

INSTYTUT WŁÓKIEN NATURALNYCH I ROŚLIN ZIELARSKICH

**WPLYW WYCIĄGÓW
Z *EPILOBIUM ANGUSTIFOLIUM* I *SERENOA REPENS*
NA EKSPRESJĘ GENÓW
ZWIĄZANYCH Z PATOGENEZĄ
ŁAGODNEGO PRZEROSTU GRUCZOŁU
KROKOWEGO**

RADOSŁAW KUJAWSKI

ROZPRAWA DOKTORSKA

PROMOTOR: prof. UM dr hab. Przemysław Ł. Mikołajczak

POZNAŃ 2014

*Panu prof. UM dr hab. Przemysławowi Ł. Mikołajczakowi
za wsparcie, serdeczność, opiekę merytoryczną, życzliwość
oraz za stworzenie milej atmosfery i warunków pracy,*

*Pracownikom Katedry i Zakładu Farmakologii
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu za współpracę w
zakresie realizacji części eksperymentalnej*

*Pracownikom Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin
Zielarskich w Poznaniu
za pomoc, serdeczność, miłą atmosferę i wsparcie,
serdecznie i z głębi serca dziękuję*

*Pamięci prof. dr hab. Przemysława M. Mrozikiewicza,
za umożliwienie realizacji tematu pracy doktorskiej, wsparcie
merytoryczne, wyrozumiałość,
bez którego zaangażowania, życzliwości i determinacji moja
„przygoda” z nauką nie byłaby możliwa.....*

SPIS TREŚCI

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
SPIS RYCIN I TABEL	9
1. WSTĘP	14
1.1. Budowa morfologiczna i anatomiczna gruczołu krokowego u ludzi	14
1.1.1. Budowa morfologiczna gruczołu krokowego	14
1.1.2. Budowa anatomiczna gruczołu krokowego.....	14
1.2. Rola fizjologiczna gruczołu krokowego.....	16
1.3. Epidemiologia BPH.....	17
1.4. Etiopatogeneza BPH	18
1.4.1. Teoria indukcja przebudowy tkanek gruczołu krokowego	19
1.4.2. Teoria zmian hormonalnych - udział genów regulujących metabolizm androgenów i estrogenów	21
1.4.2.1. Metabolizm i rola androgenów, udział w patogenezie BPH	21
1.4.2.2. Estrogeny – ich metabolizm, udział w patogenezie BPH	29
1.4.2.3. Kontrowersje w klinicznym obrazie obwodowego stężenia androgenów / estrogenów w patomechanizmie BPH	32
1.4.3. Procesy zapalne w przebiegu BPH	34
1.4.4. BPH jako zespół metaboliczny	36
1.5. Patofizjologia BPH	37
1.6. Farmakoterapia BPH	41
1.7. Fitoterapia schorzeń prostaty	45
1.8. <i>Serenoa repens</i> – charakterystyka surowca, właściwości farmakologiczne, stan badań	47
1.9. <i>Epilobium</i> sp. – charakterystyka surowca, właściwości biologiczne	54
1.9.1. Właściwości biologiczne przedstawicieli <i>Epilobium</i> sp.	64
2. CELE PRACY	71
3. MATERIAŁY I METODY	72
3.1. Materiały	72
3.1.1. Odczynniki, bufony, roztwory	72
3.1.1.1. Bufory	72
3.1.1.2. Odczynniki i roztwory	72
3.1.2. Urządzenia laboratoryjne i aparatura badawcza	73
3.2. Metodyka badań	73
3.2.1. Zakup zwierząt, kwarantanna	73
3.2.2. Otrzymanie i charakterystyka wyciągu z <i>Epilobium angustifolium</i>	74
3.2.2.1. Uzyskanie surowca zielarskiego, ustalenie tożsamości	74
3.2.2.2. Sporządzenie wyciągu z <i>Epilobium angustifolium</i>	74
3.2.3. Ocena <i>in vivo</i> właściwości przeciwzapalnych wyciągu z <i>Epilobium angustifolium</i>	75
3.2.4. Ocena właściwości przeciwdiuretycznych ekstraktu z <i>Epilobium angustifolium</i>	76
3.2.4.1. Dane eksperymentalne.....	76
3.2.4.2. Oszacowanie zmian ilości oraz częstotliwości oddawanego moczu.....	77
3.2.6. Ocena <i>in vivo</i> właściwości antyproliferacyjnych wyciągów z <i>Epilobium angustifolium</i> i <i>Serenoa repens</i>	77

