

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA RUMENVIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TAMARA RUMENVIČ

**VPLIV IZBRANIH POLIMORFIZMOV POSAMEZNIH  
NUKLEOTIDOV NA KONCENTRACIJE TUMORSKIH  
OZNAČEVALCEV PRI BOLNIKI Z RAKOM PROSTATE**

**EFFECT OF SELECTED SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISMS  
ON THE CONCENTRATIONS OF TUMOR MARKERS IN PATIENTS  
WITH PROSTATE CANCER**

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za klinično biokemijo na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorstvom prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem. Meritve smo izvedli v laboratoriju na Kliničnem inštitutu za klinično kemijo in biokemijo v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Del naloge je bil opravljen na Centru za funkcijsko genomiko in biočipe v Ljubljani.

## **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem mentorju prof. dr. Jošku Osredkarju, mag. farm., spec. med. biokem., za vso izraženo pomoč pri ustvarjanju magistrske naloge. Hvala za vse prijazne nasvete, hitre odgovore, popravke in usmeritve pri delu.

Prav tako se najlepše zahvaljujem somentorici prof. dr. Janji Marc, mag. farm., spec. med. biokem., ki me je nesebično vzela pod svoje okrilje in mi nudila podporo ter številne uporabne nasvete. Hvala Vam za vaš čas in trud.

Zahvaljujem se tudi Kristini Kumer, univ. dipl. bioteh., in dr. Roku Koširju, univ. dipl. biol., za vso pomoč pri delu v laboratorijih. Z vajino pomočjo sem delo opravljala z večjo samozavestjo in veseljem.

Velika zahvala gre tudi moji družini in prijateljem, ki so mi ves čas šolanja stali ob strani in me vzpodbujali. Še posebej bi se rada zahvalila mami in fantu, ki sta mi nudila nasvete in tolažbo takrat, ko sem to najbolj potrebovala. Hvala – zaradi vas se je splačalo truditi.

Nalogo posvečam svojemu očetu.

## **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja prof. dr. Joška Osredkarja, mag. farm., spec. med. biokem., in somentorice prof. dr. Janje Marc, mag. farm., spec. med. biokem.

Tamara Rumenočič

# KAZALO VSEBINE

<b>1</b>	<b>UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1	OPIS PROSTATE.....	1
1.2	BOLEZNI PROSTATE .....	3
1.2.1	PROSTATITIS .....	3
1.2.2	BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE.....	4
1.2.3	RAK PROSTATE .....	5
1.3	TUMORSKI OZNAČEVALCI .....	9
1.3.1	PROSTATNO SPECIFIČNI ANTIGEN (PSA) .....	10
1.3.2	DODATNI DIAGNOSTIČNI PARAMETRI IZ PSA .....	12
1.3.3	GENETSKI OZNAČEVALCI .....	13
<b>2</b>	<b>NAMEN DELA</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>17</b>
3.1	OPIS PREISKOVANCEV .....	17
3.2	IZOLACIJA DNA .....	18
3.2.1	POSTOPEK IZOLACIJE DNA .....	18
3.3	KAKOVOST IN KOLIČINA IZOLIRANE DNA .....	19
3.3.1	POSTOPEK MERJENJA KAKOVOSTI IN KOLIČINE IZOLIRANE DNA .....	19
3.4	GENOTIPIZACIJA Z METODO KASP .....	21
3.4.1	MEHANIZEM REAKCIJE.....	22
3.4.2	PRIPRAVA VZORCEV ZA GENOTIPIZACIJO .....	23
3.4.3	IZVEDBA KASP GENOTIPIZACIJE.....	25
3.5	STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV .....	26
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b> .....	<b>28</b>
4.1	KAKOVOST IN KOLIČINA IZOLIRANE DNA.....	28
4.2	REZULTATI GENOTIPIZACIJE Z METODO KASP.....	29

4.3	OSNOVNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV .....	32
4.4	POVEZAVA POLIMORFIZMOV S KLINIČNIMI PODATKI PREISKOVANCEV .....	33
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA.....</b>	<b>40</b>
5.1	KAKOVOST IN KOLIČINA IZOLIRANE DNA.....	40
5.2	KASP GENOTIPIZACIJA .....	41
5.3	KLINIČNI PODATKI IN ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV .....	43
5.4	POVEZAVA POLIMORFIZMOV S KLINIČNIMI PODATKI PREISKOVANCEV .....	44
5.4.1	ZASTOPANOST ALELOV V SKUPINI RAK IN BHP.....	44
5.4.2	OCENA VPLIVA ALELOV NA VREDNOSTI SPREMENLJIVK.....	46
<b>6</b>	<b>SKLEPI .....</b>	<b>49</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>PRILOGE.....</b>	<b>56</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Lega prostate v organizmu (3). .....	1
Slika 2: Histološka slika prostate s prikazanimi žlezami in vezivno-mišičnim tkivom (4). .	1
Slika 3: Prikaz delitve prostate na posamezne dele oz. cone. Pogled s strani (levo) in od zgoraj (desno) (7).....	2
Slika 4: Velikost normalne prostate in velikost pri BHP (13).....	4
Slika 5: Prikaz širjenja raka prostate na celični ravni (19). .....	6
Slika 6: Digitalni rektalni pregled (9).....	7
Slika 7: TRUZ – transrektalni ultrazvok (23).....	8
Slika 8: Prikaz nanosa vzorca na NanoDrop 1000 Spectrophotometer (45).....	20
Slika 9: Prikaz komponent, potrebnih za izvedbo KASP reakcije (46).....	22
Slika 10: Mehanizem reakcije KASP za homozigotni primer (47). .....	22
Slika 11: Razporeditev vzorcev na 384-mikrotitrski ploščici (svetlo zeleno: vzorci s prve 96-mikrotitrške ploščice; temno zeleno: vzorci z druge 96-mikrotitrške ploščice; rdeče: negativne kontrole; oranžno: 12 polj za ponovitve vzorcev). .....	25
Slika 12: Prikaz porazdelitve vzorcev v odvisnosti od koncentracije izolirane DNA.....	28
Slika 13: Porazdelitev vzorcev za $A_{260}/A_{280}$ (levo) in $A_{260}/A_{230}$ (desno).....	28
Slika 14: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs80130819: zelena barva za genotip CC, rdeča barva za genotip AC in modra barva za genotip AA.....	30
Slika 15: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs76934034: zelena barva za genotip TT, rdeča barva za genotip CT in modra barva za genotip CC. ....	30
Slika 16: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs115306967: zelena barva za genotip GG, rdeča barva za genotip CG in modra barva za genotip CC.....	30
Slika 17: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs4054823: zelena barva za genotip TT, rdeča barva za genotip CT in modra barva za genotip CC. ....	30
Slika 18: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs1447295: zelena barva za genotip CC, rdeča barva za genotip AC in modra barva za genotip AA.....	30
Slika 19: Grafični prikaz relativnih frekvenc genotipov za rs80130819, rs76934034, rs115306967, rs4054823 in rs1447295. ....	31

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Normalne vrednosti PSA pri belcih v odvisnosti od starosti (17) in orientacijske verjetnosti pojava raka pri posameznih območjih PSA (31).....	11
Preglednica II: Izbrani polimorfizmi, njihove kromosomske lokacije oz. regije ter podatki o najbližje ležečih genih in spremembi nukleotida (20, 40).....	14
Preglednica III: Srednje vrednosti (povprečna vrednost $\pm$ SD) biokemijskih spremenljivk pri vseh preiskovancih .....	17
Preglednica IV: Valovne dolžine emisije in ekscitacije za posamezen fluorofor (48).....	23
Preglednica V: Količina posameznih komponent KASP reakcije.....	24
Preglednica VI: "Touchdown" protokol (49) .....	25
Preglednica VII: Optimizacijski protokol s 3 dodatnimi cikli (50) .....	26
Preglednica VIII: Alela FAM in HEX za posamezen polimorfizem.....	29
Preglednica IX: Osnovne klinične značilnosti vseh preiskovancev, vključenih v raziskavo .....	32
Preglednica X: Rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa .....	32
Preglednica XI: Primerjava povprečnih vrednosti spremenljivk med skupinama RAK in BHP .....	33
Preglednica XII: Prikaz genotipskih in alelnih frekvenc v skupini RAK in BHP za posamezen polimorfizem.....	34
Preglednica XIII: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs80130819 v celotni skupini 99 preiskovancev.....	35
Preglednica XIV: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs76934034 v celotni skupini 99 preiskovancev .....	35
Preglednica XV: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs115306967 v celotni skupini 99 preiskovancev.....	36
Preglednica XVI: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs4054823 v celotni skupini 99 preiskovancev .....	36
Preglednica XVII: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs1447295 v celotni skupini 99 preiskovancev .....	36
Preglednica XVIII: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs80130819.....	37

Preglednica XIX: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs76934034.....	37
Preglednica XX: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs115306967.....	38
Preglednica XXI: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs4054823.....	38
Preglednica XXII: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs1447295.....	39
Preglednica XXIII: Prikaz porazdelitve genotipskih frekvenc v naši preiskovani skupini in splošni evropski populaciji za vseh 5 polimorfizmov .....	42



## SEZNAM OKRAJŠAV

BHP	benigna hiperplazija prostate
DHT	dihidrotestosteron
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleotid trifosfat
DRP	digitalni rektalni pregled
EtOH	etanol
fPSA	prosti prostatno specifični antigen (angl. <i>free PSA</i> )
GWA	vsegenomske povezave (angl. <i>Genome wide association</i> )
HGPIN	prostatična intraepitelijska neoplazija visoke stopnje (angl. <i>High grade prostatic intraepithelial neoplasia</i> )
IPSS	mednarodni vprašalnik o simptomih prostate (angl. <i>International prostate symptom score</i> )
KASP	kompetitivna alelna-specifična PCR reakcija (angl. <i>Kbioscience competitive allele-specific PCR</i> )
kDa	kilodalton
LH-RH	luteinizirajoči hormon-sproščujoči hormon (angl. <i>Luteinizing hormone-releasing hormone</i> )
LUTS	simptomi spodnjega urinarnega trakta (angl. <i>Lower urinary tract symptoms</i> )
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. <i>Polymerase chain reaction</i> )
PHI	prostatični indeks (angl. <i>Prostate Health Index</i> )
proPSA	prostatno specifični proantigen
PSA	prostatno specifični antigen
PSAD	gostota PSA (angl. <i>PSA Density</i> )
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida (angl. <i>Single nucleotide polymorphism</i> )
TO	tumorski označevalec
tPSA	totalni (skupni) PSA (angl. <i>total PSA</i> )
TRUZ	transrektalni ultrazvok

## POVZETEK

Tumorski označevalec prostatno specifični antigen (PSA) ni dovolj specifičen in občutljiv za ločevanje benignih in malignih obolenj prostate, predvsem pri bolnikih s PSA vrednostmi med 2,7 in 10,0 µg/L. Mnogokrat dobimo v tem območju lažno pozitivne oz. negativne rezultate, zaradi katerih morajo na bolnikih opraviti neprijetne diagnostične posege. Posamezniki z omenjenimi PSA vrednostmi zato predstavljajo skupino, ki potrebuje dodaten način razlikovanja med bolniki z benigno hiperplazijo prostate (BHP) in rakom prostate. Na podlagi objavljenih genetskih študij smo izbrali pet pogosto omenjenih enonukleotidnih polimorfizmov, povezanih z rakom prostate: rs80130819, rs76934034, rs115306967, rs4054823 in rs1447295. Želeli smo ugotoviti pogostost izbranih polimorfizmov v slovenski populaciji in ovrednotiti vpliv prisotnosti polimorfizmov na koncentracije PSA, fPSA, proPSA, PHI, %fPSA in %proPSA pri posameznikih z benignim oz. malignim obolenjem. V ta namen smo zbrali vzorce slin 119 preiskovancev, iz katerih smo izolirali DNA. Količino in kakovost izolirane DNA smo spektrofotometrično ovrednotili in za določitev genotipov pri vseh petih polimorfizmih uporabili genotipizacijsko metodo KASP. Dokazali smo, da je slina primeren vzorec za izolacijo DNA in jo lahko v prihodnje uporabljamo v ta namen. Genotipske frekvence so pri vseh preiskovanih polimorfizmih v slovenski populaciji sledile Hardy-Weinbergovem ravnotežju in niso odstopale od frekvenc v drugih evropskih populacijah. Ugotovili smo, da so imeli pacienti z rakom prostate značilno višje vrednosti PSA ( $P = 0,003$ ), proPSA ( $P = 0,003$ ), PHI ( $P = 0,000$ ) in %proPSA ( $P = 0,014$ ). Pogostosti posameznih alelov so bile primerljive v obeh skupinah za vseh pet polimorfizmov. Dokazali smo, da imajo pri polimorfizmu rs80130819 rakavi bolniki z alelom A višje vrednosti proPSA ( $P = 0,029$ ), bolniki z BHP in alelom C pa višje vrednosti fPSA ( $P = 0,027$ ). Prisotnost alela T je bila pri polimorfizmu rs76934034 povezana z višjimi vrednostmi PHI ( $P = 0,033$ ) in %proPSA ( $P = 0,027$ ) v skupini bolnikov z rakom prostate, ne pa tudi v skupini BHP. Pri polimorfizmih rs115306967 in rs4054823 nismo ugotovili nobene povezanosti s parametri PSA. Ugotovili smo, da imajo pri polimorfizmu rs1447295 pacienti BHP z alelom C višje vrednosti proPSA v primerjavi s pacienti z alelom A ( $P = 0,034$ ). V prihodnosti bi bilo potrebno izvesti raziskavo na večjem številu preiskovancev s širšim območjem koncentracije PSA ter z oceno sočasnega vpliva več polimorfizmov hkrati.

**Ključne besede:** rak prostate, benigna hiperplazija prostate, polimorfizem

## ABSTRACT

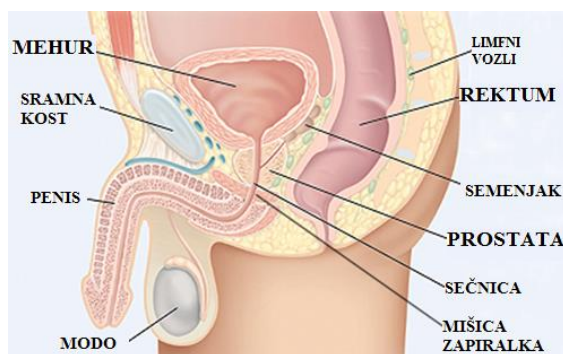
Prostate specific antigen (PSA) tumor marker is neither specific enough nor sensitive to distinguish benign from malignant prostate disease, especially in patients with PSA values between 2,7 and 10,0 µg/L. Therefore, patients are often diagnosed false positive or negative leading to uncomfortable diagnostic procedures. That is why individuals with PSA values in mentioned interval represent a group that needs additional way of distinguishing between benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostate cancer. Based on published genetic studies, we selected five frequently mentioned single nucleotide polymorphisms associated with prostate cancer: rs80130819, rs76934034, rs115306967, rs4054823 and rs1447295. We wanted to determine the frequency of polymorphisms in Slovenian population and to evaluate the impact of the presence of selected polymorphisms on PSA, fPSA, proPSA, PHI, %fPSA and %proPSA in individuals with benign or malignant disease. Therefore we collected saliva samples from 119 individuals to isolate the DNA. The amount and quality of isolated DNA was spectrophotometrically evaluated. For determining the genotype of all five polymorphisms we used the KASP genotyping method. We proved that saliva presents a suitable sample for the isolation of DNA and may be applied to genetic testing in the future. Genotype frequencies of all the investigated polymorphisms followed the Hardy-Weinberg equilibrium and the frequencies did not deviate from the other European populations. We found that prostate cancer patients had significantly higher PSA ( $P = 0,003$ ), proPSA ( $P = 0,003$ ), PHI ( $P = 0,000$ ) and %proPSA ( $P = 0,014$ ) levels. Allele frequencies were comparable in both groups for all five polymorphisms. We proved that the polymorphism rs80130819 allele A in prostate cancer patients causes higher values of proPSA ( $P = 0,029$ ) and that allele C causes higher fPSA ( $P = 0,027$ ) values in BPH patients. The presence of rs76934034 allele T was significantly associated with higher levels of PHI ( $P = 0,033$ ) and %proPSA ( $P = 0,027$ ) in prostate cancer patients, but not in patients with BPH. In rs115306967 in rs4054823 polymorphisms we found no association to PSA parameters neither in cancer nor in BPH group. We have found that BPH patients with the rs1447295 C allele had higher proPSA values compared to BPH patients with the A allele ( $P = 0,034$ ). In the future, it would be necessary to carry out a study on a larger number of subjects with a wider range of PSA concentrations as well as assessing the impact of more polymorphisms simultaneously.

**Key words:** prostate cancer, benign prostatic hyperplasia, polymorphism

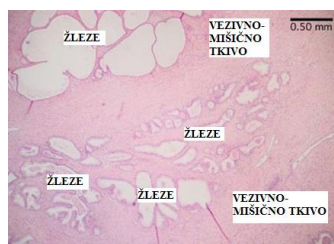
# 1 UVOD

## 1.1 OPIS PROSTATE

Prostata je del moškega razmnoževalnega sistema, ki leži pod mehurjem in pred rektumom, ter hkrati obkroža začetni del sečnice (slika 1). Skupaj z mehurjem in sečnico sestavlja spodnji del moškega urinarnega trakta. Zdrava prostata ima velikost in obliko oreha. Je ovalne oblike in normalno meri več v širino kot dolžino. Po velikosti in obliki jo največkrat primerjajo s kostanjem. Najdaljši premer celotne žleze znaša okoli 4 cm, v dolžino pa meri med 2,5 in 4 cm. Tehta okoli 20 g in sodeluje pri sintezi skoraj tretjine celotnega volumna semenske tekočine. Sečnica med svojo potjo od mehurja do konca penisa, prečka prostato po njeni celotni dolžini. Prostata je zgrajena iz vezivno-mišičnega (30 %) in žleznega (70 %) tkiva (slika 2) (1, 2).



Slika 1: Lega prostate v organizmu (3).



Slika 2: Histološka slika prostate s prikazanimi žlezami in vezivno-mišičnim tkivom (4).

Prostata iz svojih žleznih celic izloča prostatično tekočino. Ta je sestavni del semenske tekočine, ki pomaga pri ohranjanju gibljivosti in vitalnosti semenčic (5). Prostatična tekočina je bele barve, rahlo kislja (pH 6,8) in je sestavljena iz večjih količin cinka, kalcija, citronske kisline, fosfatov ter ostalih sestavin. Največja koncentracija cinka v moškem telesu se nahaja ravno v prostati. Cink nudi antibakterijsko zaščito, citronska kislina pomaga uravnati pH semenske tekočine in preprečuje koagulacijo krvi, ko se vanjo

izločijo prostatni izločki (6). Prostatična tekočina vsebuje vsaj 57 različnih beljakovin, vendar se vse ne nahajajo v serumu. Glavne so prostatična kislina fosfataza, prostatični specifični antigen in prostatični vezavni antigen. Od pubertete do približno 40. leta življenja poteka v prostati tudi pretvorba testosterona v aktivno obliko dihidrotestosteron (DHT) ob prisotnosti encima  $5\alpha$ -reduktaze. DHT je dva- do desetkrat močnejši in nujno potreben za razvoj moških spolnih znakov (5).

Po McNealu lahko prostato razdelimo na 3 glavne dele oz. cone (slika 3). To so tranzicijska, centralna in periferna cona.

- Tranzicijska oz. prehodna cona predstavlja 5–10 % celotne prostate in obkroža distalno polovico prostatne sečnice. Prostatna sečnica predstavlja dolžino 2,5–4 cm celotne sečnice (uretre), ki jo obkroža prostata. Benigna hiperplazija prostate se navadno pojavi v tem delu in lahko povzroči obstrukcijo prostatne sečnice s posledičnimi težavami prehoda urina.
- Centralna cona sestavlja 25 % žleze in ima značilno piramidasto obliko. Njeno področje sega od baze mehurja ter okoli sečnice. Skozi to cono vstopata ejakulatorna voda.
- Periferna cona obsega preostali del prostate v zadnjem in stranskih predelih žleze. V tej coni se pojavlja večina (70 %) raka prostate. Prav tako je ta cona najbolj dosegljiva pri digitalnem rektalnem pregledu (2).

Sprednji, vezivno-mišični del obsega preplet gladkih mišic z vlakni mišice mehurja – detruzorja. Celotna prostata je ovita v ovojnico, ki preprečuje širjenje žleze v okolico. To posledično pomeni, da se pri povečanju prostate pritisk najbolj prenese na sečnico (5).



Slika 3: Prikaz delitve prostate na posamezne dele oz. cone. Pogled s strani (levo) in od zgoraj (desno) (7).

## 1.2 BOLEZNI PROSTATE

### 1.2.1 PROSTATITIS

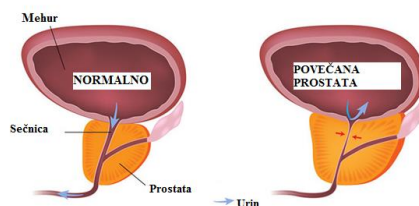
Prostatitis predstavlja najpogostejši urološki problem pri moških, starih pod 50 let, in tretjo najpogostejšo urološko diagnozo pri moških, starih več kot 50 let (6). Prizadene 10–14 % moških vseh starosti in etničnih pripadnosti ter predstavlja poglavitni razlog obiska pri zdravniku (8). Prostatitis pomeni vnetje prostate, ki je lahko posledica bakterijske okužbe, lahko pa se pojavi tudi neodvisno od nje. Simptomi vključujejo oviran prehod urina, pekočo bolečino ob uriniranju, pogosto uriniranje majhne količine urina, vročino, bolečine v spodnjem predelu hrbta, trebuha, dimelj ali v predelu za modi, bolečo ejakulacijo, rektalni pritisk oz. bolečino, kljuvajočo genitalno bolečino, težave s spolnostjo in drugo (9). Nacionalni inštitut za diabetes, prebavna in ledvična obolenja (angl. *The National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases*) deli prostatitis na 4 sledeče kategorije (6).

