132810C>T$: vzorec 59.

SEZNAM PREGLEDNIC

- Preglednica 1: Razlike v sintezi estrogenov pri moških, ženskah v rodni dobi in ženskah v menopavzi.
- Preglednica 2: Značilnosti estrogenskih receptorjev.
- Preglednica 3: Reakcijska zmes za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za polimorfizem *XbaI* v genu za estrogenski receptor 1.
- Preglednica 4: Razmere za potek kvantitativne verižne reakcije s polimerazo za polimorfizem *XbaI* v genu za estrogenski receptor 1.
- Preglednica 5: Reakcijska zmes za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za polimorfizem *PvuII* v genu za estrogenski receptor 1.
- Preglednica 6: Razmere za potek kvantitativne verižne reakcije s polimerazo za polimorfizem *PvuII* v genu za estrogenski receptor 1.
- Preglednica 7: Reakcijska zmes za verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za polimorfizem *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor.
- Preglednica 8: Razmere za potek verižne reakcije s polimerazo za polimorfizem *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor.
- Preglednica 9: Reakcijska zmes za analizo dolžin restriksijskih fragmentov enega vzorca pri polimorfizmu *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor.
- Preglednica 10: Reakcijska zmes za alelni specifično verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za oba polimorfizma *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidozo 19A1.
- Preglednica 11: Razmere za potek alelni specifične verižne reakcije s polimerazo za oba polimorfizma *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidozo 19A1.
- Preglednica 12: Reakcijska zmes za verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za polimorfizem *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidozo 19A1 za sekvenciranje.
- Preglednica 13: Razmere za potek verižne reakcije s polimerazo za polimorfizem *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidozo 19A1 za sekvenciranje.
- Preglednica 14: Sestava reakcijske zmesi za sekvenciranje.
- Preglednica 15: Razmere za reakcijo sekvenciranja.

- Preglednica 16: Oligonukleotidni začetniki in njihova zaporedja.
- Preglednica 17: Fragmenti, ki jih dobimo pri določenem genotipu z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov pri polimorfizmu *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor.
- Preglednica 18: Frekvence genotipov za polimorfizem *XbaI* v genu za estrogenski receptor 1.
- Preglednica 19: Frekvence genotipov za polimorfizem *PvuII* v genu za estrogenski receptor 1.
- Preglednica 20: Frekvence genotipov za polimorfizem *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor.
- Preglednica 21: Frekvence genotipov za polimorfizem *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidoza 19A1.
- Preglednica 22: Primerjava nekaterih značilnosti dutasterida in finasterida.
- Preglednica 23: Povprečne vrednosti parametrov pred uvedbo zdravljenja.
- Preglednica 24: Analiza razlik v kliničnih in biokemičnih parametrih v skupinah, ki sta se zdravili s finasteridom oz. dutasteridom.
- Preglednica 25: Polimorfizmi, ki so bili proučevani v povezavi z benigno hiperplazijo prostate.

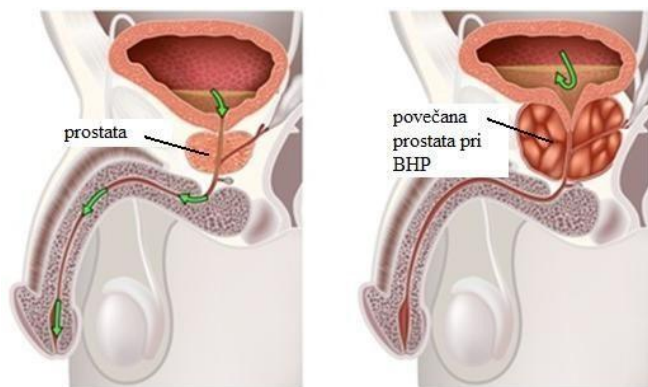
SEZNAM GRAFOV

- Graf 1: Rezultati genotipizacije polimorfizma *XbaI* s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo pri 70 bolnikih z BHP.
- Graf 2: Rezultati genotipizacije polimorfizma *PvuII* s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo pri 70 bolnikih z BHP.
- Graf 3: Zniževanje volumna prostate (VP), prostatičnega specifičnega antigena (PSA) in dihidrotestosterona (DHT) med terapijo.
- Graf 4: Zviševanje koncentracij testosterona (T) in estrogena (E) med terapijo.
- Graf 5: Spreminjanje koncentracije kostnih označevalcev med terapijo.

1. UVOD

1.1 BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE

Benigna hiperplazija prostate (BHP) je kronično napredujoča bolezen, ki je načeloma nenevarna, vpliva pa na kakovost življenja. Zaradi povečane prehodne cone prostate se zveča pritisk na sečnico, kar se kaže kot motnje uriniranja (npr. oslabel, prekinjajoč curek, pogostejše uriniranje čez dan, uhajanje seča in občutek neizpraznjenega mehurja po opravljenem mokrenju, kapljanje med in po mokrenju, nokturija), kar s skupno besedo poimenujemo simptomi spodnjih sečil (ang. lower urinary tract symptoms; LUTS) (1, 2). V primeru nepopolne izpraznitve mehurja se pogosto pojavijo še infekcije urinarnega trakta. BHP se pojavi pri več kot 50% moških, starih med 51 in 60 let ter pri 90% moških, starejših od 85 let. Potrebno pa je omeniti, da vsako povečanje prostate ne vodi do LUTS. Poleg tega vsak pacient z LUTS nima nujno BHP. Le 46% moških, starejših od 70 let, ima LUTS. Skoraj vsak moški, starejši od 80 let, pa ima histološko obliko BHP (Slika 1) (3, 4).



Slika 1: Primerjava zdrave prostate (levo) s povečano prostato (desno) pri benigni hiperplaziji prostate (5).

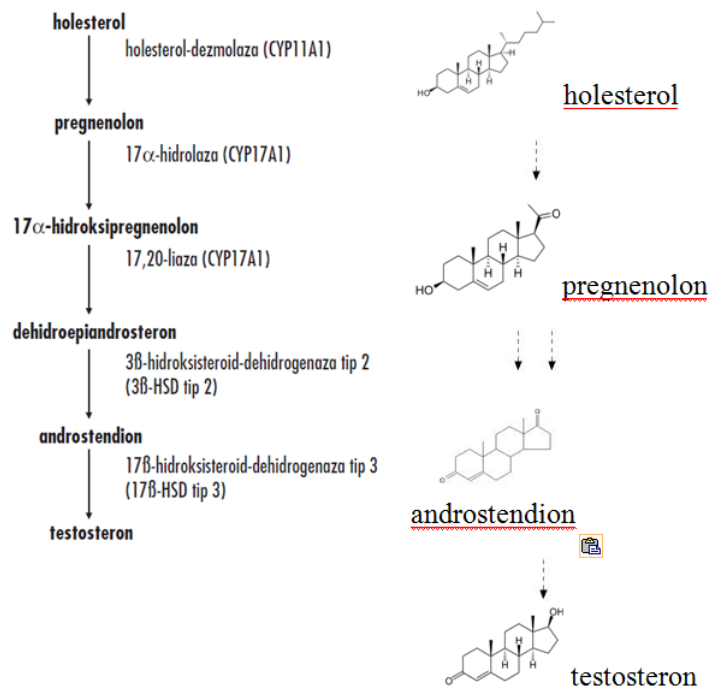
Najpogostejši dejavniki tveganja, ki povečajo verjetnost za razvoj BHP ali njeno poslabšanje, so starost (>50 let), volumen prostate >30 ml, veliko število točk (>8) pri vprašalniku IPSS (mednarodni vprašalnik za točkovno vrednotenje simptomov BHP) in povišana koncentracija prostatičnega specifičnega antigena (PSA) >1,5 ng/ml (1, 3). Pogostost bolezni se lahko oceni tudi s kliničnimi kriteriji, kamor poleg volumna prostate in IPSS vprašalnika štejemo še volumen zaostalega urina po uriniranju (>50 ml) in največji pretok urina (<10 ml/sekundo) (2).

BHP razdelimo v 2 fazi. Prva oz. patološka faza je asimptomatska. Vključuje napredovanje iz mikroskopskega na makroskopski nivo bolezni. Mikroskopski nivo se razvije pri vseh

moških, če dosežejo dovolj visoko življenjsko dobo, makroskopski nivo pa le pri približno polovici moških, ki so imeli predhodno razvit mikroskopski nivo bolezni. Druga oz. klinična faza se običajno kaže kot LUTS. Samo pri približno polovici moških z razvito makroskopsko obliko BHP se razvije klinična oblika (3).

1.2 SINTEZA TESTOSTERONA TER TESTOSTERON 5-ALFA-REDUKTAZA

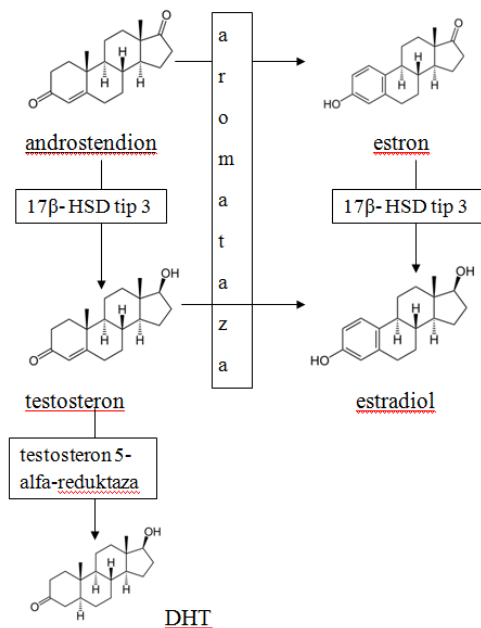
Sinteza testosterona je večstopenjska. Nastane iz holesterola preko pregnenolona, v zadnji stopnji pa se androstendion pod vplivom encima 17 β -hidroksisteroid-dehidrogenaze tipa 3 (17 β -HSD tip 3) pretvori v testosteron (Slika 2). V nadaljevanju se testosteron presnavlja v dva aktivna presnovka; v DHT (pod vplivom encima testosteron 5-alfa-reduktaze) ali estradiol (s pomočjo encima aromataze) (Slika 3) (6).



Slika 2: Sintezna pot testosterona (6).

Testosteron 5-alfa-reduktaza (5-AR) je encim, ki je vpleten v normalen razvoj prostate in napredovanje različnih bolezni prostate. Poznamo 3 tipe encimov, od katerih sta najbolj razširjena tip I in tip II. 5-AR tipa I se nahaja predvsem v koži in ledvicah ter v manjši meri v prostati, 5-AR tipa II pa v semenskih mešičkih, obmodku in prostati. Oba tipa encimov uvrščamo med mikrosomalne od nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata (NADPH)

odvisne encime. Optimalen pH za delovanje 5-AR1 je 6-8,5, za 5-AR2 pa 5-5,5. Tako 5-AR1 kot 5-AR2 sta prisotna v stromalnih in epitelijskih celicah normalne zdrave prostate ter tudi pri BHP. 5-AR2 je prevladujoč tip encima v stromalnih celicah. Pri BHP je 5-AR1 izražen predvsem v epitelijskih celicah, 5-AR2 pa je izražen v stromalnih in epitelijskih celicah. Prevladujoč tip encima pri BHP je 5-AR2, sta pa obe obliki prekomerno izraženi v primerjavi s prisotnostjo v normalni prostati (7).



Slika 3: Pretvorba testosterona v estradiol ali dihidrotestosteron (DHT) (8).

1.3 AROMATAZA

Aromataza oz. CYP19A1 (citokrom P450-oksidadza 19A1) je encim iz družine citokrom P450 (monooksigenaze), ki sodeluje pri ireverzibilni pretvorbi testosterona v estradiol - 17β in androstendiona v estron. Nahaja se v spolnih žlezah, maščobnem tkivu, posteljici, koži in kosteh. Mehanizem reakcije je zaporedna trikratna hidroksilacija, čemur sledi aromatizacija A obroča. Encim se nahaja v endoplazmatskem retikulumu spolnih žlez, možganov, maščobnega tkiva, placente, kosti in številnih drugih tkiv. Z zaviralci encima aromataza se zmanjša količina estrogenov (estradiola, estrona) v krvnem obtoku, količina androgenov (testosterona, androstendiona) pa se poveča. Posledično je večja količina androgenov na voljo za pretvorbo v DHT, kar pa lahko vodi v razvoj BHP. Pri moških se zaviralci aromataze uporabljajo za zdravljenje neplodnosti in ginekomastije (9).

1.4 DIHIDROTESTOSTERON IN ANDROGENI RECEPTOR

DHT nastaja iz testosterona s pomočjo encima 5-AR v prostati, modih, nadledvični žlezi in lasnih mešičkih. Testosteron je odgovoren predvsem za razvoj primarnih, DHT pa za razvoj sekundarnih moških spolnih znakov. DHT ima 2-3-krat večjo afiniteto do androgenega receptorja (AR), poleg tega tudi 5-krat počasneje oddisociira z AR kot testosteron. Androgeni igrajo preko AR tudi pomembno vlogo pri vzdrževanju normalnih procesov v kostnih celicah (osteoblastih, osteocitih) (6, 8, 10).

Na miših moškega spola so proučevali povezanost AR s kostnimi celicami. Pri proučevanju osteoblastov so miši brez gena za AR imele manjši volumen trabekularnih kosti in manjše število kostnih celic. Opazili so tudi rahlo prehodno znižanje celic kortikalne kostnine. AR ima v osteoblastih pomembno vlogo pri uravnavanju resorpcije trabekularne kostnine in formaciji kortikalne kostnine pri miših.

Aktivnost AR povečuje diferenciacijo osteocitov. Zaradi tega so verjetno ravno osteociti glavne tarčne celice za delovanje androgenov na kostnino. Ugotovili so, da delovanje androgenov na osteocite vpliva predvsem na trabekularno kostnino starejših miši, ne pa na razvoj kortikalne kostnine (11).

AR spada v skupino jedrnih receptorjev; v prostati se nahaja v epiteljskih in stromalnih celicah. Na AR se vežeta in ga s tem aktivirata testosteron in DHT. Obstajata 2 obliki AR, in sicer AR-A in AR-B. Obe sta si strukturno podobni, sestavljeni pa sta iz 5 domen (A/B-F). V prostati prevladuje oblika AR-B. V prostati se DHT lahko presnovi do manj aktivnih metabolitov: redukcija s 3α -hidroksisteroid dehidrogenazo (3α -HSD) v 5α -androstan- 3α , 17β -diol (3α -diol) ali s 3β -hidroksisteroid dehidrogenazo (3β -HSD) v 5α -androstan- 3β , 17β -diol (3β -diol), oksidacija s 17β -HSD v 5α -androstan-3,17-dion (5α -androstandion), ta pa se s 3α -HSD v nadaljevanju reducira v androsteron (6, 10, 12, 13).

1.5 ESTRADIOL IN ESTROGENSKA RECEPTORJA

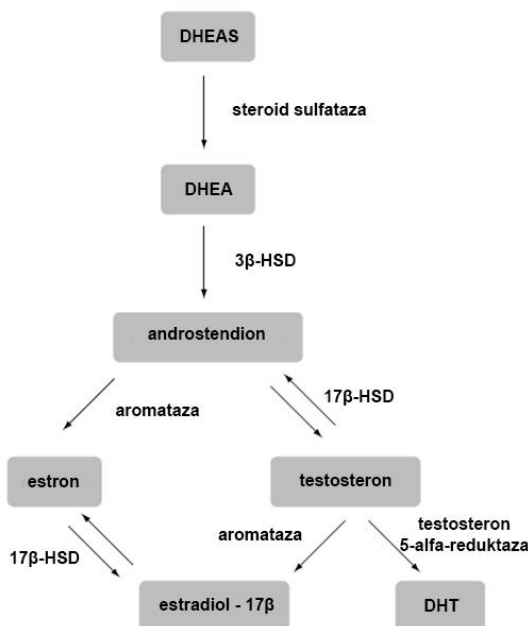
Estradiol je eden od predstavnikov estrogenov, ženskih spolnih hormonov. Nastaja v jajčnikih, v manjši meri pa tudi v modih, maščobnih celicah, dojkah, jetrih in nadledvični žlezi. Sintetizira se iz testosterona ali androstendiona pod vplivom encima aromataze (Slika 4) (14).

Estrogeni igrajo pomembno vlogo ne le pri ženskah ampak tudi pri moških. Pri ženskah v rodni dobi se estrogeni izločajo predvsem iz jajčnikov, pri ženskah v menopavzi in moških pa igrajo pomembno vlogo ekstra gonadna tkiva. Sinteza estrogenov v ekstra gonadnih tkivih je odvisna predvsem od C19 steroidnih prekurzorjev (testosterona, androstendiona, dehidroepiandrosterona (DHEA) in dehidroepiandrosteron sulfata (DHEAS)). Podobno kot testosteron, se tudi androstendion, DHEA in DHEAS pretvorijo v DHT ali estradiol-17 β . V Preglednici 1 so prikazani podatki o sintezi estrogenov pri obeh spolih, na Sliki 4 pa sintezna pot estrogenov pri moških. Sintezni poti estrogenov in androgenov sta močno povezani in tako pomembni za oba spola (15).

Preglednica 1: Razlike v sintezi estrogenov pri moških, ženskah v rodni dobi in ženskah v menopavzi (15).

	moški	ženske v rodni dobi	ženske v menopavzi
vir estradiola-17β	ekstra gonadna tkiva (80%), testisi (20%)	jajčniki (95%), skorja nadledvične žleze (5%)	ekstra gonadna tkiva (100%)
koncentracija estradiola-17β v plazmi	prib. 0,10 nM	0,11-2,20 nM	prib. 0,04 nM
molekule, iz katerih nastane estradiol-17β	testosteron, androstendion, DHEA*, DHEAS*	acetil koencim A, holesterol v plazmi	testosteron, androstendion, DHEA*, DHEAS*

*DHEA – dehidroepiandrosteron, DHEAS - dehidroepiandrosteron sulfat



Slika 4: Sintezna pot estrogenov pri moških in ženskah v menopavzi (15).

Sproščanje estrogenov uravnava folikle stimulirajoči hormon (FSH), ki ga izloča hipofiza. Estrogeni se vežejo na estrogenske receptorje (ESR), ki jih uvrščamo med jedrne receptorje in na z G- proteinom sklopljene estrogenske receptorje (GPER). Poznamo dve vrsti ESR: ESR1 (ali ESR α) in ESR2 (ali ESR β). ESR1 se nahajajo predvsem v maternici, vagini, stromalnih celicah jajčnikov, mlečnih žlezah in hipotalamusu, ESR2 pa v granuloznih celicah jajčnikov, ledvicah, srcu, kosteh, pljučih... Ugotovili so, da je za proliferacijo prostatičnega tkiva potrebno delovanje estradiola preko ESR1 receptorjev. V zdravi prostati so ESR1 izraženi le v stromalnih celicah, v epitelijskih celicah prostate pa ne. Pri rakavih celicah pa so ESR1 izraženi tudi v epitelijskih celicah. Gen *ESR1* je sestavljen iz 8 eksonov in 7 intronov, dolg 140 kbp. Aktivirani ESR tvorijo dimere. Ker pa sta tako ESR α kot ESR β izražena v večini tarčnih celic, lahko receptorji tvorijo $\alpha\alpha$ oz. $\beta\beta$ homodimere ali pa $\alpha\beta$ heterodimere (12, 14, 16). V Preglednici 2 so predstavljene glavne značilnosti estrogenskih receptorjev (15).

Preglednica 2: Značilnosti estrogenskih receptorjev (15).

	ER α	ER β	GPER 1
tip receptorja	jedrni receptor	jedrni receptor	z G-proteinom sklopljeni receptor
struktura	DNA-vezavna domena, ligand vezavna domena, N-terminalna domena	DNA-vezavna domena, ligand vezavna domena, N-terminalna domena	7 transmembranskih regij (α vijačnica), 4 zunajcelični in 4 znotrajcelični segmenti
porazdelitev po tkivih	uterus, prsi, jetra, ledvica, prostata, jajčniki, testisi, skelet, možgani	debelo črevo, žleze slinavke, pljuča, mehur, prostata, jajčniki, testisi, skelet, možgani	centralni in periferni živčni sistem, maternica, jajčniki, mlečne žleze, testisi, gastrointestinalni trakt, trebušna slinavka, kostno tkivo, celice imunskega sistema

V študiji (Nicholson et al., 2013) so ugotovili, da so epiteljske celice, ki imajo hkrati izražene *AR* in *ESR1*, pogostejše pri BHP kot v normalnem, zdravem tkivu prostate. Hkrati so epiteljske celice, ki nimajo izraženih niti *AR* niti *ESR1* redkejše pri BHP kot v normalnem, zdravem tkivu. V stromalnih celicah ni bilo statistično značilne razlike pri hkratnem izražanju *AR* in *ESR1* med BHP in zdravo prostato. So pa tudi stromalne celice, z neizraženimi *AR* in *ESR1*, redkejše pri BHP kot pri zdravem tkivu (12).