3.2.6.1. Schemat doświadczenia	77
3.2.6.2. Pobieranie tkanki zwierzęcej	79
3.2.6.3. Oszacowanie wpływu wyciągów z <i>Epilobium angustifolium angustifolium</i> i <i>Serenoa repens</i> na poziom hormonów w osoczu badanych zwierząt	79
3.2.6.4. Ocena wpływu wyciągów z <i>E. angustifolium</i> i <i>Serenoa repens</i> na ekspresję wybranych genów metabolizmu androgenów i estrogenów.....	80
3.2.6.4.1. Izolacja RNA i analiza zmian poziomu transkryptów	80
3.2.6.4.1.1. Izolacja całkowitego RNA z pobranego materiału biologicznego.....	80
3.2.6.4.1.2. Elektroforetyczne sprawdzenie wydajności izolacji całkowitego RNA z pobranego materiału tkankowego	81
3.2.6.4.1.3. Reakcje odwrotnej transkrypcji.....	82
3.2.6.4.1.4. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym.....	82
3.2.6.5. Ocena wpływu wyciągów z <i>E. angustifolium</i> i <i>Serenoa repens</i> na transkrypcję wybranych mRNA genów genomowej i niegenomowej drogi działania androgenów.....	85
3.2.6.5.1. Przebieg doświadczenia.....	85
3.2.6.5.2. Pobieranie szczurzych prostat.....	89
3.2.6.5.3. Izolacja RNA.....	89
3.2.6.5.4. Analiza zmian poziomu transkryptów genomowego i niegenomowego szlaku działania androgenów	89
3.2.6.4.5. Analiza statystyczna.....	91
4. WYNIKI.....	93
4.1. Ocena działania przeciwzapalnego ekstraktu z zieleń <i>Epilobium angustifolium</i>	93
4.2. Wpływ wyciągu z zieleń <i>Epilobium angustifolium</i> na zmianę objętości i częstotliwości oddawania moczu u szczurów.....	94
4.3. Ocena molekularnego, antyproliferacyjnego działania wyciągów z <i>Epilobium angustifolium</i> i <i>Serenoa repens</i>	95
4.3.1. Optymalizacja warunków reakcji PCR w czasie rzeczywistym	95
4.3.1.1. Wyznaczanie krzywych standardowych dla reakcji qPCR.....	95
4.3.1.2. Weryfikacja produktów amplifikacji na krzywych topnienia	98
4.3.2. Ocena zmian poziomu mRNA genów metabolizmu androgenów i estrogenów w płatach prostat u szczurów	101
4.3.2.1. Ocena zmian poziomu mRNA receptora androgenowego (AR)	101
4.3.2.1.1. Zmiany poziomu mRNA receptora androgenowego (AR) w płacie brzuszny	101
4.3.2.1.2. Zmiany poziomu mRNA receptora androgenowego (AR) w płacie grzbietowy	102
4.3.2.2. Ocena zmian poziomu mRNA receptora estrogenowego α (ER α)	103
4.3.2.2.1. Zmiany poziomu mRNA receptora estrogenowego α (ER α) w płacie brzuszny	103
4.3.2.2.2. Zmiany poziomu mRNA receptora estrogenowego α (ER α) w płacie grzbietowy.....	104
4.3.2.3. Ocena zmian poziomu mRNA receptora estrogenowego β (ER β)	105
4.3.2.3.1. Zmiany poziomu mRNA receptora estrogenowego β (ER β) w płacie brzuszny	105
4.3.2.3.2. Zmiany poziomu mRNA receptora estrogenowego β (ER β) w płacie grzbietowy.....	106
4.3.2.4. Ocena zmian poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1).....	107

4.3.2.4.1. Zmiany poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w płacie brzuszny	107
4.3.2.4.2. Zmiany poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w płacie grzbietowym	108
4.3.2.5. Ocena zmian poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2)	110
4.3.2.5.1. Zmiany poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) w płacie brzuszny	110
4.3.2.5.2. Zmiany poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) w płacie grzbietowym	111
4.3.2.6. Ocena zmian poziomu mRNA aromatazy (CYP19)	112
4.3.2.6.1. Zmiany poziomu mRNA aromatazy (CYP19) w płacie brzuszny	112
4.3.2.6.2. Zmiany poziomu mRNA aromatazy (CYP19) w płacie grzbietowym	113
4.3.2.7. Podsumowanie zmian poziomów badanych mRNA w obu płatach prostat u szczurów	114
4.3.3. Zmiany poziomu transkrypcji wybranych mRNA genów genomowej i niegenomowej drogi działania androgenów	119
4.3.3.1. Zmiany poziomu transkryptów genomowego i niegenomowego szlaku sygnalizacji androgenów w płacie brzuszny szczurzych prostat	119
4.3.3.1.1. Zmiany poziomu transkrypcji mRNA p68 i Arip4 – przedstawicieli genomowego szlaku działania androgenów	119
4.3.3.1.2. Zmiany poziomu transkrypcji mRNA RafA, Mapk1, Mapk3 – przedstawicieli niegenomowego szlaku działania androgenów	121
4.3.3.2. Zmiany poziomu transkryptów genomowego i niegenomowego szlaku sygnalizacji androgenów w płacie grzbietowym szczurzych prostat	124
4.3.3.2.1. Zmiany poziomu transkrypcji mRNA p68 i Arip4 – przedstawicieli genomowego szlaku działania androgenów	124
4.3.3.2.2. Zmiany poziomu transkrypcji mRNA RafA, Mapk1, Mapk3 – przedstawicieli niegenomowego szlaku działania androgenów	126
4.4. Analiza zmian hormonalnych w osoczu zwierząt	130
4.4.1. Zmiany poziomu wolnego testosteronu pod wpływem badanych wyciągów roślinnych i finasterydu	130
4.4.2. Zmiany poziomu wolnego dihydrotestosteronu pod wpływem badanych wyciągów roślinnych i finasterydu	131
4.4.3. Zmiany poziomu wolnego estradiolu pod wpływem badanych wyciągów roślinnych i finasterydu	133
4.4. Wpływ badanych wyciągów roślinnych i finasterydu na masy prostat u szczurów	137
4.4.1. Zmiany mas płatów szczurzych prostat pod wpływem badanych ekstraktów roślinnych oraz finasterydu	137
4.4.1.1. Zmiany masy płata brzuszny szczurzych prostat pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu	139
4.4.1.2. Zmiany masy płata grzbietowy szczurzych prostat pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu	140
5. Dyskusja	143
5.1. Wpływ ekstraktu z <i>Epilobium angustifolium</i> na oddawanie moczu u szczurów	143
5.2. Ocena obwodowy przeciwzapalny działanie ekstraktu z <i>Epilobium angustifolium</i>	144
5.3. Wpływ ekstraktów z <i>Epilobium angustifolium</i> i <i>Serenoa repens</i> na zmianę mas szczurzych prostat	146