- Kategorija I: Akutni bakterijski prostatitis – ta oblika se pojavi nenadno in je posledica bakterijske okužbe. Pogosto se poleg nekaterih zgoraj omenjenih simptomov pojavi kri v urinu, povišajo se tudi vrednosti PSA. Je najredkejša od 4 oblik, a najlažja za diagnosticiranje ter zdravljenje (9).
- Kategorija II: Kronični bakterijski prostatitis – prav tako kot akutnega ga povzroči bakterija, vendar se ta oblika ne pojavi nenadno. Lahko je izredno moteča, saj se pojavlja v obliki ponavljajočih se okužb mehurja skozi daljše časovno obdobje (9).
- Kategorija III: Sindrom kronične pelvične bolečine – ta oblika je najpogostejša in se lahko pojavi že pri 18. letu. Značilne so kronične bolečine v medeničnem predelu, ki trajajo vsaj 3 mesece (6). Simptomi se lahko izmenično pojavljajo in izginjajo brez opozorila. Pri tej obliki do sedaj ni zaznane bakterijske prisotnosti (9).
- Kategorija IV: Asimptomatski prostatitis – bolniki s to obliko nimajo prisotnega nobenega simptoma prostatitisa. Pogosto se takšna oblika diagnosticira naključno pri drugih stanjih, npr. pri preiskavi zaradi neplodnosti ali pri pregledu za raka prostate. Prav tako so pri tej obliki lahko povečane vrednosti PSA (9).

Za diagnosticiranje prostatitisa najpogosteje odvzamemo vzorec urina, lahko pa opravimo tudi digitalni rektalni pregled (9). Pri zdravljenju najpogosteje uporabljamo antibiotike za krajše ali daljše časovno obdobje, protivnetne in protibolečinske zdravilne učinkovine,  $\alpha$ -blokatorje, antimuskarinike in tudi tople kopeli (10).

## 1.2.2 BENIGNA HIPERPLAZIJA PROSTATE

Benigna hiperplazija prostate (BHP) je kronično bolezensko stanje, za katerega je značilno povečanje tako stromalnih kot tudi žleznihi celic, kar vodi v povečanje celotne prostate. Kot pove že samo ime bolezni, se pri BHP poveča število celic prostate, ne pa tudi njihova velikost. Vzrok tega dogajanja še ni povsem pojasnjen, a je verjetno, da gre za povečano celično proliferacijo in/ali zmanjšano celično smrt. Ta dva procesa sta pod vplivom androgenov, estrogenov, rastnih dejavnikov ter vnetnih in avtoimunih mediatorjev. Ker se BHP pojavi v tranzicijski coni, posledično prihaja do kompresije prostatne sečnice (slika 4) in pojava simptomov spodnjega urinarnega trakta (angl. *LUTS – Lower Urinary Tract Symptoms*) (11). Vsi simptomi spodnjega urinarnega trakta niso nujno povezani s pojavom BHP, temveč so lahko tudi posledica s staranjem povezane disfunkcije gladkih mišic mehurja in/ali ostalih pridruženih (nevroloških) bolezni (depresija, anksioznost, metabolični sindrom, srčna obolenja, astma, artritis, družinska prisotnost bolezni prostate) (3, 12).



Slika 4: Velikost normalne prostate in velikost pri BHP (13).

BHP je ena izmed najpogostejših uroloških bolezni pri moških. Po navadi se začne razvijati pri moških po 40. letu starosti in je v 50 % prisotna pri starosti 60 let ter približno v 90 % pri moških, starih 85 let (14). Pri starosti 20 let je velikost prostate podobna velikosti oreha, pri 40. letih jo lahko primerjamo z marelico, do 60. leta lahko zraste tudi do velikosti limone. BHP ne poveča tveganja za razvoj raka prostate, kljub temu da so si simptomi obeh med seboj zelo podobni (9). Za BHP veljata visoka stopnja boleznosti in nizka stopnja smrtnosti (14). Simptomi BHP vključujejo upočasnjeno in tanek curek urina, ki je lahko razpršen, prekinjajoč ali se izloča le po kapljicah, pogosto dnevno in nočno uriniranje, nenadna nuja po praznjenju mehurja z zelo majhno količino izločene vsebine, nehoteno izločanje urina, občutek nepopolne izpraznjenosti mehurja. Velja tudi, da predhodno omenjeni simptomi niso povezani v velikostjo prostate. Če bolezni ne zdravimo, se prostata povečuje, kar lahko vodi v kronično zastajanje seča v mehurju,

uhajanja seča, erektilne disfunkcije, akutne zapore seča in v končni fazi do postopne ledvične odpovedi. Pojavijo se lahko tudi sečni kamni, okužbe in divertikli (5).

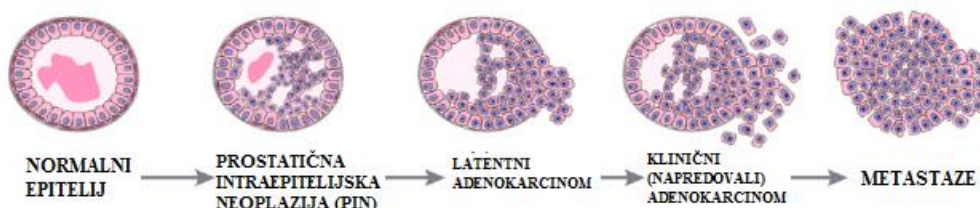
Pri diagnosticiranju BHP zdravnik opravi anamnezo, pri čemer si pomaga z mednarodnim vprašalnikom o simptomih prostate (IPSS), s katerim lahko oceni, ali gre za blage, zmerne ali hude težave. Zdravnik opravi tudi digitalni rektalni pregled. V laboratoriju opravijo urinsko analizo, ultrazvok sečil, meritev PSA ter serumskega kreatinina. Bolnik si zapisuje tudi svoj dnevnik uriniranja. Najblažjo obliko BHP lahko zdravimo samo z uvedbo zdravega življenjskega sloga in natančnega opazovanja ter rednih obiskov pri zdravniku, ki spremlja vrednosti PSA. Najpogosteje predpišejo zdravila, ki pomagajo odpravljati simptome bolezni ter zmanjševati velikost prostate (20–30 % v 3–6 mesecih) (15). To so  $\alpha$ -blokatorji, zaviralci 5 $\alpha$ -reduktaze in njune kombinacije ter zaviralci fosfodiesteraze tipa 5 (11). Poleg naštetega pogosto uporabljamo tudi rastlinske pripravke iz semen navadne buče, korenine koprive, plodu palmeta, južnoafriške zvezdaste trave in različne kombinacije. Če nobeden od zgoraj omenjenih načinov zdravljenja ne pomaga, opravimo tudi različne kirurške posege, med katerimi je najpogostejša transuretralna resekcija prostate, ki ima kljub večletnemu izvajanju še vedno možne zaplete, ki za bolnika nikakor niso prijetne (krvavitve, zapora seča zaradi strdkov, okužbe ...) (5). Za BHP velja, da ne ogroža človeškega življenja, saj se ne širi drugod po telesu. Prizadeto prostatno tkivo se lahko odstrani in navadno ne zraste več nazaj (1).

### **1.2.3 RAK PROSTATE**

Podatki za Slovenijo med letoma 2007 in 2011 pričajo, da rak prostate z 19,5 % zavzema vodilni položaj med vrstami raka v moški populaciji. V tem obdobju je na novo zbolelo 1319 moških, zabeleženih pa je bilo 362 smrti na leto (16). Tudi v večini držav po svetu velja, da se rak prostate pojavi pri 1 od 6 moških in je drugi najpogostejši vzrok smrti med moškimi z rakom (17).

Rak se pojavi, ko je celična delitev prisotna mnogo bolj kot celična smrt, kar vodi v nenadzorovano rast tumorja. Več kot 95 % primerov raka prostate je adenokarcinomov, ki izvirajo iz žleznih celic epitelija. Izmed omenjenih primerov se jih 70 % nahaja v periferni, 15–20 % v centralni in 10–15 % v tranzicijski coni prostate. Če bolezni ne zdravimo in rakavo tkivo raste, lahko tumorske celice metastazirajo skozi limfatični sistem in krvni obtok v ostala tkiva oz. organe. Pogosto se pojavijo metastaze (slika 5) v kosteh (18).





Slika 5: Prikaz širjenja raka prostate na celični ravni (19).

Za razliko od ostalih vrst raka rak prostate raste počasi in včasih se zgodi, da se simptomi nikoli ne pojavijo oz. rak nikoli ne predstavlja resne nevarnosti za zdravje posameznika. Celične spremembe se lahko začnejo že 10, 20 ali 30 let preden tumor zraste do mejne velikosti, ki spodbudi pojav simptomov. Ko se simptomi enkrat pojavijo, zelo spominjajo na BHP, saj se pri obeh boleznih pojavljajo podobne težave. Tako tudi pri raku prostate opazimo težave pri uriniranju, pogosto (nočno) uriniranje, šibek oz. prekinjajoč curek urina, kri v urinu ali spermi, bolečo ejakulacijo, kljuvajočo bolečino v spodnjem delu hrbta, bokih, medenici ali kosteh (9).

### 1.2.3.1 DEJAVNIKI TVEGANJA

- *Starost*

Starost je najpomembnejši dejavnik tveganja. Rak se zelo redko pojavi pri moških, mlajših od 40 let, vendar pojavnost hitro narašča z vsakim naslednjim desetletjem. Verjetnost, da bo moški diagnosticiran z rakom prostate pri 49. letih, je 1 od 304, pri 59. letih 1 od 44, pri 69. letih 1 od 16 in 1 od 9 pri starosti 70 let in več (20).

- *Etnična pripadnost*

Pomemben dejavnik predstavlja tudi pripadnost določeni etnični skupini oz. rasi. Največje tveganje za razvoj raka prostate imajo predstavniki črne rase, in sicer za 60 % večje od pripadnikov bele rase. Najnižje tveganje je prisotno med predstavniki avtohtonih Japoncev. Te razlike so lahko odraz genetskih, okoljskih ali socialnih vplivov. Med slednje spada tudi različna dostopnost posameznika do zdravstvenega sistema (20).

- *Družinska preteklost*

Tveganje za razvoj raka prostate je od 2- do 3-krat višje pri moškemu, čigar oče ali brat je imel/ima bolezen. Tveganje je približno 10-krat višje pri moškemu, ki ima 3 bližnje družinske člane z rakom prostate. Mlajši kot je moški, ko zboli za rakom, večje je tveganje

za pojav bolezni pri njegovih družinskih članih. Prav tako se smatra, da je tveganje malo višje pri moškemu, čigar mati ali sestra je imela/ima raka dojke (9).

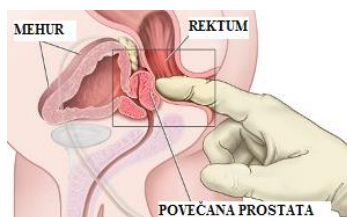
- *Ostali potencialni dejavniki tveganja*

Sem spadajo nezdrave prehranjevalne navade (premalo zelenjave in sadja ter nenasičenih maščob), pomanjkanje vitaminov D in E, nevarni okoljski dejavniki, delo v gumarski industriji, kajenje, vazektomija, prenizka fizična aktivnost, spremenjen androgeni metabolizem, pridružene bolezni (debelost, sladkorna bolezen, metabolični sindrom), oksidativni stres in drugi (17).

### 1.2.3.2 DIAGNOSTIKA RAKA PROSTATE

Potem, ko zdravnik opravi anamnezo, se poleg morebitnega odvzema vzorca urina, pri diagnostiki raka prostate najpogosteje izvajajo sledeči 3 tipi testov.

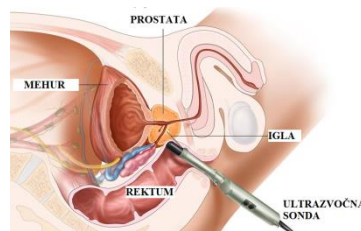
- *Digitalni rektalni pregled (DRP)* je standardni postopek pregleda prostate, pri katerem zdravnik z rokavico, na katero je nanesen lubrikant, otipa prostato skozi področje rektuma (slika 6). Zdravnik med postopkom preveri velikost in čvrstost žleze, prisotnost zatrdlin ali oteklina ter bolečin zaradi dotikanja in pritiskanja prostate. Celoten test traja 10–15 sekund. Na tak način lahko zdravnik otipa le eno, tj. periferno stran prostate (9). Za DRP velja, da ima 59 % stopnjo točnosti. Pogosto se s tem postopkom diagnosticira rak, kljub temu da preostali rutinski testi tega ne pokažejo. DRP je relativno poceni test, ki omogoča tudi diagnostiko BHP, vendar pogosto velja za subjektivnega (18).



Slika 6: Digitalni rektalni pregled (9).

- *Test PSA* nam je v pomoč pri merjenju serumskih vrednosti prostatno specifičnega antigena (PSA). PSA je protein, ki nastaja samo v prostati. Večje kot so izmerjene vrednosti PSA, večja je verjetnost pojava raka prostate (21). PSA ima visoko občutljivost in nizko specifičnost, saj lahko povišane vrednosti povzroči tudi drugo patološko stanje, kot npr. BHP in prostatitis. Vse skupaj lahko zato velikokrat vodi v lažno pozitivne rezultate, kar bistveno poviša stroške zdravljenja in bolnike sili v neprijetne invazivne postopke. PSA uporabljamo tudi za spremljanje bolnikov po začetku zdravljenja (18). Podrobnosti PSA in testa PSA so opisane v poglavju 1.3.1.

- *TRUZ – transrektalni ultrazvok* s sledečo biopsijo je invaziven postopek, ki ga izvaja specialist urolog. Pri postopku v rektum vstavimo posebno sondo, ki omogoča vpogled v prostato in tudi odvzem vzorcev (slika 7) (22). Zdravniki največkrat uporabljajo vrednost PSA 4 ng/mL kot mejno vrednost, pri kateri posameznika pošljejo na biopsijo. Za potrebe biopsije s pomočjo igle odvzamemo vzorce tkiva na več delih prostate. Diagnozo raka potrdimo šele po natančnem pregledu odvzetega tkiva pod mikroskopom (9). Postopek je zmerno boleč in ga izvajamo pri lokalni anesteziji, vendar zaradi invazivnosti uvedemo antibiotično zaščito še pet dni po posegu (22). Prav tako kot PSA ima tudi TRUZ (brez biopsije) slabo specifičnost in visoko občutljivost (18).



Slika 7: TRUZ – transrektalni ultrazvok (23).

### 1.2.3.3 GLEASONOVA LESTVICA IN STADIJI RAKA PROSTATE

Če je histološki pregled vzorcev, odvzetih pri biopsiji prostate, pozitiven, pomeni, da so celice rakave. Na podlagi histološkega pregleda nato izračunamo vrednost, določeno po Gleasonovi lestvici (9). Lestvica vsebuje številčne vrednosti (ocene) od 1 do 5, kjer vsaka ocena ustreza določeni porazdelitvi celic, ki so vidne ob histološkem pregledu. Vrednosti od 1 do 3 predstavljajo tumor, ki v največji meri vsebuje normalne prostatne žleze, medtem ko vrednosti 4 in 5 nakazujejo na močno nepravilnost žlezne arhitekture (24). Oceno podamo na podlagi dveh najbolj reprezentativnih vzorcev, ki jima pripada ena ocena od 1 do 5. Končna Gleasonova vrednost predstavlja vsoto obeh ocen, ki tako znaša najmanj 2 in največ 10. Nižje kot je število, manjša je možnost, da je rak agresiven in da bi se lahko razširil po telesu (25). Za določanje stadija raka prostate uporabljamo sistem TNM (angl. *Tumor Node Metastasis*), ki temelji na podlagi rezultatov testa PSA, DRP, biopsije in Gleasonove vrednosti. Na podlagi vseh zbranih rezultatov rak prostate delimo na 4 stadije, kjer stadij 1 predstavlja zelo nizko in stadij 4 zelo visoko tveganje za smrt (26).

### 1.2.3.4 ZDRAVLJENJE RAKA PROSTATE

Zdravljenje raka prostate vključuje več različnih možnosti. Izbira ene ali več izmed njih je odvisna od posameznikove starosti, Gleasonove vrednosti, stadija raka, izraženih

simptomov in splošne zdravstvene slike. Ni nujno, da bodo določene oblike zdravljenja pomagale posamezniku v enako izraženi meri kot pri ostalih, zato je tudi včasih težavno najti pravo vrsto za vsakogar. Pri zdravljenju se zdravnik in pacient odločata med možnostmi rednega in aktivnega opazovanja bolnika, številnimi operacijskimi posegi, radiacijsko terapijo, hormonsko terapijo, kemoterapijo ali imunoterapijo (1).

Z uporabo hormonske terapije zmanjšamo količino moških spolnih hormonov oz. preprečimo njihovo delovanje. Hormonska terapije vključuje: agoniste LH-RH (leuprolid, goserelin, buserelin), antiandrogene (flutamid, bicalutamid, enzalutamid, nilutamid), zdravila, ki preprečujejo sintezo androgenov (ketokonazol, aminoglutetimid), kirurško odstranitev testisov in (redko) estrogene (23).

Imunoterapija oz. biološka terapija izkorišča posameznikov imunski sistem v boju proti rakavim celicam. Primer takšnega zdravila oz. cepiva je sipuleucel-T. Za izdelavo tega cepiva pacientu z rakom prostate odvzamejo imunske celice, na katere pripnejo posebej sintetiziran protein, ki omogoča aktivacijo T-celic in razkroj rakavih celic, potem ko preoblikovane celice pacientovega imunskega sistema ponovno aplicirajo v sistemski krvni obtok z infuzijo (23).

### **1.3 TUMORSKI OZNAČEVALCI**

Tumorski označevalci (TO) so snovi, ki jih proizvajajo rakave in ostale celice kot odgovor na maligno ali benigno stanje v telesu. Najvišjo koncentracijo po navadi določimo pri rakavih stanjih. TO najdemo v krvi, urinu, blatu, tumorskemu tkivu in drugih telesnih tekočinah. Uporabljamo jih pri diagnosticiranju in spremljanju določenih vrst raka (27). TO so večinoma proteini, a jih poznamo tudi kot hormone, encime, produkte onkogenov, membranske antigene, produkte genov tumorskih supresorjev, poliamine, nukleozide in določene DNA podatke. TO so lahko na novo sintetizirane snovi, ki normalno niso prisotne v telesu, lahko pa najdemo samo nenormalno povišane koncentracije telesu lastnih snovi. Idealni TO naj bi bil specifičen za določen organ in vrsto raka, vzorčenje malo ali celo neinvazivno, določljiv pri vseh bolnikih z istim tipom tumorja ter visoko občutljiv. Njegove koncentracije naj bi odražale dinamiko tumorske rasti, ne nazadnje velja tudi ekonomsko sprejemljiv vidik (28). TO nikoli ne uporabljamo kot samostojno metodo pri postavljanju diagnoze, temveč vedno v kombinaciji z ostalimi metodami. Mnogokrat se namreč zgodi, da ima posameznik maligno obolenje kljub nizkim koncentracijam TO in obratno (27). To je odraz nezadostne specifičnosti in velike možnosti pojavljanja lažno

pozitivnih/negativnih rezultatov. TO se v velikih koncentracijah sintetizirajo tudi pri različnih vnetjih, benignih tumorjih, boleznih jeter in trebušne slinavke, nosečnosti, menstruaciji, laktaciji ... Prav tako lahko najdemo povišane koncentracije TO v povsem zdravih tkivih.

Večina analiznih metod za določanje TO je imunokemijskih (28). Trenutno je v klinični rabi več kot 20 različnih TO, bolj ali manj diagnostično specifičnih. Tako so torej določeni TO povezani samo z eno, drugi pa z dvema ali več tipi tumorja. Univerzalnega TO, ki bi prepoznal katero koli obliko tumorja, zaenkrat še ni. Nove raziskave temeljijo predvsem na genetski ravni, in sicer na področju izražanja genov in sprememb v verigi DNA (27). Danes v klinični praksi za spoznavanje in vodenje raka prostate najpogosteje izvajamo meritve dveh TO, in sicer prostatične kisle fosfataze in PSA. Pri raku prostate so lahko povišane vrednosti tudi nekaterih ostalih TO, kot npr. alkalne fosfataze, CA15-3 – karcinomskega antigena 15-3, MCA – mucinskega karcinomskega antigena, CA125 – karcinomskega antigena 125 in drugih. Med vsemi TO se je PSA izkazal kot tisti z najvišjo diagnostično občutljivostjo in specifičnostjo za raka prostate (29).

### **1.3.1 PROSTATNO SPECIFIČNI ANTIGEN (PSA)**

PSA je serinska proteaza z molekulsko maso 33 kDa, imenovana tudi kalikrein-3, ki jo izločajo epiteljske celice prostate (30). Genski zapis zanj se nahaja na 19. kromosomu, njegova razpolovna doba traja 2,2–2,3 dneva. Zaradi proteolitične aktivnosti je njegova glavna funkcija preprečevanje koagulacije semenske tekočine. PSA se v žleznih celicah in semenski tekočini nahaja v prosti obliki. Če se celična zgradba žlez zaradi kakršnega koli razloga poruši, PSA prehaja v serum. Tam se PSA nahaja v vezani (60–90 %) in prosti (10–40 %) obliki (28, 30). Vezana oblika pomeni, da je PSA vezan na serumske proteazne zaviralce, kot so  $\alpha_1$ -antikimotripsin,  $\alpha_1$ -proteazni zaviralec,  $\alpha_2$ -makroglobulin in  $\alpha$ -antitripsin (29). S testom PSA izmerimo količino antigena v krvnem vzorcu. Dolgo so za normalne veljale vrednosti PSA do 4,0 ng/mL, v zadnjih letih pa se je zgornja meja spustila na 3,0 ng/mL. Izmerjene vrednosti PSA se lahko močno spreminjajo v odvisnosti od določenih dejavnikov. Povišane so pri BHP, prostatitisu, po biopsiji, infarktu prostate, ejakulaciji, zaradi mehanskih vplivov, pri višji starosti (preglednica I) in uporabi moških hormonov, medtem ko lahko določena zdravila vrednosti PSA tudi znižajo (tiazidni diuretiki, statini, zaviralci 5 $\alpha$ -reduktaze (finasterid zmanjša vrednosti PSA tudi za 50 %)), acetilsalicilna kislina, razni rastlinski pripravki (17). Transrektalna biopsija dvigne PSA za

okoli 7,9 ng/mL (31). Pri zdravih moških je povprečna koncentracija PSA okoli 1,15 ng/mL (29).

Preglednica I: Normalne vrednosti PSA pri belcih v odvisnosti od starosti (17) in orientacijske verjetnosti pojava raka pri posameznih območjih PSA (31)

STAROST (leta)	VREDNOST PSA (ng/mL)	VREDNOST PSA (ng/mL)	VERJETNOST KARCINOMA (%)
40–49	0–2,5	0–2	1
50–59	0–3,5	2–4	15
60–69	0–4,5	4–10	25
70–79	0–6,5	> 10	> 50

Raven PSA v serumu je sorazmerna velikosti tumorja. Vsak mililiter adenoma prostate prispeva k serumski koncentraciji PSA 0,3 ng/mL, medtem ko mililiter karcinoma prostate 3,5 ng/mL, kar je približno desetkrat več. Posledično se vrednosti serumskega PSA pri bolnikih z BHP in tistimi z zgodnjo, ozdravljivo obliko raka bistveno prekrivajo. Problematične so predvsem vrednosti PSA med 2,7 in 10 ng/mL, kjer je specifičnost testa slaba (29).