1.6 ZDRAVLJENJE BENIGNE HIPERPLAZIJE PROSTATE

Moškim z blagimi do zmernimi simptomi spodnjih sečil svetujejo le zmanjšan vnos tekočine zvečer ter zmanjšan vnos kofeina in alkohola. To velja le v primerih, ko simptomi ne predstavljajo grožnje zdravju oz. ne motijo preveč življenjskega sloga posameznika (4).

Zdravljenje poteka z zdravili in/ali kirurško. Za zdravljenje z zdravili se uporabljajo predvsem zaviralci encima testosteron 5-alfa-reduktaze (finasterid, dutasterid), zaradi katerih se velikost prostate zmanjša za 20-30% v 3-6 mesecih. Uporabljajo se tudi antagonisti adrenergičnih receptorjev α (delujejo na gladke mišice), ki izboljšajo pretok seča in redkeje zaviralci fosfodiesteraze 5. Kirurška terapija pa se uporabi, ko je zdravljenje z zdravili neuspešno oz. ko so obstruktivni znaki (npr. akutna retenca urina, kamni, pogoste okužbe spodnjih sečil) močno izraženi (2).

Antagonisti adrenergičnih receptorjev α_1 (prazosin, terazosin, doksazosin, silodosin, tamsulozin, alfuzosin) se uporabljajo za odpravljanje kliničnih simptomov bolezni in povečanje pretoka seča. Mehanizem delovanja zaviralcev fosfodiesteraze 5 (sildenafil, tadalafil, vardenafil) zajema povečanje znotrajcelične koncentracije cGMP. Rezultat je relaksacija gladkih mišic in povečanje krvnega pretoka v tkivu. Sočasna uporaba doksazosina in zaviralcev fosfodiesteraze 5 lahko pri nekaterih bolnikih povzroči ortostatsko hipotenzijo. Zaradi tega se zdravljenje z zaviralci fosfodiesteraze 5 začne le, če ima bolnik med zdravljenjem z α_1 antagonisti urejen krvni tlak (15, 17).

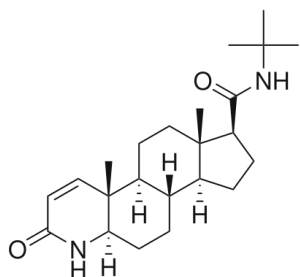
1.6.1 ZAVIRALCI TESTOSTERON 5-ALFA-REDUKTAZE

Zaviralce 5-AR predpisujejo moškim, ki imajo hkrati zmerne do hude simptome spodnjih sečil in povečan volumen prostate (>40 ml) ali povišano koncentracijo PSA (>1,4-1,6 $\mu\text{g/l}$). Njihov učinek je preprečevanje povečanja prostate, lahko jo celo zmanjšajo. Izboljšanje simptomov nastopi z zakasnitvijo, in sicer v treh do šestih mesecih. Poleg tega zaviralci testosteron 5-alfa-reduktaze zmanjšajo tveganje za akutni zastoj seča (4, 17).

Glavna naloga 5-AR je pretvorba testosterona v DHT. Ker je encim v veliki meri prisoten v prostati, pride v žlezi do izrazitega ojačanja androgenega signala. Z zaviranjem delovanja 5-AR, kar dosežemo z dutasteridom in finasteridom, se zniža koncentracija DHT, hkrati pa se poveča koncentracija testosterona. Rezultati študij kažejo, da je koncentracija DHT bolj znižana kot je povišana koncentracija testosterona. Poleg tega je učinek DHT na celice prostate večji kot učinek testosterona. Vse skupaj vodi v močno zmanjšano delovanje androgenov na prostato (18).

1.6.1.1 FINASTERID

Finasterid (*N*-(1,1-dimetiletil)-3-okso-(5 α ,17 β)-4-azaandrost-1-en-17-karboksamid) v primerjavi z dutasteridom zavira le tip II 5-AR (Slika 5). Uporablja se za zdravljenje BHP in preprečitev zapletov, povezanih s sečili (zmanjšuje tveganje za akutno retenco urina, zmanjšuje potrebo po kirurških posegih). Rezultat zdravljenja je zmanjšan volumen prostate in izboljššan pretok urina, vpliva pa tudi na izboljšanje nekaterih drugih simptomov BHP (19).



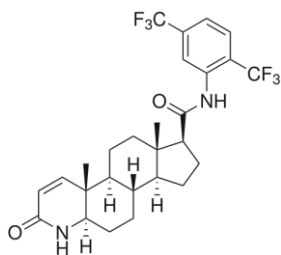
Slika 5: Kemijska struktura finasterida (20).

V 5-letni študiji (Kaplan et al., 2011) so primerjali učinkovitost finasterida (vs. placebo) pri različnih volumnih prostate (VP). Pacienti so dnevno prejeli bodisi 5 mg finasterida bodisi 5 mg placeba. Pri dolgotrajnem zdravljenju je finasterid v primerjavi s placebom zmanjšal napredovanje klinične oblike BHP in LUTS pri pacientih z $VP \geq 30$ mL. Pri pacientih z $VP < 30$ ml pa ni bilo statistično značilnih razlik med skupino s placebom in skupino, na terapiji s finasteridom. VP se je pri pacientih z $VP \geq 30$ mL v povprečju zmanjšal za 5,79 ml, pri pacientih z $VP < 30$ ml pa se je celo povečal za 0,28 ml (21).

1.6.1.2 DUTASTERID

Dutasterid ((5 α , 17 β)-*N*-{2,5-bis(trifluorometil)fenil}-3-okso-4-azaandrost-1-en-17-karboksamid) z inhibicijo tipa I in tipa II 5-AR zmanjša koncentracijo DHT v krvi (Slika 6). Posledica tega je zmanjšanje volumna prostate. Uporablja se za zdravljenje zmernih do hudih simptomov (22).

V 4-letni študiji (Toren et al., 2013) so primerjali vpliv dutasterida in placeba na različne parametre BHP. 792 moških je dnevno prejelo 0,5 mg dutasterida, 825 moških pa 0,5 mg placeba. Klinična oblika BHP se je razvila pri 297 (36%) moških, ki so jemali placebo in 167 (21%) moških na terapiji z dutasteridom. Akutno retenco urina je imelo 63 pacientov s placebom in 13 na terapiji z dutasteridom, infekcijo urinarnega trakta pa 87 moških na placebo in 54 na terapiji z dutasteridom. Pri neželenih učinkih ni bilo statistično značilnih razlik med skupinama; erektilna disfunkcija se je sicer pojavila pri 42 pacientih, ki so prejeli placebo in 71 pacientih, ki so prejeli dutasterid, vendar pa je prišlo do pomembnega zmanjšanja klinične oblike BHP (23).



Slika 6: Kemijska struktura dutasterida (24).

1.6.2 KIRURŠKO ZDRAVLJENJE BHP

Kljub čedalje uspešnejšemu zdravljenju BHP z zdravili, se v določenih primerih še vedno uporablja kirurško zdravljenje. Najpogostejše indikacije, pri katerih se poseže po kirurškem zdravljenju, so bodisi nenadna zapora seča bodisi kronična zapora seča, vnetja, krvavitve, kamni, okvare v delovanju ledvic in neuspešno zdravljenje z zdravili. Metode, ki se že dlje časa uporabljajo za zdravljenje simptomov spodnjih sečil pri benigni prostatični obstrukciji, so transuretralna resekcija prostate, transuretralna incizija prostate in odprta prostatektomija (25).

Transuretralno resekcijo prostate (TURP) opravijo pri prostatah, velikih 30-80 cm³. Po posegu se izboljšajo simptomi mokrenja (za 70%) in pretok (za 125%). Transuretralno incizijo prostate (TUIP) opravijo pri prostatah, manjših od 30 cm³, medtem ko klasično ali odprto prostatektomijo opravijo le pri močno povečanih prostatah (nad 80-100 cm³) (25).

1.7 FARMAKOGENETIKA FINASTERIDA/DUTASTERIDA PRI BENIGNI HIPERPLAZIJI PROSTATE

Farmakogenetika finasterida in dutasterida pri BHP je zaenkrat še bolj malo raziskano področje. Pri pregledu literature smo našli študijo o povezanosti kroničnega vnetja in debelosti z BHP ter LUTS, ki pa ni povezana s finasteridom in dutasteridom. Domnevali so, da lahko kronično vnetje in debelost prispevata k razvoju ali napredovanju BHP in LUTS. S tem namenom so proučevali 17 polimorfizmov enega nukleotida v genih imunskega odziva in genih, ki so vpleteni v razvoj debelosti. Ugotovili so, da noben od preiskovanih polimorfizmov ni statistično značilno povezan z nastankom ali napredovanjem BHP in LUTS. Opazili pa so nekoliko večje tveganje za razvoj in napredovanje BHP pri določenih polimorfizmih (polimorfizem *rs1205* v genu za C

reaktivni protein, *rs1501299* v genu *ADIPOQ*...). Zaključili so, da so polimorfizmi v genih za debelost in imunski odziv verjetno povezani z razvojem in napredovanjem BHP (26).

Več podatkov najdemo o farmakogenetiki omenjenih zdravilnih učinkovin pri raku prostate. Tako je Makridakis ugotovil, da so genetske variante encima 5-AR povezane z razvojem in napredovanjem raka prostate. In vitro so proučevali farmakogenetiko finasterida in dutasterida preko variacij v genu *SRD5A2*. Mutacije v genu *SRD5A2*, ki nosi zapis za encim 5-AR tipa II, povzročijo povečano aktivnost encima in hkrati zmanjšan učinek inhibicije finasterida. Ta ugotovitev pojasnjuje, da prisotnost specifičnih mutacij v genu *SRD5A2*, povzroči zmanjšano učinkovitost finasterida in s tem bolj agresivno rast tumorjev (27).

Proučevali so številne variacije v genu *SRD5A2*, ki bi lahko vplivale na uspešnost zdravljenja s finasteridom in dutasteridom. Dokazali so, da je dutasterid močnejši zaviralec encima 5-AR kot finasterid: to velja za večino preiskovanih variacij. Dokazali so, da učinkovini spadata med počasne, časovno odvisne kompetitivne zaviralce 5-AR. Vendar pa je dutasterid uspešnejši (določili so nižjo konstanto inhibicije) (27).

2 NAMEN DELA

Benigna hiperplazija prostate (BHP) je kronično napredujoča bolezen, ki se kaže kot motnje uriniranja (pogostejše uriniranje čez dan, uhajanje seča, oslabel, prekinjajoč curek, občutek neizpraznjenega mehurja...). Zdravljenje poteka z zdravili in/ali kirurško. Pri farmakoterapiji BHP se lahko uporabljajo zaviralci testosteron 5-alfa-reduktaze (5-AR), antagonisti adrenergičnih receptorjev α , v določenih primerih tudi zaviralci fosfodiesteraze 5. Razvoj BHP ima tudi genetsko ozadje, ki je prav tako kot farmakogenetika zaviralcev 5-AR pri BHP slabo raziskano, zato je bil namen naše naloge oceniti vpliv izbranih polimorfizmov v genih za estrogenski receptor 1 (*ESR1*), androgeni receptor (*AR*) in aromatazo (*CYP19A1*) na:

- razvoj BHP,
- učinkovitost zdravljenja BHP s finasteridom in dutasteridom po 6 in 12 mesecih zdravljenja,
- povezanost z morebitnimi neželenimi učinki na kosti, ki bi lahko bili posledica znižanja koncentracije dihidrotestosterona.

V ta namen bomo izvedli več stopenj:

- načrtovali in izbrali ustrezne oligonukleotidne začetnike ter optimizirali reakcijske pogoje PCR za pomnoževanje izbranih odsekov DNA,
- optimizirali postopek analize dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP) in postopek alelna specifične verižne reakcije s polimerazo,
- genotipizirali vzorce DNA 70 bolnikov z BHP s kvantitativnim PCR (polimorfizma *XbaI* in *PvuII*), PCR-RFLP metodo (polimorfizem *g.6754G>A*) ali z alelna specifičnim PCR (polimorfizem *g.132810C>T*),
- določili pogostost štirih polimorfizmov v treh genih in sicer *XbaI* in *PvuII* v genu *ESR1*, *g.6754G>A* v genu *AR* in *g.132810C>T* v genu *CYP19A1* pri bolnikih z BHP. V nadaljevanju bomo s pomočjo kliničnih in biokemijskih parametrov ugotavljali vpliv polimorfizmov *XbaI*, *PvuII*, *g.6754G>A* in *g.132810C>T* na učinkovitost zdravljenja s finasteridom in dutasteridom ter morebitne učinke na kosti, ki bi lahko bili posledica spremenjenih koncentracij dihidrotestosterona,
- s statističnimi metodami primerjali učinkovitost obeh zdravilnih učinkovin pri zdravljenju benigne hiperplazije prostate v celotni skupini ne glede na genotip,

- ocenili učinkovitost zdravljenja v odvisnosti od genotipov s pomočjo podatkov o volumnu prostate, serumskih koncentracij testosterona, dihidrotestosterona, estradiola in prostatično specifičnega antigena ter vpliv na kostno remodelacijo s pomočjo koncentracije kostnih biokemijskih označevalcev (CTX, osteokalcina, P1NP).

3 EKSPERIMENTALNO DELO

3.1 OPIS VZORCEV

Za analizo smo uporabili izolirano DNA iz periferne krvi 70 pacientov z benigno hiperplazijo prostate. Polovica pacientov je bila na terapiji z dutasteridom (0,5 mg/dan), polovica pa s finasteridom (5 mg/dan). Podatke smo pridobivali eno leto (na začetku študije, pol leta in eno leto po začetku): pridobivali smo antropometrične, klinične in biokemične podatke. Študija je bila izvedena v Splošni bolnišnici Celje, odobrila pa jo je Komisija Republike Slovenije za medicinsko etiko. Vsi bolniki so tudi podpisali izjavo o prostovoljnem sodelovanju v študiji. Povprečna starost pacientov je bila 67 ± 7 let (od 51 do 79 let), povprečna telesna teža $85,0 \pm 12,8$ kg in obseg pasu $102,7 \pm 8,9$ cm ter minimalna vrednost volumna prostate 30 cm^3 (povprečna vrednost $46,7 \pm 15,4 \text{ cm}^3$). Vsi bolniki so imeli glede na število točk IPSS vprašalnika zmerne simptome spodnjih sečil (15 ± 5 točk).

3.2 METODE

3.2.1 AVTOKLAVIRANJE

Nastavke za polavtomatske pipete in centrifugirke smo morali pred uporabo sterilizirati. Sterilizacijo materiala smo opravili pri 1 baru nadtlaka in temperaturi 121°C . Po končanem postopku smo material posušili v sušilniku.

3.2.2 UPORABA KVANTITATIVNE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA DOLOČITEV GENOTIPOV PRI PREISKOVANCIH ZA POLIMORFIZMA *XbaI* in *PvuII* V GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1

Kvantitativni PCR (qPCR) smo uporabili za določitev polimorfizmov *XbaI* in *PvuII* v genu *ESR1*. Priprava vzorcev je potekala v DNA komori, ki smo jo predhodno očistili s 70% etanolom. S 3% hipokloritom pa smo očistili še ostali material, ki smo ga uporabljali med pripravo vzorcev (polavtomatske pipete, epice z vzorci in reagenti). Vse reagente smo pred uporabo in po dodatki v reakcijsko zmes dobro premešali. Na ploščico smo najprej odpipetirali zmes reagenčne zmesi HOT Firepol (ROX), sonde in vode, nato pa še

posamezne vzorce DNA. V slepi vzorec smo namesto DNA dali vodo ter tako preverili morebitno kontaminacijo reakcijske zmesi.

Po nanosu vzorcev na ploščico smo ploščico centrifugirali 5 minut pri hitrosti 2000 obratov/min. S tem smo dosegli večjo homogenost vzorcev. Sestava reakcijske zmesi in razmere za potek PCR reakcije za polimorfizem *XbaI* so podani v Preglednicah 3 in 4, za polimorfizem *PvuII* pa v Preglednicah 5 in 6.

Preglednica 3: Reakcijska zmes za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za polimorfizem *XbaI* v genu za estrogenski receptor 1.

SESTAVINA	VOLUMEN (μl)
5x HOT Firepol Probe reagenčna zmes (ROX)	1,6
sonde 40× C___3163591_10	0,2
ultračista voda	5,2
DNA	1,0
SKUPAJ	8,0

Preglednica 4: Razmere za potek kvantitativne verižne reakcije s polimerazo za polimorfizem *XbaI* v genu za estrogenski receptor 1.

TEMPERATURA	ČAS	ŠTEVILO PONOVIJEV	STOPNJA REAKCIJE
95°C	15 min	1×	začetna denaturacija
95°C	15-20 s	45×	denaturacija
60°C	60 s		prileganje oligonukleotidnih začetnikov/podaljševanje verige DNA

Preglednica 5: Reakcijska zmes za kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za polimorfizem *PvuII* v genu za estrogenski receptor 1.

SESTAVINA	VOLUMEN (μl)
5x HOT Firepol Probe reagenčna zmes (ROX)	1,6
sonde C__3163590_10	0,2
ultračista voda	5,2
DNA	1,0
SKUPAJ	8,0

Preglednica 6: Razmere za potek kvantitativne verižne reakcije s polimerazo za polimorfizem *PvuII* v genu za estrogenski receptor 1.

TEMPERATURA	ČAS	ŠTEVILO PONOVIJEV	STOPNJA REAKCIJE
95°C	15 min	1×	začetna denaturacija
95°C	15-20 s	45×	denaturacija
60°C	60 s		prileganje oligonukleotidnih začetnikov/podaljševanje verige DNA

3.2.3 UPORABA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO IN ANALIZE DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV ZA DOLOČITEV GENOTIPOV PRI PREISKOVANCIH ZA POLIMORFIZEM *g.6754G>A* V GENU ZA ANDROGENI RECEPTOR

Klasično PCR reakcijo smo uporabili za pomnoževanje DNA pri identifikaciji polimorfizma v genu *AR*. Najprej smo začeli z načrtovanjem ustreznih oligonukleotidnih začetnikov, ki smo jih v nadaljevanju tudi preverili. Zanimali so nas predvsem parametri, ki sem jih opisala v poglavju Rezultati in razprava. Pomagali smo si z literaturo in programoma Primer3web (28) in Primer-BLAST (29). Sestava reakcijske zmesi za PCR reakcijo za polimorfizem v genu *AR* in optimalne razmere pomnoževanja so predstavljeni v Preglednicah 7 in 8.

Po končanem delu smo izbrali najbolj optimalna oligonukleotidna začetnika:

istosmerni začetnik (AR_F): 5'-GCTACCTGGTCCTGGATGAG-3' (60% GC;

$T_m=63,7^{\circ}\text{C}$)

protismerni začetnik (AR_R): 5'-CTGCCTTACACAACCTCCTTGGC-3' (54,5% GC;

$T_m=66,8^{\circ}\text{C}$)

Preglednica 7: Reakcijska zmes za verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za polimorfizem *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor.

SESTAVINA	VOLUMEN (μl)
ultračista voda	7,6
10× GOLD pufer	2,0
dNTP (2 mM)	2,0
istosmerni začetnik AR_F (5 μM)	1,0
protismerni začetnik AR_R (5 μM)	1,0
MgCl ₂ (25 mM)	3,2
Taq polimeraza (5 U/l)	0,2
DNA	3,0
SKUPAJ	20,0

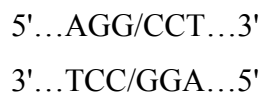
Preglednica 8: Razmere za potek verižne reakcije s polimerazo za polimorfizem *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor.

TEMPERATURA ($^{\circ}\text{C}$)	ČAS	ŠTEVILO PONOVIJEV	STOPNJA REAKCIJE
94	10 min	1×	začetna denaturacija
94	30 s	41×	denaturacija
60	30 s		prileganje oligonukleotidnih začetnikov
72	40 s		podaljševanje verige DNA
72	7 min	1×	zaključno podaljševanje

Za potrditev uspešnosti reakcije PCR smo pri polimorfizmu v genu *AR* preverili nastale produkte z agarozno gelsko elektroforezo. Uporabili smo 3% agarozni gel, ki smo ga pripravili iz 2,25 g agaroze in 75 ml 1×TAE pufra. Vse skupaj smo krajši čas segrevali v mikrovalovni pečici, da se je agarozna raztopila. Preden smo raztopino vlili v kadičko, smo dodali še 3,0 µl barvila Midori Green. Gel smo pustili v kadički, da se je strdil.