5.4. Wpływ ekstraktów z <i>Epilobium angustifolium</i> i <i>Serenoa repens</i> na gospodarkę hormonalną.....	149
5.5. Wpływ ekstraktów z <i>Epilobium angustifolium</i> i <i>Serenoa repens</i> na profil ekspresji genów biorących udział w patogenezie BPH	151
5.5.1. Wykorzystanie analiz ekspresji genów w ocenie patomechanizmu BPH.....	151
5.5.2. Analiza zmian ekspresji genów metabolizmu androgenów w poszczególnych płatach szczurzych prostat.....	153
5.5.2.1. Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na transkrypcję mRNA reduktaz steroidowych.....	153
5.5.2.2. Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na transkrypcję mRNA AR oraz wybranych genów genomowego oraz niegenomowego szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej zależnej od androgenów.....	157
5.5.3. Analiza zmian ekspresji genów metabolizmu estrogenów w poszczególnych płatach szczurzych prostat.....	159
6. WNIOSKI	161
7. STRESZCZENIE.....	162
8. SUMMARY.....	164
9. LITERATURA.....	166

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

- 5ARI** - leki wpływające na środowisko hormonalne stercza, głównie inhibitory 5 α -reduktazy steroidowej (ang. *5 α -steroid reductase inhibitors*)
- AF** - domena w strukturze receptora androgenowego wykazujące określone funkcje aktywujące (ang. *activation function*; syn. *transcription activation unit*; TAU).
- AF-1** - domena warunkującą funkcję aktywacyjną AF-1 (ang. *activation function domain 1*)
- AF-2** - domena warunkującą funkcję aktywacyjną AF-2 (ang. *activation function domain 2*)
- AR** - receptor androgenowy (ang. *androgen receptor*);
- ARA** - leki blokujące receptory α 1-adrenergiczne, (ang. *adrenergic receptors antagonists*)
- ARA70** - przykład białka aktywatora AR
- ARE** - elementy odpowiedzi androgenów (ang. *androgen response elements*)
- 17 β -HSD** - reduktaza 17 β -hydroksysteroidowa
- BD** - zaburzenie czynności mięśnia wypieracza pęcherza (*bladder dysfunction*; syn. *detrusor dysfunction*, DD; syn. *detrusor overactivity*, DO) - określane potocznie „podrażnieniem mięśniówki wypieracza”)
- BPE** - powiększenie gruczołu krokowego (ang. *benign prostatic enlargement*; syn. *enlarged prostate*, EP)
- BPH** - łagodny rozrost stercza (ang. *benign prostatic hyperplasia*, ŁRS, syn. gruczolak stercza)
- BPO** - przeszkoda podpęcherzowa (upośledzenie przepływu cewkowego) (ang. *benign prostatic obstruction*, BPO; syn. *bladder outlet obstruction*, BOO),
- cAMP** - drugorzędowe przekaźniki informacji
- CB** - odcinek błoniasty cewki
- CM** - cewka moczowa.
- COX-2** – enzym cyklooksigenaza 2
- CYP19** - enzym aromataza
- CZ** - strefa środkowa (ang. *central zone*)
- DBD** - domena wiążącą DNA (ang. *DNA binding domain*)
- DHEA** - dehydroepiandrosteron (ang. *didehydroepiandrosterone*; syn. dehydroepiandrosterone)
- DHT** – dihydrotestosteron (ang. dihydrotestosterone)
- E2** - estradiol
- ER1** - receptor estrogenowy alfa (ang. *estrogen receptor alpha*; ER α)
- ER2** - receptor estrogenowy beta (ang. *estrogen receptor beta*; ER β)
- GAPDH** - dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego; (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)
- GPCR** - receptorów sprzężonych z białkiem G (ang. *G-protein coupled receptor*)
- HME** - enzymy modyfikujące histony (ang. *histone modifying enzymes*)
- HSP** - białka szoku termicznego (ang. *heat shock proteins*)
- IPSS** - kwestionariusza oceny objawów LUTS wg Międzynarodowej Oceny Symptomów Prostaty (IPSS, ang. *International Prostate Symptoms Score*)
- IU** - nietrzymanie moczu (ang. *urinary incontinence*)
- LAM** - mięsień dźwigacz odbytu (łac. *musculus laevator ani*)
- LBD** - domena wiążąca ligand (ang. *ligand binding domain*)
- LUTS** - (ang. *lower urinary tract symptoms*)
- MAPK** - kinaza aktywowana mitogenami (ang. *mitogen-activated kinase*)
- MetS** - “zespół metaboliczny” (ang. *metabolic syndrome*.)
- MTOPS** – rodzaj badania klinicznego (ang. *Medical Therapy of Prostate Symptoms Study*)

NLS - domena zawiasowa zawierająca tzw. "sygnał lokalizacji jądrowej" (ang. *nuclear localization signal*)

NRF - nadrodzina receptorów jądrowych (ang. *nuclear receptors family*)

NRF - podrodzina jądrowych receptorów (ang. *nuclear receptor superfamily*);