Za test PSA je značilno, da ne razlikuje med stadiji raka in ne zazna njegove metastatske oblike z zahtevano občutljivostjo in specifičnostjo, ki bi omogočala točne terapevtske odločitve (30). Občutljivost testa PSA znaša med 79 in 82 %, medtem ko je njegova specifičnost slabša, okrog 59 % (31). Od uvedbe presejalnih testov PSA se je povprečna starost bolnikov z rakom prostate znižala s 70–71 na 67 let. Zaradi razširjene uporabe testa PSA se je v zadnjih dveh desetletjih močno povečalo število postavljenih diagnoz raka prostate. Kljub znižanju umrljivosti zaradi raka prostate v zadnjih letih, še vedno ni znano, ali se pojavlja zaradi uporabe PSA testa ali zaradi napredka in učinkovitosti metod zdravljenja. Na žalost dobimo s testom PSA mnogokrat lažno pozitivne rezultate, saj lahko povišane vrednosti PSA povzročijo tudi BHP, prostatitis in ostala obolenja. Prav tako velja tudi, da biopsije zgrešijo med 20 % in 40 % primerov raka, kadar je kot mejna vrednost za biopsijo uporabljena koncentracija PSA 4 ng/mL. Tako dobimo lažno negativne rezultate. Mejna vrednost za biopsijo je 4 ng/mL, čeprav nekateri znanstveniki podpirajo znižanje omenjene meje. To pa vodi v povečano tveganje lažno pozitivnih rezultatov in s tem nepotrebnih biopsij (30). V namene izboljšanja meritev PSA in boljšega razlikovanja med agresivno in neagresivno obliko raka so znanstveniki razvili več različnih izpeljav in metod merjenja (21).

### 1.3.2 DODATNI DIAGNOSTIČNI PARAMETRI IZ PSA

- *Razmerje med prostim in celokupnim PSA ( $fPSA/tPSA = \%fPSA$ )*

Razmerje, višje od 25 %, velja predvsem za BHP, nižje od 25 % pa nakazuje na maligno bolezen (5). Uporaba razmerja napove raka prostate s 95 % občutljivostjo in prepreči 20 % nepotrebnih biopsij (17). Celokupni PSA se nanaša na vsoto vezanega in prostega PSA (30).

- *Gostota PSA (PSAD)*

Gostoto določimo tako, da vrednosti PSA delimo z volumnom prostate, ki ga izmerimo s transrektalnim ultrazvokom (31). Pri vrednostih, višjih od 0,15, sumimo na rak prostate (29).

- *Hitrost PSA in podvojitveni čas PSA*

Hitrost PSA je definirana kot sprememba vrednosti PSA skozi časovno obdobje. Izražamo jo v enoti ng/mL/leto. Podvojitveni čas PSA pomeni obdobje, v katerem se določena vrednost PSA podvoji (21). Raziskave so pokazale, da imajo pacienti z BHP linearen profil naraščanja PSA vrednosti, medtem ko pri rakavih bolnikih vrednosti na začetku enakomerno rastejo, nato pa v obdobju 5 let pred odkritjem bolezni eksponentno narastejo (17). Hitrost 0,75 ng/mL/leto s 95 % specifičnostjo in 72 % občutljivostjo napoveduje raka prostate. Če se vrednosti PSA podvojijo prej kot v dveh letih, je napredovanje bolezni povečano (31).

- *Prostatno specifični proantigen (Pro-PSA)*

ProPSA se nanaša na različne neaktivne prekurzorje prostega PSA. Najpogosteje izvajamo meritve [-2]proPSA oblike, ki jih podajamo v obliki deleža glede na celokupne vrednosti prostega PSA. Vrednosti proPSA so povišane predvsem v rakavih celicah in serumu. Nedavne raziskave so potrdile, da je navedba rezultatov v obliki %[-2]proPSA natančnejša od podatkov o celokupni in/ali prosti obliki PSA pri moških s PSA vrednostmi med 2 in 10 ng/mL. ProPSA navadno podajamo v enotah pg/mL (32).

- *PHI parameter (angl. Prostate Health Index)*

PHI je najnovejša izpeljanka na tem področju, ki se izračuna z uporabo totalnega (tPSA) in prostega PSA (fPSA) ter meritve izoforme [-2]proPSA. Višje vrednosti PHI so povezane z večjo verjetnostjo raka prostate (30). Izračun PHI je prikazan v spodnji enačbi.

$$PHI = \frac{[-2]proPSA}{fPSA} \times \sqrt{tPSA} \quad (\text{enačba 1})$$

### 1.3.3 GENETSKI OZNAČEVALCI

Človeški genom gradi okoli  $3 \times 10^9$  baznih parov in predstavlja osnovo za genetsko raznolikost med posamezniki. Pojem genetska raznolikost obsega vse znane razlike v zaporedju nukleotidov npr. mutacije, polimorfizmi, delecije, inverzije, insercije in translokacije odsekov DNA, ki lahko obsegajo velikosti enega ali več milijonov baznih parov. Naštete genetske različice predstavljajo potencialne nove označevalce, ki nam pomagajo razumeti povezavo med genetsko in fenotipsko raznolikostjo. Sprememba v zaporedju DNA lahko vodi v sintezo poškodovanega proteina in pojav bolezni. Najmanjše izmed genetskih sprememb so zamenjave samo enega baznega para, imenovane SNP (angl. *Single Nucleotide Polymorphism*) ali enonukleotidni polimorfizmi. Izraz polimorfizem uporabljamo takrat, kadar je mutirana oblika gena v populaciji prisotna v več kot 1 %, medtem ko je redkejša pojavnost definirana kot mutacija (33). Izmed vseh sprememb, ki se lahko pojavijo v zaporedju DNA, je pojav SNP v človeškem genomu najštevilčnejši (34) in naj bi se po zadnjih ocenah pojavil na vsakih 100 do 300 baznih parov. Okrog 5 milijonov SNP ima najmanj 10 % alelna frekvenco v populaciji in celo do 11 milijonov 1 % (33). SNP-ji se pojavljajo tako v kodirajočih kot tudi v nekodirajočih regijah genoma. Večino odkritih SNP najdemo v intronskih ali intergenskih območjih. Vse to poraja številna ugotavljanja o molekularnih poteh, ki bi lahko pripeljale do končnega fenotipa (33, 34).

Pri odkrivanju SNP, povezanih z določeno boleznijo, nam pomagajo študije, ki se izvajajo na celotnem genomu. To so t. i. študije GWA (angl. *Genome Wide Association*), ki uspešno identificirajo dovezetne alele za številne kompleksne bolezni, med drugim tudi raka prostate. V študijah GWA so rezultati prikazani v obliki primerjave alelnih frekvenc med bolniki ter kontrolnimi primeri. Prav tako se študija izvaja na velikem številu vzorcev (po več deset tisoč primerov) (20). Prelomnica v razvoju GWA študij je bil mednarodni projekt HapMap, katerega glavni namen je bil izluščiti le najpomembnejše, klinično pomembne SNP oz. tiste, ki so na več načinov povezani z določenimi bolezenskimi fenotipi. V ta namen so izkoristili lastnost vezanega dedovanja, ki pravi, da se tisti SNP, ki se na kromosomih nahajajo blizu skupaj, tudi dedujejo skupaj. Takšne segmente imenujemo haplotipi. Takšen pristop je zmanjšal število SNP z 10 milijonov običajnih na 300 – 600 000 označevalnih ali »tag« SNP (33). Študije GWA so odkrile več kot 90 SNP (s prisotnostjo manj pogostejšega alela 5 % ali več), ki so bolj ali manj povezani s tveganjem raka prostate. Nekateri SNP so lahko značilni samo za indolentno obliko raka, drugi samo za agresivno, lahko pa se zgodi, da se določeni pojavljajo pri kateri koli obliki raka



prostata. Odkriti SNP v kombinaciji z ostalimi označevalci pojasnjujejo približno tretjino podedovanega tveganja za raka. Študije GWA so zato izrednega pomena, saj nam poiščejo lokuse, bistvene za nadaljnje raziskave. Glavna prednost genetskih označevalcev je ta, da so dostopni v katerem koli časovnem obdobju in da se njihova koncentracija ne spreminja s časom (35).

V eni izmed raziskav so ugotovili, da je relativno tveganje raka prostate na podlagi prisotnosti enega samega SNP nizko ( $< 1,5$ -krat). Vendar se tveganje močno poveča, če ima posameznik prisotnih več SNP, ki so povezani z isto boleznijo (36). Januarja 2014 objavljena študija GWA je razkrila 77 najpomembnejših lokusov, povezanih s pojavom raka prostate pri evropskih populaciji (37). Tej se je oktobra istega leta priključila objavljena meta analiza, ki je število lokusov zaokrožila na 100 (38).

Pri skoraj vseh odkritih lokacijah velja, da se nahajajo v nekodirajočih regijah genoma, zato ostajajo biološki mehanizmi za dovzetnost boleznijo nejasni. Kljub temu se pojavljajo številne hipoteze, ki bi lahko vsaj deloma povezale lokacijo tveganega alela s fenotipom. Najpogosteje zastopana hipoteza pravi, da se tvegani aleli nahajajo znotraj nadzornih delov genoma in da genotipi na teh področjih na daljavo vplivajo na aktivnost oddaljenih genov. V študijah so do sedaj največkrat preučevali onkogen c-MYC in povezavo z regijo 8q24. Ena izmed možnih razlag vključuje dejstvo, da je kromatinska konfiguracija oblikovana v takšni meri, da se področje 8q24 nahaja v neposredni bližini c-MYC, kljub temu da sta regiji v linearnem merilu med seboj precej oddaljeni (20). Prav tako naj bi povečana aktivnost gena MYC v rakavih prostatičnih celicah povzročila androgensko neodvisno rast žleze (39). Spodnja preglednica prikazuje izbrane SNP, njihove kromosomske lokacije ter podatke o regiji in najbližje ležečem genu.

Preglednica II: Izbrani polimorfizmi, njihove kromosomske lokacije oz. regije ter podatki o najbližje ležečih genih in spremembi nukleotida (20, 40)

SNP	KROMOSOMSKA LOKACIJA	REGIJA	NAJBLIŽJI GEN	NUKLEOTIDNA ZAMENJAVA
rs80130819	12q13	intergenska	RP1-228P16.4	A>C
rs76934034	10q11	intronska	MARCH8	T>C
rs115306967	6p21	intergenska	HLA-DRB6	G>C
rs4054823	17p12	intergenska	HS3ST3A1	T>C
rs1447295	8q24	intergenska	c-MYC	A>C

Produkt gena HS3ST3A1 je biosintetični encim za heparan sulfat, ki sodeluje kot koreceptor številnih rastnih dejavnikov (41), gen MARCH8 vpliva na potek signalnih poti vezikularnega transporta med membranskimi predeli. Gen HLA-DRB6 omogoča sintezo molekul poglavitnega kompleksa tkivne skladnosti, ki sodelujejo v imunskem odgovoru. Poleg gena HLA-DRB6 je tudi RP1-228P16.4 psevdogen, za katere velja, da je njihova funkcija v genomu do danes zelo malo raziskana (40, 41).

Izmed 100 objavljenih lokusov smo jih v našo raziskavo vključili 5, ki so bolj ali manj povezani z rakom prostate. Najpogosteje se v študijah pojavlja SNP rs1447295, za katerega je značilno, da je alel A povezan s povečanim tveganjem raka prostate v različnih etničnih populacijah (42). V študiji, ki je bila izvedena na Japoncih, so ugotovili značilno povezavo med omenjenim SNP in agresivno obliko raka prostate (39). SNP rs4054823 oz. alel T naj bi bil prav tako povezan z agresivnejšo obliko raka prostate. Znanstveniki so študijo izvedli na skupini z agresivno obliko raka prostate, ki so jo primerjali s skupino, ki je imela manj agresivno obliko raka (41). Tudi preostali SNP rs115306967 (tvegani alel G), rs76934034 (tvegani alel T) in rs80130819 (tvegani alel A) so bili v številnih študijah GWA odkriti kot tisti, ki vplivajo na pojav raka prostate, le da njihova vloga še ni najbolj raziskana (20).

## 2 NAMEN DELA

Merjenje koncentracij tumorskega označevalca PSA ima omejeno diagnostično uporabnost, saj diagnostična specifičnost in občutljivost pri pacientih z vrednostmi PSA med 2,7 in 10  $\mu\text{g/L}$  nista zadovoljivi. V tem območju mnogokrat dobimo lažno pozitivne/negativne PSA rezultate, ki paciente vodijo v poznejše nepotrebne ali neprijetne diagnostične posege (29). Posamezniki z vrednostmi PSA v omenjenem območju predstavljajo skupino, kjer bi bilo potrebno z dodatnimi parametri razlikovati med bolniki z benigno (BHP) in maligno hiperplazijo prostate.

Na podlagi objavljenih študij smo izbrali 5 pogosto omenjenih genetskih označevalcev oz. SNP, ki naj bi bili povezani z rakom prostate, in sicer: rs1447295, rs4054823, rs115306967, rs76934034 in rs80130819. V magistrski nalogi bomo poskušali ovrednotiti povezanost njihovih prisotnosti z meritvami in izračunanimi podatki biokemijskih označevalcev za rak prostate, in sicer PSA, fPSA, proPSA, PHI, %fPSA in %proPSA.

S tem namenom bomo:

- izolirali DNA iz vzorcev sline 119 bolnikov z benigno ali maligno hiperplazijo prostate,
- z metodo KASP analizirali vzorce DNA in določili genotip/alel za vsakega od 5 izbranih SNP,
- s statističnimi testi ugotavljali, ali obstajajo razlike v frekvencah genotipov/alelov med obema skupinama bolnikov,
- ugotavljali, ali obstaja korelacija med prisotnostjo alelov in plazemskimi koncentracijami PSA in ostalimi spremenljivkami – neodvisno od bolezni,
- ugotavljali, ali se vrednosti biokemijskih spremenljivk razlikujejo v odvisnosti od alela posebej v skupini z rakom in skupini z BHP.

Naša prva hipoteza predvideva, da obstajajo razlike v frekvencah alelov pri bolnikih z benigno hiperplazijo prostate in rakom prostate.

Naša druga hipoteza predvideva, da prisotnost določenega alela vpliva na koncentracije PSA, fPSA, proPSA ter vrednosti PHI, %fPSA in %proPSA tako pri pacientih z rakom kakor tudi pri pacientih z BHP.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 OPIS PREISKOVANCEV

V raziskavo smo vključili 119 preiskovancev, starih od 46 do 80 let, od katerih jih je 59 prihajalo iz Univerzitetnega kliničnega centra Ljubljana in 60 iz Univerzitetnega kliničnega centra Maribor. Preiskovancem so predhodno iz serumskih vzorcev s kemiluminiscenčno metodo izmerili koncentracijo PSA in fPSA ter z uporabo encimsko-immunskega testa izmerili koncentracijo [-2]proPSA (v nadaljevanju proPSA). Vrednosti PHI, %fPSA in %[-2]proPSA (v nadaljevanju %proPSA) so bile računsko določene. Meritve so izvedli v laboratoriju Kliničnega inštituta za klinično kemijo in biokemijo (KIKKB) v Univerzitetnem kliničnem centru Ljubljana. Pridobili smo tudi podatke o starosti preiskovancev ter njihove histološke izvide, ki so nam omogočili razdelitev preiskovancev na 2 skupini. Vključitveni kriteriji za nabor preiskovancev so bili: vrednosti PSA med 2 in 10 ng/mL (po Hybritechu), starost nad 50 let, opravljen digitalni rektalni pregled, TRUZ in opravljena biopsija ne prej kot 6 mesecev glede na odvzem krvi ter histološko potrjena diagnoza. Preiskovanci, vključeni v našo raziskavo, niso uporabljali nobenih zdravil, ki bi lahko vplivala na vrednosti kliničnih parametrov v času do treh mesecev. Prav tako je med izključitvene kriterije spadala prisotnost akutnega prostatitisa v času odvzema krvi ali biopsije ter prisotnost raka prostate kadar koli prej. Srednje vrednosti in standardne deviacije biokemijskih spremenljivk preiskovancev smo prikazali v preglednici III. Popolne klinične podatke smo uspeli pridobiti za 99 preiskovancev.

Preglednica III: Srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) biokemijskih spremenljivk pri vseh preiskovancih

SPREMENLJIVKA	VREDNOST (N = 99)
PSA [ $\mu$ g/L]	4,95 $\pm$ 2,18
fPSA [ $\mu$ g/L]	0,81 $\pm$ 0,49
proPSA [ng/L]	14,56 $\pm$ 16,51
PHI	43,51 $\pm$ 35,95
Starost [let]	66,69 $\pm$ 6,90
%fPSA	17,05 $\pm$ 8,61
%proPSA	1,99 $\pm$ 1,53

Za potrebe genotipizacijske raziskave smo uporabili vzorce slin, ki so bile do uporabe shranjene v ustreznih zbiralnikih pri  $-20$  °C. Pri zbiranju vzorcev slin so uporabili komplet

zbiralnikov DNA Genotek kit. Vsi vzorci so bili ustrezno označeni s črtno kodo, laboratorijsko številko, imenom in priimkom pacienta ter njihovim datumom rojstva. Ustrezali so zahtevi protokola, da naj količina sline znaša od 1 do 4 ml.

## **3.2 IZOLACIJA DNA**

Protokol za izolacijo DNA iz vzorcev sline se začne z inkubacijo vzorcev, s katero dolgotrajno inaktiviramo nukleaze. Po dodatku denaturanta in inkubaciji na ledu postane vsebina v centrifugirkah motna, saj se oborijo proteini, ki predstavljajo nečistoče. Sledi centrifugacija, pri kateri se oborjene nečistoče usedejo na dno centrifugirke v obliki usedline, v bistrem supernatantu pa se nahaja DNA. Supernatant v naslednji stopnji prenesemo v sveže in ustrezno označene centrifugirke. Po dodatku 95 % EtOH v supernatant se DNA obori in opazijo se njena vidna vlakna. Po vnovičnem centrifugiranju imamo tokrat DNA na dnu centrifugirke v usedlini, zato zavržemo supernatant, v katerem so prisotne morebitne nečistoče. V naslednjih stopnjah DNA večkrat speremo s 70 % EtOH, usedlino posušimo na zraku, da ves EtOH izhlapi, in na koncu rehidriramo z dodatkom prečiščene vode (44). Postopek izolacije DNA smo izvajali v serijah po pet vzorcev.

### **3.2.1 POSTOPEK IZOLACIJE DNA**

1. Vzorce smo odtalili pri sobni T in jih inkubirali na vodni kopeli minimalno 1 uro pri 50 °C. Vzorce smo v inkubator položili obrnjene na glavo in jih obtežili, da smo zagotovili popoln stik z vodo.
2. Celoten vzorec sline smo iz prvotnega zbiralnika prelili v 15 ml centrifugirko in si zabeležili odčitano  $V_{\text{vzorca}}$ .
3. V vsako 15 ml centrifugirko smo dodali  $1/25 V_{\text{vzorca}}$  denaturanta PT-L2P in mešali na vibracijskem mešalniku 5 s.
4. Vzorce smo inkubirali na ledu 10 min.
5. Vzorce smo centrifugirali pri sobni T 10 min na 5000 x g.
6. Pazljivo smo odpipetirali večino bistrrega supernatanta v sveže 15 ml centrifugirke ter zavrgli usedlino.
7. Vsakemu vzorcu smo nato dodali  $1,2 \times V_{\text{vzorca}}$  95 % EtOH in nežno ter zelo počasi premešali z 10-kratnim preobračanjem.

8. Vzorce smo pustili 10 min na sobni T.
9. Vzorce smo centrifugirali pri sobni T 10 min na 5000 x g.
10. Previdno smo odpipetirali večino supernatanta s plastično pipeto in ga zavrgli.
11. V vsako centrifugirko smo previdno dodali 1 mL 70 % EtOH in pustili stati 1 min na sobni T. Nato smo centrifugirko nežno zavrteli v njenem vodoravnem položaju in odpipetirali večino EtOH brez dotikanja usedline. Centrifugirke smo pustili odprte približno 1 min, da je izhlapela še preostala količina 70 % EtOH.
12. V vsako centrifugirko smo dodali 500  $\mu$ L prečiščene vode in mešali 30 s.
13. Vzorce smo inkubirali 24 ur pri sobni T, da smo zagotovili popolno rehidracijo izolirane DNA.
14. Rehidrirano DNA smo prenesli v ustrezno označene 1,5-mL mikroeprovete in jih shranili v zamrzovalniku pri  $-20$  °C.

### **3.3 KAKOVOST IN KOLIČINA IZOLIRANE DNA**

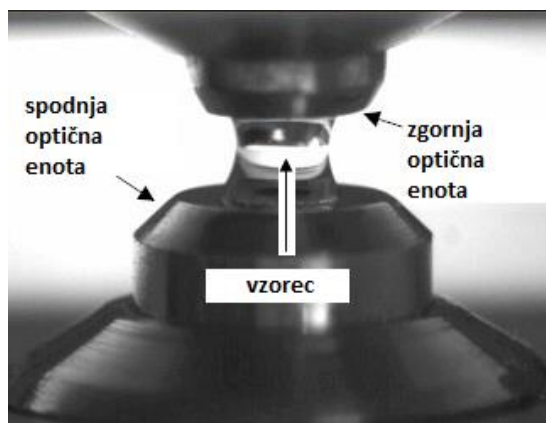
Po končanem postopku izolacije DNA iz vzorcev sline smo morali preveriti koncentracijo in kakovost izolirane DNA v posameznem vzorcu. Ti podatki so izrednega pomena pri izvedbi genotipizacije, ki zahteva enako koncentracijo DNA pri vseh vzorcih.

Za oceno kakovosti in meritve koncentracij izoliranih DNA smo uporabili spektrofotometer NanoDrop™ 1000. Uporabljeni spektrofotometer omogoča širokospektralno merjenje (220–750 nm) z veliko natančnostjo in ponovljivostjo. Pri meritvah ne potrebujemo kivet ali ostalih vsebnikov, saj spektrofotometer deluje na osnovi retencijske tehnologije, ki omogoča zadrževanje vzorca na svojem mestu s pomočjo površinske napetosti. Pulzna ksenonska žarnica predstavlja izvor svetlobe spektrofotometra, ki prehaja skozi vzorec na detektor CCD (angl. *Charge-Coupled Device*), ki svetlobo pretvori v električni signal. Naprava je povezana z računalnikom, ki podatke samodejno shranjuje v arhivske datoteke (45).