Elektroforezo smo izvedli tako, da smo v posamezne žepke na 3% agaroznem gelu nanašali zmes PCR produkta (2 µl) in barvila bromfenol modro (1 kapljica), ki smo ju predhodno s polavtomatsko pipeto pomešali na parafilmu. Elektroforeza je potekala v 1×TAE pufri, 25 min pri 90 V. Gel smo po koncu elektroforeze slikali z napravo G-Box.

Vrsto genotipov smo v nadaljevanju določili z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov. PCR produkt pri polimorfizmu v genu *AR* je bil dolg 411 bp. S pomočjo programa NEB Cutter (New England BioLabs) (30) smo poiskali ustrezen restrikcijski encim- *Stu I* (Slika 10). *Stu I* cepi naslednje zaporedje:



Stu I je cepil naš PCR produkt (v primeru homozigota GG je prišlo do cepitve, pri homozigotu AA ne, pri heterozigotu AG pa je pri alelu G prišlo do cepitve, pri alelu A pa ne) na dva manjša fragmenta: 324 in 87 bp . Sestava reakcijske zmesi za RFLP je podana v Preglednici 9.

Preglednica 9: Reakcijska zmes za analizo dolžin restrikcijskih fragmentov enega vzorca pri polimorfizmu *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor.

SESTAVINA	VOLUMEN (µl)
ultračista voda	8,3
NEBuffer 4	1,5
<i>Stu I</i> (10U/ µl)	0,2
PCR produkt	5,0
SKUPAJ	15,0

Reakcijsko zmes (Preglednica 9) smo pustili na vodni kopeli (37°C) čez noč. Po končani restrikciji smo izvedli elektroforezo. Najprej smo 1,5 ml epice z restrikcijsko zmesjo

centrifugirali (da je bila celotna vsebina na dnu epice). V epice smo nato dodali 3,0 μ l nanašalnega pufra (ksilen cianol) ter celotno vsebino nanесли na 3% agarozni gel. Po optimizaciji pogojev RFLP smo elektroforezo izvajali 60 min pri 90 V, v 1xTAE pufri.

3.2.4 UPORABA ALELNO SPECIFIČNE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA DOLOČITEV GENOTIPOV PRI PREISKOVANCIH ZA POLIMORFIZEM *g.132810C>T* V GENU ZA AROMATAZO

Pri določanju genotipa za polimorfizem *g.132810C>T* v genu *CYP19A1* smo uporabili alelno specifični PCR, ki smo ga izvedli na aparatu Biorad C1000 Thermal Cycler. Najprej smo izbrali ustrezne oligonukleotidne začetnike z uporabo programov Primer3web (28) in Primer-BLAST (29) ter jih preverili s programom OligoAnalyzer (31). Preverili smo, ali oligonukleotidni začetniki tvorijo dimere in zanke ter vrednost T_m in odstotek GC. Nato smo izvedli še optimizacijo pogojev za potek reakcije. Reakcijska zmes za PCR reakcijo enega vzorca in razmere za potek PCR reakcije so prikazani v Preglednicah 10 in 11.

Oligonukleotidni začetniki pri polimorfizmu v genu *CYP19A1*;

istosmerni začetnik (CYP19A1_C_F): 5'-TAGAGAAGGCTGGTCAGTAACC-3' (50% GC; $T_m=61,2^\circ\text{C}$)

protismerni začetnik (CYP19A1_C_R): 5'-GCACATTTGGTGGGAATCGGG-3' (55% GC; $T_m=69,5^\circ\text{C}$)

istosmerni začetnik (CYP19A1_T_F): 5'-TGCAGGAAAGTACATCGCCA-3' (50% GC, $T_m=66,6^\circ\text{C}$)

protismerni začetnik (CYP19A1_T_R): 5'-ACTGATGAGAAATGCTCCAGAATA-3' (37,5% GC; $T_m=62,7^\circ\text{C}$)

Preglednica 10: Reakcijska zmes za alelni specifično verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za oba polimorfizma *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidozo 19A1.

SESTAVINA	VOLUMEN (µl)
Sybr Select 2×	5,0
ultračista voda	3,0
istosmerni začetnik (CYP19A1_C_F)/(CYP19A1_T_F)	0,5
protismerni začetnik (CYP19A1_C_R)/(CYP19A1_T_R)	0,5
DNA	1,0
SKUPAJ	10,0

Preglednica 11: Razmere za potek alelni specifične verižne reakcije s polimerazo za oba polimorfizma *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidozo 19A1.

TEMPERATURA (°C)	ČAS	ŠTEVILO PONOVIJEV	STOPNJA REAKCIJE
95	2 min	1×	začetna denaturacija
95	15 s	T alel: 46× C alel: 44×	denaturacija
T alel: 64 C alel: 66	30 s		prileganje oligonukleotidnih začetnikov
72	30 s		podaljševanje verige DNA
72	5 min	1×	zaključno podaljševanje

Po končani reakciji smo izvedli še agarozno gelsko elektroforezo (pogoji elektroforeze: 3% agarozni gel z Midori Green, U=90 V, t=25 min, nanašalni pufer ksilen cianol).

3.2.5 SEKVENCIRANJE

Pred sekvenciranjem smo najprej izvedli PCR reakcijo. Izbrali smo po 3 različne vzorce za vsak genotip: heterozigot CT (vzorci št. 1, 13 in 59) in homozigota CC (vzorci št. 20, 32, 56) ter TT (vzorci št. 9, 16, 30). Sestava reakcijske zmesi enega vzorca in razmere za potek reakcije so podani v Preglednicah 12 in 13. Pri PCR reakciji smo za oligonukleotidna začetnika uporabili istosmerni začetnik T alela (5'-TGCAGGAAAGTACATCGCCA-3') in

protismerni začetnik C alela (5'-GCACATTTGGTGGGAATCGGG-3') ter tako zagotovili, da je bilo mesto polimorfizma na sredini.

Preglednica 12: Reakcijska zmes za verižno reakcijo s polimerazo enega vzorca za polimorfizem *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidozo 19A1 za sekvenciranje.

SESTAVINA	VOLUMEN (μl)
Sybr Select 2×	10,0
ultračista voda	6,0
istosmerni začetnik (CYP19A1_T_F)	1,0
protismerni začetnik (CYP19A1_C_R)	1,0
DNA	2,0
SKUPAJ	20,0

PCR reakcijo smo izvedli z napravo Biorad C1000 Thermal Cycler. Dobili smo 487 bp dolg PCR produkt. Sledila je agarozna gelska elektroforeza (pogoji elektroforeze: 3% agarozni gel z Midori Green, U=90 V, t=25 min, nanašalni pufer bromfenol modro).

Preglednica 13: Razmere za potek verižne reakcije s polimerazo za polimorfizem *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidozo 19A1 za sekvenciranje.

TEMPERATURA (°C)	ČAS	ŠTEVILO PONOVI TEV	STOPNJA REAKCIJE
95	2 min	1×	začetna denaturacija
95	15 s	46×	denaturacija
63	30 s		prileganje oligonukleotidnih začetnikov
72	40 s		podaljševanje verige DNA
72	5 min	1×	zaključno podaljševanje

Pred sekvenciranjem smo PCR produkt še očistili. Delali smo po protokolu reagenčnega kompleta QIAquick PCR Purification. S tem postopkom, ki je opisan v nadaljevanju, smo produkt očistili ostankov oligonukleotidnih začetnikov, nukleotidov in polimeraze.

Postopek je potekal v naslednjih korakih:

- 1 volumnu PCR produkta smo dodali 5 volumnov pufru PB in premešali (v našem primeru $V_{\text{PCR}}=20,0 \mu\text{l}$; $V_{\text{PB}}=100,0 \mu\text{l}$).
- Preverili smo, da je zmes rumene barve (pH indikator I je bil dodan pufru PB). Če je bila barva zmesi oranžna ali vijolična, smo dodali $10,0 \mu\text{l}$ 3 M natrijevega acetata (pH=5,0) in premešali. Barva zmesi se je spremenila v rumeno.
- Namestili smo QIAquick kolono v 2 ml zbirno epruveto.
- Za vezavo DNA smo odpipetirali vzorec na QIAquick kolono in centrifugirali 60 s.
- Zavrgli smo vsebino v zbirni cevki in namestili QIAquick kolono nazaj v isto zbirno cevko.
- Sprali smo QIAquick kolono z $0,75 \text{ ml}$ pufru PE in centrifugirali 60 s.
- Zavrgli smo vsebino v zbirni cevki ter namestili QIAquick kolono nazaj v isto zbirno cevko. Centrifugirali smo 60 s.
- Namestili smo QIAquick kolono v čisto, $1,5 \text{ ml}$ centrifugirko.
- Dodali smo $50,0 \mu\text{l}$ vode (pH 7,0-8,5) (z namenom eluiranja DNA) na sredino membrane v QIAquick koloni, inkubirali 60 s in centrifugirali 60 s.

Po čiščenju DNA je sledilo merjenje koncentracije DNA na napravi NanoDrop ND-1000 Spectrofotometer. Z merjenjem absorpcije pri valovnih dolžinah 260 nm in 280 nm določamo koncentracijo DNA. Izmerjena $A_{260}=1$ pomeni, da je koncentracija dvoverižne DNA v vzorcu $50 \mu\text{g/ml}$. Razmerje A_{260}/A_{280} nam pove čistost vzorca; pri čistem vzorcu DNA je okoli 1,8. Vsi naši vzorci so bili ustrezne čistote, njihova koncentracija pa je bila okoli $60 \text{ ng}/\mu\text{l}$.

Vzorci smo pred sekvenciranjem redčili v razmerju 1:4 ($5,0 \mu\text{l} + 15,0 \mu\text{l}$). V reakcijsko zmes smo dali $2,0 \mu\text{l}$ razredčenega vzorca. Sekvenciranje smo izvedli po protokolu GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit:

- Pripravili smo reakcijsko zmes za sekvenciranje v $0,2 \text{ ml}$ centrifugirkah in jo temeljito premešali. Vsi reagenti so morali biti med pripravo reakcijske zmesi na ledu. Sestava zmesi je podana v Preglednici 14.

Preglednica 14: Sestava reakcijske zmesi za sekvenciranje.

SESTAVINA	VOLUMEN (μl)
ultračista voda	3,3
DNA (očiščen in redčen vzorec; PCR produkt)	2,0
protismerni začetnik (CYP19A1_C_R); (sequencing primer)	0,7
DTCS Quick Start Master Mix	4,0
SKUPAJ	10,0

- Nato smo izvedli reakcijo z napravo Thermal Cycler C1000 (Biorad) pri razmerah, ki so podane v Preglednici 15.

Preglednica 15: Razmere za reakcijo sekvenciranja.

TEMPERATURA ($^{\circ}$C)	ČAS	ŠTEVILO PONOVIJEV	STOPNJA REAKCIJE
96	20 s	35×	denaturacija
50	20 s		prileganje oligonukleotidnega začetnika
60	4 min		podaljševanje verige

- Sledila je precipitacija z etanolom po spodnjem postopku:
 - Pripravili smo 0,5 ml sterilne centrifugirke.
 - Pripravili smo svežo raztopino (Stop Solution): 1 μ l 3 M natrijevega acetata (pH 5,2) in 1 μ l 100 mM Na₂-EDTA (pH 8,0). V vsako 0,5 ml centrifugirko smo dali 2 μ l te zmesi.
 - V 0,5 ml centrifugirke smo prenesli reakcijsko zmes za sekvenciranje in temeljito premešali.
 - Dodali smo 60 μ l hladnega 95% (v/v) etanola/dH₂O iz zamrzovalnika (-20 $^{\circ}$ C) in temeljito premešali. Takoj smo centrifugirali vzorec na 14,000 rpm pri temperaturi 4 $^{\circ}$ C, 15 minut. Supernatant smo zavrgli.
 - Vzorec (trdi preostanek) smo 2-krat sprali z 200 μ l hladnega 70% (v/v) etanola/dH₂O iz zamrzovalnika (-20 $^{\circ}$ C). Po vsakem spiranju smo vzorec takoj vsaj 2 minuti centrifugirali na 14,000 rpm pri temperaturi 4 $^{\circ}$ C. Supernatant smo vsakič zavrgli.

- f) Vakuumsko smo sušili 10 minut (oz. dokler se ni posušilo).
- g) Vzorec smo suspendirali v 40 μ l raztopine (Sample Loading Solution).

Po čiščenju produkta smo sekvenciranje izvedli na sekvenatorju Beckman Coulter.

S sekvenciranjem smo le dodatno preverili in potrdili ustreznost določenega genotipa polimorfizma v genu *CYP19A1* z alelno specifičnim PCR.

3.3 MATERIALI, REAGENTI IN OPREMA

Pri delu smo uporabljali različne materiale, reagente in opremo. Zaradi lažje preglednosti so predstavljeni za vse metode skupaj.

3.3.1 MATERIALI

- centrifugirke 0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml (Eppendorf)
- nastavki za polavtomatske pipete 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l (Sarstedt)
- polavtomatske pipete 0,1-2,5 μ l; 0,5-10 μ l; 2-20 μ l; 20-200 μ l; 100-1000 μ l (Eppendorf Research Plus)
- ploščica s 384 mesti za aplikacijo vzorca (Sarstedt)
- parafilm »M« (Sigma)
- MicroAmp Optical Adhesive Film (Applied Biosystems)
- kadičke za pripravo 3% in 4% agaroznega gela (Biorad)
- glavnički za pripravo 3% in 4% agaroznega gela (Biorad)
- nosilec kadičke za pripravo 3% in 4% agaroznega gela (Biorad)
- 250 ml erlenmajerice
- 100 ml merilni valji

3.3.2 REAGENTI

- deionizirana in ultračista voda
- 1 \times TAE pufer, pripravljen iz 50 \times TAE pufra (tris/acetat/EDTA)
 - Priprava 50 \times TAE pufra: Natehtali smo 242,0 g Tris baze in dodali 57,1 g 100% očetne kisline, 100 ml 0,5 M raztopine Na₂EDTA s pH 8,0 ter dopolnili z bidestilirano vodo do končnega volumna 1000 ml.
- 70% etanol za čiščenje (Merck)
- 3% natrijev hipoklorit za razkuževanje površin (Gram-Mol)

- agaroz (Sigma)
- barvilo Midori Green (Nippon Genetics Europe GmbH)
- barvilo bromfenol modro
 - Priprava barvila: Natehtali smo 0,025 g bromfenol modro, 3 ml glicerola in 7 ml destilirane vode.
- barvilo ksilen cianol
 - Priprava barvila: Natehtali smo 0,025 g ksilen cianola in 3,78 g glicerola ter 7 ml destilirane vode.
- PCR Marker (Promega)
 - Sestava: 6 fragmentov DNA, dolžin-50, 150, 300, 500, 750 in 1000 bp.
- 5×HOT Firepol Probe z barvilom ROX
 - Sestava: HOT Firepol DNA Polymerase, 5×Probe qPCR buffer, 15 mM MgCl₂ (1×PCR solution-3 mM MgCl₂), dNTPs, ROX dye) (Solis BioDyne)
- TaqMan sonde 40×C___3163591_10 (polimorfizem *XbaI*) in C___3163590_10 (polimorfizem *PvuII*) (Applied Biosystems)
- pufer 10×GOLD Buffer (Roche)
- 2 mM raztopina dNTP
 - Priprava: V centrifugirko smo odpipetirali 10 μL vsake 100 mM osnovne raztopine dATP, dGTP, dCTP in dTTP (GeneAmp dNTPs, Applied Biosystems) ter dodali 490 μL ultračiste vode.
- 4 mM raztopina MgCl₂ (Roche)
- AmpliTaq Gold polimeraza (Applied Biosystems)
- raztopini oligonukleotidnih začetnikov (F oz. smerni in R oz. protismerni začetnik; koncentracija osnovne raztopine 100 μM in delovne raztopine 5 μM) (Sigma)
- raztopine oligonukleotidnih začetnikov (istosmerni in protismerni začetnik za C alel ter istosmerni in protismerni začetnik za T alel) (Sigma)

Preglednica 16: Oligonukleotidni začetniki in njihova zaporedja.

oligonukleotidni začetnik	zaporedje
istosmerni začetnik (AR_F)	5'-GCTACCTGGTCCTGGATGAG-3' (20 bp)
protismerni začetnik (AR_R)	5'-CTGCCTTACACAACCTCCTTGGC-3' (22 bp)
istosmerni začetnik (CYP19A1_C_F)	5'-TAGAGAAGGCTGGTCAGTAACC-3' (22 bp)
protismerni začetnik (CYP19A1_C_R)	5'-GCACATTTGGTGGGAATCGGG-3' (20 bp)
istosmerni začetnik (CYP19A1_T_F)	5'-TGCAGGAAAGTACATCGCCA-3' (20 bp)
protismerni začetnik (CYP19A1_T_R)	5'-ACTGATGAGAAATGCTCCAGAATA- 3' (24 bp)

- 10×NEBuffer 4 (New England Biolabs)
- restrikcijski encim Stu I (10 U/μl) (New England Biolabs)
- Sybr Select 2× (Applied Biosystems)
- raztopini oligonukleotidnih začetnikov za pripravo produkta PCR za sekveniranje (istosmerni začetnik za T alel in protismerni začetnik za C alel) (Sigma)
- QIAquick komplet za čiščenje PCR produkta (Qiagen)
- raztopina Sample Loading Solution (Beckman Coulter, Inc.: protokol GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing with Quick Start Kit)

3.3.3 OPREMA

- avtoklav 25 (SHP Steriltechnik AG)
- sušilnik (Heraeus)
- hladilniki (od 2°C do 8°C) (Gorenje)
- zamrzovalniki (do -20°C) (Gorenje)
- mikrovalovna pečica (Optimo Moulinex)
- naprava za pridobivanje ultra čiste vode (ELGA)
- NanoDrop ND-1000 Spectrofotometer (Thermo Scientific)

- centrifuge 5415 R (Eppendorf)
- centrifuga Centric 322A (Tehtnica)
- centrifuga Combi-Spin FVL-2400N (Biosan)
- vodna kopel Waterbath-Thermostat WB-4MS (Biosan)
- Biovortex V1 (Biosan)
- tehtnica EW 620-3NM (Kern)
- DNA komora UV-Cleaner UVC/T-M-AR (Biosan)
- naprava za slikanje gela G-BOX (Syngene)
- ciklični pomnoževalnik C1000 Thermal Cycler (Biorad)
- LightCycler 480 II (Roche)
- AB 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems)
- sekvenator GenomeLab GeXP Genetic Analysis System (Beckman Coulter)
- digestorij

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Polimorfizma *g.6754G>A* v genu *AR* in *g.132810C>T* v genu *CYP19A1* smo poimenovali glede na referenco (32) in PharmGKB (33). Poimenovanje obeh polimorfizmov izhaja iz analize RFLP in je najstarejši ter zato najpogostejši način poimenovanja teh dveh polimorfizmov. Metode za genotipizacijo vsakega od štirih polimorfizmov smo najprej morali optimizirati potem pa smo s statistično analizo ocenjevali njihov klinični pomen.

Verižna reakcija s polimerazo (ang. polymerase chain reaction, PCR) je *in vitro* metoda, ki omogoča podvojevanje odsekov DNA s pomočjo encima DNA-polimeraza. Reakcija poteka v več ciklih (običajno 20-40 ciklov), vsak izmed njih pa je sestavljen iz treh stopenj. To so denaturacija, prileganje oligonukleotidnih začetnikov in podaljševanje verige DNA. Pri denaturaciji segrejemo vzorec na 95°C, s tem pa dosežemo razklenitev verige (dobimo enoverižni DNA). Nato z znižanjem temperature na okoli 60°C (točno temperaturo določimo pri načrtovanju oligonukleotidnih začetnikov tako, da povprečni temperaturi tališča oligonukleotidnih začetnikov (T_m) odštejemo 5°C) omogočimo prileganje oligonukleotidnih začetnikov. Sledi še dvig temperature na 72°C (optimalna temperatura za delovanje encima DNA-polimeraza), pri kateri poteka podaljševanje DNA verige v smeri 5' proti 3' koncu (34, 35).