NRSF - podrodziny jądrowych receptorów (ang. *nuclear receptor superfamily*)

NTD – domena transaktywacyjna w strukturze AR (ang. *amino-terminal transactivation domain*)

OAB - nadreaktywny pęcherz moczowy (ang. *overactive bladder*);

PIC - tzw. kompleks preinicjujący; ang. *preinitiation complex*,

PKA, PKC - kinazy białkowe A, C (ang. *protein kinases A, C*);

PSA - marker białkowy (ang. *prostate specific antigen*)

PSAT1 - aminotransferaza fosfoserynowa (ang. *phosphoserine aminotransferase 1*; syn. PSA)

PW - przewód wytryskowy

PZ - strefa obwodowa (ang. *peripheral zone*)

REDUCE – rodzaj badania klinicznego (ang. *Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events trial*)

SHBG - białek transportujących androgeny (ang. *sexual hormone binding globulins*)

SP - spoidło przednie

SRd5ar – enzym 5 α -reduktaza steroidowa (syn. SRD5AR)

T – testosteron (ang. testosterone)

Tm – temperatura topnienia – jej analiza stosowana jest w ocenie produktu amplifikacji reakcji qPCR (ang. *Temperature melting*)

TZ - strefa przejściowa (ang. *transition zone*)

U - łagiewka sterczowa (łac. *utricle*)

UTI - zakażenie dróg moczowych (ang. *urinary tract infection*);

UW - ujście wewnętrzne cewki

Wa-Wa - baczna obserwacja (objawów dolegliwości LUTS) (ang. *watchful waiting*)

SPIS RYCIN I TABEL

RYCINY

Ryc. 1. Schemat budowy gruczołu krokowego z podziałem na strefy.....	16
Ryc. 2. Najistotniejsze teorie tłumaczące etiopatogenezę BPH i występujące między nimi zależności.....	19
Ryc. 3. Schemat zmian w strukturze prostaty w patomechanizmie BPH.....	21
Ryc. 4. Schemat budowy receptora androgenowego (AR) z podziałem na poszczególne domeny.....	25
Ryc. 5. Schemat genomowej drogi działania receptora androgenowego.....	28
Ryc. 6. Schemat metabolizmu wybranych androgenów i estrogenów w komórkach zrębu prostaty z udziałem kluczowych enzymów patogenezy BPH. Opracowanie własne	32
Ryc. 7. Schemat współzależności poszczególnych objawów klinicznych u chorych cierpiących na BPH.....	40
Ryc. 8. Typowy rozdział elektroforetyczny wyizolowanego RNA wybranych prób pochodzących z płata grzbietowego szczurzych prostat w 0,8% żelu agarozowym	81
Ryc. 9 (a-f). Wykresy krzywych rozcieńczeń cDNA reakcji qPCR dla poszczególnych transkryptów.....	98
Ryc. 10(a-f). Wykresy krzywych topnienia produktów amplifikacji dla poszczególnych genów	100

TABELE

Tab. 1. Charakterystyka 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 i typu 2.....	22
Tab.2. Kryteria oceny zespołu metabolicznego.....	37
Tab. 3. Objawy i dolegliwości towarzyszące podrażnieniu pęcherza (BD) oraz przeszkody podpęcherzowej (BPO).....	39
Tab. 4. Wybrane parametry farmakokinetyczne finasterydu i dutasterydu.....	43
Tab. 5. Zestawienie wybranych kontrolowanych, randomizowanych badań klinicznych z podwójną ślepą próbą z zastosowaniem grupy placebo.....	53
Tab. 6. Zestawienie gatunków rodzaju <i>Epilobium</i> wraz z najistotniejszymi zidentyfikowanymi metabolitami wtórnymi. Opracowanie własne.....	59
Tab. 7. Schemat dawkowania wyciągu z <i>Epilobium angustifolium</i> oraz substancji syntetycznych.....	76
Tab. 8. Schemat dawkowania vehiculum, wyciągu z <i>Epilobium angustifolium</i> , finasterydu z podziałem na grupy.....	76
Tab. 9. Podział na grupy w doświadczeniu nad oceną właściwości antyproliferacyjnych.....	78
Tab. 10. Zestawienie dawkowania oraz okresu podawania zwierzętom badanych wyciągów oraz substancji syntetycznych w doświadczeniu nad oceną właściwości antyproliferacyjnych.....	79
Tab. 11. Rodzaje składników mieszaniny reakcyjnej, ich stężenia oraz profil termiczny prowadzonych reakcji odwrotnej transkrypcji.....	82
Tab. 12. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla poszczególnych genów.....	85
Tab. 13. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	85
Tab. 14. Podział na grupy w doświadczeniu nad wpływem wyciągów na transkrypcję wybranych mRNA genów genomowej i niegenomowej drogi działania androgenów.....	88
Tab. 15. Zestawienie dawkowania oraz okresu podawania zwierzętom badanych wyciągów oraz substancji syntetycznych w doświadczeniu nad wpływem wyciągów na	