#### **3.3.1 POSTOPEK MERJENJA KAKOVOSTI IN KOLIČINE IZOLIRANE DNA**

1  $\mu$ L vzorca smo previdno odpipetirali na spodnjo optično enoto. Potem smo na vzorec položili zgornjo optično enoto tako, da se je med obema enotama ustvaril most, povezan z vzorcem (slika 8). Računalniški program je samodejno podal rezultate meritev in izrisal

absorbančne spektre. Po vsaki končani meritvi smo najprej odmaknili zgornjo optično enoto in z nežnim laboratorijskim robčkom obrisali vzorec. S tem smo preprečili mešanje oz. prenos enega vzorca na drugega in s tem meritve previsokih koncentracij posameznih vzorcev. Prav tako smo na začetku in po vsakemu 10. vzorcu nanесли 1  $\mu\text{l}$  vode, ki je služila kot negativna kontrola.



Slika 8: Prikaz nanosa vzorca na NanoDrop 1000 Spectrophotometer (45)

Meritve smo izvajali pri valovnih dolžinah ( $\lambda$ ) 230, 260 in 280 nm. Razmerje med absorbanca ma pri valovnih dolžinah 260 in 280 nm ( $A_{260}/A_{280}$ ) je pokazatelj kontaminacije vzorca s proteini. Pri čisti DNA znaša razmerje  $A_{260}/A_{280}$  okoli 1,8 ali več. Če je razmerje  $A_{260}/A_{280}$  nižje od 1,8, sumimo na prisotnost proteinov, fenola ali ostalih kontaminantov, ki absorbirajo svetlobo višjih valovnih dolžin (pri/okoli 280 nm). Razmerje  $A_{260}/A_{230}$  je sekundarni pokazatelj kontaminacije s proteini in organskimi topili, ki se uporabljajo v nekaterih postopkih izolacije DNA. Vrednosti čiste DNA tu navadno znašajo od 1,8 do 2,2. Pri določevanju koncentracije DNA v posameznem vzorcu potrebujemo podatek o  $A_{260}$ , saj imajo organske baze v DNA svoj absorpcijski maksimum pri 260 nm. Računalniški program spektrofotometra nato na podlagi Beer-Lambertovega zakona (enačbi 2 in 3) izračuna rezultat. Ekstinkcijski koeficient za dvoverižno DNA je konstanta in znaša 50  $\text{ng} \cdot \text{cm} / \mu\text{L}$  (45).

$$A = E \times b \times c \text{ (Beer-Lambertov zakon)} \quad \text{(enačba 2)}$$

$$c = \frac{A}{E \times b} \quad \text{(enačba 3)}$$

A ..... Absorbanca pri  $\lambda=260$  nm

E ..... Ekstinkcijski koeficient [ $\text{ng} \cdot \text{cm} / \mu\text{L}$ ]

b ..... Dolžina poti žarka skozi snov [cm]

c ..... Koncentracija DNA [ $\text{ng} / \mu\text{L}$ ]

### 3.4 GENOTIPIZACIJA Z METODO KASP

KASP (angl. *KBioscience competitive Allele-Specific PCR*) je genotipizacijska metoda, ki temelji na alelnu-specifični PCR reakciji (angl. *Polymerase Chain Reaction*) in s tem omogoča določanje enonukleotidnih polimorfizmov (SNP – angl. *Single Nucleotide Polymorphism*) ter manjših insercij in delecij na specifičnih lokusih. Deluje na podlagi tehnologije FRET (angl. *Fluorescence Resonance Energy Transfer*), ki omogoča genotipizacijo vzorcev v končni točki reakcije. Takrat je mogoče zaznati porast fluorescence. Poleg vzorcev DNA za reakcijo potrebujemo še 2 dodatni komponenti. To sta za posamezen polimorfizem specifičen Assay mix in univerzalen Master mix (slika 9) (46).

#### KASP Assay mix vsebuje:

- 2 različna alelnu-specifična začetna oligonukleotida (eden za vsak alel SNP), ki imata vsak svoje univerzalno zaporedje v obliki repka na 5'-koncu.
- 1 skupni protismerni (reverzni) začetni oligonukleotid, ki služi izgrajevanju komplementarnih verig (46).

#### KASP Master mix vsebuje:

- 2 oligonukleotida, označena s fluorescenčnim barvilom na 5'-koncu. Eden je označen s FAM (modro obarvan), drugi s HEX barvilom (zeleno obarvan). Oligonukleotida imata identično zaporedje repkov alelnu-specifičnih začetnikov iz Assay mixa, kar je tudi razvidno po ujemanjih se črkah (X, Y) na sliki 9.
- 2 oligonukleotida, označena z dušilcem na 3'-koncu. Oligonukleotida sta komplementarna zgoraj omenjenima iz Master mixa. Dokler ostane dušilec vezan na fluorescenčno barvilo, porasta fluorescence ne zaznamo.
- Taq-polimerazo, posebej modificirano za alelnu-specifični PCR.
- proste nukleotide (dNTP), sol  $MgCl_2$  (kofaktor za Taq-polimerazo), pufer in pasivno referenčno barvilo ROX (5-karboksi-X-rodamin sukcinimidil ester) (46).

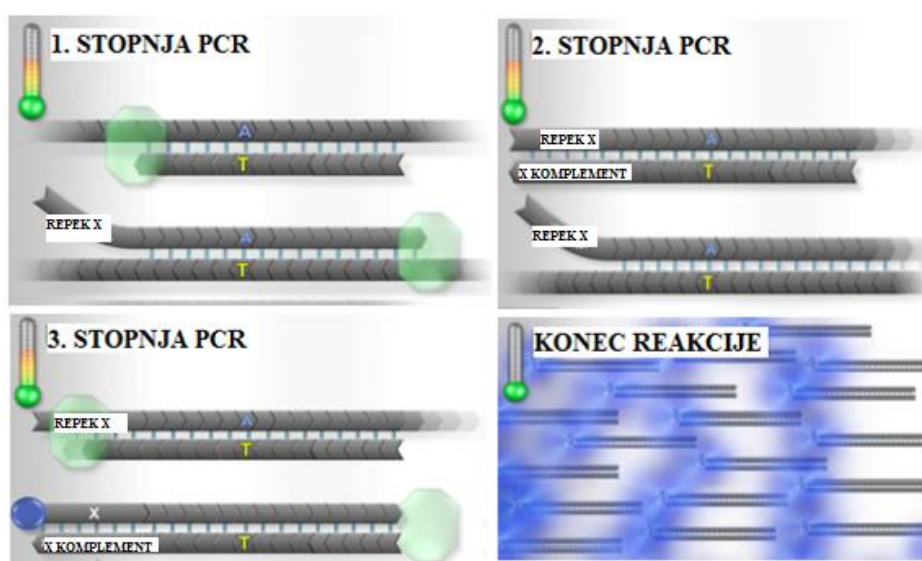




Slika 9: Prikaz komponent, potrebnih za izvedbo KASP reakcije (46).

### 3.4.1 MEHANIZEM REAKCIJE

V začetnih ciklih PCR reakcije se po razklenitvi izvorne DNA verige v fazi prileganja eden od alelno-specifičnih začetnih oligonukleotidov iz Assay mixa komplementarno veže na tarčno mesto SNP. Reverzni začetni oligonukleotid se veže na komplementarno verigo DNA, Taq-polimeraza pa podvoji obe novo nastali verigi v smeri 5' → 3'. Tu še ni porasta fluorescence, saj oligonukleotida iz Master mixa še vedno ostajata vezana na dušilec. V sledečih ciklih reakcije se s pomočjo protismernega začetnega oligonukleotida podvojijo tudi repki alelno-specifičnih oligonukleotidnih začetnikov. V zadnjih ciklih PCR reakcije se fluorescenčno obarvana oligonukleotida iz Master mixa vežeta na komplementarne odseke alelno-specifičnih repkov. Predhodno se odcepita od verige, vezane z dušilec, zato v zadnjih fazah reakcije zaznamo porast fluorescence. Mehanizem je prikazan na sliki 10.



Slika 10: Mehanizem reakcije KASP za homozigotni primer (47).

Če je oseba homozigot za preiskovani polimorfizem (SNP), bomo zaznali samo eno vrsto (barvo) fluorescentnega signala oz. mešani signal, če je oseba heterozigot. V našem primeru smo uporabili 2 vrsti fluoroforov. To sta FAM in HEX, ki emitirata svetlobo pri različnih valovnih dolžinah, kot je razvidno iz spodnje preglednice (46).

Preglednica IV: Valovne dolžine emisije in ekscitacije za posamezen fluorofor (48)

FLUOROFOR	EKSCITACIJA (nm)	EMISIJA (nm)
FAM	485	520
HEX	535	556

### 3.4.2 PRIPRAVA VZORCEV ZA GENOTIPIZACIJO

Pred izvedbo KASP reakcije smo morali naše vzorce DNA najprej razredčiti na enako koncentracijo, kot je zahtevano v protokolu za genotipizacijo. Če vzorci ne bi bili enakih koncentracij, izvedene meritve ne bi predstavljale primerljivih oz. zanesljivih podatkov.

#### Redčenje vzorcev

Minimalna končna koncentracija DNA za KASP genotipizacijo, priporočena s proizvajalčeve strani, znaša 2,5 ng/ $\mu$ L. Ta vrednost je določena na podlagi velikosti človeškega genoma, ki znaša ~3000 Mbp. Prav tako je določena tudi okvirna količina DNA, potrebna za eno reakcijo. Te vrednosti segajo od 5 do 50 ng (48).

Glede na kasnejša preračunavanja količin reagentov, ki smo jih uporabili v končni mešanici, smo se odločili, da naše raztopine DNA redčimo do 20 ng/ $\mu$ L. Na ta način smo zadostili zgoraj opisanim zahtevam. Pred redčenjem smo mikroeprovete z odmrznjenimi vzorci premešali z vibracijskim mešalnikom in centrifugirali 30 s. Vedno smo napipetirali najprej določeno količino vode in nato DNA. Po končanem redčenju smo površino mikrotitrskih ploščic prelepili z zaščitnim raztegljivim trakom. Od začetnih 119 vzorcev jih je 14 vsebovalo premajhno koncentracijo DNA za nadaljnje meritve, tako da smo za KASP genotipizacijo uporabili 105 vzorcev.

#### Priprava reagentov za KASP

Pred začetkom dela smo si vedno delovno površino in vso ostalo opremo očistili s 70 % raztopino EtOH. Med delom smo imeli vse potrebne reagente na dosegu roke. Poleg naštetega smo pazili, da smo se mikrotitrskih ploščic dotikali le na skrajnih robovih in med

delom nismo pretirano govorili, da smo preprečili morebitno okužbo vzorcev. Slednje smo zmanjšali tudi s tem, da smo mikrotitrne ploščice sproti zalepili nazaj z zaščitnim trakom. Končni volumen ene reakcije je v našem eksperimentu znašal 8  $\mu\text{L}$ . Pri preračunavanju količin potrebnih reagentov smo poleg količine za 105 vzorcev upoštevali tudi to, da smo izvedli 12 ponovitev in dodali 3 negativne kontrole. Prav tako smo upoštevali 7 % prebitek vseh količin (razen DNA) zaradi napake pipetiranja. Končne količine posameznih reagentov so prikazane v preglednici V. Pozitivnih kontrol zaradi težje dosegljivosti nismo imeli.

Preglednica V: Količina posameznih komponent KASP reakcije

KOMPONENTA	1 vzorec ( $\mu\text{L}$ )	120 vzorcev + 7 % prebitek ( $\mu\text{L}$ )
KASP Master mix	4,00	513,60
KASP Assay mix	0,11	14,12
Voda	2,39	306,88
DNA (konc. 20 ng/ $\mu\text{L}$ )	1,50	/
$\Sigma$	8,00	834,60

1. Delovno površino smo očistili z EtOH in vse potrebne reagente dobro premešali.
2. V svežo mikropruveto smo napipetirali najprej 306,88  $\mu\text{L}$  prečiščene vode, nato 513,60  $\mu\text{L}$  Master mixa in nazadnje 14,12  $\mu\text{L}$  izbranega Assay mixa.
3. Mikropruveto smo ustrezno označili, vsebino dobro premešali in centrifugirali 2 min. Odvečni Master mix, Assay mix ter vodo smo postavili nazaj v hladilnik.
4. V bližino delovne površine smo si postavili mikrotitrski ploščici z razredčenimi vzorci ter skopiran list papirja, kjer smo si predhodno pripravili postavitev na 384-mikrotitrski ploščici (slika 11).
5. Na delovno površino smo položili kos aluminijaste folije, nanj postavili 384-mikrotitrsko ploščico in previdno označili polja, v katera bomo nanašali vzorce.
6. V vsako predvideno polje na ploščici smo z reverznim pipetiranjem prenesli po 6,5  $\mu\text{L}$  že pripravljene mešanice, omenjene v 2. točki (Master, Assay mix in voda).
7. Nato smo z 12-kanalno pipeto v vsako polje dodali še po 1,50  $\mu\text{L}$  posameznega vzorca.
8. V polja z negativno kontrolo (NTC) smo namesto DNA dodali 1,50  $\mu\text{L}$  prečiščene vode.
9. Celotno površino mikrotitrne ploščice smo previdno prelepili s samolepilno folijo in ustrezno zatesnili vse robove.
10. Pripravljeno ploščico smo premešali na stresalniku in centrifugirali 3 min pri 1900 obratih/min.

11. V aluminijasto folijo smo zavili pripravljeno ploščico, na folijo in ploščico zapisali vrsto preiskovanega polimorfizma in zavito ploščico prenesli do aparature za izvedbo genotipizacije.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
A	10	16	1	3	49	118	24	25	7	43	77	99	NTC
B	97	105	98	80	82	92	65	93	88				
C	54	2	56	37	11	39	45	8	44	29	106	52	NTC
D													
E	83	81	57	109	19	34	50	74	55	38	86	9	
F													
G	58	12	67	33	60	64	32	51	115	46	90	75	
H													
I	48	42	17	30	21	108	104	40	61	110	26	28	
J													
K	27	68	79	78	22	41	47	69	113	66	4	23	
L													
M	35	107	15	14	53	114	13	96	117	36	119	89	
N													
O	59	71	63	62	94	91	84	100	6	20	70	18	
P	NTC												

Slika 11: Razporeditev vzorcev na 384-mikrotitrski ploščici (svetlo zeleno: vzorci s prve 96-mikrotitrške ploščice; temno zeleno: vzorci z druge 96-mikrotitrške ploščice; rdeče: negativne kontrole; oranžno: 12 polj za ponovitve vzorcev).

### 3.4.3 IZVEDBA KASP GENOTIPIZACIJE

Genotipizacijo smo izvedli z napravo LightCycler<sup>®</sup> 480, povezano z računalnikom, na katerem smo predhodno nastavili vse potrebne parametre protokola. Reakcijo smo izvedli po t. i. 61–55 °C »touchdown« protokolu. KASP tehnologija izkorišča metodo PCR, ki poteka v dveh in ne v treh temperaturnih korakih, kakor je značilno za standardno PCR reakcijo. V našem primeru sta prileganje začetnih oligonukleotidov in podaljševanje verige združena v en sam korak. »Touchdown PCR« se prične pri višji T prileganja (61 °C), ki se postopoma (po 0,6 °C na cikel) znižuje (do 55 °C). Ta način zagotavlja večjo specifičnost in učinkovitost reakcije, saj imajo začetni oligonukleotidi pri višjih temperaturah večjo moč in specifičnost tvorjenja baznih parov z molekulo DNA. V zadnji, 4. stopnji reakcije, se vsi podatki kvantitativno obdelajo (49). Za boljšo razumljivost je podana spodnja preglednica.

Preglednica VI: "Touchdown" protokol (49)

STOPNJA PCR	TEMPERATURA	TRAJANJE	ŠTEVILO CIKLOV
1.	94 °C	15 min	1
2.	94 °C	20 s	10
	61 °C–55 °C	60 s	
3.	94 °C	20 s	26
	55 °C	60 s	
4.	37 °C	60 s	1

Učinkovitost KASP reakcije je odvisna od številnih dejavnikov, vključujoč koncentracijo DNA in razporeditev nukleotidnega zaporedja okoli preiskovanega mesta SNP. Nekatere stopnje zato morda ne potečejo v celoti kljub večjim številom ciklov, ki se odvijajo v času reakcije. To opazimo šele na koncu po izrisanem grafu, na katerem so nanizani vzorci, ki se razprostirajo na vse strani in niso lepo razporejeni po skupinah (angl. *cluster*). Zato je včasih potrebnih še nekaj dodatnih ciklov reakcije, da dosežemo opaznejše razlikovanje med posameznimi genotipi in s tem zmanjšamo možnost napak pri interpretaciji rezultatov. Zato smo pri vseh 5 SNP na koncu vključili 3 dodatne cikle, kot jih predpisuje protokol, podan v preglednici VII (50). Celoten čas ene reakcije je tako trajal 69 minut.

Preglednica VII: Optimizacijski protokol s 3 dodatnimi cikli (50)

STOPNJA PCR	TEMPERATURA	TRAJANJE	ŠTEVILO CIKLOV
1.	94 °C	20 s	3
	57 °C	60 s	
2.	37 °C	60 s	1

### 3.5 STATISTIČNA OBDELAVA PODATKOV

Podatke o pacientih, pridobljene meritve ter diagnoze smo razvrstili v tabele s pomočjo računalniškega programa Microsoft Office Excel 2007. Statistično analizo podatkov in rezultatov smo izvedli s programom IBM SPSS Statistics 20.

Pri vsakem preiskovanem polimorfizmu smo za izmerjene frekvence genotipov s testom  $\chi^2$  izračunali tudi Hardy-Weinbergovo ravnotežje. To ravnotežje pravi, da se alelne oz. genotipske frekvence v določeni populaciji ohranjajo iz generacije v generacijo. Ravnotežje velja pri veliki populaciji, ki se med seboj naključno razmnožuje, ne vključuje nobenih selitev, mutacij in selekcij (51). Do testa smo dostopali preko spletne strani <http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/Court%20lab%20-%20HW%20calculator.xls>. Vrednost  $P \geq 0,05$  je pomenila, da so naše genotipske frekvence v Hardy-Weinbergovem ravnotežju.

S Fisherjevim testom smo ugotavljali, ali med skupinama obstajajo statistično pomembne razlike v alelnih frekvencah. Do testa smo dostopali s spletne strani

<http://vassarstats.net/odds2x2.html> in kot statistično pomembno razliko opredelili vrednost  $P \leq 0,05$ .

V programu SPSS smo s pomočjo Kolmogorov-Smirnovega testa ugotavljali, ali se naše spremenljivke porazdeljujejo normalno ali nenormalno ter nato rezultatu prilagodili uporabo neparametričnih testov. Kot statistično pomembno smo uporabili vrednost  $P \leq 0,05$ .

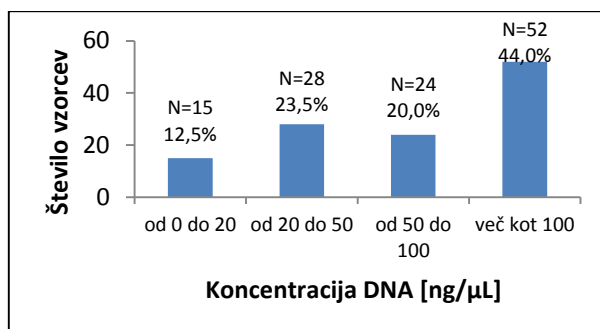
Kadar smo med dvema skupinama ali dvema aleloma ugotavljali razlike v povprečnih vrednostih spremenljivk, smo v SPSS uporabili Mann-Whitneyjev test. Statistično pomembno razliko nam je pokazala vrednost  $P \leq 0,05$ .

Kot odvisne spremenljivke pri vseh testih smo uporabili vrednosti PSA, fPSA, proPSA, PHI, starost, %fPSA in %proPSA. Da smo ugotovili povprečne vrednosti ter standardne deviacije posameznih spremenljivk, smo uporabili funkcijo *Descriptive statistics* v programu SPSS.

## 4 REZULTATI

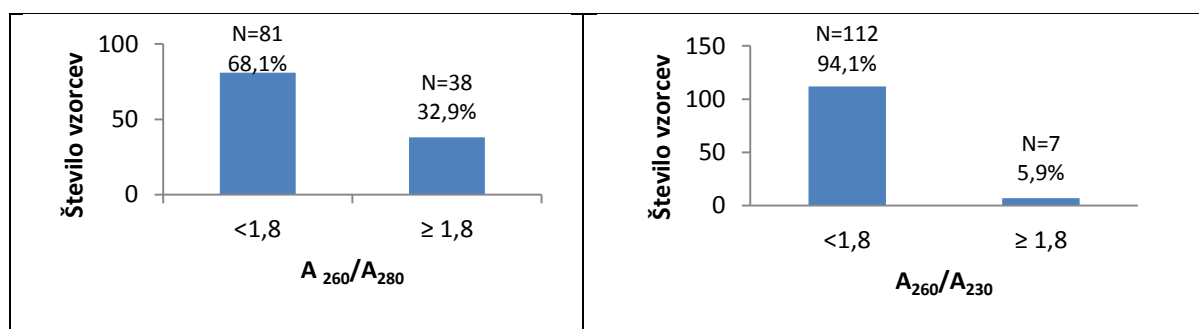
### 4.1 KAKOVOST IN KOLIČINA IZOLIRANE DNA

Da bi lahko ugotovili uspešnost postopka izolacije, smo spektrofotometrično izmerili koncentracijo DNA ter razmerji  $A_{260}/A_{280}$  in  $A_{260}/A_{230}$  za vsak vzorec in podatke prikazali na slikah 12 in 13 ter v prilogi I.



Slika 12: Prikaz porazdelitve vzorcev v odvisnosti od koncentracije izolirane DNA.

Izmed 119 vzorcev smo v 15 primerih izmerili zelo nizko koncentracijo izolirane DNA, tj. pod  $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$  (slika 12). Zaradi prenizkih koncentracij teh vzorcev nismo mogli vključiti v postopke redčenja na  $20 \text{ ng}/\mu\text{L}$ . Obdržali smo samo en vzorec (št. 88) s koncentracijo  $19,83 \mu\text{L}$ , preostalih 14 pa smo izključili iz nadaljnjih meritev. Povprečna koncentracija DNA v vseh vzorcih je znašala  $121,84 \text{ ng}/\mu\text{L}$ .