Za potek PCR reakcije potrebujemo:

- vzorec DNA (služi kot matrica)
- dNTP (gradniki novo nastajajoče DNA verige)
- Mg^{2+} ione (kofaktor DNA-polimeraze, vpliv tudi na prileganje oligonukleotidnih začetnikov in temperaturo tališča kompleksa matrica-oligonukleotidni začetnik)
- oligonukleotidna začetnika (istosmerni in protismerni začetnik, s katerima določimo odsek DNA, ki ga želimo pomnožiti)
- reakcijski pufer (omogoča optimalne pogoje za potek PCR reakcije)
- termostabilno DNA-polimerazo (encim, ki omogoča podvojevanje verige DNA)

Vsako PCR reakcijo je potrebno optimizirati. Vsaki matrici in paru oligonukleotidnih začetnikov moramo prilagoditi reakcijske pogoje in sestavo reakcijske zmesi. Prenizka koncentracija Mg^{2+} v reakcijski zmesi ima za posledico slabši izkoristek PCR reakcije. Previsoka koncentracija Mg^{2+} pa povzroči zmanjšano točnost encima, poveča se tudi

stopnja nespecifičnega pomnoževanja. Na količino prostega Mg^{2+} vplivajo predvsem koncentracija matrične DNA, oligonukleotidnih začetnikov, dNTP, prisotnost proteinov ali kelirajočih snovi (npr. EDTA) (34).

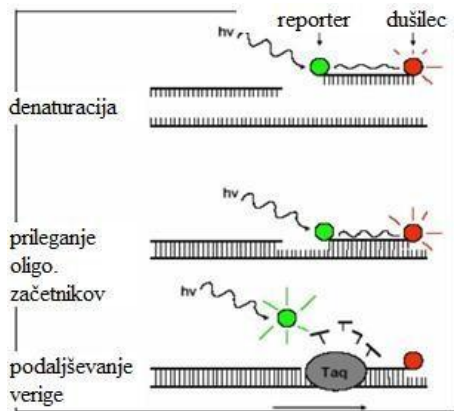
Načrtovanje oligonukleotidnih začetnikov je še ena izmed pomembnih faz uspešne izvedbe PCR reakcije. Z njimi vplivamo na specifičnost reakcije. Najpogosteje so sestavljeni iz 18-24 nukleotidov. Vsebnost GC je 40-60%, to pa vpliva na temperaturo tališča (T_m). Zaželeno je, da razlika v T_m med obema začetnikoma ni večja kot $5^{\circ}C$. Tako dosežemo učinkovito prileganje začetnikov pri enaki temperaturi. Pomnoževanje je bolj učinkovito za krajše PCR produkte. Zato izberemo začetnika tako, da je produkt dolg 100-1000 bp. Nespecifičnemu prileganju se izognemo na več načinov: oligonukleotidni začetniki ne smejo vsebovati treh zaporednih G ali C v zadnjih petih nukleotidih na 3' koncu, v zaporedju je prisotnih čim manj ponovitev, ne vsebujejo inter- in intramolekularnih komplementarnih območij (34).

4.1 OPTIMIZACIJA ANALIZE POLIMORFIZMOV *XbaI* IN *PvuII* V GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1 S KVANTITATIVNO VERIŽNO REAKCIJO S POLIMERAZO

Prednost kvantitativnega PCR (ang. quantitative PCR, qPCR) pred klasično PCR reakcijo je boljša kvantifikacija in zmanjšana možnost kontaminacije. Glavna razlika pa je v načinu pomnoževanja in detekcije PCR produkta; pri klasični PCR reakciji najprej izvedemo pomnoževanje, nato še detekcijo. Pri qPCR pa potekata sočasno (količino produkta torej merimo v vsakem ciklu). Poznamo nespecifične in specifične načine detekcije (34). Za določitev genotipov pri polimorfizmih *XbaI* in *PvuII* v genu *ESR1* smo uporabili princip sond TaqMan, ki spadajo med specifične načine detekcije.

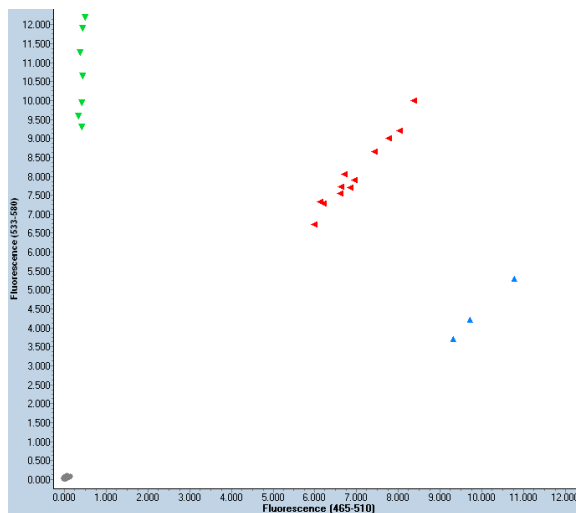
TaqMan sonde so 18-20 bp dolgi oligonukleotidi. Na 5' koncu imajo vezan reporter (barvilo), npr. 6-karboksi-fluorescein (FAM) ali VIC, na 3' koncu pa dušilec. Princip metode temelji na 5'-3' eksonukleazni aktivnosti termostabilne Taq polimeraze. Najprej se sonda in oligonukleotidni začetniki vežejo na komplementarno zaporedje na enovijačni DNA. Pri podvojevanju DNA verige Taq polimeraza doseže sondo ter jo razgradi. Reporter se odcepi, razdalja med reporterjem in dušilcem se poveča, reporter pa začne

oddajati fluorescenco, ki jo merimo. Med potekom reakcije kontinuirano merimo fluorescenco, količina nastalega PCR produkta pa je sorazmerna intenziteti fluorescence (36).

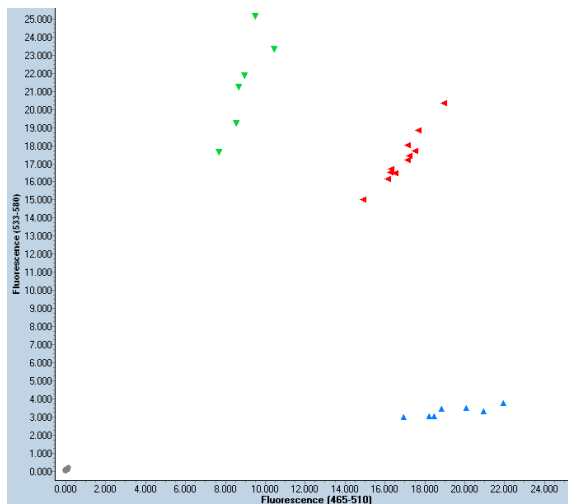


Slika 7: Mehanizem delovanja TaqMan sond (37).

Rezultati qPCR za polimorfizma *XbaI* in *PvuII* v genu *ESR1* so prikazani na grafih 1 in 2 ter v Preglednicah 7.1 in 7.2 v Prilogi. Na grafih vidimo tri skupine vzorcev: zelene in modre lise predstavljajo homozigote za divji oz. mutiran alel, rdeče lise pa heterozigote. Na y osi je prikazana fluorescenca barvila VIC, na x osi pa fluorescenca barvila FAM.



Graf 1: Rezultati genotipizacije polimorfizma *XbaI* s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo pri 70 bolnikih z BHP.



Graf 2: Rezultati genotipizacije polimorfizma *PvuII* s kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo pri 70 bolnikih z BHP.

Pri polimorfizmu *XbaI* smo pri vzorcih heterozigotov (AG) opazili rdeče lise (VIC/FAM). V primeru vzorcev homozigotov (AA) smo opazili zeleno (VIC) oz. modro liso (FAM) za homozigote (GG). V danem primeru smo določevali genotip vzorcem št. 31 do 53. Pri polimorfizmu *PvuII* smo v primeru vzorcev heterozigotov (CT) opazili rdeče lise (VIC/FAM). Pri vzorcih homozigotov (CC) smo opazili zeleno (VIC) oz. modro liso (FAM) za homozigote (TT). Na grafu so določeni genotipi vzorcev št. 24 do 47. V levem spodnjem kotu grafov opazimo liso slepega vzorca.

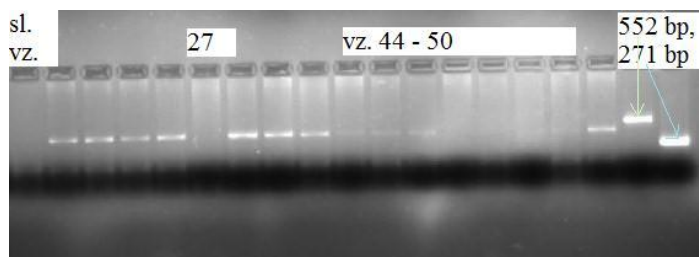
S kvantitativno verižno reakcijo s polimerazo smo uspešno genotipizirali polimorfizma *XbaI* in *PvuII* v genu *ESR1* pri 70 bolnikih z BHP, kar opazimo tudi na Grafih 1 in 2. Povsod dobimo 3 različne skupine vzorcev (nemutirane in mutirane homozigote ter heterozigote), to pa se kaže s tremi različnimi barvami (nemutirani homozigoti so zeleni, mutirani homozigoti so modri, heterozigoti pa rdeči).

4.2 OPTIMIZACIJA VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO IN ANALIZE DOLŽIN RESTRIKCIJSKIH FRAGMENTOV ZA DOLOČITEV POLIMORFIZMA *g.6754G>A* V GENU ZA ANDROGENI RECEPTOR

Da bi določili optimalno sestavo reakcijske zmesi za PCR reakcijo za polimorfizem *g.6754G>A* v genu *AR* smo najprej preverili različne koncentracije $MgCl_2$ (2 mM, 3 mM

in 4 mM raztopine). Najboljša rezultata smo dobili pri 2 mM in 4 mM raztopini MgCl₂. V nadaljevanju pa se je izkazalo, da 4 mM raztopina MgCl₂ zagotovi najboljše rezultate.

Za nekatere vzorce (vzorci št. 1, 27, 44-50) smo pogoje še dodatno prilagodili, saj nismo dobili ustreznih rezultatov (lise na gelu niso bile vidne) (Slika 8). Zato smo v teh primerih povečali količino dodane DNA (namesto 3,0 smo dodali 4,0 µl), povečali smo tudi število ponovitev (iz 41× na 45×). V nekaterih primerih še vedno nismo dobili željenih rezultatov - lise na gelu zopet niso bile vidne (vzorci št. 16-23, 27, 28, 30, 31, 47, 49). Ponovno smo prilagodili pogoje; tokrat smo spet uporabili 3,0 µl DNA, smo pa povečali število ponovitev, in sicer na 48×.



Slika 8: Agarozna gelska elektroforeza po neuspešni verižni reakciji s polimerazo pri polimorfizmu v genu za androgeni receptor za vzorce 27, 44-50. sl. vz.- slepi vzorec.

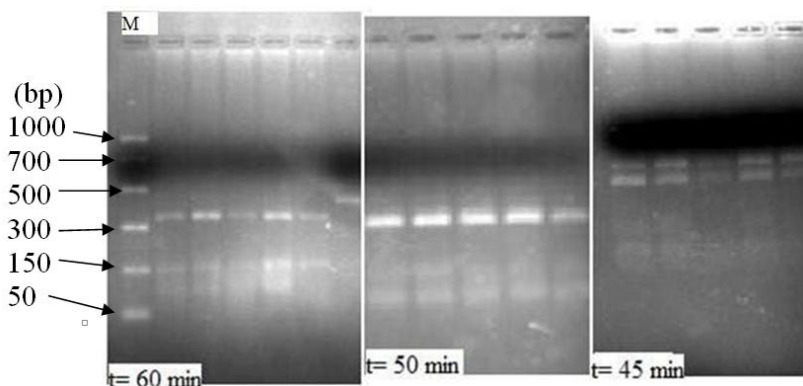
Dobili smo PCR produkt, dolg 411 baznih parov (bp), ki ga vidimo spodaj. S krepkim tiskom sta označena smerni in protismerni začetnik, z rdečo barvo pa mesto polimorfizma.

GCTACCTGGTCCTGGATGAGGAACAGCAACCTTCACAGCCGCAGTCGGCCCT
 GGAGTGCCACCCCGAGAGAGGTTGCGTCCCAGAGCCTGGAGCCGCCGTGGCC
 GCCAGCAAGGGGCTGCCGCAGCAGCTGCCAGCACCTCCGGACGAGGATGACT
 CAGCTGCCCCATCCACGTTGTCCCTGCTGGGCCCCACTTTCCCCGGCTTAAGCA
 GCTGCTCCGCTGACCTTAAAGACATCCTGAGCGAGGCCAGCACCATGCAACTC
 CTCAGCAACAGCAGCAGGAAGCAGTATCCGAAGGCAGCAGCAGCGGGAGAG
 CGAGGGA(**G/A**)GCCTCGGGGGCTCCCACTTCTCCAAGGACAATTACTTAGGG
 GGCCTTCGACCATTTCTGACAAC**GCCAAGGAGTTGTGTAAGGCAG**

Da bi genotipizirali polimorfizem v genu za androgeni receptor, smo izvedli še analizo dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP). RFLP je metoda detekcije za ugotavljanje sprememb v nukleotidnem zaporedju, ki so nam že znane. Endonukleaze bakterijskega

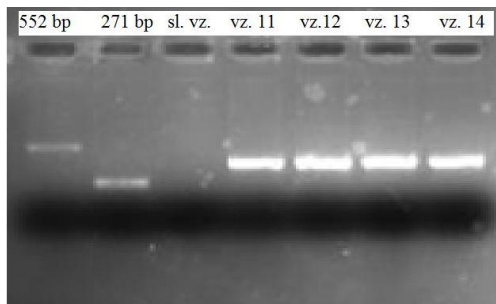
izvora režejo DNA na specifičnih prepoznavnih mestih ali blizu njih. Metoda temelji na polimorfizmih, ki spremenijo prepoznavno mesto za restrikcijske encime zaradi spremembe nukleotidnega zaporedja. Najprej pomnožimo odsek DNA (PCR reakcija), ki vsebuje restrikcijsko mesto. Nato izvedemo RFLP. Rezultat cepitve z restrikcijskim encimom so različno dolgi fragmenti, ki jih ločimo na elektroforeznem gelu (36).

Pri metodi RFLP smo morali optimizirati pogoje elektroforeze. Spreminjali smo čas, ki je bil potreben za potek elektroforeze (45 min, 50 min, 60 min) (Slika 9). Z agarozno gelsko elektroforezo smo preverili ustreznost PCR produkta in dolžino restrikcijskih fragmentov (Sliki 10 in 11).

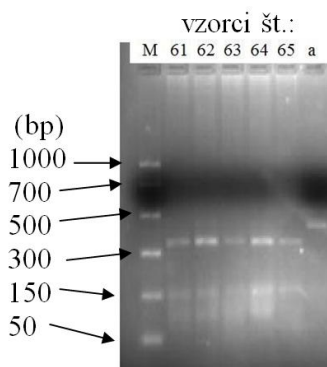


Slika 9: Optimizacija časov pri 3% agarozni gelski elektroforezi po analizi dolžin restrikcijskih fragmentov. Pri času 45 minut lise niso še dovolj ločene. M-marker.

Pri agarozni gelski elektroforezi po RFLP smo na gel nanesti tudi nerazcepljen PCR produkt, kot dodatni dokaz, da je do restrikcije dejansko prišlo. Pri vzorcih vidimo dodatne lise, ki so lahko ostanki oligonukleotidnih začetnikov (dimeri, zanke). Vzorci št. 61-65 so homozigoti GG - vidimo 2 lise: 319 in 92 bp.



Slika 10: Agarozna gelska elektroforeza po verižni reakciji s polimerazo za določitev genotipa pri polimorfizmu $g.6754G>A$ v genu za androgeni receptor. 552 bp in 271 bp-2 stara PCR produkta kot markerja, sl. vz.-slepi vzorec.



Slika 11: Agarozna gelska elektroforeza po analizi dolžin restrikcijskih fragmentov. M-marker, a-nerazcepljen PCR produkt.

V preglednici 17 so predstavljeni fragmenti, ki jih lahko pričakujemo pri posameznem genotipu. Nerazcepljen PCR produkt je dolg 411 bp.

Preglednica 17: Fragmenti, ki jih dobimo pri določenem genotipu z analizo dolžin restrikcijskih fragmentov pri polimorfizmu *g.6754G>A* v genu za androgeni receptor.

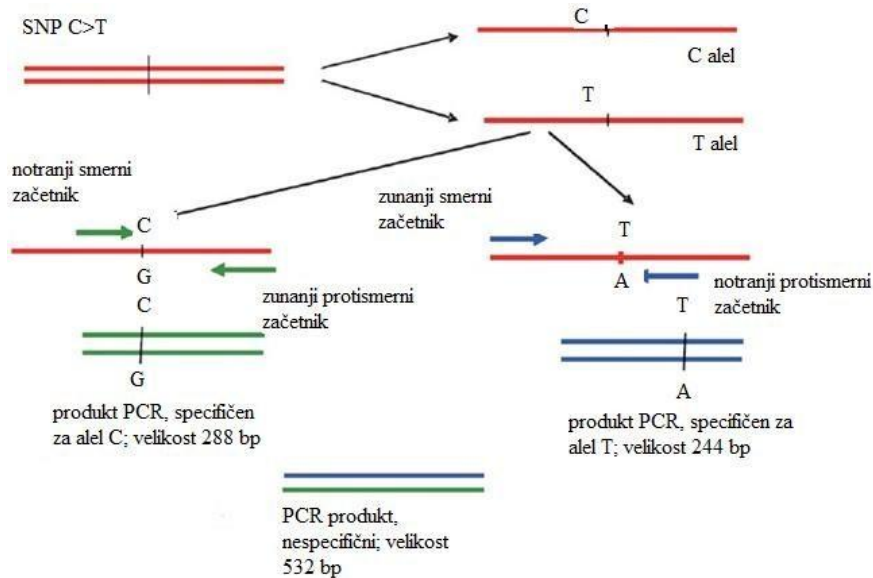
genotip	dolžine fragmentov (bp)
GG	319 in 92
GA	411, 319 in 92
AA	411

Z verižno reakcijo s polimerazo in RFLP smo uspešno genotipizirali polimorfizem v genu *AR* pri 70 bolnikih z BHP, saj smo za vsak vzorec določili genotip (nemutirani homozigot G/G, mutirani homozigot A/A ali heterozigot G/A). V primerjavi s qPCR je bila pri RFLP za uspešen rezultat (določitev genotipov) potrebna večja optimizacija pogojev.

4.3 OPTIMIZACIJA ALELNO SPECIFIČNE VERIŽNE REAKCIJE S POLIMERAZO ZA DOLOČITEV POLIMORFIZMA *g.132810C>T* V GENU ZA AROMATAZO

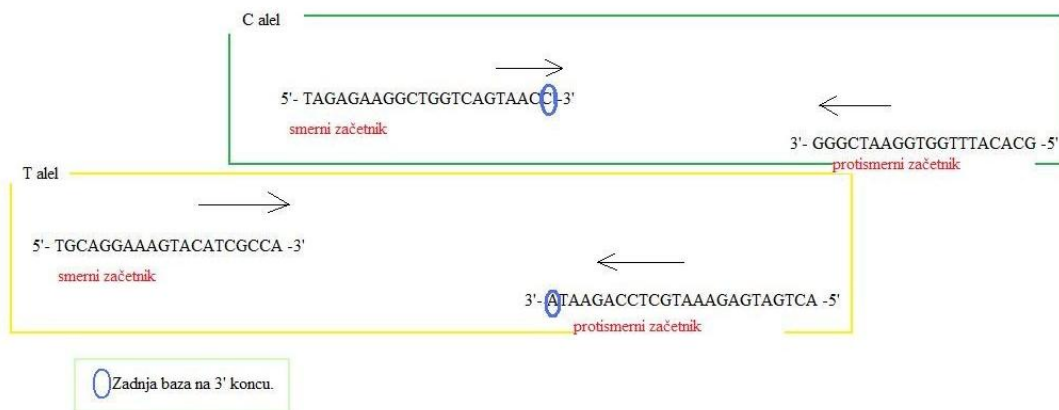
Alelna specifična verižna reakcija s polimerazo je vrsta PCR reakcije za določanje polimorfizma enega nukleotida (ang. SNP; single nucleotide polymorphism). Metoda temelji na pridobivanju specifičnega PCR produkta s pomočjo ustrezno načrtovanih oligonukleotidnih začetnikov, katerih zadnja baza na 3' koncu predstavlja preiskovani

polimorfizem enega nukleotida. Izvedemo lahko 1 reakcijo (če imamo 2 smerna začetnika in 1 protismerni začetnik) oz. 2 reakciji (če imamo 2 smerna začetnika in 2 protismerna začetnika), kar je odvisno tudi od temperature tališča oligonukleotidnih začetnikov. Zaradi prevelikih razlik v temperaturah tališč oligonukleotidnih začetnikov smo izvedli 2 reakciji - za vsak alel eno.