transkrypcję wybranych mRNA genów genomowej i niegenomowej drogi działania androgenów.....	88
Tab. 16. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla poszczególnych genów genomowej i niegenomowej drogi działania androgenów w komórkach prostaty.....	91
Tab. 17. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	91
Tab. 18. Oszacowanie <i>in vivo</i> właściwości przeciwzapalnych ekstraktu z ziela <i>Epilobium angustifolium</i> w modelu obrzęku łapy indukowanym karageniną u szczurów.....	93
Tab. 19. Ocena wpływu wyciągu z ziela <i>Epilobium angustifolium</i> (100 mg/kg, p.o.) podawanego osobno lub wraz z testosteronem (40 mg/kg, s.c.) i finasterydem (50 mg/kg, p.o.) na zmianę objętości i częstotliwości oddawania moczu u szczurów.....	95
Tab. 20. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora androgenowego (AR) w płacie brzusznej prostaty u szczurów.....	102
Tab. 21. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora androgenowego (AR) w płacie grzbietowej prostaty u szczurów.....	103
Tab. 22. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora estrogenowego α (ER α) w płacie brzusznej prostaty u szczurów.....	104
Tab. 23. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora estrogenowego α (ER α) w płacie grzbietowej prostaty u szczurów.....	105
Tab. 24. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora estrogenowego β (ER β) w płacie brzusznej prostaty u szczurów.....	106
Tab. 25. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora estrogenowego β (ER β) w płacie grzbietowej prostaty u szczurów.....	107
Tab. 26. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w płacie brzusznej prostaty u szczurów.....	108
Tab. 27. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w płacie grzbietowej prostaty u szczurów.....	109

Tab. 28. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) w płacie brzusznej prostaty u szczurów	111
Tab. 29. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) w płacie grzbietowej prostaty u szczurów	112
Tab. 30. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA aromatazy (CYP19) w płacie brzusznej prostaty u szczurów	113
Tab. 31. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA aromatazy (CYP19) w płacie grzbietowej prostaty u szczurów	115
Tab. 32. Zestawienie zmian transkrypcji mRNA białek metabolizmu androgenów / estrogenów w płacie brzusznej i grzbietowej prostaty u szczurów	116
Tab. 33. Zestawienie uzyskanych wyników pomiaru poziomu ekspresji badanych genów względem odpowiedniej grupy kontrolnej	117
Tab. 34. Zestawienie zmian transkrypcji wybranych mRNA genomowego szlaku działania androgenów w płacie brzusznej szczurzych prostat	121
Tab. 35. Zestawienie zmian transkrypcji wybranych mRNA szlaku niegenomowego działania androgenów w płacie brzusznej prostaty u szczurów	124
Tab. 36. Zestawienie zmian transkrypcji wybranych mRNA genomowego szlaku działania androgenów w płacie grzbietowej szczurzych prostat	126
Tab. 37. Zestawienie zmian transkrypcji wybranych mRNA szlaku niegenomowego działania androgenów w płacie grzbietowej prostaty u szczurów	129
Tab. 38. Zmiany poziomu wolnego testosteronu w surowicy u szczurów pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu	131
Tab. 39. Zmiany poziomu wolnego dihydrotestosteronu w surowicy u szczurów pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu	132

Tab. 40. Zmiany poziomu wolnego estradiolu w surowicy u szczurów pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu	134
Tab. 41. Podsumowanie wyników pomiaru stężeń hormonów steroidowych w surowicy u szczurów względem grupy kontrolnej	135
Tab. 42. Podsumowanie zmian stężeń hormonów steroidowych w surowicy u szczurów pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt	136
Tab. 43. Podsumowanie zmiany mas prostat u szczurów pod wpływem badanych wyciągów roślinnych i finasterydu.....	137
Tab. 44. Zestawienie mas płatów brzusznych i grzbietowych prostat u poszczególnych grup szczurów.....	142
Tab. 45. Zestawienie wybranych surówców roślinnych (ekstraktów) o potencjalnych właściwościach antyandrogennych. Opracowanie własne.....	147

1. WSTĘP

1.1. Budowa morfologiczna i anatomiczna gruczołu krokowego u ludzi

1.1.1. Budowa morfologiczna gruczołu krokowego

Gruczoł krokowy (syn. prostata, stercz) u mężczyzny jest nieparzystym narządem mięśniowo – gruczołowym zlokalizowanym w obrębie miednicy mniejszej, w proksymalnej części cewki moczowej, pod spojeniem łonowym, poniżej pęcherza moczowego i powyżej przepony moczowo – płciowej. Stanowi integralną część męskiego układu płciowego. Jego waga u młodych mężczyzn waha się w granicach ok. 15–20 g, wymiary to ok. 40 x 30 x 30 mm [Bochenek i wsp., 2010]. Występowanie charakterystycznych powierzchni, tj. wierzchołka (łac. *apex*), podstawy (łac. *basis*, syn. powierzchnia górna – łac. *facies superior*), powierzchni przedniej (łac. *facies anterior*), tylnej (łac. *facies posterior*) oraz dwóch powierzchni bocznych (łac. *facies inferolaterales*) powoduje, iż u ludzi swoim kształtem narząd ten przypomina kasztan jadalny bądź też stożek „ścięty” ku tyłowi. Część sterczowa cewki moczowej przebiega ku dołowi odcinek przedni gruczołu [Bochenek i wsp., 2010; Timms i wsp., 2011]. Przez tylną, większych rozmiarów, część gruczołu przechodzą przewody wytryskowe. Charakterystyczny dla tego narządu jest tzw. płat środkowy (łac. *lobus medius*; syn. pol. więzina gruczołu krokowego - łac. *isthmus prostatae*) o klinowatym kształcie, znajdujący się pomiędzy cewką moczową a przewodami wytryskowymi, który u starzejących się mężczyzn ulega powiększeniu powodując ucisk dna pęcherza [Bochenek i wsp., 2010; Timms i wsp., 2011].