Slika 13: Porazdelitev vzorcev za  $A_{260}/A_{280}$  (levo) in  $A_{260}/A_{230}$  (desno).

Pokazatelj čistosti oz. kontaminacije s proteini je razmerje  $A_{260}/A_{280}$ , ki pri čistem vzorcu znaša  $\geq 1,8$ . Vzorci z  $A_{260}/A_{280} < 1,8$  imajo večjo prisotnost proteinov in/ali aromatskih derivatov (45). Povprečna vrednost  $A_{260}/A_{280}$  pri vzorcih je bila 1,69.

Podatki za  $A_{260}/A_{230}$  prikazujejo prisotnost nečistoč, ki absorbirajo pri valovni dolžini 230 nm. Tudi tu se kot mejna vrednost čistosti DNA uporablja vrednost  $A_{260}/A_{230} \geq 1,8$ . Pri 230

nm absorbirajo peptidne vezi v proteinih ter ostale organske komponente (45). Za naše vzorce smo izmerili povprečno vrednost  $A_{260}/A_{230}$  1,24.

## 4.2 REZULTATI GENOTIPIZACIJE Z METODO KASP

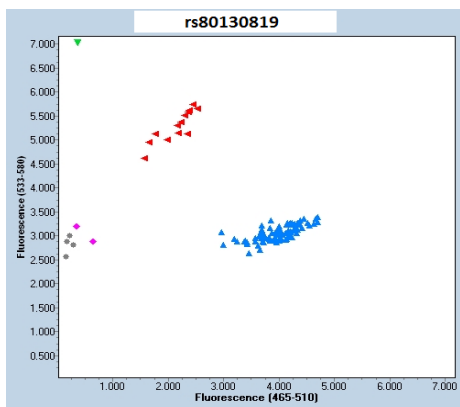
Po končani KASP reakciji so se podatki za posamezen polimorfizem izpisali v obliki grafa. Vodoravna (x) os nam je v vseh petih primerih dala podatek o alelu FAM, navpična (y) os pa o alelu HEX. Vzorci, ki se nahajajo v neposredni bližini abscisne osi, so homozigoti za alel FAM, vzorci v neposredni bližini ordinatne osi homozigoti za alel HEX, tisti vzorci, ki so razporejeni na vmesno površino, so t. i. heterozigoti. Alela FAM in HEX sta pri vsakem preiskovanem polimorfizmu določala alel, prikazan v preglednici VIII.

Preglednica VIII: Alela FAM in HEX za posamezen polimorfizem

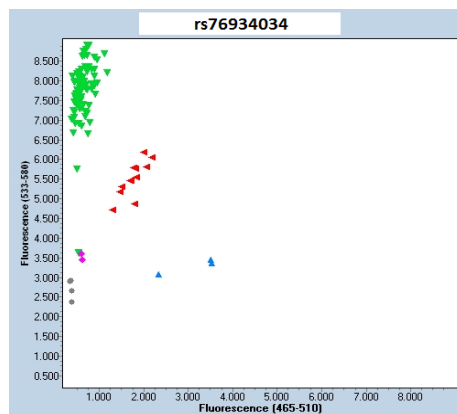
POLIMORFIZEM	FAM alel (abscisna os)	HEX alel (ordinatna os)	NUKLEOTIDNA ZAMENJAVA
rs80130819	A	C	A>C
rs76934034	C	T	T>C
rs115306967	C	G	G>C
rs4054823	C	T	T>C
rs1447295	A	C	A>C

Vsi vzorci so se po končani reakciji razvrstili v 3 skupine (slike 14–18). Homozigoti za alel FAM so na grafih obarvani modro in za alel HEX zeleno. Heterozigotni vzorci so obarvani rdeče. Sivo obarvana polja predstavljajo 3 negativne kontrole in vzorce, kjer KASP reakcija ni uspela, medtem ko rožnata barva prikazuje vzorce, ki jim sistem ni uspel določiti lokacije na grafu. Kljub slabšim rezultatom začetnih meritev  $A_{260}/A_{230}$  in  $A_{260}/A_{280}$  smo večini vzorcem uspešno določili vrste genotipov. Pri enem vzorcu (št. 36) se je zgodilo, da genotipizacija kljub optimizaciji ni bila uspešno izvedena pri nobenem izmed petih polimorfizmov. Poleg omenjenega vzorca (št. 36) je bil pri rs80130819 neuspešno določen še eden (št. 2), pri rs76934034 pa še 4 vzorci (št. 32, 47, 51, 78). Pri vseh ostalih vzorcih je bila genotipizacija uspešna. Neuspešno določenih vzorcev v nadaljevanju nismo mogli uporabiti pri analizi kliničnih podatkov.

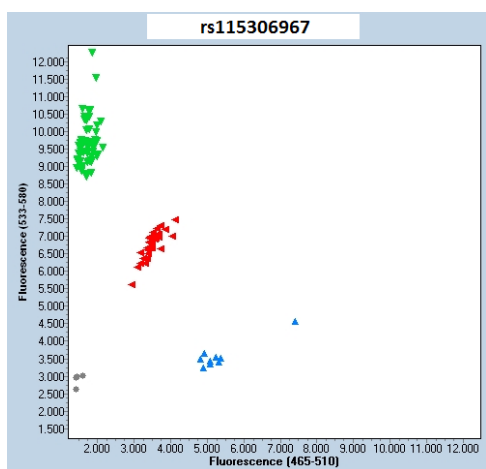




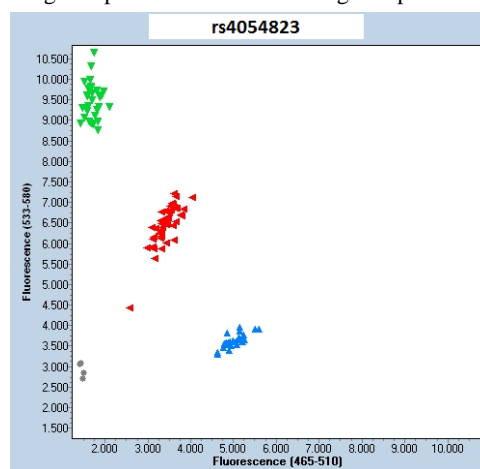
Slika 14: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs80130819: zelena barva za genotip CC, rdeča barva za genotip AC in modra barva za genotip AA.



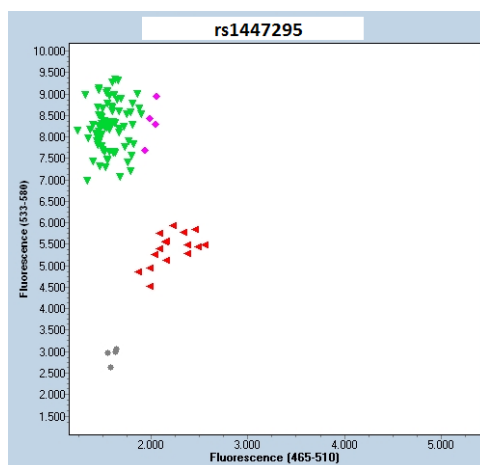
Slika 15: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs76934034: zelena barva za genotip TT, rdeča barva za genotip CT in modra barva za genotip CC.



Slika 16: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs115306967: zelena barva za genotip GG, rdeča barva za genotip CG in modra barva za genotip CC.

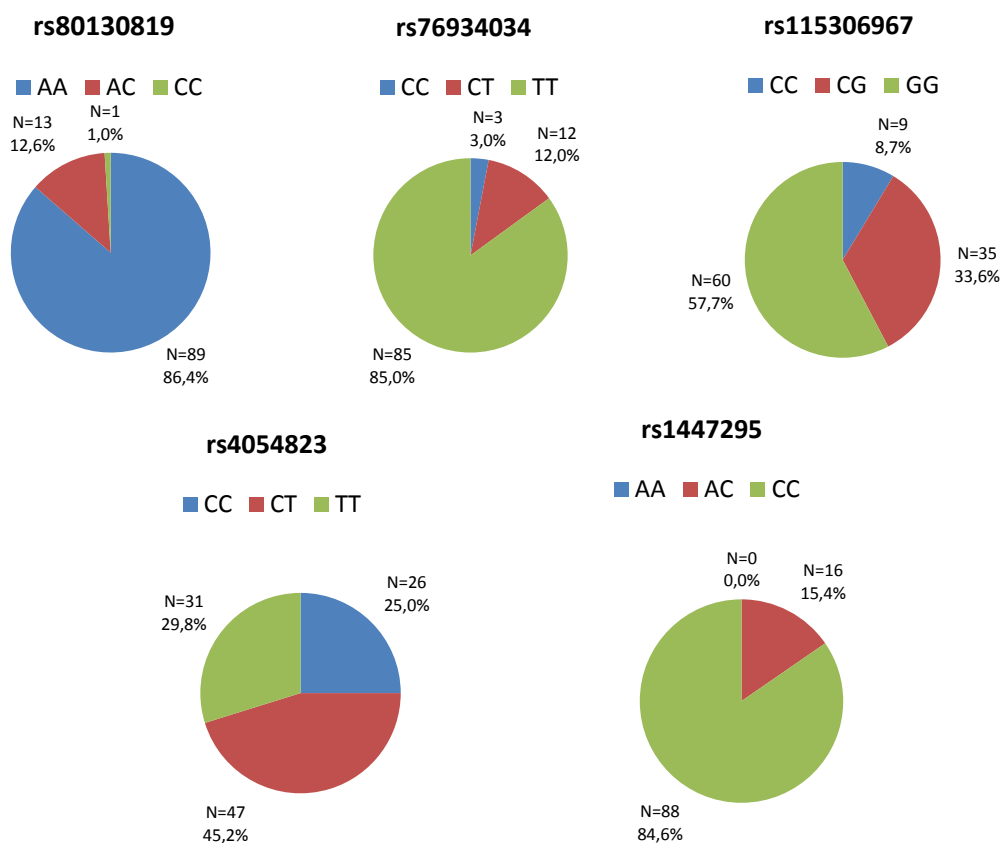


Slika 17: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs4054823: zelena barva za genotip TT, rdeča barva za genotip CT in modra barva za genotip CC.



Slika 18: Grafična porazdelitev genotipov pri analizi rs1447295: zelena barva za genotip CC, rdeča barva za genotip AC in modra barva za genotip AA.

Na podlagi alelov FAM in HEX pri posameznem polimorfizmu smo dobljene rezultate razvrstili v preglednico, v kateri so zbrani podatki o genotipih za posamezen vzorec. Prikazani so v prilogah II in III, na spodnji sliki pa so združeni rezultati vseh vzorcev in prikazani v obliki številčnega deleža oz. relativne frekvence za vsak SNP posebej.



Slika 19: Grafični prikaz relativnih frekvenc genotipov za rs80130819, rs76934034, rs115306967, rs4054823 in rs1447295.

### 4.3 OSNOVNE ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV

Osnovne klinične značilnosti naše skupine preiskovancev smo povzeli v preglednici IX in prilogah II in III ter s pomočjo programa SPSS podatke podali v obliki srednjih vrednosti  $\pm$  standardne deviacije. V analizo kliničnih podatkov smo lahko vključili 99 pacientov, saj smo le zanje imeli popolne podatke za vse spremenljivke.

Preglednica IX: Osnovne klinične značilnosti vseh preiskovancev, vključenih v raziskavo

SPREMENLJIVKA	VREDNOST (N = 99)	RAK (N = 37)	BHP (N = 62)
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	4,95 $\pm$ 2,18	5,78 $\pm$ 2,27	4,46 $\pm$ 1,98
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,81 $\pm$ 0,49	0,91 $\pm$ 0,59	0,75 $\pm$ 0,42
proPSA [ng/L]	14,56 $\pm$ 16,51	20,16 $\pm$ 25,13	11,22 $\pm$ 5,91
PHI	43,51 $\pm$ 35,95	57,19 $\pm$ 49,97	35,35 $\pm$ 20,52
Starost [let]	66,69 $\pm$ 6,90	69,49 $\pm$ 6,49	65,02 $\pm$ 6,64
%fPSA	17,05 $\pm$ 8,61	16,32 $\pm$ 10,90	17,78 $\pm$ 6,95
%proPSA	1,99 $\pm$ 1,53	2,40 $\pm$ 2,11	1,74 $\pm$ 0,98

Za potrebe nadaljnje statistične obdelave podatkov smo morali ugotoviti, kako se spremenljivke porazdeljujejo v naši populaciji. Rezultate Kolmogorov-Smirnovega testa smo strnili v preglednico X. Vrednosti fPSA, proPSA, PHI in %proPSA so se izkazale kot nenormalno porazdeljujoče v celotni populaciji ( $P \leq 0,05$ ), zato smo v nadaljevanju s pomočjo programa SPSS izvajali neparametrične statistične teste.

Preglednica X: Rezultati Kolmogorov-Smirnovega testa

SPREMENLJIVKA	PSA	fPSA	proPSA	PHI	Starost	%fPSA	%proPSA
P vrednost	0,078	<b>0,023</b>	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>	0,586	0,220	<b>0,024</b>

V nadaljevanju smo preiskovano populacijo bolnikov razdelili v dve skupini na podlagi potrjenega histološkega izvida, in sicer na skupino RAK in skupino BHP. V skupini RAK se nahajajo pacienti, ki jim je bila določena diagnoza raka prostate ter pacienti s HGPIIN (angl. *High grade prostatic intraepithelial neoplasia*). Skupino BHP pa sestavljajo pacienti z BHP s pridruženim vnetjem ali atrofijo. Z uporabo Mann-Whitneyjevega testa smo med skupinama primerjali povprečne vrednosti posameznih spremenljivk in rezultate podali v obliki vrednosti P. Vrednost  $P \leq 0,05$  pri posamezni spremenljivki je označevala statistično pomembno razliko med skupinama. Klinične podatke ter rezultate Mann-Whitneyjevega testa za posamezno skupino smo prikazali v preglednici XI. Statistično pomembna razlika

med obema skupinama je bila prisotna pri vrednostih PSA, proPSA, PHI, starosti ter %proPSA.

Preglednica XI: Primerjava povprečnih vrednosti spremenljivk med skupinama RAK in BHP

SPREMENLJIVKA	RAK (N = 37)	BHP (N = 62)	P vrednost
<b>PSA [µg/L]</b>	<b>5,78 ± 2,27</b>	<b>4,46 ± 1,98</b>	<b>0,003</b>
fPSA [µg/L]	0,91 ± 0,59	0,75 ± 0,42	0,211
<b>proPSA [ng/L]</b>	<b>20,16 ± 25,13</b>	<b>11,22 ± 5,91</b>	<b>0,003</b>
<b>PHI</b>	<b>57,19 ± 49,97</b>	<b>35,35 ± 20,52</b>	<b>0,000</b>
<b>starost [let]</b>	<b>69,49 ± 6,49</b>	<b>65,02 ± 6,64</b>	<b>0,001</b>
%fPSA	16,32 ± 10,90	17,78 ± 6,95	0,105
<b>%proPSA</b>	<b>2,40 ± 2,11</b>	<b>1,74 ± 0,98</b>	<b>0,014</b>

#### 4.4 POVEZAVA POLIMORFIZMOV S KLINIČNIMI PODATKI PREISKOVANCEV

V preglednici XII so zbrani rezultati kombinacij genotipov oz. alelov za vseh 5 polimorfizmov. Rezultati so prikazani kot števila oz. deleži preiskovancev za določen genotip oz. alel. Zaradi nizke frekvence določenih genotipov smo preiskovance naknadno razdelili na alele tako, da smo med seboj združili heterozigote in homozigote z najmanjšo frekvenco in v nadaljevanju paciente obravnavali samo glede na alel.

Pri vsakem polimorfizmu smo ugotovili, da so naše genotipske frekvence v Hardy-Weinbergovem ravnotežju tako v skupini z rakom kot tudi z BHP. Vrednosti P v zadnjem stolpcu preglednice XII prikazujejo rezultate Fisherjevega testa, s katerim smo med skupinama primerjali alelne frekvence. Ugotovili smo, da pri nobenem polimorfizmu ne najdemo statistično pomembne razlike v alelnih frekvencah med skupinama RAK in BHP.

Preglednica XII: Prikaz genotipskih in alelnih frekvenc v skupini RAK in BHP za posamezen polimorfizem

SNP	Genotip/Alel	RAK [N (%)]	BHP [N (%)]	PRIMERJAVA ALELNIH FREKVENC
<b>rs80130819</b>	AA	34 (94,4)	52 (83,9)	0,138
	AC	2 (5,6)	9 (14,5)	
	CC	0 (0)	1 (1,6)	
	alel A	70 (97,2)	113 (91,1)	
	alel C	2 (2,8)	11 (8,9)	
*HWE Hardy-Weinbergovo ravnotežje: P = 0,864 za skupino RAK in P = 0,421 za skupino BHP				
<b>rs76934034</b>	CC	2 (5,5)	1 (1,7)	0,128
	CT	6 (16,7)	6 (10,2)	
	TT	28 (77,8)	52 (88,1)	
	alel C	10 (13,9)	8 (6,8)	
	alel T	62 (86,1)	110 (93,2)	
*HWE Hardy-Weinbergovo ravnotežje: P = 0,069 za skupino RAK in P = 0,133 za skupino BHP				
<b>rs115306967</b>	CC	3 (8,1)	6 (9,7)	0,869
	CG	14 (37,8)	20 (32,2)	
	GG	20 (54,1)	36 (58,1)	
	alel C	20 (27,0)	32 (25,8)	
	alel G	54 (73,0)	92 (74,2)	
*HWE Hardy-Weinbergovo ravnotežje: P = 0,804 za skupino RAK in P = 0,215 za skupino BHP				
<b>rs1447295</b>	AA	0 (0,0)	0 (0,0)	0,999
	AC	6 (16,2)	10 (16,1)	
	CC	31 (83,8)	52 (83,9)	
	alel A	6 (8,1)	10 (8,1)	
	alel C	68 (91,9)	114 (91,9)	
*HWE Hardy-Weinbergovo ravnotežje: P = 0,591 za skupino RAK in P = 0,490 za skupino BHP				
<b>rs4054823</b>	CC	8 (21,6)	17 (27,4)	0,242
	CT	15 (40,6)	29 (46,8)	
	TT	14 (38,8)	16 (25,8)	
	alel C	31 (41,9)	63 (50,8)	
	alel T	43 (58,1)	61 (49,2)	
*HWE Hardy-Weinbergovo ravnotežje: P = 0,309 za skupino RAK in P = 0,613 za skupino BHP				

S pomočjo statističnih testov smo skušali ugotoviti, ali obstajajo razlike med povprečnimi vrednostmi posameznih spremenljivk pri preiskovancih, ki nosijo eden oz. drugi alel. V tem primeru nas je zanimal samo vpliv alela na povprečne vrednosti PSA, fPSA, proPSA in PHI, neodvisno od bolezni. Paciente smo zato pri vsakem SNP razvrstili v 2 skupini (glede na alel) in ugotavljali, ali se pri kateri izmed spremenljivk pokaže statistično pomembna razlika. Rezultate smo prikazali v preglednicah XIII–XVII. Navedeni so

podatki o povprečnih vrednostih spremenljivk skupaj s standardnimi deviacijami ter vrednosti P, pridobljene z Mann-Whitneyjevim testom.

Pri rs80130819 se je kot statistično pomembna izkazala razlika v vrednostih %proPSA. Pri ostalih spremenljivkah statistično pomembnih razlik za rs80130819 nismo dokazali. Pri rs76934034, rs115306967 in rs4054823 nismo uspeli določiti nobenih statistično pomembnih razlik. Pri rs1447295 se je kot statistično pomembna izkazala razlika v vrednosti fPSA med posamezniki, ki imajo alel A oz. C.

Preglednica XIII: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs80130819 v celotni skupini 99 preiskovancev

rs80130819			
Spremenljivka	alel A (N = 86)	alel C (N = 12)	P vrednost
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	4,85 $\pm$ 2,15	5,77 $\pm$ 2,36	0,193
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,80 $\pm$ 0,51	0,89 $\pm$ 0,30	0,116
proPSA [ng/L]	15,02 $\pm$ 17,59	10,92 $\pm$ 4,40	0,533
PHI	44,87 $\pm$ 38,01	32,27 $\pm$ 12,80	0,253
starost [let]	66,81 $\pm$ 6,87	65,75 $\pm$ 7,70	0,529
%fPSA	16,93 $\pm$ 8,63	18,04 $\pm$ 9,13	0,795
<b>%proPSA</b>	<b>2,07 <math>\pm</math> 1,60</b>	<b>1,35 <math>\pm</math> 0,66</b>	<b>0,041</b>

Preglednica XIV: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs76934034 v celotni skupini 99 preiskovancev

rs76934034			
Spremenljivka	alel C (N = 15)	alel T (N = 80)	P vrednost
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	5,36 $\pm$ 2,53	4,92 $\pm$ 2,16	0,459
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,89 $\pm$ 0,33	0,80 $\pm$ 0,52	0,106
proPSA [ng/L]	12,98 $\pm$ 6,37	14,97 $\pm$ 18,12	0,676
PHI	33,89 $\pm$ 14,65	45,16 $\pm$ 38,49	0,213
starost [let]	68,47 $\pm$ 7,04	66,58 $\pm$ 6,93	0,419
%fPSA	18,72 $\pm$ 7,69	16,75 $\pm$ 8,9	0,288
%proPSA	1,52 $\pm$ 0,56	2,06 $\pm$ 1,61	0,090

Preglednica XV: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs115306967 v celotni skupini 99 preiskovancev

rs115306967			
Spremenljivka	alel C (N = 43)	alel G (N = 56)	P vrednost
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	5,08 $\pm$ 2,16	4,86 $\pm$ 2,21	0,346
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,82 $\pm$ 0,52	0,80 $\pm$ 0,47	0,846
proPSA [ng/L]	16,72 $\pm$ 22,93	12,89 $\pm$ 8,82	0,521
PHI	47,59 $\pm$ 47,01	40,38 $\pm$ 24,34	0,463
starost [let]	65,84 $\pm$ 6,99	67,34 $\pm$ 6,83	0,184
%fPSA	16,33 $\pm$ 6,52	17,60 $\pm$ 9,94	0,910
%proPSA	2,22 $\pm$ 2,01	1,79 $\pm$ 0,97	0,592

Preglednica XVI: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs4054823 v celotni skupini 99 preiskovancev

rs4054823			
Spremenljivka	alel C (N = 69)	alel T (N = 30)	P vrednost
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	4,73 $\pm$ 2,14	5,47 $\pm$ 2,21	0,063
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,75 $\pm$ 0,44	0,93 $\pm$ 0,58	0,215
proPSA [ng/L]	13,94 $\pm$ 18,44	15,98 $\pm$ 11,00	0,114
PHI	44,04 $\pm$ 40,39	42,30 $\pm$ 23,24	0,137
starost [let]	65,84 $\pm$ 6,45	68,63 $\pm$ 7,60	0,653
%fPSA	16,94 $\pm$ 9,14	17,28 $\pm$ 7,36	0,637
%proPSA	2,058 $\pm$ 1,733	1,831 $\pm$ 0,889	0,891

Preglednica XVII: Povprečne vrednosti spremenljivk v odvisnosti od alela ter P vrednosti za rs1447295 v celotni skupini 99 preiskovancev

rs1447295			
Spremenljivka	alel A (N = 16)	alel C (N = 83)	P vrednost
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	4,27 $\pm$ 2,17	5,09 $\pm$ 2,17	0,210
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	<b>0,56 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>0,85 <math>\pm</math> 0,51</b>	<b>0,017</b>
proPSA [ng/L]	10,27 $\pm$ 5,24	15,39 $\pm$ 17,79	0,098
PHI	39,29 $\pm$ 18,04	44,33 $\pm$ 38,48	0,962
starost [let]	65,31 $\pm$ 5,75	66,95 $\pm$ 7,11	0,438
%fPSA	14,47 $\pm$ 5,91	17,54 $\pm$ 8,98	0,146
%proPSA	2,075 $\pm$ 0,961	1,973 $\pm$ 1,616	0,309

V nadaljevanju smo ponovno uvedli razdelitev na skupino z rakom in skupino z BHP in znotraj vsake skupine ugotavljali razlike v laboratorijskih vrednostih odvisno od alela za

vsak polimorfizem posebej. V tem primeru smo vplivu alela na vrednosti spremenljivk dodali še vpliv bolezni. Zanimalo nas je, ali bomo s takšno delitvijo uspeli najti več statistično pomembnih razlik. Zopet smo uporabili Mann-Whitneyjev test in rezultate prikazali v obliki povprečnih vrednosti  $\pm$  standardne deviacije ter P vrednosti v preglednicah XVIII–XXII.