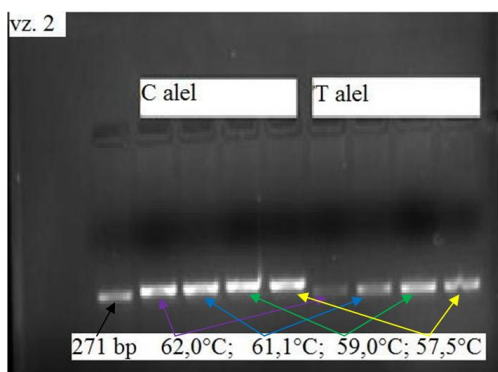
Slika 12: Princip alelno specifične verižne reakcije s polimerazo (38).

V številnih študijah so raziskovali učinek neujemanja med tarčno DNA in načrtovanimi oligonukleotidnimi začetniki. Ugotovili so, da pride do podvojevanja DNA kljub manjšim neujemanjem med njimi. Gre za neujemanje v enem baznem paru (bp) na 3' koncu ali manjšem številu bp na 5' koncu. Že neujemanje v 2 bp na 3' koncu prepreči pomnoževanje DNA (36). Zato smo pri načrtovanju oligonukleotidnih začetnikov namenoma zamenjali še eno bazo v zaporedju in sicer 3. bazo s 3' konca v ustreznem oligonukleotidnem začetniku (pri C alelu je to A namesto C, 20. baza v smernem začetniku, pri T alelu pa tudi A namesto C, vendar 22. baza v protismernem začetniku). S tem smo se prepričali, da je res prisoten polimorfizem le enega nukleotida; z vsako naslednjo, nam neznano spremembo na 3' koncu namreč ne bi dobili PCR produkta.



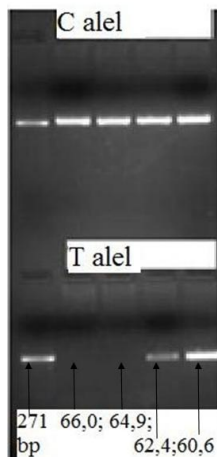
Slika 13: Istosmerna in protismerna začetnika, ki smo jih uporabili pri alelno specifični verižni reakciji s polimerazo. Na sliki sta označeni zadnji bazi na 3' koncu, 3. bazi v istih oligonukleotidnih začetnikih pa smo zamenjali, kot je opisano zgoraj.

Na začetku smo preverili, katera temperatura je najustreznejša za izvedbo reakcije, saj je le tako prišlo do specifičnega prileganja oligonukleotidnih začetnikov in nastanka ustreznega PCR produkta (Slika 14). Preverili smo več različnih temperatur; določili smo temperaturni interval, ki smo ga želeli preveriti, program pa je sam določil 4 različne temperature znotraj tega intervala. Temperaturni interval smo izbrali glede na T_m oligonukleotidnih začetnikov. Najprej smo preverili temperaturni interval med 57,0°C in 62,0°C (izbrane temperature so bile 62,0°C; 61,1°C; 59,0°C in 57,5°C). Najboljše rezultate smo dosegli pri temperaturi 59,0°C, vendar pa se je v nadaljevanju izkazalo, da ta temperatura ni primerna; po analizi več različnih vzorcev smo namreč dobili same heterozigote, kar je bilo glede na podatke iz literature nesmiselno. Predpostavili smo nespecifično prileganje oligonukleotidnih začetnikov.



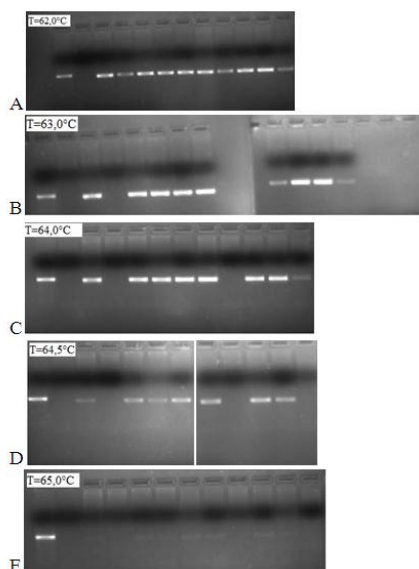
Slika 14: Rezultati ugotavljanja ustrezne temperature za potek alelno specifične verižne reakcije s polimerazo.

Ker nismo dobili primernih rezultatov, smo se odločili za testiranje novega temperaturnega intervala, od 60,0°C do 66,0°C (izbrane temperature so bile 66,0°C; 64,9°C; 62,4°C in 60,6°C). Izbrali smo temperaturo 66,0°C, ker smo glede na rezultate agarozne gelske elektroforeze domnevali, da bomo pri tej temperaturi dobili najbolj specifične rezultate. Nadaljnji rezultati so pokazali, da bomo morali pogoje prilagoditi za vsak alel posebej (Slika 15).



Slika 15: Rezultati ponovnega ugotavljanja ustrezne temperature pri alelno specifični verižni reakciji s polimerazo (vzorec št. 2).

Temperatura 66,0°C je bila ustrezna za C alel. Za T alel smo preverili še nekaj temperatur (62,0°C; 63,0°C; 64,0°C; 64,5°C in 65,0°C) in na podlagi rezultatov optimizacije izbrali temperaturo 64°C. Rezultate optimizacije vidimo na Sliki 16. Vzorce smo nanašali: star PCR produkt, ki nam je služil kot marker (271 bp); slepi vzorec; PCR produkti vzorcev (za T alel) št. 1, 2, 3, 4, 5, 64, 66, 67, 68, 69. Gel A (temperatura 62,0°C), gel B (temperatura 63,0°C), gel C (temperatura 64,0°C), gel D (temperatura 64,5°C) in gel E (temperatura 65,0°C).



Slika 16: Optimizacija temperature za potek alelna specifične verižne reakcije s polimerazo za T alel.

Optimizirali smo tudi število ponovitev, za vsak alel posebej. Za C alel smo izbrali 44, za T alel pa 46 ponovitev. Za vzorca 27 in 63 smo morali izvesti dodatno optimizacijo. Povečali smo število ponovitev; za T alel na 48 in za C alel na 46 ponovitev.

Dobili smo PCR produkt, dolg 288 bp (C alel) oz. 244 bp (T alel). S krepkim tiskom so označeni smerni in protismerni začetniki, z rdečo barvo mesto polimorfizma, z rumeno pa spremenjena nukleotida. Kot že omenjeno, smo pri C alelu, pri istosmernemu začetniku zamenjali 3. nukleotid z zadnjega konca (A namesto C). Zamenjavo smo naredili tudi pri T alelu, pri protismernemu začetniku (A namesto C).

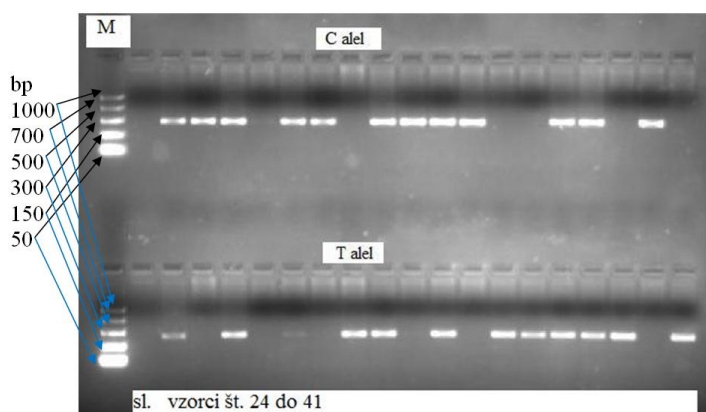
C alel, PCR produkt

TAGAGAAGGCTGGTCAGTAA**CCACTCTGGAGCATTCTCATCAGTAGTTCAC
 ATACAAATCATCCATCCTTGCCAATAGTGTCATCCTCACAGTGAACACTCAGTG
 GCCCATGGCATTATATAGGCATACCTCCTATGGGTTGTCACCAAGCTAGGTGCT
 ATTTGTCATCTGCTCCTGTTACACACCAGAGAACCAGGCTACAAGAGAAAAAGC
 AGAGGCCAAGAGTTTGAGGGAGAAATAGTCGGTGAAGAAACCGTATCCATAA
 AGACCCGATTCCACCAAATGTGC**

T alel, PCR produkt

TGCAGGAAAGTACATCGCCATGGTGATGATGAAAGCCATCCTCGTTACACTT
CTGAGACGATTCCACGTGAAGACATTGCAAGGACAGTGTGTTGAGAGCATACA
GAAGATACACGACTTGTCTTGCACCCAGATGAGACTAAAAACATGCTGGAAA
TGATCTTTACCCCAAGAACTCAGACAGGTGTCTGGAACACTAGAGAAGGCTG
GTCAGTACCCTATTCTGGAGCATTTCATCAGT

Ustreznost PCR produkta smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (Slika 17). Če se je lisa pojavila le zgoraj (C alel), smo določili genotip CC, če pa se je pojavila le spodaj (T alel), smo določili genotip TT. Če sta se pri istem vzorcu pojavili obe lisi, smo določili genotip CT.



Slika 17: Agarozna gelska elektroforeza po alelno specifični verižni reakciji s polimerazo. M-marker.

Z alelno specifično verižno reakcijo s polimerazo smo uspešno genotipizirali polimorfizem v genu *CYP19A1* pri 70 bolnikih z BHP. Povsod smo namreč določili genotipe vzorcev (nemutirani homozigoti C/C, mutirani homozigoti T/T ali heterozigoti C/T).

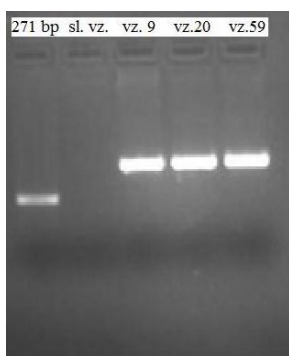
4.4 SEKVENCIRANJE ZA POTRDITEV USTREZNOSTI ANALIZE POLIMORFIZMA V GENU ZA AROMATAZO

Sekvenciranje DNA je metoda za določanje nukleotidnega zaporedja določenega odseka DNA. Rezultat je upodobitev sekvence, ki nam omogoča vpogled v osnovno strukturo preiskovane biomolekule (39). Poznamo sekvenciranje po Sangerju in številne novejšje metode. Pri našem delu smo uporabili Sangerjevo metodo s fluorescentnim označevanjem

baz. Vsaka izmed 4 baz je bila označena s fluorescentnim barvilom druge barve. Rezultat je kromatogram, v katerem dobimo vrhove 4 različnih barv. Vsaka barva predstavlja drugo bazo, celokupno pa dobimo sekvenco preiskovanega fragmenta DNA.

S pomočjo sekvenciranja smo preverili in potrdili ustreznost genotipov polimorfizma v genu *CYP19A1*. Pred reakcijo sekvenciranja smo pomnožili PCR produkt, dolg 487 bp, katerega ustreznost smo preverili z agarozno gelsko elektroforezo (Slika 18). S krepkim tiskom sta označena smerni in protismerni začetnik ter z rdečim krepkim tiskom polimorfizem.

TGCAGGAAAGTACATCGCCATGGTGATGATGAAAGCCATCCTCGTTACACTT
CTGAGACGATTCCACGTGAAGACATTGCAAGGACAGTGTGTTGAGAGCATACA
GAAGATACACGACTTGTCCCTGCACCCAGATGAGACTAAAAACATGCTGGAAA
TGATCTTTACCCCAAGAACTCAGACAGGTGTCTGGAACACTAGAGAAGGCTG
GTCAGTACCT**T**ACTCTGGAGCATTTCTCATCAGTAGTTCACATAAAATCATCCA
TCCTTGCCAATAGTGTCATCCTCACAGTGAACACTCAGTGGCCCATGGCATTTT
ATAGGCATACCTCCTATGGGTTGTCACCAAGCTAGGTGCTATTTGTCATCTGCT
CCTGTTACACCAGAGAACCAGGCTACAAGAGAAAAAGCAGAGGCCAAGAGT
TTGAGGGAGAAATAGTCGGTGAAGAAACCGTATCCATAAAGA**CCCGATTCCA**
CCAAATGTGC



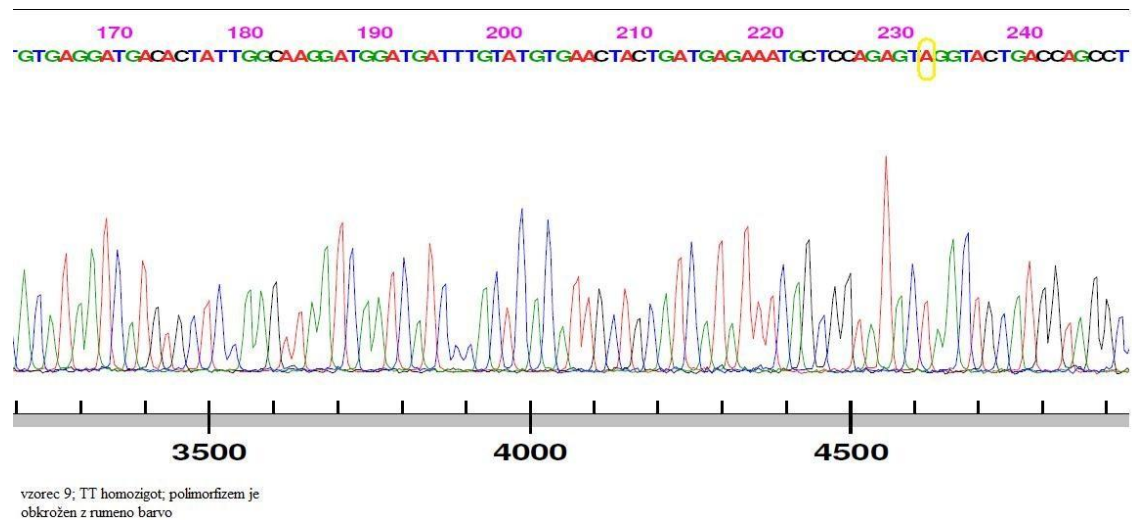
Slika 18: Agarozna gelska elektroforeza po verižni reakciji s polimerazo za sekvenciranje. sl. vz.-slepi vzorec.

Nato smo izvedli sekvenciranje po treh vzorcih za vse tri različne genotipe (heterozigot C/T, homozigota C/C in T/T). Tri vzorce za posamezen genotip smo uporabili le za

dodatno potrditev ustreznosti genotipa. S sekvenciranjem smo preverili, če smo z alelno specifičnim PCR uspeli določiti ustrezen genotip polimorfizma v genu *CYP19A1*. Uporabili smo protismerni začetnik C alela: 5'-GCACATTTGGTGGGAATCGGG-3'.

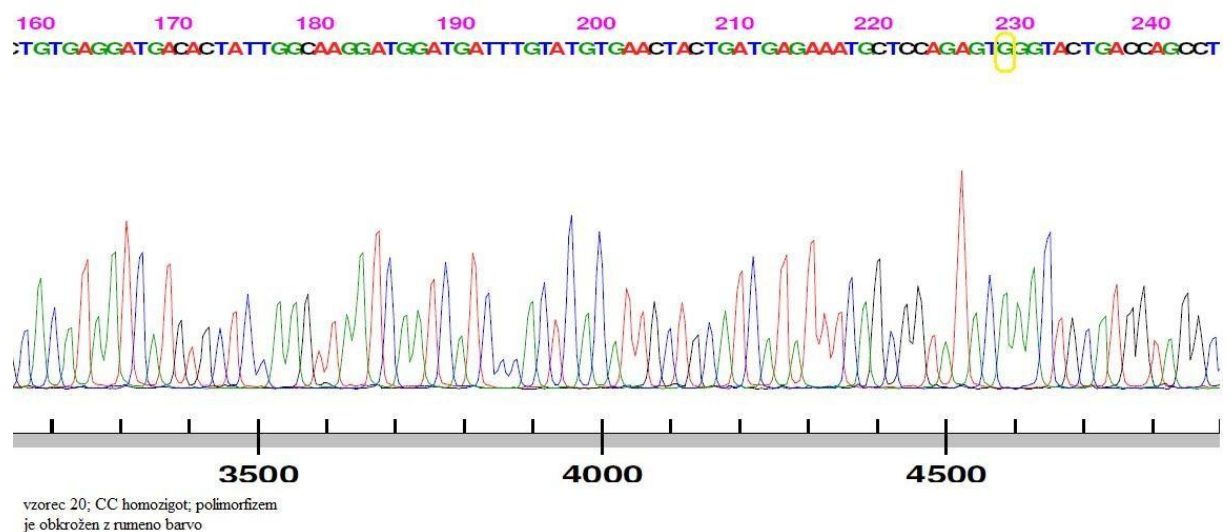
V nadaljevanju bom predstavila sekvence za posamezne genotipe (vzorci št. 9, 20 in 59). Polimorfizem je obkrožen z rumeno barvo. Pri homozigotu vidimo v sekvenci 1 vrh (en nukleotid), pri heterozigotu pa 2 (dva različna nukleotida) (Slike 18-20).

vzorec 9; homozigot T/T



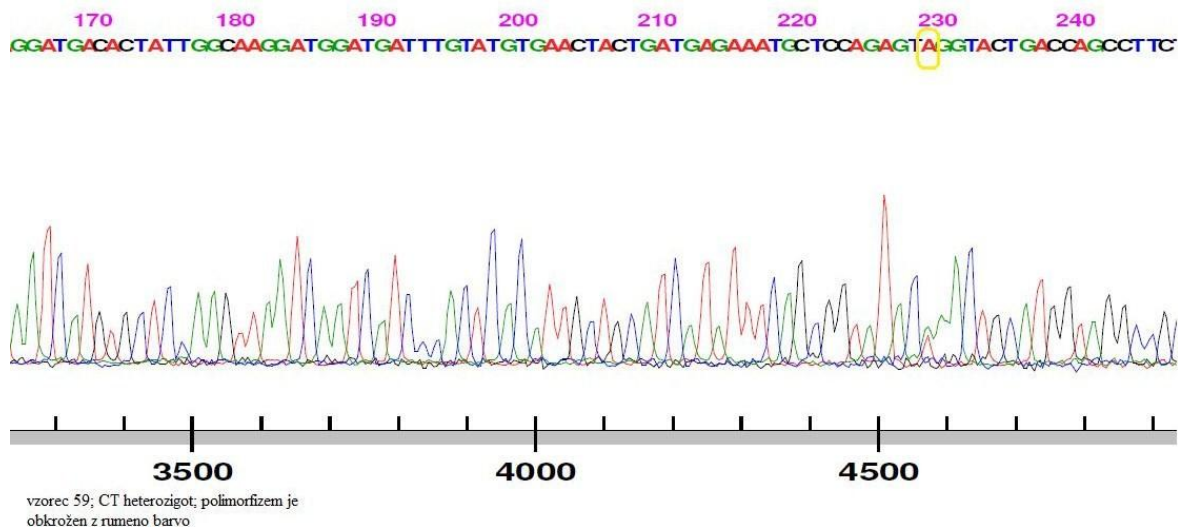
Slika 19: Prikaz dela sekvence, kjer je prisoten polimorfizem *g.132810C>T*: vzorec 9. Polimorfizem je na 231. mestu in je označen z rumeno.

vzorec 20; homozigot C/C



Slika 20: Prikaz dela sekvence, kjer je prisoten polimorfizem *g.132810C>T*: vzorec 20. Polimorfizem je na 228. mestu in je označen z rumeno.

vzorec 59; heterozigot C/T



Slika 21: Prikaz dela sekvence, kjer je prisoten polimorfizem *g.132810C>T*: vzorec 59. Polimorfizem je na 228. mestu in je označen z rumeno.

Sekvenca na Sliki 19 pripada homozigotu T/T-ker smo za sekvenciranje uporabili protismerni začetnik, smo sekvenirali nasprotno verigo (obratno zaporedje), zato na sliki vidimo nukleotid A. Sekvenca na sliki 20 pripada homozigotu C/C-ker smo uporabili protismerni začetnik smo sekvenirali nasprotno verigo (obratno zaporedje), zato na sliki vidimo nukleotid G. Sekvenca na Sliki 21 pripada heterozigotu C/T-ker smo uporabili protismerni začetnik smo sekvenirali nasprotno verigo (obratno zaporedje), zato na sliki vidimo nukleotid A. Ker gre za heterozigota, vidimo tudi dva vrhova zaradi dveh različnih nukleotidov.