1.1.2. Budowa anatomiczna gruczołu krokowego

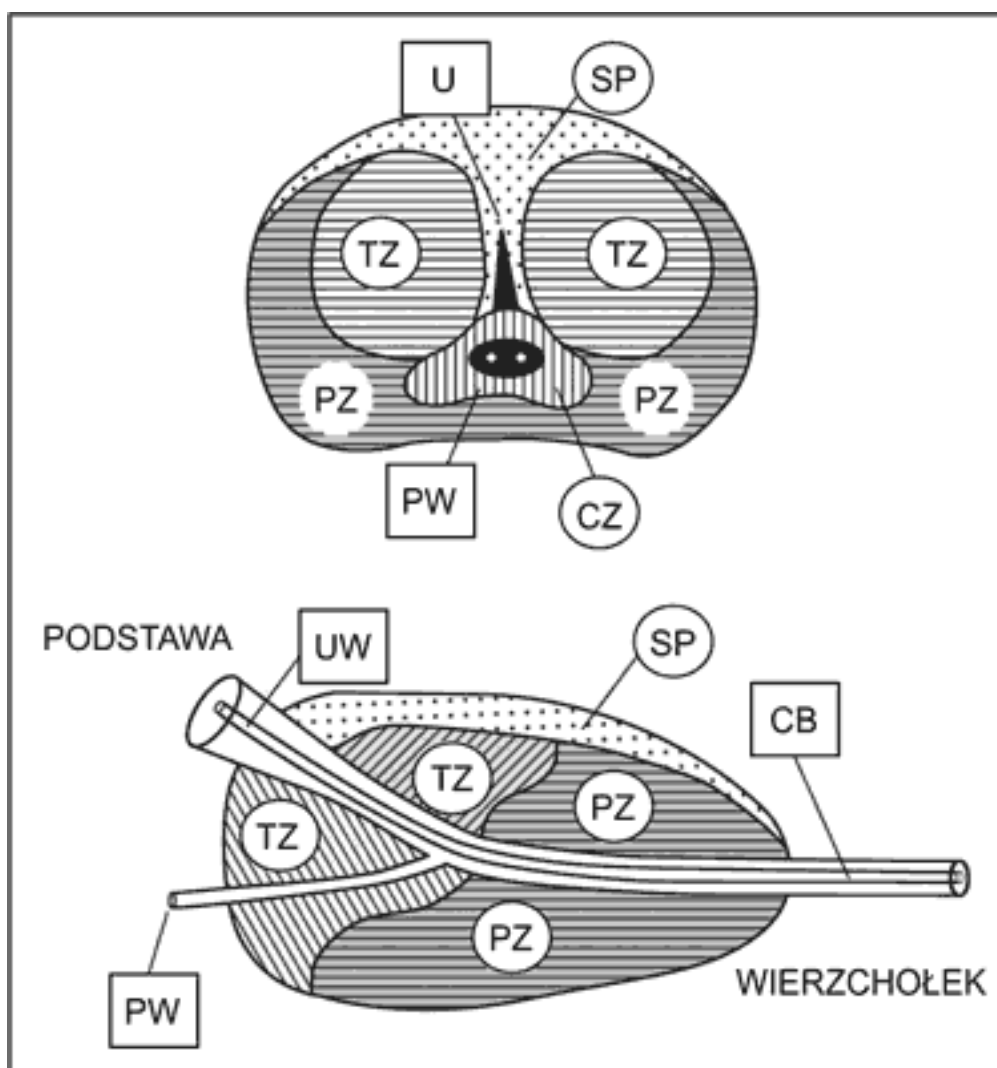
Na strukturę gruczołu krokowego składa się tkanka gruczołowa zwana miąższem gruczołowym oraz tzw. tkanka śródmiąższowa zbudowana z pasem mięśniówki gładkiej przedzielonych tkanką łączną.

Istotną strukturalno-funcjonalną składową stercza są komórki nabłonka o charakterze wydzielniczym (tzw. Nabłonek wydzielniczy) zebrane w postaci gron zakończonych przewodami wydzielniczymi w obrębie podścieliska włóknisto-mięśniowego, z przewagą głównie z mięśni gładkich. W zrębie prostaty znajdują się także liczne fibroblasty, naczynia krwionośne, włókna nerwowe, komórki układu odpornościowego składniki odpornościowe [Cunha i wsp., 2004; Schauer i wsp., 2011; Cunha i wsp., 2011; Powers i wsp., 2013].

Konsekwencją różnicy w procentowym udziale ww. tkanek w strukturze stercza jest odpowiednie nazewnictwo budowy prostaty – wyróżnia się bowiem gruczołowy lub mięśniowy typ budowy tego gruczołu. Uważa się ponadto, iż ilość substancji gruczołowej jest zawsze większa aniżeli tkanki mięśniowej [Bochenek i wsp., 2010; Timms i wsp., 2011]. W późniejszym wieku przeważa jednak udział składowej tkanki śródmiąższowej, tj. pasem mięśniowych [Timms i wsp., 2011].