Rezultati za rs80130819 prikazujejo statistično pomembno razliko v vrednostih proPSA v skupini z rakom. V skupini BHP se je kot statistično pomembna izkazala razlika v vrednostih fPSA.

Preglednica XVIII: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs80130819

rs80130819						
Spremenljivka	RAK			BHP		
	alel A (N = 34)	alel C (N = 2)	P	alel A (N = 52)	alel C (N = 10)	P
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	5,65 $\pm$ 2,22	8,64 $\pm$ 1,70	0,133	4,32 $\pm$ 1,95	5,20 $\pm$ 2,07	0,221
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,92 $\pm$ 0,60	0,81 $\pm$ 0,58	0,667	<b>0,72 <math>\pm</math> 0,44</b>	<b>0,91 <math>\pm</math> 0,26</b>	<b>0,027</b>
proPSA [ng/L]	<b>21,02 <math>\pm</math> 26,00</b>	<b>6,31 <math>\pm</math> 3,47</b>	<b>0,029</b>	11,09 $\pm$ 6,22	11,85 $\pm$ 4,08	0,384
PHI	58,37 $\pm$ 51,52	34,71 $\pm$ 35,16	0,419	36,04 $\pm$ 22,14	31,78 $\pm$ 7,84	0,916
Starost [let]	69,56 $\pm$ 6,73	69,50 $\pm$ 3,54	0,813	65,02 $\pm$ 6,40	65,00 $\pm$ 8,21	0,666
%fPSA	16,80 $\pm$ 11,19	8,89 $\pm$ 4,96	0,178	17,01 $\pm$ 6,55	19,87 $\pm$ 8,76	0,491
%proPSA	2,45 $\pm$ 2,17	1,25 $\pm$ 1,33	0,317	1,82 $\pm$ 1,03	1,37 $\pm$ 0,57	0,151

V naši raziskavi smo ugotovili, da pri rs76934034 obstajajo statistično pomembne razlike v vrednostih PHI in %proPSA pri bolnikih z rakom prostate. Za ostale spremenljivke statistično pomembnih razlik nismo dokazali. Prav tako nismo našli nobene statistično pomembne razlike v skupini z BHP.

Preglednica XIX: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs76934034

rs76934034						
Spremenljivka	RAK			BHP		
	alel C (N = 8)	alel T (N = 28)	P	alel C (N = 7)	alel T (N = 52)	P
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	5,89 $\pm$ 2,30	5,80 $\pm$ 2,32	0,837	4,75 $\pm$ 2,81	4,45 $\pm$ 1,93	0,936
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,88 $\pm$ 0,36	0,93 $\pm$ 0,64	0,614	0,90 $\pm$ 0,32	0,72 $\pm$ 0,43	0,121
proPSA [ng/L]	12,85 $\pm$ 8,31	22,63 $\pm$ 28,44	0,135	13,14 $\pm$ 3,77	10,84 $\pm$ 6,07	0,110
<b>PHI</b>	<b>35,77 <math>\pm</math> 17,95</b>	<b>63,90 <math>\pm</math> 55,26</b>	<b>0,033</b>	31,74 $\pm$ 10,71	35,08 $\pm$ 19,53	0,810
Starost [let]	69,75 $\pm$ 7,17	69,68 $\pm$ 6,38	0,780	67,00 $\pm$ 7,14	64,90 $\pm$ 6,68	0,542
%fPSA	16,08 $\pm$ 7,35	16,56 $\pm$ 11,98	0,985	21,73 $\pm$ 7,42	16,85 $\pm$ 6,83	0,090
<b>%proPSA</b>	<b>1,51 <math>\pm</math> 0,73</b>	<b>2,67 <math>\pm</math> 2,34</b>	<b>0,027</b>	1,53 $\pm$ 0,13	1,73 $\pm$ 0,90	0,621



Za rs115306967 in rs4054823 nismo z uporabo statističnih testov našli nobenih statistično pomembnih razlik v laboratorijskih vrednostih med pacienti z rakom ali BHP (preglednici XX in XXI).

Preglednica XX: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs115306967

rs115306967						
Spremenljivka	RAK			BHP		
	alel C (N = 17)	alel G (N = 20)	P	alel C (N = 26)	alel G (N = 36)	P
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	6,00 $\pm$ 2,12	5,58 $\pm$ 2,42	0,283	4,47 $\pm$ 2,00	4,46 $\pm$ 2,00	0,819
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,88 $\pm$ 0,52	0,93 $\pm$ 0,65	0,988	0,77 $\pm$ 0,52	0,73 $\pm$ 0,33	0,764
proPSA [ng/L]	25,36 $\pm$ 34,71	15,74 $\pm$ 11,71	0,341	11,08 $\pm$ 5,31	11,31 $\pm$ 6,37	0,966
PHI	67,03 $\pm$ 68,10	48,83 $\pm$ 25,80	0,557	34,88 $\pm$ 17,85	35,69 $\pm$ 22,49	0,989
Starost [let]	68,65 $\pm$ 7,33	70,20 $\pm$ 5,77	0,497	64,00 $\pm$ 6,23	65,75 $\pm$ 6,92	0,191
%fPSA	14,69 $\pm$ 5,59	17,72 $\pm$ 13,94	0,684	17,40 $\pm$ 6,96	17,53 $\pm$ 7,05	0,842
%proPSA	2,82 $\pm$ 2,87	2,04 $\pm$ 1,09	0,798	1,73 $\pm$ 0,83	1,75 $\pm$ 1,08	0,943

Preglednica XXI: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs4054823

rs4054823						
Spremenljivka	RAK			BHP		
	alel C (N = 23)	alel T (N = 14)	P	alel C (N = 46)	alel T (N = 16)	P
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	5,58 $\pm$ 2,33	6,10 $\pm$ 2,20	0,298	4,30 $\pm$ 1,92	4,93 $\pm$ 2,14	0,307
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,89 $\pm$ 0,61	0,94 $\pm$ 0,56	0,722	0,68 $\pm$ 0,31	0,92 $\pm$ 0,61	0,303
proPSA [ng/L]	20,20 $\pm$ 30,61	20,10 $\pm$ 12,77	0,344	10,81 $\pm$ 5,10	12,37 $\pm$ 7,91	0,474
PHI	58,12 $\pm$ 61,55	55,67 $\pm$ 22,36	0,284	37,00 $\pm$ 21,47	30,61 $\pm$ 17,26	0,319
Starost [let]	68,43 $\pm$ 5,11	66,48 $\pm$ 8,19	0,138	64,54 $\pm$ 6,71	66,38 $\pm$ 6,48	0,468
%fPSA	16,92 $\pm$ 13,00	15,34 $\pm$ 6,45	0,889	16,95 $\pm$ 6,61	18,99 $\pm$ 7,89	0,368
%proPSA	2,48 $\pm$ 2,63	2,27 $\pm$ 0,76	0,588	1,85 $\pm$ 1,01	1,45 $\pm$ 0,83	0,135

Pri rs1447295 smo ugotovili, da pri pacientih z BHP obstajajo statistično pomembne razlike v laboratorijskih vrednostih proPSA. Vrednosti proPSA se razlikujejo, če ima posameznik alel A oz. alel C. Pri pacientih z rakom nismo odkrili nobenih statistično pomembnih razlik.

Preglednica XXII: Prikaz povprečnih vrednosti spremenljivk v skupinah RAK in BHP za alela rs1447295

rs1447295						
Spremenljivka	RAK			BHP		
	alel A (N = 6)	alel C (N = 31)	P	alel A (N = 10)	alel C (N = 52)	P
PSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	5,26 $\pm$ 2,58	5,87 $\pm$ 2,24	0,342	3,68 $\pm$ 1,75	4,61 $\pm$ 2,00	0,353
fPSA [ $\mu\text{g/L}$ ]	0,58 $\pm$ 0,14	0,97 $\pm$ 0,62	0,125	0,55 $\pm$ 0,32	0,78 $\pm$ 0,43	0,073
<b>proPSA [ng/L]</b>	13,79 $\pm$ 5,10	21,39 $\pm$ 27,27	0,825	<b>8,16 <math>\pm</math> 4,25</b>	<b>11,80 <math>\pm</math> 6,03</b>	<b>0,034</b>
PHI	53,33 $\pm$ 18,28	57,94 $\pm$ 54,20	0,857	30,87 $\pm$ 12,11	36,21 $\pm$ 21,75	0,745
Starost [let]	67,83 $\pm$ 5,57	69,81 $\pm$ 6,69	0,408	63,80 $\pm$ 5,57	62,25 $\pm$ 6,85	0,631
%fPSA	11,96 $\pm$ 3,08	17,17 $\pm$ 11,68	0,147	16,98 $\pm$ 6,80	17,76 $\pm$ 7,01	0,503
%proPSA	2,51 $\pm$ 1,00	2,38 $\pm$ 2,27	0,385	1,82 $\pm$ 0,89	1,73 $\pm$ 1,00	0,515

## 5 RAZPRAVA

### 5.1 KAKOVOST IN KOLIČINA IZOLIRANE DNA

Spektrofotometrično smo ugotovili, da je 14 vzorcev (11,8 %) vsebovalo prenizko koncentracijo DNA, da bi lahko z njimi nadaljevali postopek genotipizacije. Z meritvijo  $A_{260}/A_{280}$  smo preverili, kakšna je onesnaženost izolirane DNA s proteini. Kljub nižjemu razmerju  $A_{260}/A_{280}$  smo imeli še vedno 89,0 % (N = 106) vzorcev v območju med 1,5 in 2,0, kar pomeni, da je imela večina naših vzorcev zadovoljivo čistočo. Z meritvijo  $A_{260}/A_{230}$  smo preverili prisotnost ostalih nečistoč (npr. peptidov, kaotropnih soli, fenolov in ostalih aromatskih komponent, ki absorbirajo pri 230 nm). Tudi tu se večina vzorcev (79 %, N = 95) nahaja v zgornjih območjih merjenja, saj vrednosti  $A_{260}/A_{230}$  znašajo med 1 in 2. Rezultati potrjujejo kontaminacijo z nečistočami, saj večina vzorcev ne zadosti literaturnim zahtevam, da naj bi vrednosti  $A_{260}/A_{230}$  in  $A_{260}/A_{280}$  znašale  $> 1,8$  (45).

Na pridobljene rezultate je lahko vplival napačen postopek odvzema sline že na začetku, tj. da so pacienti manj kot pol ure pred odvzemom pili, jedli, kadili oz. žvečili, s čimer so vzorci vsebovali dodatno količino nečistoč. Prav tako so bili vzorci odvzetih slin različnih volumnov, barve in konsistence, kar smo opazili pred postopkom izolacije DNA. Tudi med samim postopkom izolacije DNA smo lahko v primerih prenosa supernatanta s seboj prenesli nečistoče oz. za seboj nehote pustili ostanke organskih topil (npr. EtOH).

Nizka koncentracija DNA lahko nakazuje tudi na možnost, da DNA ni bila uspešno izolirana oz. je ostala prilepljena na steni mikrocentrifugirke in bila po pomoti v večini zavržena. Velika večina vzorcev (9 od 14), ki jih zaradi prenizke koncentracije DNA nismo uspeli genotipizirati, je vsebovala spodnjo mejno vrednost zahtevane količine sline, to je 1 mL.

Izolacije DNA nismo mogli ponoviti, saj smo imeli na voljo le en vzorec sline za vsakega posameznika. Za boljše rezultate bi bila potrebna optimizacija postopka oz. odvzem alternativnega vzorca krvi, kar pa je invaziven postopek, čemur smo se v naši študiji hoteli izogniti.

Če rezultate izolacije DNA iz sline primerjamo z rezultati, ki jih je leta 2007 predstavil Hansen s sodelavci z enakimi metodami, lahko zaključimo, da so bile DNA iz naših vzorcev uspešno določene, saj so bile tudi v njihovem primeru koncentracije DNA nizke

(52). Pri 72 vzorcih so določili povprečno koncentracijo DNA 108 ng/ $\mu$ L, medtem ko je pri naših 119 vzorcih znašala 121,84 ng/ $\mu$ L. Povprečje absorbanca  $A_{260}/A_{280}$  je v primerjalni raziskavi znašalo 1,63, v našem primeru pa 1,69. Za  $A_{260}/A_{230}$  so določili povprečje 0,80, medtem ko so bile naše meritve malo boljše, saj smo izmerili povprečje  $A_{260}/A_{230}$  1,24. Prav tako kot v opisani študiji lahko tudi za našo raziskavo zaključimo, da se vzorci slin lahko uporabijo kot alternativa vzorcem krvi, saj z njimi pridobimo zadovoljivo kakovost izolirane DNA za nadaljnjo obdelavo.

## 5.2 KASP GENOTIPIZACIJA

Odločili smo se, da bomo za genotipizacijo uporabili metodo KASP, saj je cenovno ugodnejša in omogoča večje število genotipizacij kot nekatere druge metode. Pri izvedbi genotipizacije smo najprej uporabili standardni KASP protokol, ki vključuje 10 ciklov »touchdown« PCR reakcije (od 61 °C do 55 °C, s postopnim zniževanjem T za 0,6 °C/cikel) in 26 ciklov standardne dvostopenjske reakcije PCR pri nižji T prileganja (55 °C). Kljub temu da protokol zaradi »touchdown« tehnologije zagotavlja večjo specifičnost in učinkovitost reakcije, se je v našem primeru pri vseh 5 polimorfizmih zgodilo, da se vzorci niso lepo porazdelili v skupke (angl. *cluster*), da bi lahko natančno določili genotip vsakemu vzorcu.

Do opisane situacije je prišlo najverjetneje zaradi tega, ker določeni vzorci niso razvili zadostnega števila amplikonov in je bil končni signal zaradi tega nejasen. Zato smo se po priporočilih proizvajalca odločili za optimizacijo metode in v reakcijo na koncu vključili še 3 dodatne PCR cikle. Po vključitvi dodatnih 3 ciklov smo dobili jasnejšo razporeditev (slike 14–18). Kjer so se rožnato obarvani vzorci nahajali v neposredni bližini določenega skupka vzorcev, smo jih združili skupaj z njimi in tako vzorcem določili genotip. Kljub optimizaciji reakcije pa še vedno pri največ pet vzorcih genotipizacija ni uspela. Vzrok za neuspeh določanja genotipa pripisujemo slabi kakovosti izolirane DNA oz. prisotnosti nečistoč v vzorcih, ki močno motijo uspešnost genotipizacije. Vsi neuspeli vzorci so imeli razmeroma nizke vrednosti  $A_{260}/A_{230}$  in  $A_{260}/A_{280}$ . Prav tako se je lahko pri neuspehih vzorcih zgodilo, da se alelni-specifični začetni oligonukleotidi niso vezali na pravo mesto v zaporedju DNA, če le-ta vsebuje podobno zaporedje še na katerem drugem mestu oz. je okolica SNP preprečevala vezavo alelni-specifičnega začetnika (50). Da bi se prepričali o

morebitnih vzrokih neuspeha, bi lahko reakciji dodali število ciklov ali genotipizacijo ponovili z uporabo druge metode, npr. TaqMan.

Po končani genotipizaciji smo za vsak SNP združili podatke o pogostosti genotipov v sliko 19. Naše rezultate smo primerjali s tistimi, ki jih najdemo za evropsko populacijo v podatkovni bazi Ensembl (40), kjer so na podlagi številnih študij zbrani podatki o frekvencah genotipov. Ugotovili smo, da se frekvence genotipov v naši populaciji preiskovancev bistveno ne razlikujejo od evropske, saj zasledimo podobne vrednosti pri vseh petih preiskovanih polimorfizmih. Genotipi, ki se nahajajo v naši preiskovani skupini v večini, so prav tako v večini zastopani v širši evropski populaciji. Primerjava naših rezultatov s podatkovno bazo je prikazana v preglednici XXIII. Zaključimo lahko, da rezultati porazdelitve genotipov v naši populaciji po pričakovanih predstavljajo povprečno evropsko populacijo.

Preglednica XXIII: Prikaz porazdelitve genotipskih frekvenc v naši preiskovani skupini in splošni evropski populaciji za vseh 5 polimorfizmov

SNP	GENOTIP	RAK IN BHP	EVROPSKA POPULACIJA
<b>rs80130819</b>	AA	86,4 %	85,3 %
	AC	12,6 %	13,3 %
	CC	1,0 %	1,4 %
<b>rs76934034</b>	TT	85,0 %	87,1 %
	CT	12,0 %	12,3 %
	CC	3,0 %	0,6 %
<b>rs115306967</b>	GG	57,7 %	50,1 %
	CG	33,6 %	39,6 %
	CC	8,7 %	10,3 %
<b>rs4054823</b>	TT	29,8 %	29,8 %
	CT	45,2 %	51,1 %
	CC	25,0 %	19,1 %
<b>rs1447295</b>	CC	84,6 %	81,5 %
	AC	15,4 %	16,5 %
	AA	0,0 %	2,0 %

## 5.3 KLINIČNI PODATKI IN ZNAČILNOSTI PREISKOVANCEV

Vključitveni kriteriji za nabor naših pacientov so zahtevali koncentracije PSA med 2 in 10 µg/L (v naši raziskavi imamo razpon koncentracije PSA med 1,18 µg/L in 10,74 µg/L). Številne študije navajajo, da so vrednosti PSA med 2,7 in 10,0 µg/L tiste, kjer je specifičnost PSA testa razmeroma slaba in se zato nanj ne moremo zanesti. Prav tako tudi velja, da vrednost PSA, ki je znotraj referenčnih, ne izključuje možnosti pojava raka prostate (29). Območje PSA med 2 in 10 µg/L, imenovano tudi »siva cona«, je bilo zato uporabljeno v naši raziskavi, saj je interpretacija takšnih izvidov težavna in so preiskovanci s temi vrednostmi najbolj dovzetni za lažno pozitivne oz. lažno negativne rezultate (28). V raziskavo smo poleg PSA zato vključili tudi druge parametre (fPSA, proPSA, PHI, %fPSA, %proPSA), ki bi nam z večjo specifičnostjo pomagale razlikovati med obema skupinama. Za vse vključene preiskovance velja, da jim je bila predhodno potrjena diagnoza z opravljenim histološkim in digitalnim rektalnim pregledom ter transrektalnim ultrazvokom. V skupino bolnikov z rakom prostate smo namerno priključili tudi paciente z diagnosticirano prostatično intraepitelijsko neoplazijo visoke stopnje (HGPIIN – angl. *High grade prostatic intraepithelial neoplasia*) (N = 7), saj HGPIIN predstavlja prekursorško lezijo za pojav raka prostate. Prav tako kot karcinom se pojavlja v periferni coni prostate. Za paciente s HGPIIN velja, da imajo visoko stopnjo tveganja (41,8 %), da jim ob naslednji biopsiji diagnosticirajo raka (53). V drugo skupino, ki smo jo poimenovali BHP, smo vključili paciente z BHP, od katerih imajo nekateri pridruženo še vnetje ali atrofijo. Za BHP in ostala obolenja do sedaj še ni bilo dokazanih povezav, ki bi nakazovale, da lahko vodijo v pojav raka prostate (1, 54). Opisana razdelitev pacientov na dve skupini (maligna in nemaligna obolenja) se nam je zato zdela primerna za raziskavo.

V preglednici XI smo med skupinama RAK in BHP primerjali povprečne vrednosti posameznih spremenljivk. Rezultati Mann-Whitneyjevega testa so pokazali statistično pomembne razlike med skupinama v vrednostih PSA (P = 0,03), proPSA (P = 0,03), PHI (P = 0,000), starosti (P = 0,001) in %proPSA (P = 0,014). Na podlagi testa smo za našo populacijo ugotovili, da imajo pacienti z rakom prostate višje vrednosti PSA, proPSA, PHI in %proPSA, nenazadnje pa so bolniki z rakom tudi malo starejši od tistih z BHP.

V študiji iz leta 2014 so Lazzeri in sodelavci ugotavljali razlike med posamezniki v enakih spremenljivkah kot v naši skupini, poleg tega so v nasprotju z našo raziskavo med skupinami primerjali tudi volumen prostate in volumen adenoma (55). Podobno kot mi so določili statistično pomembno razliko v vrednostih %proPSA ( $P < 0,0001$ ) in PHI ( $P < 0,0001$ ) med posamezniki z rakom in BHP. V objavljeni študiji so prav tako ugotovili, da imajo posamezniki z rakom višje vrednosti %proPSA in PHI kakor pacienti z BHP. Rezultate so prikazali v obliki srednjih vrednosti (mediane) in razpona podatkov za posamezno spremenljivko. To študijo lahko deloma primerjamo z našo raziskavo, saj so Lazzeri in sodelavci v raziskavo vključili posameznike s koncentracijo PSA med 4 in 10 ng/mL, medtem ko smo mi zajeli tudi nekaj nižjih vrednosti. Poleg tega so v študiji posameznike razdelili v skupine s kroničnim prostatitisom ( $N = 73, 27,3 \%$ ), BHP ( $N = 93, 34,8 \%$ ) in rakom prostate ( $N = 101, 37,8 \%$ ), medtem ko smo mi v skupino z BHP priključili tudi posameznike z vnetjem in atrofijo, v skupino RAK pa priključili še posameznike s HGPIN.