S sekvenciranjem smo uspešno potrdili, da smo dobili ustrezne in pričakovane genotipe: vzorec 9 predstavlja homozigota T/T, vzorec 20 homozigota C/C, vzorec 59 pa heterozigota C/T.

4.5 POGOSTOST ANALIZIRANIH GENOTIPOV V SKUPINI BOLNIKOZ BENIGNO HIPERPLAZIJO PROSTATE

V Preglednici 18 je primerjava podatkov o genotipih med literaturo in našimi rezultati za polimorfizem *XbaI* v genu *ESR1*. Podatki iz literature se nanašajo na evropsko populacijo.

Frekvence genotipov so v Hardy-Weinbergovem ravnovesju ($p=0,955$), kar pomeni da se ohranjajo skozi celotno populacijo (iz generacije v generacijo).

Preglednica 18: Frekvence genotipov za polimorfizem *XbaI* v genu za estrogenski receptor 1.

GENOTIP	ŠTEVILO VZORCEV	%	% (PODATEK IZ LITERATURE)*
homozigot A/A	20	28,6	47,3
heterozigot A/G	36	51,4	43,7
homozigot G/G	14	20,0	8,9

*Povzeto po programu Ensembl genome browser (40).

Naši rezultati se od podatkov iz literature nekoliko razlikujejo (enostranska anova, Bonferroni). Dobili smo 18,7% manj homozigotov A/A, 7,7% več heterozigotov A/G in 11,1% več homozigotov G/G. Razmerje med posameznimi genotipi se ne ujema s podatki iz literature (določili smo največ heterozigotov A/G, najmanj pa homozigotov G/G) (Preglednica 18). Glavni razlog za razlikovanje od podatkov iz literature je verjetno v velikosti vzorca; imeli smo majhen vzorec, »le« 70 preiskovancev, poleg tega so našo skupino sestavljali izključno moški, stari od 51 do 79 let in oboleli za BHP.

V Preglednici 19 je primerjava podatkov o genotipih med literaturo in našimi rezultati za polimorfizem *PvuII* v genu *ESR1*. Podatki iz literature se nanašajo na evropsko populacijo. Frekvence genotipov so v Hardy-Weinbergovem ravnovesju ($p=0,916$), kar pomeni da se ohranjajo skozi celotno populacijo (iz generacije v generacijo).

Preglednica 19: Frekvence genotipov za polimorfizem *PvuII* v genu za estrogenski receptor 1.

GENOTIP	ŠTEVILO VZORCEV	%	% (PODATEK IZ LITERATURE)*
homozigot C/C	22	31,4	17,5
heterozigot C/T	36	51,4	49,5
homozigot T/T	12	17,1	33,0

*Povzeto po programu Ensembl genome browser (40).

Naši rezultati se tudi v tem primeru nekoliko razlikujejo od podatkov iz literature (enostranska anova, Bonferroni), zopet je vzrok verjetno v velikosti vzorca. Dobili smo

13,9% več homozigotov C/C, 1,9% več heterozigotov C/T in 15,9% manj homozigotov T/T. Razmerje med genotipi se ne ujema s podatki iz literature (določili smo največ heterozigotov C/T, najmanj pa homozigotov T/T) (Preglednica 19).

V Preglednici 20 je primerjava podatkov o genotipih med literaturo in našimi rezultati za polimorfizem $g.6754G>A$ v genu *AR*. Podatki iz literature se nanašajo na kavkazijsko populacijo. Frekvence genotipov niso v Hardy-Weinbergovem ravnovesju ($p<0,001$), kar pomeni da se ne ohranjajo skozi celotno populacijo (iz generacije v generacijo).

Preglednica 20: Frekvence genotipov za polimorfizem $g.6754G>A$ v genu za androgeni receptor.

GENOTIP	ŠTEVILO VZORCEV	%	% (PODATEK IZ LITERATURE)*
homozigot G/G	66	94,3	73,3
heterozigot G/A	0	0,0	16,7
homozigot A/A	4	5,7	10,0

*Povzeto po programu Ensembl genome browser (40).

Izid je pričakovan, saj v celotni skupini ni bilo heterozigota G/A, poleg tega so bili le 4 homozigoti A/A (t-test). Eden izmed razlogov je verjetno majhno število preiskovancev. Pri primerjavi naših rezultatov z rezultati iz literature opazimo, da smo dobili 21,0% več homozigotov G/G in 4,3% manj homozigotov A/A (Preglednica 20).

V Preglednici 21 je primerjava podatkov o genotipih med literaturo in našimi rezultati za polimorfizem $g.132810C>T$ v genu *CYP19A1*. Podatki iz literature se nanašajo na evropsko populacijo. Frekvence genotipov so v Hardy-Weinbergovem ravnovesju ($p=0,641$), kar pomeni da se ohranjajo skozi celotno populacijo (iz generacije v generacijo).

Preglednica 21: Frekvence genotipov za polimorfizem *g.132810C>T* v genu za citokrom P450-oksidozo 19A1.

GENOTIP	ŠTEVILO VZORCEV	%	% (PODATEK IZ LITERATURE)*
homozigot C/C	18	25,7	27,2
heterozigot C/T	31	44,3	47,9
homozigot T/T	21	30,0	24,9

*Povzeto po programu Ensembl genome browser (40).

Dobili smo 1,5% manj homozigotov C/C, 3,6% manj heterozigotov C/T in 5,1% več homozigotov T/T. V tem primeru se razmerje med genotipi ne ujema; dobili smo največ heterozigotov C/T in najmanj homozigotov C/C, v podatkih iz literature pa je najmanj homozigotov T/T (enostranska anova, Bonferroni) (Preglednica 21).

4.6 FARMAKOGENETSKA ANALIZA POLIMORFIZMOV V GENIH ZA ESTROGENSKI IN ANDROGENI RECEPTOR TER AROMATAZO PRI ZDRAVLJENJU Z ZAVIRALCI TESTOSTERON 5-ALFA-REDUKTAZE

Zaviralci 5-AR delujejo tako, da zavirajo delovanje omenjenega encima in s tem zmanjšajo pretvorbo testosterona v DHT. V Preglednici 22 so podane glavne značilnosti finasterida in dutasterida, ki spadata v skupino zaviralcev 5-AR. Njihov učinek je preprečevanje povečanja prostate in zmanjšanje tveganja za akutni zastoj seča.

Preglednica 22: Primerjava nekaterih značilnosti dutasterida in finasterida (17, 19, 22).

	DUTASTERID	FINASTERID
Selektivnost zaviranja 5-AR	tip I in tip II	tip II
Razpolovni čas	5 tednov	povprečno 6 ur, pri starejših moških (>70 let) pa 8 ur
Priporočeni dnevni odmerek	0,5 mg	5 mg
Biološka uporabnost	60%	65%
Čas, v katerem je dosežena največja plazemska	po 3 urah	v 8 urah

koncentracija		
Volumen porazdelitve	300-500 l	44-96 l
Vezava na plazemske beljakovine	99%	90%
Znižanje plazemske koncentracije DHT*	90%	70%
Presnova	CYP3A4 in CYP3A5	CYP3A4
Izločanje	večinoma z blatom	59% z blatom, 39% z urinom

*DHT-dihidrotestosteron

V randomizirani, dvojno slepi klinični študiji EPICS so primerjali učinkovitost dutasterida in finasterida v 12-mesečnem časovnem obdobju. Sodelovalo je 1630 moških iz različnih držav, starejši od 50 let, z diagnozo BHP. V raziskavo so jih vključili na osnovi naslednjih kriterijev: seštevek IPSS vprašalnika >12 točk, volumen prostate (VP) >30 cm³, maksimalni pretok urina <15 ml/s. Poleg naštetih kriterijev ti moški niso imeli vrednosti PSA <1,5 ng/ml oz. >10,0 ng/ml, kadarkoli prej raka prostate, poleg tega v preteklosti tudi niso bili na operaciji prostate (3).

Med študijo so 4 tedne, 1-krat dnevno prejeli placebo, nato pa 48 tednov, 1-krat dnevno 0,5 mg dutasterida (813 moških) ali 5 mg finasterida (817 moških). Pri zdravniku so se zglasili vsake 3 mesece. 1454 moških je končalo 12-mesečno študijo (719 iz skupine, ki se je zdravila z dutasteridom in 735 iz skupine, ki je prejela finasterid). Študijo so nadaljevali z 448 osebami (222 iz skupine z dutasteridom in 226 iz skupine s finasteridom). Vsak pacient je v nadaljevanju prejel 0,5 mg dutasterida 1-krat dnevno, 24 mesecev. Študijo je zaključilo 371 moških (3).

Zmanjšanje VP po 12-ih mesecih je bilo v obeh skupinah primerljivo (dutasterid; 26,3%, finasterid; 26,7%). Ugotovili so, da je pri pacientih z VP \geq 40 cm³, prišlo do bolj izrazitega zmanjšanja VP kot pri pacientih, z VP<40 cm³ (\geq 40 cm³; dutasterid: 27,6%, finasterid: 27,7% in <40 cm³; dutasterid: 22,6%, finasterid: 24,2%). Znižale so se tudi vrednosti PSA (dutasterid: 49,5%, finasterid: 47,7%). Pri pacientih, ki so v nadaljevanju prejeli dutasterid, se je pojavilo več neželenih učinkov (pri 45% pacientov, v prvih 12. mesecih

študije pa pri 20% pacientov, ki so prejeli finasterid in 17% pacientov, ki so prejeli dutasterid) (3).

V drugi študiji (*R. Wurzel et al*) so primerjali učinkovitost zaviralcev 5-AR na zmanjšanje koncentracije DHT v plazmi in prostati v primerjavi s placebom, primerjali pa so tudi dutasterid in finasterid med sabo (za finasterid so vzeli podatke iz literature). Dutasterid je zmanjšal koncentracijo intraprostatičnega DHT za 94% v primerjavi s placebom. Poleg tega so v skupini, ki je prejela dutasterid, opazili znižanje serumske koncentracije DHT za 93% (od začetne vrednosti) v 3 mesecih, medtem ko je bilo znižanje serumske koncentracije DHT v skupini s placebom 15% (glede na začetno vrednost) (41).

Dutasterid je v primerjavi s finasteridom močnejše znižal koncentracijo plazemskega DHT (>90 vs. 70%). 7-dnevno zdravljenje s finasteridom, 1 ali 5 mg/dan, je zmanjšalo koncentracijo intraprostatičnega DHT za približno 85% v primerjavi s placebom. 6-mesečno zdravljenje s 5 mg finasterida dnevno pa je znižalo koncentracijo intraprostatičnega DHT za 68% (41).

Nizka serumska koncentracija androgenov je povezana s povečanim tveganjem za pojav osteoporoze ali zlomov. Zato znižanje DHT, ki ga povzroča dutasterid, privede do znižanja mineralne kostne gostote in povečanja tveganja za zlome. Dutasterid močnejše zavira sintezo DHT kot finasterid, zato je večja verjetnost, da vpliva na sintezo lipoproteinov, hematopoezo in koncentracijo PSA (42).

V študiji (*J. K. Amory et al*) so eno leto proučevali učinke zaviralcev 5-AR na kosti in prostato. Vključili so 99 mladih moških, od katerih je 33 prejelo 0,5 mg dutasterida, 34 oseb 5mg finasterida in 32 oseb placebo. Znano je, da dutasterid in finasterid v primerjavi s placebom statistično značilno zavirata nastanek DHT (dutasterid 94%, finasterid 73%, $p < 0.001$ pri obeh učinkovinah v primerjavi s placebom) in prehodno zvišata koncentracijo testosterona v serumu. Ni pa razlik pri vplivu na serumsko koncentracijo estradiola, LH, FSH in SHBG. Vse osebe so na začetku zdravljenja imele normalno mineralno kostno gostoto. Tekom zdravljenja niso uspeli dokazati statistično značilnih razlik v mineralni kostni gostoti med skupinami. Ravno tako ni prišlo do izrazitih razlik med skupinami v serumski koncentraciji osteokalcina (označevalec kostne formacije). Na osnovi teh

ugotovitev so zato domnevali, da serumska koncentracija DHT verjetno nima vpliva na vzdrževanje normalne mineralne kostne gostote (42).

4.7 GENETSKO OZADJE BENIGNE HIPERPLAZIJE PROSTATE

BHP je genetsko pogojena, zato nas je zanimalo tudi genetsko ozadje bolezni. Za boljši pregled smo v literaturi poiskali informacije o genih, ki so bili proučevani v povezavi z BHP. Nato pa smo se lotili še iskanja informacij o pomenu polimorfizmov *XbaI* in *PvuII* v genu *ESR1*, polimorfizma v genu *AR* in polimorfizma v genu *CYP19A1* pri BHP.

Roberts et al so povzeli vpliv številnih polimorfizmov na BHP (Preglednica 25). Ugotovili so, da naj bi bili polimorfizmi v genih *HSD3B1*, *AKR1C3* in *CYP19* vpleteni v razvoj BHP. Pri heterozigotih A/C (gen *HSD3B1*) in G/A (gen *AKR1C3*) je bila manjša verjetnost za povečanje volumna prostate. Nasprotno so bili homozigoti TT (gen *CYP19*) bolj nagnjeni k povečanemu volumnu prostate (43).

Preglednica 25: Polimorfizmi, ki so bili proučevani v povezavi z benigno hiperplazijo prostate (43).

gen (SNP)	polimorfizem	frekvenca genotipa		
		nemutirani homozigot	heterozigot	mutirani homozigot
ESR1 (rs9340799)	A/G	39.5	46.4	14.1
ESR1 (rs2234693)	T/C	24.9	51.0	24.1
AR (g.6754G>A)	G/A	86.2	0	13.8
CYP19 (g.132810C>T)	C/T	27.0	49.7	23.3
CYP17 (rs743572)	T/C	40.0	42.2	17.8
HSD3B2 (rs1819698)	C/T	81.2	18.0	0.8
HSD3B2 (rs1361530)	C/G	81.9	17.7	0.4
HSD3B1 (rs6203)	C/T	30.4	48.9	20.7
HSD3B1 (rs1047303)	A/C	48.8	40.5	10.7
CYP19 (rs700519)	C/T	92.3	7.5	0.2
AKR1C3 (rs12529)	C/G	35.3	44.9	19.8
AKR1C3 (rs7741)	G/A	45.3	43.5	11.2
HSD17B1 (rs605059)	A/G	35.1	49.2	15.7
UGT2B15 (rs1902023)	G/T	23.5	48.3	28.2
CYP1A1 (rs1048943)	A/G	94.5	5.5	0
CYP1A1 (rs646903)	T/C	82.5	16.5	1.0
CYP1A2 (rs762551)	A/C	53.7	39.2	7.1
CYP1B1 (rs10012)	C/G	53.6	38.5	8.0
CYP1B1 (rs1056827)	G/T	52.9	39.0	8.1

CYP1B1 (rs1056836)	C/G	31.1	49.3	19.6
CYP1B1 (rs1800440)	A/G	65.4	30.8	3.8
CYP3A4 (rs2740574)	A/G	92.5	7.5	0
CYP2D6 (rs3892097)	G/A	64.4	30.7	4.9
CYP2D6 (rs1065852)	C/T	61.9	32.9	5.2
NQ01 (rs1800566)	C/T	69.9	27.7	2.4
GSTP1 (rs947894)	A/G	38.5	48.5	13.0
GSTP1 (rs1799811)	C/T	82.4	16.4	1.2
COMT (rs4680)	G/A	22.3	50.1	27.6
PSA (rs4802764)	G/A	54.3	38.3	7.4
PSA (rs266882)	G/A	24.5	50.1	25.5

Znano je, da androgeni in v določeni meri tudi estrogeni, igrajo pomembno vlogo pri rasti in razvoju prostate. Podatki o vplivu polimorfizmov *XbaI* (rs9340799, (A>G)) in *PvuII* (rs2234693, (C>T)) v genu *ESR1* na razvoj BHP so v literaturi redki. Vpliva polimorfizma *XbaI* na razvoj BHP pri pregledu literature nismo zasledili. Našli pa smo podatek, da polimorfizem *PvuII* ne pripomore k povečanemu tveganju za nastanek BHP. Vpliv polimorfizmov *XbaI* in *PvuII* so raziskovali predvsem v povezavi s pojavnostjo raka prostate. Določene študije dokazujejo, da so za razvoj raka prostate potrebni tako androgeni kot tudi estrogeni. Epidemiološke študije pa niso pokazale povezave med količino steroidnih hormonov v krvi in pojavom raka prostate (44, 45).

V študiji (Yu-Mei Wang et al., 2013) dobimo pregled 12 študij. Glede na etično skupino so za polimorfizem *PvuII* tako ugotovili, da je povezan z večjo verjetnostjo za pojav raka prostate pri azijski populaciji, pri kavkazijski in afriški populaciji pa tega niso potrdili. Nekatero študije so šle še bolj v podrobnosti; primerjali so povezavo pri posameznih državah. Tako so ugotovili, da se rak prostate pogosteje pojavlja pri indijski populaciji, pri ameriški in japonski populaciji pa te hipoteze niso uspeli potrditi. Študije, ki so raziskovale le povezanost med polimorfizmom in pojavnostjo raka prostate neodvisno od etičnosti pa niso uspeli potrditi vpletenost polimorfizma *PvuII* v pojav raka prostate (16).

Tudi pri polimorfizmu *XbaI* so ugotavljali povezanost z razvojem raka prostate. Najbolj izpostavljena je afriška populacija, pri kavkazijski in azijski populaciji pa študije niso uspeli potrditi povezanosti z rakom prostate. Pri proučevanju vpliva polimorfizma *XbaI* po državah so ugotovili, da so najbolj izpostavljeni Američani, za Japonce in Indijce pa tega niso potrdili (16).

Kljub temu, da so posamezne študije dokazovale vpletenost polimorfizmov *XbaI* in *PvuII* v večjo verjetnost za pojav raka prostate, pa nekatere študije tega niso potrdile. Razlog za nasprotja lahko iščemo v heterogenosti študij, ki se med drugim kažejo v različnem številu vzorcev in različnih preiskovanih etičnih skupinah (16).

Za polimorfizem *g.6754G>A* (gen *AR*) niso uspeli dokazati povezanosti z razvojem BHP (42). Pri pregledu literature smo našli le en članek, ki je zajemal povezanost polimorfizma *g.6754G>A* z BHP kar kaže na do sedaj majhno proučevanje tega polimorfizma v povezavi z BHP. Ravno tako v literaturi ni veliko znanega o povezanosti polimorfizma *g.132810C>T* (gen *CYP19A1*) z BHP. V študiji (Berges et al) so prišli do zaključka, da je za razvoj BHP potrebnih več polimorfizmov v različnih genih, niso pa uspeli dokazati vpletenosti *g.132810C>T* pri pojavu BHP (46).

Vpliva polimorfizmov *XbaI* in *PvuII* v genu *ESR1*, polimorfizma v genu *AR* in polimorfizma v genu *CYP19A1* pri BHP nismo uspeli dokazati, saj pri preiskovanih parametrih ni bilo statistično značilnih razlik, ki bi potrdile pomembnost teh polimorfizmov pri razvoju BHP.

4.8 UČINKI ZDRAVLJENJA BENIGNE HIPERPLAZIJE PROSTATE S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM

Finasterid je zaviralec testosteron 5 - alfa- reduktaze tipa II, medtem ko dutasterid zavira testosteron 5 - alfa - reduktazo tipa I in II. Zato nas je zanimala primerjava teh dveh učinkovin in morebitna razlika v učinkovitosti pri enoletnem zdravljenju bolnikov z BHP. Pričakovali smo večjo učinkovitost dutasterida, vendar pa se po enem letu terapije statistično značilne razlike med učinkovinama niso izrazile. Po pregledu literature lahko trdimo, da je rezultat pričakovan, saj tudi literaturni podatki po enem letu zdravljenja ne pokažejo pomembnih razlik v zdravljenju BHP.

Da bi lahko primerjali učinkovitost zdravljenja s finasteridom in dutasteridom pri preiskovanih polimorfizmih, smo morali najprej preveriti, ali so naši pacienti v obeh skupinah (skupina na terapiji s finasteridom ter skupina na terapiji z dutasteridom) na začetku zdravljenja primerljivi med sabo (Preglednica 23). Iz preglednice je razvidno, da

sta skupini primerljivi med sabo oz. da med skupinama ni statistično značilnih razlik ($p > 0,05$ pri vseh parametrih).