W strukturze tkanki gruczołowej wyróżniają się liczne, nieregularne, silnie promienisto rozgałęzione na 30 – 50 jednostek gruczoły cewkowo – pęcherzykowe, od których odchodzą przewody wyprowadzające łączące się stopniowo w tzw. przewodziki gruczołu krokowego [Bochenek i wsp., 2010; Timms i wsp., 2011]. W budowie stercza wyróżnia się cztery, zróżnicowane morfologicznie i czynnościowo oraz podlegające odmiennym zmianom patologicznym, strefy:

- strefę obwodową (*peripheral zone*),
- strefę przejściową (*transition zone*),
- strefę środkową (*central zone*),
- część przednią - spoidło (syn. przegrodą przednią (*anterior septum*)) [Szopiński i wsp., 2012].



Ryc. 1. Schemat budowy gruczołu krokowego z podziałem na strefy; wg McNeal [McNeal, 1978; Szopinski i wsp., 2012]. Góra – przekrój w płaszczyźnie czołowej, dół – przekrój w płaszczyźnie strzałkowej. UW – ujście wewnętrzne cewki, CB – odcinek błonisty cewki, TZ (*transitional zone*) – strefa przejściowa, CZ (*central zone*) – strefa środkowa, SP – spoidło przednie, PW – przewód wytryskowy, U (*utricle*) – łagiewka sterczowa.

1.2. Rola fizjologiczna gruczołu krokowego

Główną funkcją prostaty jest do wytwarzania płynnej frakcji nasienia. Komórki gruczołów w obrębie stercza produkują w sposób ciągły płyn bogaty w białka i składniki mineralne, które utrzymują i odżywiają plemniki, a nadmiar produkowanej cieczy usuwany jest z organizmu wraz z moczem. Wydzielina gruczołu krokowego wytwarzana jest w komórkach gruczołowych w postaci ziaren lipidowych, charakteryzuje się mętnym, białawym zabarwieniem o pH zasadowym nadając nasieniu charakterystyczny dla niego zapach. Tylko około 15 – 30% produkowanej wydzieliny ulega sekrecji, pozostała ilość gromadzona jest w

sterczu [Bochenek i wsp., 2010]. Wraz z wiekiem u mężczyzn również jakość produkowanej przez stercz wydzieliny zmienia się – obserwuje się powstawanie tzw. kamyków sterczowych zbudowanych z koncentrycznych struktur wydzieliny inkrustowanych solami wapnia [Bochenek i wsp., 2010]. W trakcie pobudzenia seksualnego u mężczyzny dochodzi do produkcji większej jego ilości, który następnie ulega zmieszaniu się z pozostałymi składnikami nasienia. Gruczoł krokowy odgrywa również rolę w regulacji przepływu moczu na odcinku sterczowym cewki moczowej. Włókna mięśniowe prostaty okalające cewkę moczową, poprzez zmianę kurczliwości regulowaną poprzez zakończenia włókien nerwowych autonomicznego układu nerwowego, mogą w ten sposób zwalniać i zatrzymać przepływ moczu na tym odcinku [Lepor, 2004; Untergasser i wsp., 2005; Schauer i wsp., 2011].

1.3. Epidemiologia BPH

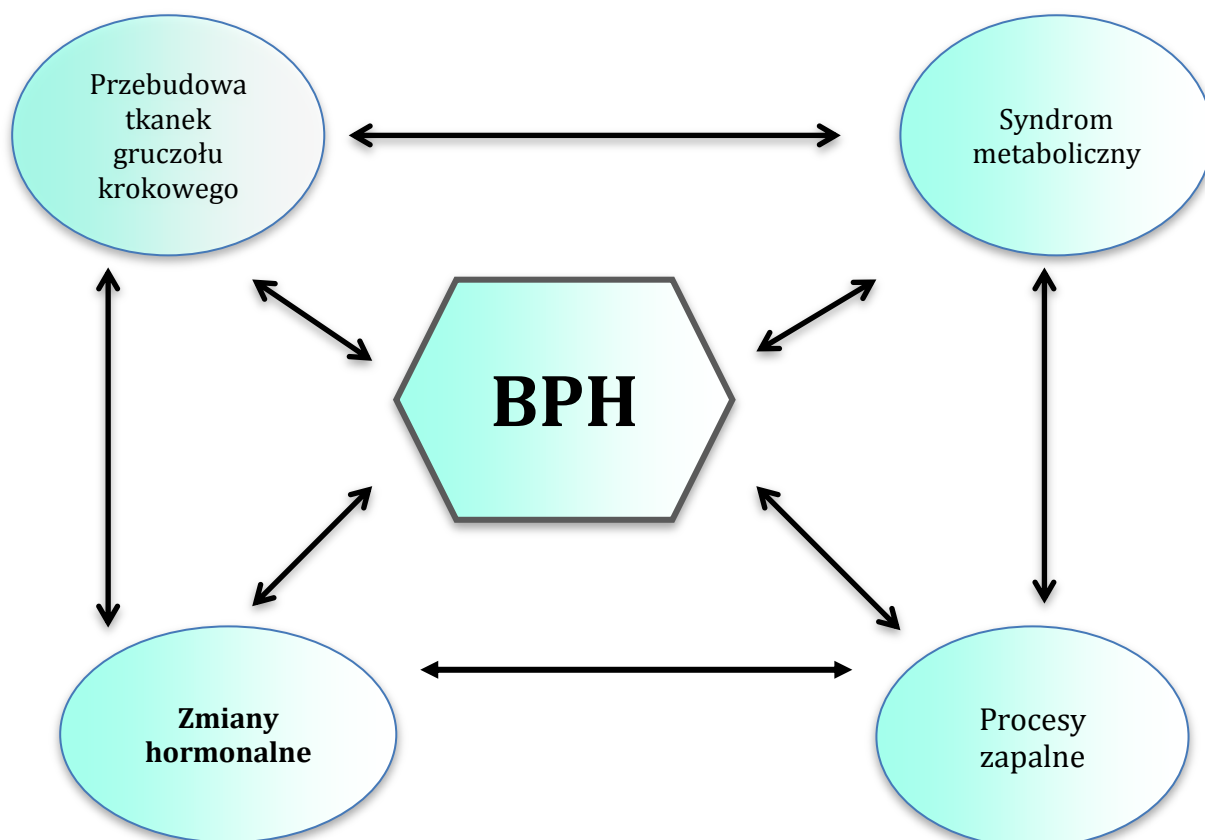
Łagodny rozrost stercza (ang. *benign prostatic hyperplasia*, syn. *benign prostatic hyperthrophy*, BPH; pol. łagodny rozrost stercza, ŁRS, syn. gruczolak stercza) jest powszechnym, postępującym wraz z wiekiem niejednorodnym zespołem chorobowym u starzejących się mężczyzn, o różnorodnym przebiegu zmian patofizjologicznych, symptomów i dolegliwości. Występuje u ok. 20% mężczyzn po 40 r.ż., u ok. 31% - 50% po 50 r.ż., nasila się u mężczyzn przekraczających 70 r.ż. (dotyka wówczas blisko 70%) [Chute i wsp., 1993; Dutkiewicz, 2010]. Dane statystyczne wskazują, iż w USA 17% pacjentów w wieku 50 – 59 lat wymaga leczenia, 27% w przedziale wiekowym 60 – 69 lat, 35% w wieku 70 – 79 lat [Garraway i wsp., 1997; Mędraś i wsp., 2004], a mężczyzn w wieku 80 lat i więcej kliniczne objawy BPH występują u ponad 80% [McDowell i wsp., 2009; Barnard, 2009]. Inni badacze zajmujący się problematyką schorzeń stercza wskazują na wyniki badań autopsyjnych (anatomiczno – mikroskopowych), u których fenotypowo rozrost był widoczny u 50% wszystkich mężczyzn w wieku 50 lat i więcej [Berry i wsp., 1984; Kwias i wsp., 2001]. Zgodnie z obliczeniami prof. Borówki, byłego Krajowego Konsultanta ds. Urologii, w Polsce BPH stwierdzono u ponad 1,5 mln mężczyzn [Borówka, 2002].