Jung in sodelavci so leta 2000 objavil študijo, v kateri so podobno kot mi ugotovili, da so imeli rakavi bolniki statistično višje vrednosti PSA ter nižje vrednosti %fPSA kot pacienti z BHP ( $P < 0,001$ ). V študiji je imela večina pacientov z rakom in BHP koncentracije PSA med 2,01 in 10  $\mu\text{g/L}$  (56).

## **5.4 POVEZAVA POLIMORFIZMOV S KLINIČNIMI PODATKI PREISKOVANCEV**

### **5.4.1 ZASTOPANOST ALELOV V SKUPINI RAK IN BHP**

V preglednico XII smo združili podatke o frekvencah genotipov in alelov glede na skupino z rakom in BHP. Za vseh 5 polimorfizmov smo uspeli dokazati, da so genotipske frekvence v Hardy-Weinbergovem ravnotežju ( $P \geq 0,05$ ).

Za rs80130819 smo ugotovili, da je v obeh skupinah pogosteje zastopan alel A, medtem ko se alel C nahaja v manjšini. Pri rs76934034 je v obeh skupinah v večini alel T in pri rs115306967 alel G, medtem ko se alel C nahaja v manjšini za oba omenjena SNP. Za rs1447295 smo v obeh skupinah določili večjo zastopanost alela C in manjšo pri alelu A.

Le pri rs4054823 sta bila večinska alela različna, in sicer smo v skupini RAK določili več primerov alela T, medtem ko je bil v skupini BHP bolj izražen alel C.

Z uporabo Fisherjevega testa (preglednica XII) nismo uspeli dokazati statistično pomembnih razlik med skupinama (vrednost P je povsod višja od 0,05). Na podlagi naših rezultatov lahko zaključimo, da nobeden izmed alelov ni pogostejši v skupini RAK ali BHP. To pomeni, da se relativne frekvence posameznih alelov v obeh skupinah ne razlikujejo in zato ne moremo trditi, da prisotnost določenega alela vpliva na pojav raka ali BHP. Predhodno opisane trditve veljajo za vseh 5 preiskovanih SNP (rs80130819, rs76934034, rs115306967, rs1447295, rs4054823).

V meta analizi, objavljeni oktobra 2014, so z uporabo študij GWA uspeli dokazati statistično pomembne razlike v pogostosti alelov pri 23 polimorfizmih, od katerih smo 3 izmed njih uporabili tudi v naši raziskavi. V objavljeni analizi so med seboj primerjali frekvence alelov pri pacientih z rakom (N = 35 093) in kontrolno skupino (N = 34 599).

V primerjavi objavljenega članka z našo raziskavo smo ugotovili, da se v večini pojavljajo isti aleli kot v naši raziskavi. Relativne frekvence alelov v objavljenem članku so bile sledeče: rs80130819 – alel A 91 %; rs76934034 – alel T 91 %; rs115306967 – alel G 65 % (38).

Za rs1447295 so v švedski študiji iz leta 2008 v skupini z rakom določili 17 % zastopanost alela A (42), medtem ko je bil v študiji, izvedeni na avstralski populaciji, delež A alela višji (27,5 %) (43). Zastopanosti alela A sta v obeh študijah višji od vrednosti, ki smo jih določili v naši preiskovani skupini (8,1 %).

Prav tako smo za rs4054823 našli primerjavo s študijo iz leta 2009, kjer so podobno kot mi ugotovili, da je pri rakavih bolnikih alel T bolj izražen (56 % pri pacientih z agresivnim in 54 % pri pacientih z neagresivnim rakom) (41).

Zaključimo lahko, da so relativne frekvence alelov pri rakavih bolnikih, ki smo jih dobili v naši raziskavi, primerljive z drugimi po svetu. Statistično pomembnih razlik v naši raziskavi nismo uspeli dokazati zaradi tega, ker smo skupino z rakom primerjali s skupino, ki ima BHP. Ugotovili smo, da so aleli med pacienti z rakom in BHP prisotni v skoraj enakih relativnih deležih. Študije GWA, kjer bi med seboj primerjali paciente z rakom in benigno hiperplazijo prostate, do sedaj še ni objavljene.



## 5.4.2 OCENA VPLIVA ALELOV NA VREDNOSTI SPREMENLJIVK

Pri ugotavljanju genetskega vpliva na vrednosti PSA in ostalih spremenljivk smo se najprej odločili, da vse preiskovance razdelimo samo glede na alel in ne po benigni oz. maligni hiperplaziji prostate. Z uporabljenimi razdelitvijo smo želeli preveriti, ali določen alel brez vnaprej postavljene diagnoze značilno vpliva na vrednosti PSA in ostalih spremenljivk. Torej smo tu upoštevali samo to, da smo v testiranje vključili preiskovance s PSA vrednostmi med 2 in 10 ng/mL. V preglednice od XIII do XVII smo nanizali srednje vrednosti (povprečna vrednost  $\pm$  SD) spremenljivk v odvisnosti od alela za vsak polimorfizem.

Pri rs80130819 smo ugotovili, da obstaja statistično pomembna razlika v vrednosti %proPSA ( $P = 0,041$ ). Pacienti z alelom A imajo v povprečju višje vrednosti %proPSA. Pri ostalih spremenljivkah statistično pomembnih razlik nismo uspeli dokazati, vendar lahko vseeno opazimo trend višjih vrednosti proPSA in PHI ter nižje vrednosti fPSA in %fPSA pri alelu A, zaradi česar bi lahko sklepali, da je alel A tisti, ki vpliva na višje/nižje vrednosti posameznih spremenljivk.

Pri rs76934034, rs115306967 in rs4054823 statistično pomembnih razlik nismo uspeli dokazati pri nobeni od spremenljivk. Vrednosti  $P$  so v vseh primerih znašale  $\geq 0,05$ .

Pri rs1447295 smo statistično pomembno razliko dokazali v vrednostih fPSA ( $P = 0,017$ ). Pacienti z alelom A imajo namreč nižje vrednosti fPSA kakor tisti z alelom C. Pri ostalih spremenljivkah za rs1447295 nismo dokazali nobenih statistično pomembnih razlik.

Samo na podlagi te razdelitve bi lahko zaključili, da alel A pri rs80130819 in alel A pri rs1447295 statistično pomembno vplivata na vrednosti določenih spremenljivk, medtem ko pri rs76934034, rs115306967 in rs4054823 nismo uspeli najti nobenih statistično pomembnih razlik v vrednostih spremenljivk, ki bi lahko določen alel označile kot tvegan.

V nadaljevanju nas je zanimalo, ali lahko dokažemo več statistično pomembnih razlik, če uporabimo dodatno razdelitev pacientov glede na njihov histološki izvid. Prejšnji razdelitvi posameznikov samo na alele smo sedaj dodali še vpliv benigne oz. maligne hiperplazije in rezultate zbrali v preglednicah od XVIII do XXII. Naše mnenje je, da nam takšna razdelitev omogoča veliko bolj reprezentativne rezultate, saj smo na podlagi delitve preiskovancev na RAK in BHP s statističnimi testi dobili tudi več statistično pomembnih

razlik. Rezultate teh meritev smo zato obravnavali z večjo težnjo in na njihovi podlagi izoblikovali končne ugotovitve.

Pri rs80130819 smo z dodatno razdelitvijo dokazali statistično pomembno razliko v vrednostih proPSA pri pacientih z rakom. Izkazalo se je, da imajo rakavi bolniki z alelom A veliko višje vrednosti proPSA od tistih z alelom C ( $P = 0,029$ ). Pri ostalih spremenljivkah znotraj skupine RAK statistično pomembnih razlik nismo uspeli dokazati. V skupini BHP se je za edino statistično pomembno razliko izkazala vrednost fPSA ( $P = 0,027$ ). Pacienti z alelom A so imeli v povprečju nižje vrednosti fPSA v primerjavi s pacienti z alelom C.

Z uvedbo dodatne razdelitve pacientov smo ugotovili, da je pri rs80130819 alel A tisti, ki povzroča višje vrednosti proPSA pri pacientih z rakom in nižje vrednosti fPSA pri pacientih z BHP in ga lahko označimo kot tvegani alel.

Pri rs76934034 smo znotraj skupine z rakom dokazali dve statistično pomembni razliki, in sicer v vrednostih PHI ( $P = 0,033$ ) in %proPSA ( $P = 0,027$ ). Pacienti z alelom T so imeli v povprečju višje vrednosti PHI in %proPSA. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da se pri rakavih bolnikih prisotnost alela T odraža v višjih vrednostih PHI in %proPSA. Znotraj skupine z BHP nismo uspeli dokazati statistično pomembnih razlik.

Pri rs115306967 in rs4054823 nismo uspeli dokazati statistično pomembnih razlik niti v skupini z rakom niti v skupini z BHP. To pomeni, da nobeden izmed alelov značilno ne povzroča višjih oz. nižjih vrednosti posameznih spremenljivk v obeh skupinah.

Pri rs1447295 v skupini z rakom nismo uspeli dokazati statistično pomembne razlike pri nobeni spremenljivki. V skupini z BHP pa se je kot statistično pomembna izkazala razlika v vrednosti proPSA ( $P = 0,034$ ). Pacienti z BHP in alelom C so imeli v povprečju višje vrednosti proPSA v primerjavi s pacienti z alelom A. Na podlagi statističnih rezultatov lahko zaključimo, da pri pacientih z rakom prisotnost enega ali drugega alela ne vpliva na razlike v vrednostih spremenljivk, medtem ko pri pacientih z BHP genetsko ozadje (alel C) pomembno vpliva na razlike vrednosti proPSA. To pomeni, da bodo imeli pacienti z BHP višje vrednosti proPSA, če imajo v svojem genetskem zapisu na lokaciji rs1447295 alel C.

V do sedaj objavljenih študijah so bili rezultati vedno prikazani v obliki števila (N) ali relativne frekvence (%) posameznikov v skupini pacientov z rakom in kontrolnimi primeri – te vrednosti so raziskovalci med seboj primerjali, ugotavljali statistično pomembne

razlike in glede na rezultat napovedali tvegani alel za različne SNP (19, 39, 41, 42). V naši raziskavi smo skušali te ugotovitve podkrepiti tudi s povezavo tveganih alelov na višje vrednosti PSA, proPSA in PHI ter nižje vrednosti fPSA za skupino pacientov z rakom.

Za rs80130819 velja, da je tvegani alel pri raku prostate alel A (20). Tudi v naši raziskavi smo uspeli dokazati, da ravno alel A vpliva na višje vrednosti proPSA v skupini RAK.

V študijah velja, da je pri SNP rs76934034 tvegani alel T (20). Tudi za ta polimorfizem smo v naši raziskavi uspeli dokazati, da prisotnost alela T vpliva na višje vrednosti %proPSA in PHI.

Pri rs4054823 tveganje povzroča alel T, pri rs115306967 alel G in pri rs1447295 alel A (39, 41, 42). V naši raziskavi za skupino RAK nismo uspeli dokazati statistično pomembnih razlik v vrednosti spremenljivk za nobenega izmed alelov v primerih rs4054823, rs115306967 in rs1447295.

Naših rezultatov o vplivih alelov na vrednosti spremenljivk (kadar posameznike delimo na podlagi histološkega izvida ali pa jih uporabimo kot celoto) nismo uspeli primerjati z nobenimi ostalimi rezultati, saj nismo našli študij, kjer bi se raziskovalci osredotočali na takšne pogoje, kot smo si jih zastavili mi.

Pomembno je izpostaviti tudi dejstvo, da imamo v naši populaciji v določenih primerih izredno nizko število posameznikov, kar bistveno vpliva na končni rezultat. Prav tako smo skupino bolnikov z rakom primerjali s skupino bolnikov z BHP, zaradi česar se je morda pokazalo manj sprememb, kot če bi imeli na voljo tudi kontrolno skupino. V prihodnosti bi bilo zato potrebno študijo ponoviti na večjem številu preiskovancev in vključiti tudi kontrolno skupino.

## 6 SKLEPI

Na podlagi naših rezultatov smo oblikovali spodnje zaključke.

- Slina je primeren vzorec za izolacijo DNA in se lahko tudi v prihodnje uporablja za genetske preiskave.
- Genotipske frekvence pri vseh 5 preiskovanih polimorfizmih v slovenski populaciji ne odstopajo od frekvenc v drugih evropskih populacijah.
- Pacienti z rakom prostate so imeli značilno višje vrednosti PSA, proPSA, PHI in %proPSA.
- Genotipske frekvence so za vseh 5 polimorfizmov sledile Hardy-Weinbergovemu ravnotežju ( $P \geq 0,05$ ).
- Pogostost alelov je podobna v obeh skupinah bolnikov, zato ne moremo trditi, da je prisotnost določenega alela značilna za pojav raka ali BHP.
- Polimorfizem rs80130819 je bil povezan z vrednostmi proPSA in fPSA. Bolniki z alelom A in rakom prostate so imeli značilno višje vrednosti proPSA. Pri bolnikih z BHP in alelom C pa smo dokazali značilno višje vrednosti fPSA.
- Polimorfizem rs76934034 je bil značilno povezan z vrednostmi PHI in %proPSA v skupini bolnikov z rakom prostate ne pa tudi v skupini BHP. Pri tem se je prisotnost alela T odražala v višjih vrednostih PHI in %proPSA.
- Polimorfizma rs115306967 in rs4054823 nista izkazala povezanosti s parametri PSA niti v skupini z rakom niti v skupini z BHP.
- Pri polimorfizmu rs1447295 smo dokazali povezanost s proPSA v skupini bolnikov z BHP ne pa tudi pri bolnikih z rakom prostate. Pacienti BHP z alelom C so imeli v povprečju višje vrednosti proPSA v primerjavi s pacienti z alelom A.

Prvo hipotezo lahko na podlagi rezultatov ovržemo, saj nismo uspeli dokazati statistično pomembne razlike v alelnih frekvencah med skupinama bolnikov.

Drugo hipotezo lahko le deloma potrdimo, saj pri dveh od petih preiskovanih polimorfizmov nismo uspeli dokazati, da prisotnost enega ali drugega alela vpliva na vrednosti PSA, fPSA, proPSA, PHI, %fPSA in %proPSA pri bolnikih z malignim ali benignim obolenjem.

V prihodnosti bi bilo potrebno izvesti raziskavo na večjem številu preiskovancev s širšim območjem koncentracije PSA ter z oceno sočasnega vpliva več polimorfizmov hkrati. Na osnovi teh dokazov bo nato potrebno s funkcijskimi študijami in celičnimi modeli raziskati in proučiti mehanizme, ki so odgovorni za maligno oz. benigno hiperplazijo tkiva prostate. S pomočjo odkritih mehanizmov bo mogoče prepoznati nove terapevtske in diagnostične tarče za ti dve patološki stanji.

## 7 LITERATURA

1. National Cancer Institute at the National Institutes of Health: What You Need To Know About™ Prostate Cancer. Dostopno na spletni strani: <http://www.cancer.gov/publications/patient-education/wyntk-prostate-cancer> (29. 9. 2015).
2. Mangera A, Osman NI, Chapple CR: Anatomy of the lower urinary tract. *Surgery* 2013; 31: 319–325.
3. Slika anatomije prostate. Dostopno na spletni strani: <http://www.fairview.org/healthlibrary/Article/87095> (1. 10. 2015).
4. Histološka slika prostate. Dostopno na spletni strani: <http://www.histology-world.com/photoalbum/displayimage.php?pid=4596&fullsize=1> (1. 10. 2015).
5. Kmetec A: Benigna hiperplazija prostate. *Farmacevtski vestnik*, 2011; 62: 77–80.
6. Alshahrani S, McGill J, Agarwal A: Prostatitis and male infertility. *Journal of Reproductive Immunology* 2013; 100: 30–36.
7. Slika posameznih delov prostate. Dostopno na spletni strani: <http://www.slideshare.net/edwong56/bph-edmond> (1. 10. 2015).
8. Schaeffer AJ: Epidemiology and Demographics of Prostatitis. *European Urology Supplements* 2003; 2: 5–10.
9. National Cancer Institute: Understanding Prostate Changes – A Health Guide for Men. Dostopno na spletni strani: <http://www.cancer.gov/types/prostate/understanding-prostate-changes/prostate-booklet.pdf> (5. 10. 2015).
10. Pavone-Macaluso M: Chronic Prostatitis Syndrome: A Common, but Poorly Understood Condition. Part II. *European Association of Urology* 2007; 5: 16–25.
11. Thiruchelvam N: Benign prostatic hyperplasia. *Surgery* 2014; 32: 314–322.
12. Thorpe A, Neal D: Benign prostatic hyperplasia. *The Lancet* 2003; 361: 1359–1367.
13. Slika benigne hiperplazije prostate. Dostopno na spletni strani: <http://urology.jhu.edu/prostate/bph.php> (5. 10. 2015).
14. Allkanjari O, Vitalone A: What do we know about phytotherapy of benign prostatic hyperplasia? *Life Sciences* 2015; 126: 42–56.
15. Kmetec A: Spletno gradivo za študente medicine – urologija: Bolezni prostate. Dostopno na spletni strani: [www.mf.uni-lj.si/dokumenti/cbcc469ebe4393d9d00303eacb921a75.pdf](http://www.mf.uni-lj.si/dokumenti/cbcc469ebe4393d9d00303eacb921a75.pdf) (5. 10. 2015).

16. SLORA –Slovenija in rak, Register raka RS: Osnovni epidemiološki podatki o raku, PROSTATA (C61). Dostopno na spletni strani: <http://www.slora.si/osnovni-podatki-o-posameznem-raku1> (16. 10. 2015).
17. Esfahani M, Ataei N, Panjehpour M: Biomarkers for Evaluation of Prostate Cancer Prognosis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2015; 16: 2601–2611.
18. Madu CO, Lu Y: Novel diagnostic biomarkers for prostate cancer. *Journal of Cancer* 2010; 1: 150–177.
19. Shen MM, Abate-Shen C: Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development* 2010; 24: 1967–2000.
20. National Cancer Institute: Genetics of Prostate Cancer – for health professionals(PDQ®) Dostopno na spletni strani: <http://www.cancer.gov/types/prostate/hp/prostate-genetics-pdq#section/all> (2. 11. 2015).
21. National Cancer Institute: Prostate-Specific Antigen (PSA) Test. Dostopno na spletni strani: <http://www.cancer.gov/types/prostate/psa-fact-sheet> (7. 10. 2015).
22. Urologija: Rak prostate. Dostopno na spletni strani: <http://urologija.si/nekategorizirano/rak-prostate/#3> (7. 10. 2015).
23. National Cancer Institute: Prostate Cancer treatment (PDQ®). Dostopno na spletni strani: <http://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq#section/all> (7. 10. 2015).
24. Ovčak Z: Vloga patologa pri diagnostiki karcinoma prostate. *Radiol Oncol* 2006; 40: S115–S120.
25. Montorini R, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Scarpelli M, Cheng L: The Gleason grading system: where are we now? *Diagnostic histopathology* 2011; 17: 419–427.
26. Dunn MW, Kazer MW: Prostate Cancer Overview. *Seminars in Oncology Nursing* 2011; 27: 241–250.
27. National Cancer Institute: Tumor Markers. Dostopno na spletni strani: <http://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/diagnosis/tumor-markers-fact-sheet> (8. 10. 2015).
28. Novaković S: Tumorski označevalci v klinični onkologiji. *Onkologija* 2000; 4: 8–14.
29. Osredkar J: Izbrana poglavja iz klinične kemije: učno gradivo za študente farmacije. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2008; 1: 114–119.

30. Velonas VM, Woo HH, Remedios CG, Assinder SJ: Current Status of Biomarkers for Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 2013; 14: 11034–11060.
31. Oblak C: Prostatični specifični antigen. *Onkologija* 2006; 1: 37–40.
32. Le BV, Griffin CR, Loeb S, Carvalhal GF, Kan D, Bauman NA, Catalona WJ: [-2]Proenzyme Prostate Specific Antigen is More Accurate Than Total and Free Prostate Specific Antigen in Differentiating Prostate Cancer From Benign Disease in a Prospective Prostate Cancer Screening Study. *The Journal of Urology* 2010; 183: 1355–1359.
33. Mlinarič-Raščan I: Farmakogenomika. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2010: 2–20, 45–60.
34. Shen W, Tian Y, Ran T, Gao Z: Genotyping and quantification techniques for single-nucleotide polymorphisms. *Trends in Analytical Chemistry* 2015; 69: 1–13.
35. Demichelis F, Stanford JL, M.P.H.: Genetic predisposition to prostate cancer: Update and future perspectives. *Urologic Oncology* 2015; 33: 75–84.
36. Choudhury AD, Eeles R, Freedland SJ, Isaacs WB, Pomerantz MM, Schalken JA, Tammela T L.J., Visakorpi T: The Role of Genetic Markers in the Management of Prostate Cancer. *European Association of Urology* 2012; 62: 577–587.
37. Hazelett DJ, Rhie SK, Gaddis M, Yan C et al.: Comprehensive Functional Annotation of 77 Prostate Cancer Risk Loci. *PLOS Genetics* 2014; 10: 1-21.
38. Al Olama AA, Kote-Jarai Z, Berndt SI, Conti DV in sod.: A meta-analysis of 87,040 individuals identifies 23 new susceptibility loci for prostate cancer. *Nat Genet* 2014; 46: 1103–1109.
39. Hamano T, Matsui H, Sekine Y, Ohtake N, Nakata S, Suzuki K: Association of SNP rs1447295 and Microsatellite Marker DG8S737 With Familial Prostate Cancer and High Grade Disease. *The Journal of Urology* 2010; 184: 738–742.
40. E! Ensembl. Dostopno na spletni strani: <http://www.ensembl.org/index.html> (10. 12. 2015)
41. Xu J, Zheng SJ, Isaacs SD, Wiley KE, Wiklund F, Sun J, Kader AK in sod.: Inherited genetic variant predisposes to aggressive but not indolent prostate cancer. *PNAS* 2010; 107: 2136–2140.
42. Zheng SL, Sun J, Wiklund F, Smith S in sod.: Cumulative Association of Five Genetic Variants with Prostate Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2008; 358: 910–919.