Preglednica 23: Povprečne vrednosti parametrov pred uvedbo zdravljenja.

PARAMETER	POVPREČNA VREDNOST (CELOTNA SKUPINA)	POVPREČNA VREDNOST (FI)	POVPREČNA VREDNOST (DU)	p VREDNOST
VP 1 (cm³)	46,6714	47,1429	46,2000	0,369
PSA 1 (ng/ml)	2,9937	2,7309	3,2566	0,643
OP 1 (cm)	102,6571	102,4571	102,8571	0,749
TT 1 (kg)	85,0429	84,8857	85,2000	0,817*
V (cm)	173,1714	173,5172	173,3548	0,906
T 1 (nmol/l)	16,4243	15,2571	17,5914	0,199
DHT 1 (nmol/l)	1,4170	1,2866	1,5437	0,219
E 1 (nmol/l)	0,0949	0,1088	0,0806	0,086
CTX 1 (µg/l)	0, 22912	0,23939	0,21943	0,460*
OC 1 (µg/l)	21,4215	20,4785	22,3106	0,483
P1NP 1 (µg/l)	41,6841	41,0433	42,2883	0,750

LEGENDA: *parametrični test, VP-volumen prostate, PSA-prostatični specifični antigen, OP-obseg pasu, TT-telesna teža, V-višina, T-testosteron, DHT-dihidrotestosteron, E-estrogen, CTX-C-terminalni telopeptid, OC-osteokalcin, P1NP-intaktni N-terminalni propeptid prokolagena tipa I; vse vrednosti so izmerjene na začetku študije, ob času t_1 . Uporabili smo neparametrični test oz. *parametrični test.

S parametričnimi testi smo preverili, če so parametri, ki se porazdeljujejo normalno, v obeh skupinah (finasterid, dutasterid) med sabo primerljivi (ni statistično značilnih razlik). Z neparametričnimi testi pa smo preverili statistične razlike pri vseh ostalih parametrih, ki se niso porazdeljevali normalno. Ugotovili smo, da so vsi opazovani parametri primerljivi med obema podskupinama preiskovancev ($p > 0,05$).

Z 2 - stranskim T testom in Mann - Whitney U testom smo analizirali tudi izračunane razlike med parametri v času terapije. Statistično značilne razlike so se pojavile le pri ΔE 1 - 2 (razlika v koncentraciji estrogena v času $t_2=0,5$ leta in $t_1=0$; začetek zdravljenja; Mann - Whitney U test, $p=0,010$). Torej obstajajo statistično pomembne razlike v spremembi koncentracije estrogena v prvi polovici terapije med skupinama (Preglednica 24). Dutasterid močnejše zavira encim 5 - AR kot finasterid. Zato ostane več testosterona, ki se lahko pretvori v estradiol-17 β : zato je tudi prišlo do razlik v koncentraciji estrogenov med skupinama.

Preglednica 24: Analiza razlik v kliničnih in biokemičnih parametrih v skupinah, ki sta se zdravili s finasteridom oz. dutasteridom.

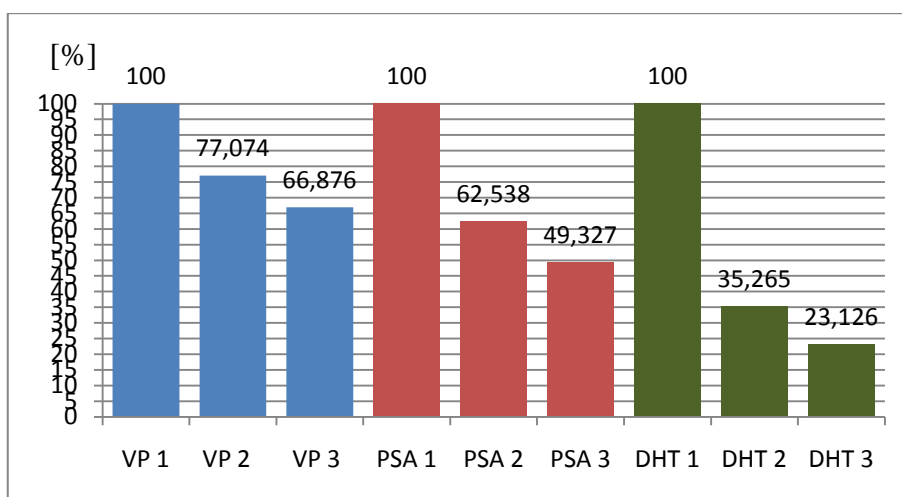
parameter	p vrednost
ΔVP 1-2	0,873
ΔVP 1-3	0,867
ΔPSA 1-2	0,661
ΔPSA 1-3	0,098
ΔDHT 1-2	0,666
ΔDHT 1-3	0,389
ΔT 1-2	0,474
ΔT 1-3	0,312
ΔE 1-2	0,010
ΔE 1-3	0,108
ΔCTX 1-2	0,593
ΔCTX 1-3	0,774
ΔOC 1-2	0,085
ΔOC 1-3	0,817
$\Delta PINP$ 1-2	0,811
$\Delta PINP$ 1-3	0,492

LEGENDA: VP-volumen prostate, PSA-prostatični specifični antigen, DHT-dihidrotestosteron, T-testosteron, E-estrogen, CTX-C-terminalni telopeptid, OC-osteokalcin, PINP-intaktni N-terminalni propeptid prokolagena tipa I; Δ 1-2-sprememba

vrednosti parametra v pol leta: razlika med t_2 in t_1 . Δ 1-3-sprememba vrednosti parametra v enem letu: razlika med t_3 in t_1 .

Največ pozornosti smo namenili VP, koncentraciji PSA, testosterona, dihidrotestosterona in estrogena, ki so nas najbolj zanimali zaradi pomena pri BHP in spreminjanja njihovih vrednosti glede na uporabljeno zdravilo (finasterid, dutasterid) ter biokemijskim označevalcem kostne remodelacije (CTX, OC, P1NP), ki so nas zanimali zaradi vpliva zaviralcev 5-AR na kostnino. Pri vseh parametrih smo opazovali vrednosti v treh časovnih obdobjih; ob času t_1 (začetek terapije), t_2 (pol leta po začetku terapije) in t_3 (eno leto po začetku terapije).

Volumen prostate, prostatični specifični antigen in dihidrotestosteron so pri BHP povišani. Med zdravljenjem so se vrednosti teh parametrov znižale, iz česar lahko sklepamo na uspešnost zdravljenja. Rezultate prikazuje Graf 3.

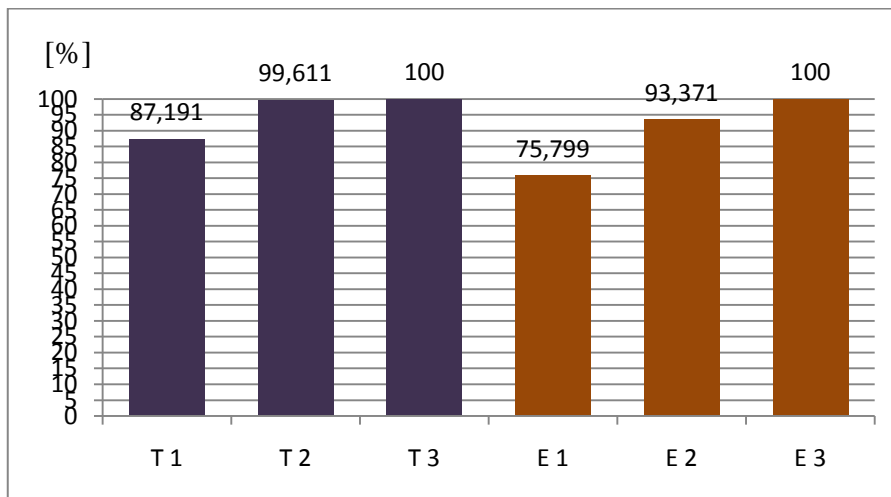


Graf 3: Zniževanje volumna prostate (VP), prostatičnega specifičnega antigena (PSA) in dihidrotestosterona (DHT) med terapijo. Pri BHP so vrednosti omenjenih parametrov povišane, z zdravljenjem s finasteridom oz. dutasteridom pa se vrednosti zmanjšajo že po enem letu terapije. VP1, PSA1, DHT1-vrednost parametra pred uvedbo zdravljenja; VP2, PSA2, DHT2-vrednost parametra po 6. mesecih zdravljenja; VP3, PSA3, DHT3-vrednost parametra po 12. mesecih zdravljenja.

VP se je v prvi polovici leta znižal za 22,9% (iz $46,6714 \text{ cm}^3$ na $35,9714 \text{ cm}^3$), v enem letu pa za 33,1% (iz $46,6714 \text{ cm}^3$ na $31,2121 \text{ cm}^3$). Koncentracija PSA se je po pol leta znižala za 37,5% (iz $2,9937 \text{ ng/ml}$ na $1,8722 \text{ ng/ml}$), po enem letu pa za 50,7% (iz $2,9937 \text{ ng/ml}$

na 1,4767 ng/ml). Tudi koncentracija DHT se je najbolj znižala v prvi polovici terapije, in sicer kar za 64,7% (iz 1,417 nmol/l na 0,4997 nmol/l), v nadaljevanju pa še za 12,1%, skupno torej za 76,9% (iz 1,417 nmol/l na 0,3277 nmol/l) v enem letu.

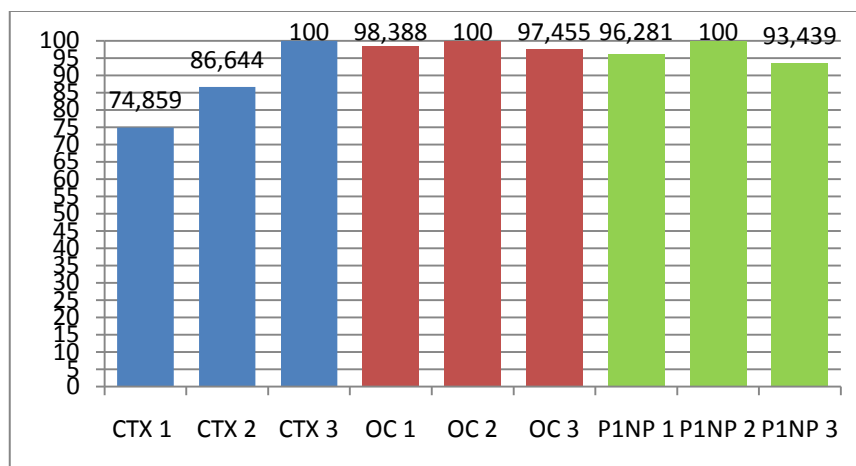
Koncentracija testosterona in estrogena se je med terapijo povišala. Koncentracija testosterona se je v prvi polovici terapije v povprečju povišala za 12,4% (iz 16,4243 nmol/l na 18,7638 nmol/l), po enem letu pa v povprečju za 12,8% (iz 16,4243 nmol/l na 18,8371 nmol/l). Koncentracija estrogena pa se je v pol leta v povprečju povišala za 17,6% (iz 0,0949 nmol/l na 0,1169 nmol/l) in v enem letu terapije v povprečju za 24,2% (iz 0,0949 nmol/l na 0,1252 nmol/l). Rezultati so prikazani v Grafu 4.



Graf 4: Zviševanje koncentracij testosterona (T) in estrogena (E) med terapijo. T1, E1-vrednost parametra pred uvedbo zdravljenja; T2, E2-vrednost parametra po 6. mesecih zdravljenja; T3, E3-vrednost parametra po 12. mesecih zdravljenja.

Povišanje koncentracije testosterona tekom terapije je pričakovano. Finasterid in dutasterid namreč zavirata encim, ki pretvarja testosteron v DHT; v prostati se zniža koncentracija DHT in posledično poviša koncentracija testosterona. Po drugi strani se testosteron s pomočjo encima aromataza (*CYP19A1*) pretvarja v estradiol. Estradiol je eden glavnih predstavnikov estrogenov. Koncentracija estradiola se je med terapijo povišala, kar je posledica povišanja koncentracije testosterona zaradi zaviranja encima testosteron 5-alfa-reduktaze.

Spremembe vrednosti kostnih označevalcev so bile bolj raznolike, kar vidimo tudi na Grafu 5. Razen vrednosti CTX, so se vrednosti vseh ostalih kostnih označevalcev v prvi polovici terapije povišale, v drugi polovici pa zopet znižale.



Graf 5: Spreminjanje koncentracije kostnih označevalcev med terapijo. CTX-C-terminalni telo-peptid, OC-osteokalcin, P1NP-intaktni N-terminalni propeptid prokolagena tipa I. CTX1, OC1, P1NP1-vrednost parametra pred uvedbo zdravljenja; CTX2, OC2, P1NP2-vrednost parametra po 6. mesecih zdravljenja; CTX3, OC3, P1NP3-vrednost parametra po 12. mesecih zdravljenja.

V študiji (Jung et al, 2004) so proučevali vpletenost označevalcev kostne tvorbe (PINP, OC) in kostne razgradnje (CTX) v pojav raka prostate. Zanimalo jih je, ali bi lahko s kostnimi označevalci postavili prognozo raka prostate. Koncentracije OC in CTX niso bile statistično značilno različne, zato ta parametra nista bila uporabna kot orodji za razlikovanje med benigno in maligno obliko bolezni prostate. Koncentracija PINP pa je bila statistično značilno povišana pri bolnikih z rakom prostate, ki so imeli hkrati kostne metastaze. Pri bolnikih z BHP in bolnikih z rakom prostate brez kostnih metastaz ni bilo statistično značilnih razlik med koncentracijami omenjenih kostnih označevalcev (47). V našem primeru nismo uspeli dokazati povezanosti koncentracije kostnih označevalcev z BHP. Razlog je verjetno v kratkotrajnosti trajanja terapije in številčno majhnem vzorcu.

Statistično značilnih razlik med finasteridom in dutasteridom po enem letu zdravljenja bolnikov z BHP nismo uspeli dokazati. Naši rezultati se ujemajo z rezultati iz literature, ki ravno tako ne potrjujejo pomembnih razlik med učinkovinama po enem letu zdravljenja.

Vendar pa ne moremo trditi, da statistično značilne razlike med učinkovinama ne obstajajo, saj je zdravljenje trajalo le eno leto, kar je prekratko časovno obdobje za oblikovanje končnega sklepa. Kljub temu pa je bilo zdravljenje uspešno, saj so se vrednost VP, koncentracija PSA in DHT znižale.

4.9 OCENA VPLIVA POLIMORFIZOV *XbaI* IN *PvuII* V GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1 NA UČINKE ZDRAVLJENJA S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM

Za vsak polimorfizem posebej smo preverili njegov vpliv na zdravljenje s finasteridom/ dutasteridom oz. klinične in biokemične parametre. Opazovali smo, ali med genotipi obstajajo statistično značilne razlike v vrednostih parametrov glede na zdravljenje s finasteridom/ dutasteridom.

Pri polimorfizih *XbaI* in *PvuII* nam pri nobeni razliki med parametri ni uspelo dokazati statistično značilnih razlik med genotipi. Eden izmed razlogov je lahko kratek čas trajanja terapije. Verjetno bi morali raziskavo izvajati dlje časa, da bi se pokazale morebitne statistično značilne razlike med genotipi. Tudi naš vzorec je bil po številu pacientov majhen.

Za oba polimorfizma najdemo v literaturi predvsem podatke o raku prostate, medtem ko jih za BHP skoraj ni-pomena polimorfizma *XbaI* pri BHP pri pregledu literature nismo zasledili, našli pa smo podatek, da polimorfizem *PvuII* ne pripomore k tveganju za nastanek BHP (45).

V študiji (Xiang Ding et al, 2012) ugotavljajo morebitno vpletenost polimorfizma *XbaI* v razvoj raka prostate, medtem ko za polimorfizem *PvuII* tega niso uspeli potrditi. Pri polimorfizmu *XbaI* ugotavljajo povečano tveganje za razvoj raka prostate pri heterozigotih C/T, C alel pa je v primerjavi s T alelom bolj pogosto prisoten pri rakavih bolnikih. Vendar bi bilo potrebno opraviti več študij, da bi lahko z večjo gotovostjo potrdili ugotovitve (48). Polimorfizma *XbaI* in *PvuII* v genu *ESR1* glede na naše rezultate nista pomembna pri razvoju BHP. Vendar pa bi moralo zdravljenje potekati dlje časa in na večjem številu pacientov, da bi lahko z večjo gotovostjo potrdili naše rezultate.

4.10 OCENA VPLIVA POLIMORFIZMA *g.6754G>A* V GENU ZA ANDROGENI RECEPTOR NA UČINKE ZDRAVLJENJA S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM

Pri polimorfizmu *g.6754G>A* smo izvedli T test in Mann-Whitney U test, saj smo pridobili rezultate le za 2 genotipa (heterozigoti $GA \rightarrow 0$ %). Statistično značilnih razlik med genotipi nam zopet ni uspelo dokazati. Podatki iz literature kažejo na povišano tveganje za razvoj BHP pri heterozigotih AG. Zanimiva je ugotovitev, da se genotip AG pogosteje pojavlja pri kadilcih, genotip AA pa pri nekadilcih (49). Iz naših rezultatov ne moremo sklepati podobno, saj se med našimi vzorci genotip AG ni pojavil. Več podatkov o pomenu polimorfizma *g.6754G>A* v genu AR pa pri pregledu literature nismo našli.

Vpliva polimorfizma v genu AR pri BHP nismo uspeli dokazati. Statistično značilnih razlik med genotipi ni bilo. Vendar pa bi morali izvesti dolgotrajnejšo študijo, z več pacienti, da bi dodatno podkrepili naše rezultate.

4. 11 OCENA VPLIVA POLIMORFIZMA *g.132810C>T* V GENU ZA CITOKROM P450-OKSIDAZO 19A1 NA UČINKE ZDRAVLJENJA S FINASTERIDOM IN DUTASTERIDOM

Do statistično značilnih razlik med genotipi je prišlo pri ΔT 1-3 (sprememba koncentracije testosterona v enem letu). V nadaljevanju nas je zanimalo, med katerimi genotipi se pojavljajo razlike. Z Games-Howell-ovim testom smo ugotovili razlike med genotipom CC in genotipoma CT, TT. Torej genotip CC najbolj odstopa od ostalih dveh (CC-CT; $p=0,012$, CC-TT; $p=0,006$, CT-TT; $p=0,769$). Moški z genotipom CC so bolj dovzetni za razvoj BHP kot moški z ostalima genotipoma. Povprečne vrednosti razlik koncentracij testosterona v času t_3 in t_1 so bile: genotip CC: 0,0647 nmol/l, genotip CT: 2,8429 nmol/l, genotip TT: 3,7118 nmol/l. V študiji (Richard Berges et al, 2011) domnevajo, da je za razvoj BHP potrebnih več polimorfizmov hkrati, v več različnih genih. Vpletenost polimorfizma *g.132810C>T* v razvoj BHP niso uspeli potrditi; statistično značilne razlike so se pojavile le pri PSA in sicer med genotipoma CC in CT (46). Tu lahko potegnemo vzporednico z našimi rezultati; tudi pri naši raziskavi se pojavljajo podobne razlike med genotipi, le da pri drugem parametru (testosteronu) kot v literaturi.

Polimorfizem v genu *CYP19A1* bi lahko bil vpleten v razvoj BHP, saj je do statistično značilne razlike med genotipi prišlo pri enem parametru. Vendar to ni dovolj za 100% potrditev vpletenosti v razvoj te bolezni. Zopet bi potrebovali podatke iz študij, ki bi trajale dlje časa in na večjem številu pacientov.

4.12 OCENA VPLIVA TERAPIJE NA KOSTNE ZAPLETE

Androgeni in estrogeni imajo pomembno vlogo pri normalni funkciji kostnine. Ker se pri zdravljenju z zaviralci 5-AR zniža koncentracija DHT in posledično poveča koncentracija testosterona, nas je zanimal vpliv zdravljenja na morebitne kostne zaplete. Ravno tako nas je zanimal morebiten vpliv posameznih polimorfizmov na kostnino.

Pri enoletnem zdravljenju bolnikov s finasteridom in dutasteridom nismo uspeli dokazati povezanosti koncentracije kostnih označevalcev z BHP. Zato tudi ne moremo oceniti vpliva terapije na kostne zaplete, saj je bilo zdravljenje kratkotrajno. Tudi podatki v literaturi so redkejši.

Pri pregledu literature smo našli študijo o vplivu zaviralcev testosteron 5-alfa-reduktaze na kostno gostoto in koncentracijo PSA, vendar pri zdravih mladih moških. Terapija je trajala eno leto: 33 oseb je enkrat dnevno prejelo 0,5 mg dutasterida, 34 oseb 5 mg finasterida in 32 oseb placebo. Mineralno kostno gostoto in koncentracijo PSA so jim izmerili na začetku, po enem letu in 6 mesecev po koncu terapije. Ugotovili so, da znižanje koncentracije DHT zaradi zdravljenja s finasteridom oz. dutasteridom ni vplivalo na mineralno kostno gostoto. Vrednosti PSA pa so se med zdravljenjem nekoliko znižale, vendar so se 6 mesecev po koncu terapije (3. meritev) vrstile na vrednosti ob začetku zdravljenja (1. meritev). Tako niso uspeli dokazati vpliva terapije s finasteridom in dutasteridom na kostne dogodke pri zdravih posameznikih (42).

Statistično značilne razlike med genotipi za kostne označevalce v enem letu zdravljenja BHP se niso izrazile. Zato tudi ne moremo oceniti vpliva genotipov na neželene učinke terapije. V enem letu se sicer neželeni učinki na kostnino niso izrazili, vendar bi moralo zdravljenje potekati dlje časa, da bi z gotovostjo trdili, da ni pomembnih razlik med genotipi.

Podatkov v literaturi o vplivu genotipov naših preiskovanih polimorfizmov nismo našli. Smo pa našli študijo o vplivu polimorfizmov *XbaI* in *PvuII* na mineralno kostno gostoto pri mladih zdravih moških. Osebe niso jemale nobenih zdravil in niso imele kostnih bolezni. Preiskovancem so izmerili mineralno kostno gostoto, vendar niso uspeli dokazati statistično značilnih razlik med genotipi polimorfizmov *XbaI* in *PvuII* (50).

Terapija z zaviralci 5-AR glede na naše rezultate nima učinkov na kostne zaplete. Ravno tako polimorfizmi *XbaI* in *PvuII* v genu *ESR1*, polimorfizem v genu *AR* in polimorfizem v genu *CYP19A1* glede na dobljene rezultate ne vplivajo na funkcijo kostnine. Glede na redkost podatkov iz literature in kratkotrajnost našega zdravljenja bi morali pridobiti podatke iz daljšega časovnega obdobja in z večjim številom pacientov, da bi lahko z gotovostjo trdili, da omenjeni polimorfizmi nimajo vpliva na kostnino.

5. SKLEP

V naši nalogi smo izvedli farmakogenetsko analizo genetskih polimorfizmov v genih za estrogenski in androgeni receptor ter aromatazo pri zdravljenju BHP s finasteridom in dutasteridom. Naši rezultati so pokazali:

- da smo uspešno optimizirali analizne metode za genotipizacijo vseh 4 polimorfizmov,
- da so bile genotipske frekvence polimorfizmov v Hardy-Weinbergovem ravnotežju (razen pri polimorfizmu v genu *AR*) in so znašale:
 - 29 : 51 : 20 za AA : AG : GG pri polimorfizmu *XbaI*
 - 31 : 51 : 17 za CC : CT : TT pri polimorfizmu *PvuII*
 - 94 : 0 : 6 za GG : GA : AA pri polimorfizmu v genu za androgeni receptor
 - 26 : 44 : 30 za CC : CT : TT pri polimorfizmu v genu za aromatazo,
- da je bila terapija z zaviralci testosteron 5-alfa-reduktaze uspešna, saj so se vrednosti VP, PSA in DHT po enem letu znižale, in sicer : VP za 33,1%, PSA za 50,7%, DHT pa za 76,9%,
- da ni razlik v učinkovitosti zdravljenja s finasteridom in dutasteridom, čeprav smo jo pričakovali,
- da sta se koncentraciji E in T pričakovano povišali. Koncentracija E se je v enem letu povišala za 24,2%, koncentracija T pa za 12,8%,
- da so se koncentracije kostnih označevalcev v prvi polovici terapije povišale, nato pa zopet znižale; do konca terapije se je poviševala le koncentracija CTX (za 25,1%). Statistično značilnih razlik med skupinama pa nam ni uspelo dokazati, verjetno zaradi krajšega časovnega obdobja trajanja raziskave.
- da razlik med genotipskimi podskupinami na izbrane parametre nismo uspeli dokazati. Le pri polimorfizmu *g.132810C>T* smo opazili statistično značilne razlike med genotipi pri parametru ΔT 1-3 (sprememba koncentracije testosterona v enem letu). Z Games-Howell-ovim testom smo ugotovili razlike med genotipom CC in genotipoma CT, TT; (CC-CT; $p=0,012$, CC-TT; $p=0,006$, CT-TT; $p=0,769$).

Iz naših rezultatov lahko zaključimo, da je uspešnost zdravljenja benigne hiperplazije prostate s finasteridom in dutasteridom neodvisna od polimorfizmov *XbaI*, *PvuII*, *g.6754G>A* in *g.132810C>T*. Statistično značilne razlike so se pojavile le pri polimorfizmu v genu za aromatazo.

Na podlagi naših rezultatov pa ne moremo z gotovostjo trditi, da omenjeni polimorfizmi nimajo pomembnejše vloge pri zdravljenju benigne hiperplazije prostate, kljub temu da so tudi podatki v literaturi o povezavi med benigno hiperplazijo prostate in omenjenimi polimorfizmi omejeni. Če bi želeli z večjo zanesljivostjo preveriti vpliv *XbaI*, *PvuII*, *g.6754G>A* in *g.132810C>T* na zdravljenje benigne hiperplazije prostate, bi morali uporabiti večje število pacientov (tudi iz več držav, celin), podaljšati bi morali tudi čas raziskave.

6. LITERATURA

1. Kmetec A: *Benigna hiperplazija prostate*. Farmaceutski vestnik 2011; 62: 77-80
2. Kmetec A: *Bolezni prostate*; spletno gradivo za študente medicine-urologija <http://www.tikasense.com/read-spletno/spletno-gradivo-za-studente-medicine-urologija-doc-dr-79838/> dostopno 2.10. 2014
3. Nickel JC, Gilling P, Tammela TL, Morrill B, Wilson TH, Rittmaster RS: *Comparison of dutasteride and finasteride for treating benign prostatic hyperplasia: the Enlarged Prostate International Comparator Study (EPICS)*. Bju International 2011; 108: 388-394
4. https://www.google.si/search?q=prostata&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=k8hoU_SzEJOg7AapzYDIBg&sqi=2&ved=0CAYQ_AUoAQ&biw=1280&bih=642#facrc=&imgdii=&imgrc=xUO5kAAzOW5EjM%253A%3BzMVIMyKhJ4et0M%3Bhttp%253A%252F%252Fprirodni-lekovi.com%252Fimages%252Fprostata.jpg%3Bhttp%253A%252F%252Fprirodni-lekovi.com%252Fprostata.html%3B387%3B310 dostopno: 3.10. 2014
5. Wang YM, Liu ZW, Guo JB, Wang XF, Zhao XX, Zheng X: *ESR1 Gene Polymorphisms and Prostate Cancer Risk: A HuGE Review and Meta-Analysis*. PLOS ONE, 2013; 8: 6.
6. Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE: *Clinical Chemistry, Techniques, Principles, Correlations*, sixth edition. 2010
7. Wang K, Fan DD, Jin S, Xing NZ, Niu YN: *Differential expression of 5-alpha reductase isozymes in the prostate and its clinical implications*. Asian Journal of Andrology 2014; 16: 274-279
8. Tewari R, Chhabra M, Madhavan Natsu S, Goel A, Dalela D, Mati Goel M, Rajender S: *Significant Association of Metabolic Indices, Lipid Profile, and Androgen Levels with Prostate Cancer*. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention, 2014; 15 (22): 9841-9846
9. Ikeda K, Horie-Inoue K, Inoue S: *Identification of estrogen-responsive genes based on the DNA binding properties of estrogen receptors using high-throughput sequencing technology*. Acta Pharmacologica Sinica, 2015; 36: 24-31

10. Lanišnik Rižner T: *Androgeni, benigna hiperplazija prostate in rak prostate*. Medicinski Razgledi 2008; 47: 73-85
11. Vanderschueren D, Laurent MR, Claessens F, Gielen E, Lagerquist MK, Vandenput L, Börjesson AE, Ohlsson C: *Sex Steroid Actions in Male Bone*. Endocr Rev. 2014; 35(6): 906-960
12. Nicholson TM, Sehgal PD, Drew SA, Huang W, Ricke WA: *Sex steroid receptor expression and localization in benign prostatic hyperplasia varies with tissue compartment*. Differentiation 2013; 85(0): 140-149
13. Nicholson TM, Ricke WA: *Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future*. Differentiation 2011; 82(4-5): 184-199
14. Watson DG: *Pharmaceutical Chemistry, First Edition* 2011
15. Vrtačnik P, Ostanek B, Mencej-Bedrač S, Marc J: *The many faces of estrogen signaling*. Biochemia Medica 2014; 24(3): 329-42
16. Wang YM, Liu ZW, Guo JB, Wang XF, Zhao XX, Zheng X: *ESR1 Gene Polymorphisms and Prostate Cancer Risk: A HuGE Review and Meta-Analysis*. PLOS ONE, 2013; 8: 6
17. Ilaš J, Obreza A: *Zdravila za zdravljenje benigne hiperplazije prostate*. Farmaceutski vestnik 2014; 65: 337-343
18. Izumi K, Mizokami A, Lin WJ, Ali KP, Chang C: *Androgen Receptor Roles in the Development of Benign Prostate Hyperplasia*. The American Journal of Pathology 2013; 182: 1942-1949
19. KRKA d.d., Finpros (finasterid), 5 mg filmsko obložene tablete, SmPC; PIL032175/2, 2012
20. Actavis Group hf., Hyplafin (finasterid), 5 mg filmsko obložene tablete, SmPC; 5363-I-175/12: datum zadnje revizije besedila: 14.12. 2011
21. Kaplan SA, Lee JY, Meehan AG, Kusek JW, Medical Therapy of Prostatic Symptoms (MTOPS) Research Group: *Long-term Treatment with Finasteride Resulted in a Significant Improvement Relative to Placebo in Clinical Progression of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) in Men with Enlarged Prostates (≥ 30 mL), But Not in Those with Smaller Prostates (< 30 mL): Data from the Medical Therapy of Prostatic Symptoms (MTOPS) Trial*. J Urol. 2011 April; 185(4): 1369-1373

22. GSK d.o.o., Avodart (dutasterid), 0,5 mg mehke kapsule, SmPC; 5363-I-240/13: datum zadnje revizije besedila: 25.9. 2013.
23. Toren P, Margel D, Kulkarni G, Finelli A, Zlotta A, Fleshner N: *Effect of dutasteride on clinical progression of benign prostatic hyperplasia in asymptomatic men with enlarged prostate: a post hoc analysis of the REDUCE study*. BMJ 2013; 346: f2109
24. Lek farmacevtska družba d.d., Dutasterid Lek (dutasterid), 0,5 mg mehke kapsule, SmPC; 5363-I-111/14: datum zadnje revizije besedila: 3.12. 2013
25. Jagodič K: *Kirurško zdravljenje prostatične obstrukcije pri bolnikih s simptomi spodnjih sečil*. Farmaceutski vestnik 2014; 65: 333-335
26. Makridakis N, Reichardt JK: *Pharmacogenetic analysis of human steroid 5 α reductase type II: comparison of finasteride and dutasteride*. Journal of Molecular Endocrinology 2005; 34: 617-623
27. Lopez DS, Peskoe SB, Tsilidis KK, Hoffman-Bolton J, Helzlsouer KJ, Isaacs WB, Smith MW, Platz EA: *Association of Variants in Genes Related to the Immune Response and Obesity with Benign Prostatic Hyperplasia in CLUE II*. Prostate Cancer Prostatic Dis. 2014; 17(4): 353-358
28. http://primer3plus.com/web_3.0.0/primer3web_input.htm dostopno: 11.7. 2014
29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/> dostopno: 3.7. 2014
30. <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/> dostopno: 3.7. 2014
31. <https://eu.idtdna.com/calc/analyzer> dostopno: 4.7.2014
32. den Dunnen JT, Antonarakis SE: *Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion*. Human mutation 2000; 15: 7-12
33. <https://www.pharmgkb.org> dostopno: 21.9.2015
34. Černe D, Ostanek B: *Biomedicinska analitika I*, učbenik za študente laboratorijske biomedicine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2012: 108-119, 136-147
35. Trebušak Podkrajšek K, Debeljak M: *Molekularna genetika v diagnostiki prirojenih bolezni*. Spletno gradivo, http://ibk.mf.uni-lj.si/teaching/objave/3Vaja_3_4_MOLGENKLDIAG.pdf dostopno: 29.10. 2014

36. Mlinarič Raščan I: *Farmakogenomika*. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010: 50-60
37. <http://ipj.quintessenz.de/index.php?doc=html&abstractID=20981> dostopno: 29.10. 2014
38. <http://www.ijmr.org.in/article.asp?issn=0971-5916;year=2012;volume=135;issue=1;spage=6;epage=8;aulast=Mittal> dostopno: 15.1. 2015
39. Komar AA (editor): *Single Nucleotide Polymorphisms, Methods and Protocols, Second Edition*. Center for Gene Regulation in Health and Disease, Cleveland, 2009: 95-133
40. Ensembl Genome Browser: <http://www.ensembl.org/index.html> dostopno: 15.1. 2015
41. Wurzel R, Ray P, Major-Walker K, Shannon J, Rittmaster R: *The effect of dutasteride on intraprostatic dihydrotestosterone concentrations in men with benign prostatic hyperplasia*. *Nature, Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2007; 10: 149-154
42. Amory JK, Anawalt BD, Matsumoto AM, Page ST, Bremner WJ, Wang C, Swerdloff RS, Clark RV: *The Effect of 5 α -Reductase Inhibition With Dutasteride and Finasteride on Bone Mineral Density, Serum Lipoproteins, Hemoglobin, Prostate Specific Antigen and Sexual Function in Healthy Young Men*. *J Urol*. 2008; 179(6): 2333-2338
43. Roberts RO, Bergstralh EJ, Farmer SA, Jacobson DJ, Hebbing SJ, Cunningham JM, Thibodeau SN, Lieber MM, Jacobse SJ: *Polymorphisms in genes involved in sex hormone metabolism may increase risk of benign prostatic hyperplasia*. *The Prostate* 2006; 66: 392-404
44. Gianfrilli D, Pierotti S, Pofi R, Leonardo C, Ciccariello M, Barbagallo F: *Sex Steroid Metabolism in Benign and Malignant Intact Prostate Biopsies: Individual Profiling of Prostate Intracrinology*. *BioMed Research International* 2014; Article ID 464869
45. Narita S, Tsuchiya N, Wang L, Matsuura S, Ohyama C, Satoh S, Sato K, Ogawa O, Habuchi T, Kato T: *Association of lipoprotein lipase gene polymorphism with risk of prostate cancer in a Japanese population*. *Int. J. Cancer* 2004; 112: 872-876

46. Berges R, Gsur A, Feik E, Höfner K, Senge T, Pientka L, Baierl A, Michel MC, Ponholzer A, Madersbacher S: *Association of polymorphisms in CYP19A1 and CYP3A4 genes with lower urinary tract symptoms, prostate volume, uroflow and PSA in a population-based sample.* World J Urol 2011; 29: 143-148
47. Jung K, Lein M, Stephan C, von Hosslin K, Semjonow A, Sinha P, Loening SA, Schnorr D: *Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications.* Int. J. Cancer 2004; 111: 783-791
48. Ding X, Cui FM, Xu ST, Pu JX, Huang YH, Zhang JL, Wei XD, Hou JQ, Yan CY: *Variants on ESRI and their Association with Prostate Cancer Risk: A Meta-analysis.* Asian Pacific Journal of Cancer Prevention 2012; 13: 3931-3936
49. Prajapati AK: *To Understand The Etiopathogenesis of Benign Prostate Hyperplasia at Biochemical, Cellular and Molecular level.* Ph.D Thesis 2014; MESCRL
50. Koh JM, Kim DJ, Hong JS, Park JY, Lee KU, Kim SY, Kim GS: *Estrogen receptor α gene polymorphisms (Pvu II and Xba I) influence association between leptin receptor gene polymorphism (Gln223Arg) and bone mineral density in young men.* European Journal of Endocrinology 2002; 147: 777-783

7. PRILOGE

7.1 REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM *Xba*I V GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1

ŠT. PRODUKTA	PC	GENOTIP		
1		AG	36	AA
2		AA	37	AG
3		AA	38	AG
4		GG	39	AG
5		GG	40	AG
6		AG	41	GG
7		AG	42	AG
8		GG	43	AG
9		GG	44	AA
10		AA	45	AG
11		AA	46	AG
12		AA	47	AG
13		AG	48	AG
14		AG	49	AG
15		AG	50	AG
16		AG	51	GG
17		AG	52	AA
18		AA	53	GG
19		AA	54	AG
20		AA	55	AG
21		AA	56	AA
22		AA	57	AG
23		AG	58	GG
24		AA	59	AG
25		AG	60	AG
26		AA	61	AG
27		AA	62	AG
28		GG	63	AG
29		GG	64	AA
30		AG	65	GG
31		AG	66	GG
32		GG	67	AG
33		GG	68	AA
34		AA	69	AG
35		AA	70	AA

**7.2 REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM *PvuII* V
GENU ZA ESTROGENSKI RECEPTOR 1**

ŠT. PRODUKTA	PC	GENOTIP		
1	CT	41	CC	
2	CT	42	CT	
3	CT	43	CC	
4	CC	44	TT	
5	CT	45	CT	
6	CT	46	CT	
7	CC	47	CT	
8	CT	48	CT	
9	CC	49	CT	
10	CT	50	CT	
11	CC	51	CC	
12	CT	52	CT	
13	CC	53	CC	
14	TT	54	CC	
15	CT	55	CT	
16	CT	56	TT	
17	CT	57	CC	
18	TT	58	CC	
19	TT	59	CT	
20	CC	60	CT	
21	CC	61	CT	
22	CC	62	CT	
23	CT	63	CT	
24	CC	64	CT	
25	CC	65	CC	
26	TT	66	CC	
27	TT	67	CT	
28	TT	68	TT	
29	CT	69	CC	
30	CT	70	CT	
31	CC			
32	CT			
33	CT			
34	CT			
35	TT			
36	TT			
37	CT			
38	CT			
39	CC			
40	TT			

7.3 REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM

g.6754G>A V GENU ZA ANDROGENI RECEPTOR

ŠT. PRODUKTA	PC	GENOTIP		
1		AA	41	AA
2		GG	42	GG
3		GG	43	GG
4		GG	44	GG
5		GG	45	GG
6		GG	46	GG
7		AA	47	GG
8		GG	48	GG
9		GG	49	GG
10		GG	50	GG
11		GG	51	GG
12		GG	52	GG
13		GG	53	GG
14		GG	54	GG
15		GG	55	GG
16		GG	56	GG
17		GG	57	GG
18		GG	58	GG
19		GG	59	GG
20		GG	60	GG
21		GG	61	GG
22		GG	62	GG
23		GG	63	GG
24		GG	64	GG
25		GG	65	GG
26		GG	66	GG
27		GG	67	GG
28		GG	68	GG
29		GG	69	AA
30		GG	70	GG
31		GG		
32		GG		
33		GG		
34		GG		
35		GG		
36		GG		
37		GG		
38		GG		
39		GG		
40		GG		

7.4 REZULTATI GENOTIPIZACIJE ZA POLIMORFIZEM *g.132810C>T*

V GENU ZA CITOKROM P450-OKSIDAZO 19A1

ŠT. PRODUKTA	PC	GENOTIP		
1		CT	41	CC
2		CC	42	TT
3		TT	43	CT
4		CT	44	CT
5		TT	45	TT
6		CT	46	CT
7		TT	47	CC
8		CT	48	CC
9		TT	49	CT
10		CC	50	TT
11		CT	51	CT
12		CT	52	CT
13		CT	53	CT
14		CT	54	CT
15		TT	55	CC
16		TT	56	CT
17		CT	57	CC
18		CC	58	CT
19		CT	59	TT
20		CC	60	CT
21		CC	61	TT
22		TT	62	CT
23		CT	63	TT
24		CT	64	TT
25		CC	65	CT
26		CT	66	TT
27		CC	67	CC
28		CC	68	CT
29		CC	69	TT
30		TT	70	CC
31		CT		
32		CC		
33		CT		
34		CC		
35		TT		
36		TT		
37		CT		
38		CT		
39		TT		
40		CC		