43. Severi G, Hayes VM, Padilla EJD, English DR, Southey MC, Southerland RL, Hopper JL, Giles GG: The common variant rs1447295 on chromosome 8q24 and prostate cancer risk: Results from an Australian population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16: 610–612.
44. Laboratory protocol for manual purification of DNA from whole sample. Dostopno na spletni strani: <http://www.dnagenotek.com/US/pdf/PD-PR-015.pdf> (7. 9. 2015).
45. NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.7 User's Manual. Dostopno na spletni strani: <http://www.nanodrop.com/library/nd-1000-v3.7-users-manual-8.5x11.pdf> (8. 9. 2015).
46. KASP Genotyping. Dostopno na spletni strani: <http://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/Products/Genotyping/kasp-explanation-fact-sheet.pdf> (8. 9. 2015).
47. Mehanizem reakcije KASP. Dostopno na spletni strani: <https://www.youtube.com/watch?v=Uq9HhmzOqUQ> (5.12.2015).
48. KASP genotyping chemistry User guide and manual. Dostopno na spletni strani: <http://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/Products/Genotyping/KASP-genotyping-chemistry-User-guide.pdf> (8.9.2015).
49. KASP thermal cycling conditions. Dostopno na spletni strani: <http://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/Products/Genotyping/KASP-thermal-cycling-conditions-all-protocols.pdf> (8. 9. 2015).
50. KASP troubleshooting guide. Dostopno na spletni strani: <http://www.lgcgroup.com/LGCGroup/media/PDFs/Products/Genotyping/KASP-troubleshooting-guide.pdf?ext=.pdf> (8. 9. 2015).
51. Wigginton JE, Cutler DJ, Abecasis GR: A note on exact test of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am. J. Hum. Genet.* 2005; 76: 887–893.
52. Hansen OT, Simonsen MK, Nielsen FC, Andresen Hundrup Y: Collection of Blood, saliva and buccal cell samples in a pilot study on the Danish nurse cohort: Comparison of the response rate and quality of genomic DNA. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007; 16(10): 2072–2076.
53. Singh PB, Nicholson CM, Ragavan N, Blades RA, Martin FL, Matanheila SS: Risk of prostate cancer after detection of isolated high-grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) on extended core needle biopsy: a UK hospital experience. *BMC Urology* 2009;3: 1–5.

54. Bostwick DG, Burke HB, Djakiew D, Euling S, Ho S, Landolph J, Morrison H, Sanawane B, Shifflett T, Waters DJ, Timms B: Human prostate cancer risk factors. *Cancer Supplement* 2004;101: 2371–2490.
55. Lazzeri M, Abrate A, Lughezzani G, Freschi M in sod.: Relationship of Chronic Histologic Prostatic Inflammation in Biopsy Specimens With Serum Isoform [-2]proPSA (p2PSA), %p2PSA, and Prostate Health Index in Men With a Total Prostate-specific Antigen of 4–10 ng/mL and Normal Digital Rectal Examination. *Urology* 2014;83: 606–612.
56. Jung K, Elgeti U, Lein M, Brux B, Sinha P in sod.: Ratio of Free or Complexed Prostate-specific Antigen (PSA) to Total PSA: Which Ratio Improves Differentiation between Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer? *Clinical Chemistry* 2000;46: 55–62.

## 8 PRILOGE

Priloga I: Rezultati merjenja koncentracije in  $A_{260}/A_{280}$  ter  $A_{260}/A_{230}$  za 119 vzorcev

Št. vzorca	Konc. DNA (ng/μl)	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$	Št. vzorca	Konc. DNA (ng/μl)	$A_{260}/A_{280}$	$A_{260}/A_{230}$
1	617,93	1,8	1,2	61	86,11	1,72	1,11
2	272,79	1,74	1,03	62	34,6	1,58	1,5
3	456,37	1,72	0,93	63	34,96	1,76	1,57
4	64,18	1,5	0,67	64	114,65	1,83	1,91
5*	4,7	0,99	0,53	65	21,67	1,69	1,27
6	28,84	1,76	0,8	66	66,5	1,8	1,76
7	320,73	1,81	1,13	67	121,26	1,78	1,41
8	203,14	1,89	1,35	68	75,92	1,74	1,13
9	129,6	1,68	0,93	69	70,7	1,76	1,36
10	911,76	1,84	1,22	70	26,92	1,73	1,96
11	235,18	1,8	1,19	71	35,28	1,42	0,53
12	125,82	1,74	1,12	72*	-1,85	0,9	1,66
13	49,16	1,59	0,58	73*	2,99	0,67	0,22
14	51,33	1,58	0,74	74	142,33	1,77	1,17
15	59,97	1,69	0,82	75	104,84	1,81	1,73
16	681,27	1,82	1,21	76*	6,16	1,28	1,33
17	102,87	1,8	1,64	77	292,23	1,71	0,93
18	26,81	1,7	1,29	78	75,55	1,77	1,29
19	153,66	1,71	0,99	79	75,77	1,79	1,34
20	28,09	1,64	1,01	80	23,18	1,51	0,87
21	95,24	1,85	1,19	81	170,69	1,84	1,61
22	74,44	1,84	1,12	82	21,87	1,56	0,9
23	64,07	1,78	1,07	83	171,86	1,86	1,3
24	332,96	1,76	1,01	84	29,98	1,67	1,48
25	322,86	1,92	1,29	85*	1,18	0,8	1,08
26	82,6	1,75	1,02	86	136,47	1,84	1,9
27	77,07	1,88	1,17	87*	8,81	1,25	0,49
28	80,03	1,73	0,96	88**	19,83	1,63	1,15
29	198,19	1,83	1,42	89	36,3	1,63	0,78
30	100,92	1,78	0,87	90	106,05	1,78	1,46
31*	3,58	1,59	0,45	91	30,85	1,63	1,18
32	112,67	1,88	1,94	92	21,71	1,66	1,84
33	119,9	1,79	1,31	93	20,17	1,65	1,33
34	153,15	1,79	1,3	94	32,34	1,61	1,86
35	63,68	1,74	1,58	95*	15,28	1,52	1,51
36	42,72	1,58	1,06	96	44,9	1,72	1,29
37	243,78	1,82	1,12	97	26,38	1,69	1,57
38	136,93	1,81	1,25	98	23,71	1,72	1,28
39	231,33	1,82	1,31	99	281,05	1,8	1,43
40	87,48	1,72	1,34	100	29,96	1,72	1,53
41	74,01	1,79	1,57	101*	12,34	1,49	1,11
42	102,99	1,75	1,45	102*	6,06	1,18	0,96
43	307,1	1,84	1,13	103*	10,32	1,38	1,56
44	199,08	1,76	1,29	104	90,44	1,82	1,77
45	215,92	1,77	1,01	105	25,71	1,47	0,51
46	107,82	1,74	1,03	106	192,05	1,89	1,85
47	73,98	1,84	1,47	107	60,68	1,78	1,6
48	103,69	1,73	1,21	108	94,09	1,83	1,6
49	443,44	1,87	1,3	109	156,43	1,88	1,36
50	146,47	1,91	1,33	110	85,77	1,79	1,38
51	110,11	1,83	1,55	111*	4,64	1,14	0,62
52	179,1	1,81	1,19	112*	19,23	1,57	0,67
53	49,95	1,73	1,19	113	68,03	1,72	1,32
54	276,67	1,83	1,4	114	49,31	1,67	0,92
55	136,99	1,91	1,62	115	109,67	1,83	1,53
56	270,06	1,84	1,25	116*	17,35	1,56	1,39
57	169,91	1,85	1,62	117	44,63	1,73	1,4
58	127,15	1,76	0,98	118	381,06	1,79	1,28
59	35,5	1,71	1,2	119	39,99	1,71	1,46
60	114,81	1,77	1,31	* 14 vzorcev, ki niso bili uporabljeni v genotipizaciji ** vzorec, ki je bil vseeno uporabljen, saj se je najbolj približal mejni vrednosti 20 ng/mL.			

Priloga II: Prikaz laboratorijskih meritev spremenljivk, histoloških izvidov in rezultatov genotipizacije za skupino RAK

Št. vzorca	Datum rojstva	Histološki izvid	PSA (µg/L)	fPSA (µg/L)	proPSA (ng/L)	PHI	%fPSA	%proPSA	rs80130819	rs76934034	rs115306967	rs1447295	rs4054823
2	21.10.1948	HGPIN	4,17	0,620	18,76	62,04	14,87	3,03	/	TT	CG	AC	CT
7	1.4.1951	Ca	10,74	2,290	35,68	51,09	21,32	1,56	AA	TT	CC	CC	TT
8	4.12.1945	Ca	5,58	1,140	155,20	323,04	20,43	13,61	AA	TT	CC	CC	CC
9	1.12.1947	Ca	10,21	1,720	43,63	81,14	16,85	2,54	AA	TT	GG	CC	CT
12	18.10.1950	HGPIN	5,55	0,820	13,30	38,18	14,77	1,62	AA	CC	GG	CC	CC
17	11.12.1944	Ca	/	/	/	/	/	/	AC	TT	GG	CC	CC
22	17.7.1931	Ca	8,06	1,250	35,28	80,13	15,51	2,82	AA	TT	CG	CC	TT
23	21.1.1948	Ca	9,84	1,220	3,85	9,85	12,40	0,32	AC	TT	GG	CC	CT
27	3.10.1943	Ca	3,87	0,410	16,00	77,04	10,59	3,90	AA	TT	GG	AC	CC
29	4.2.1954	HGPIN	3,12	0,400	4,69	20,47	12,82	1,17	AA	CT	GG	CC	CT
30	23.2.1937	Ca	4,95	1,360	10,15	16,58	27,47	0,75	AA	CC	GG	CC	TT
34	25.10.1949	Ca	3,60	0,560	11,12	37,38	15,56	1,99	AA	TT	GG	AC	CT
37	22.1.1940	Ca	5,57	0,530	16,13	71,58	9,52	3,04	AA	TT	CG	CC	TT
39	8.2.1948	HGPIN	4,22	3,050	9,07	37,52	72,27	0,30	AA	TT	GG	CC	CC
45	23.10.1947	Ca	5,35	0,820	23,63	66,59	15,33	2,88	AA	TT	CG	CC	CT
46	3.4.1941	Ca	8,66	0,960	16,45	50,15	11,09	1,71	AA	CT	GG	CC	CT
48	24.1.1947	Ca	3,90	0,520	9,79	37,51	13,33	1,88	AA	TT	CG	CC	CT
53	24.2.1941	Ca	5,67	1,100	31,35	68,10	19,40	2,85	AA	CT	CG	CC	TT
54	10.7.1939	HGPIN	6,13	1,070	14,11	32,80	17,46	1,32	AA	TT	CG	CC	CC
55	3.8.1941	Ca	7,65	0,430	13,37	85,38	5,62	3,11	AA	TT	GG	CC	CT
56	16.3.1941	HGPIN	3,47	0,730	3,94	10,09	21,04	0,54	AA	TT	GG	CC	CC
57	29.4.1944	Ca	10,02	0,710	6,68	29,80	7,09	0,94	AA	CT	CG	AC	CT
60	30.8.1939	HGPIN	4,99	1,270	10,72	18,78	25,45	0,84	AA	CT	GG	CC	TT
62	20.4.1942	Ca	6,46	0,740	19,50	66,86	11,46	2,64	AA	TT	CG	AC	TT
66	3.6.1940	Ca	9,99	1,590	49,45	98,28	15,92	3,11	AA	TT	GG	CC	TT
74	9.12.1944	Ca	6,96	1,820	14,89	21,64	26,15	0,82	AA	TT	CG	CC	CC
78	20.11.1953	Ca	4,05	0,470	9,48	40,86	11,60	2,02	AA	/	CG	CC	TT

79	4.9.1957	Ca	3,44	0,420	10,68	46,83	12,21	2,54	AA	TT	GG	AC	CT
83	22.4.1948	Ca	7,20	0,710	13,90	52,68	9,86	1,96	AA	TT	GG	CC	CT
84	3.1.1956	Ca	4,18	0,440	9,45	44,12	10,53	2,15	AA	CT	CG	CC	TT
88	16.1.1950	Ca	3,52	0,260	8,00	58,31	7,39	3,08	AA	TT	GG	CC	CT
93	28.4.1942	Ca	4,37	0,700	21,92	65,49	16,02	3,13	AA	TT	GG	CC	CT
97	18.5.1959	Ca	4,64	0,470	11,16	51,44	10,13	2,37	AA	TT	CG	CC	TT
99	4.1.1943	Ca	7,43	0,400	8,76	59,57	5,38	2,19	AC	TT	CC	CC	TT
107	10.5.1935	Ca	5,10	0,610	18,34	67,38	11,96	3,01	AA	TT	GG	CC	TT
110	25.12.1945	Ca	3,51	0,670	15,93	44,60	19,09	2,38	AA	TT	GG	CC	TT
115	9.1.1958	Ca	3,12	0,630	11,25	32,42	20,19	1,79	AA	TT	CG	CC	CT
119	9.5.1940	Ca	4,39	0,700	20,28	60,44	15,95	2,90	AA	TT	GG	CC	CC
Ca – rak prostate, HGPIN – angl. <i>high-grade prostatic intraepithelial neoplasia</i> , / - neuspeli vzorci oz. ni podatka													

Priloga III: Prikaz laboratorijskih meritev spremenljivk, histoloških izvidov in rezultatov genotipizacije za skupino BHP

Št. vzorca	Datum rojstva	Histološki izvid	PSA (µg/L)	fPSA (µg/L)	proPSA (ng/L)	PHI	%fPSA	%proPSA	rs80130819	rs76934034	rs115306967	rs1447295	rs4054823
1	29.3.1949	sumljivo za Ca + vnetje	3,84	0,840	13,24	30,88	21,88	1,58	AA	TT	GG	AC	CT
3	30.5.1942	BHP	2,95	0,810	15,02	31,86	27,46	1,85	AA	CT	GG	CC	CT
4	19.12.1945	BHP + kronično vnetje	7,27	1,130	12,42	29,65	15,54	1,10	AC	TT	GG	CC	CT
6	14.6.1952	BHP + atrofija + vnetje	4,35	0,560	9,33	34,50	12,87	1,67	AC	TT	GG	CC	TT
10	25.4.1942	BHP + vnetje	3,92	0,650	13,63	41,23	16,58	2,10	AA	TT	CG	CC	CT
11	15.9.1943	BHP	/	/	/	/	/	/	AA	TT	CG	CC	CT
13	26.9.1961	BHP	2,84	0,640	12,53	32,78	22,54	1,96	AC	TT	CC	CC	CT
14	15.2.1959	tkivo prostate brez sprememb	4,79	0,240	9,41	87,05	5,01	3,92	AA	TT	CG	CC	CC
15	5.4.1957	BHP	3,22	0,570	9,95	31,50	17,70	1,75	AA	TT	CG	CC	CT
16	16.10.1952	BHP	6,97	0,530	7,31	36,67	7,60	1,38	AA	TT	GG	CC	TT
18	7.8.1951	BHP + vnetje	2,83	0,483	3,22	11,19	17,07	0,67	AA	TT	CG	CC	TT
19	6.1.1948	BHP	4,32	0,560	6,77	25,28	12,96	1,21	AA	TT	CG	CC	CC
20	25.12.1938	BHP	7,46	0,960	15,98	45,34	12,87	1,66	AA	TT	GG	CC	TT
21	16.4.1953	kronično vnetje	4,62	0,340	10,77	68,05	7,36	3,17	AA	TT	GG	CC	CC
24	28.3.1942	BHP	4,90	1,110	17,47	34,76	22,65	1,57	AA	TT	GG	AC	CC
25	3.10.1949	BHP	2,51	0,570	8,78	24,43	22,71	1,54	AA	TT	CG	CC	TT
26	15.10.1958	BHP + atrofija	3,40	0,670	4,01	11,07	19,71	0,60	AA	TT	GG	CC	CT
28	29.5.1958	BHP	4,30	0,630	8,96	29,35	14,65	1,42	AA	CT	CG	CC	TT
32	11.6.1959	BHP	3,50	0,380	21,25	105,07	10,86	5,59	AA	/	GG	CC	CT
33	17.12.1949	BHP + atrofija	4,09	0,480	0,74	3,12	11,74	0,15	AA	TT	GG	CC	TT
35	21.5.1948	BHP + atrofija	6,67	0,880	8,79	25,83	13,19	1,00	AA	TT	GG	CC	CT
36	25.9.1946	BHP + atrofija	6,22	0,870	13,21	37,82	13,99	1,52	/	/	/	/	/
38	29.4.1946	BHP + atrofija	3,60	0,520	3,07	11,13	14,44	0,59	AA	TT	GG	CC	CT
40	14.8.1946	sumljivo za Ca, negativna biopsija	3,34	0,530	7,98	27,46	15,87	1,51	AA	TT	GG	CC	CT
41	23.9.1949	BHP + atrofija	5,40	0,610	12,73	48,20	11,30	2,09	AA	TT	GG	CC	CT
42	3.5.1952	BHP + atrofija	8,81	0,880	12,23	41,18	9,99	1,39	AC	TT	CC	CC	CC
43	21.10.1960	BHP	6,20	0,610	4,47	18,26	9,84	0,73	AC	TT	GG	AC	TT
44	5.7.1947	BHP	4,67	1,140	19,51	37,04	24,41	1,71	AA	TT	CG	CC	CT
47	30.7.1949	BHP	3,75	0,860	12,64	28,57	22,93	1,47	AA	/	CG	CC	TT
49	24.1.1969	BHP	2,64	0,430	8,62	32,56	16,29	2,00	AA	TT	GG	CC	CT
50	20.9.1936	BHP + vnetje	6,38	1,040	11,95	28,94	16,30	1,15	AC	TT	CG	CC	CC
51	14.8.1950	BHP	5,00	1,080	5,78	11,96	21,60	0,54	AA	/	CG	CC	CT
52	7.1.1941	BHP	4,41	0,720	27,35	79,22	16,33	3,80	AA	TT	CG	CC	TT
58	3.5.1950	BHP	5,92	2,170	21,14	23,77	36,66	0,97	AA	TT	CC	CC	TT

59	30.11.1946	BHP	5,30	0,960	3,65	8,73	18,11	0,38	AA	TT	GG	AC	CT
61	15.9.1948	BHP + vnetje	3,68	0,960	15,72	31,54	26,09	1,64	AA	CC	GG	CC	TT
63	8.4.1955	vnetje	10,62	2,410	10,35	14,01	22,69	0,43	AA	TT	CG	CC	TT
64	10.10.1951	ASAP - ni Ca	3,59	0,600	8,78	27,63	16,71	1,46	AA	TT	CG	CC	CT
65	23.4.1957	BHP + atrofija	1,21	0,250	6,29	27,47	20,66	2,52	AA	TT	GG	AC	CC
67	8.12.1957	vnetje+atrofija	5,17	0,510	7,61	34,18	9,86	1,49	AA	TT	CG	AC	CC
68	1.12.1937	BHP	5,53	1,680	28,61	40,07	30,38	1,70	AA	TT	GG	CC	TT
69	28.3.1948	BHP	1,66	0,170	5,81	43,61	10,24	3,42	AA	TT	GG	AC	CT
70	20.6.1932	BHP	/	/	/	/	/	/	AC	TT	GG	CC	CT
71	14.10.1952	BHP + atrofija	4,69	1,380	12,51	19,57	29,42	0,91	AC	CT	GG	CC	CT
75	7.3.1950	BHP	7,40	1,160	6,72	15,70	15,68	0,58	AA	TT	GG	CC	CC
77	18.11.1949	atrofija	3,45	0,780	14,52	34,59	22,61	1,86	AA	TT	GG	CC	CC
80	20.7.1938	BHP + atrofija	3,38	1,030	8,11	38,91	30,47	0,79	CC	TT	GG	CC	CC
81	29.8.1942	BHP + prostatitis	4,85	0,490	12,23	55,25	10,10	2,50	AA	TT	CG	CC	CT
82	10.10.1958	atrofija	2,37	0,440	8,21	28,61	18,57	1,87	AA	TT	GG	CC	CT
86	13.3.1951	atrofija	4,81	0,930	10,30	24,33	19,33	1,11	AA	TT	GG	CC	CT
89	27.11.1949	BHP + vnetje	2,86	0,430	7,17	28,34	15,03	1,67	AA	TT	GG	CC	CC
90	5.3.1950	atrofija	3,47	0,690	8,72	23,62	19,88	1,26	AA	TT	GG	CC	CT
91	26.11.1949	BHP	5,78	1,030	15,14	35,20	17,82	1,47	AC	CT	CC	CC	CC
92	26.4.1936	BHP	10,35	1,060	17,38	52,50	10,24	1,64	AA	CT	GG	CC	CT
94	10.10.1949	BHP	2,86	0,310	8,99	49,33	10,84	2,90	AA	TT	GG	CC	CT
96	29.7.1947	BHP	/	/	/	/	/	/	AA	TT	GG	CC	CT
98	5.11.1954	akutni in kronični prostatitis	4,91	1,070	13,97	28,94	21,79	1,31	AA	TT	CG	CC	CT
100	12.3.1944	vnetje + atrofija	3,86	0,620	12,80	40,37	16,06	2,06	AA	TT	GG	CC	TT
104	22.3.1954	atrofija	7,82	0,690	28,32	115,00	8,82	4,10	AA	TT	GG	CC	CC
105	14.10.1943	atrofija	2,36	0,550	10,50	29,34	23,31	1,91	AA	TT	GG	CC	TT
106	2.8.1954	BHP + kronično vnetje	2,27	0,770	19,79	38,80	33,92	2,57	AC	TT	GG	CC	CT
108	21.3.1953	BHP	/	/	/	/	/	/	AA	TT	GG	CC	TT
109	20.2.1953	BHP	3,75	0,250	6,19	48,40	6,67	2,48	AA	TT	CG	AC	CC
113	1.6.1949	vnetje	3,20	0,430	9,61	40,27	13,44	2,23	AA	TT	CG	AC	CT
114	27.3.1962	atrofija + kronično vnetje	1,18	0,240	4,58	20,46	20,34	1,91	AA	TT	CC	CC	CT
117	4.8.1951	BHP + atrofija	1,55	0,410	7,22	22,17	26,45	1,76	AA	CT	CG	AC	CC
118	4.11.1953	BHP	3,95	0,360	8,53	46,86	9,11	2,37	AA	TT	CC	CC	CC

BHP – benigna hiperplazija prostate, ASAP – angl. *atypical small acinar proliferation*, / - neuspeli vzorci oz. ni podatka