Z uwagi na współwystępowanie w obrazie histopatologicznym, makroskopowym i klinicznym charakterystycznych cech, objawów BPH u starzejących się mężczyzn szczególne znaczenie w rozwoju efektywnej diagnostyki, oceny stopnia progresji BPH i skuteczności farmakoterapii nabiera ustalenie związku przyczynowo – skutkowego, stopnia korelacji pomiędzy określonymi objawami w poszczególnych grupach wiekowych mężczyzn [Isaacs i

wsp., 1987; Lopor, 2005]. Ciągłe niedostateczna liczba dokładnych danych epidemiologicznych BPH wynika po części również z ograniczonej liczby, a w dodatku dość kosztownych, czy wymagających specjalistycznej aparatury, nieinwazyjnych lub mało inwazyjnych metod diagnostycznych umożliwiających chociażby dokonanie pomiaru objętości stercza (do metod tych zalicza się m.in. uroflowmetrię, ultrasonografię przezodbytniczą, obrazowanie rezonansu magnetycznego czy tomografię komputerową) [Bates i wsp., 1996; Lopor, 2004; Briganti i wsp., 2009].

1.4. Etiopatogeneza BPH

Łagodny rozrost stercza rozwijający się początkowo w strefach: okołocewkowej i przejściowej gruczołu krokowego stanowi niezaprzeczalny “fenomen” dla starzejącej się populacji męskiej [Untergasser i wsp., 2005; Briganti i wsp., 2009]. Pomimo znaczącego wpływu odkryć naukowych na zdrowie publiczne pacjentów cierpiących na BPH, patogeneza schorzenia pozostaje wciąż w dużej mierze nie w pełni poznana [Platz i wsp., 1999; Untergasser i wsp., 2005]. W świetle aktualnego stanu wiedzy etiologia BPH ma bowiem skomplikowany charakter [McVary i wsp., 2003; McVary i wsp., 2010; Briganti i wsp., 2009; McVary i wsp., 2011; Roosen i wsp., 2013]. Wysłunięto wiele teorii podejmujących próbę wyjaśnienia przyczyny BPH oraz patomechanizmu choroby, jednakże ustalenie, który z proponowanych mechanizmów fizjologiczno-molekularnych odgrywa najistotniejszą rolę w etiologii schorzenia pozostaje nadal otwartą kartą. Wymienia się między teorię zarodkowego przebudzenia (przebudowy) [McNeal, 1978; McNeal, 1990; Nicholson i wsp., 2011], teorię hormonalnych zmian (najobszerniej udokumentowaną dowodowo) [Briganti i wsp., 2009; Nicholson i wsp., 2011], oksydoreduktaz [Briganti i wsp., 2009], zespołu metabolicznego i procesu zapalnego [Thompson i wsp., 2000; Untergasser i wsp., 2005; Liu i wsp., 2007; Bartoletti i wsp., 2009; Briganti i wsp., 2009; Nicholson i wsp., 2011]. U podłoża wszystkich leży proces fizjologicznego starzenia się organizmu mężczyzny jako centralny mechanizm inicjacji i rozwoju choroby [Ryc. 2, 3].

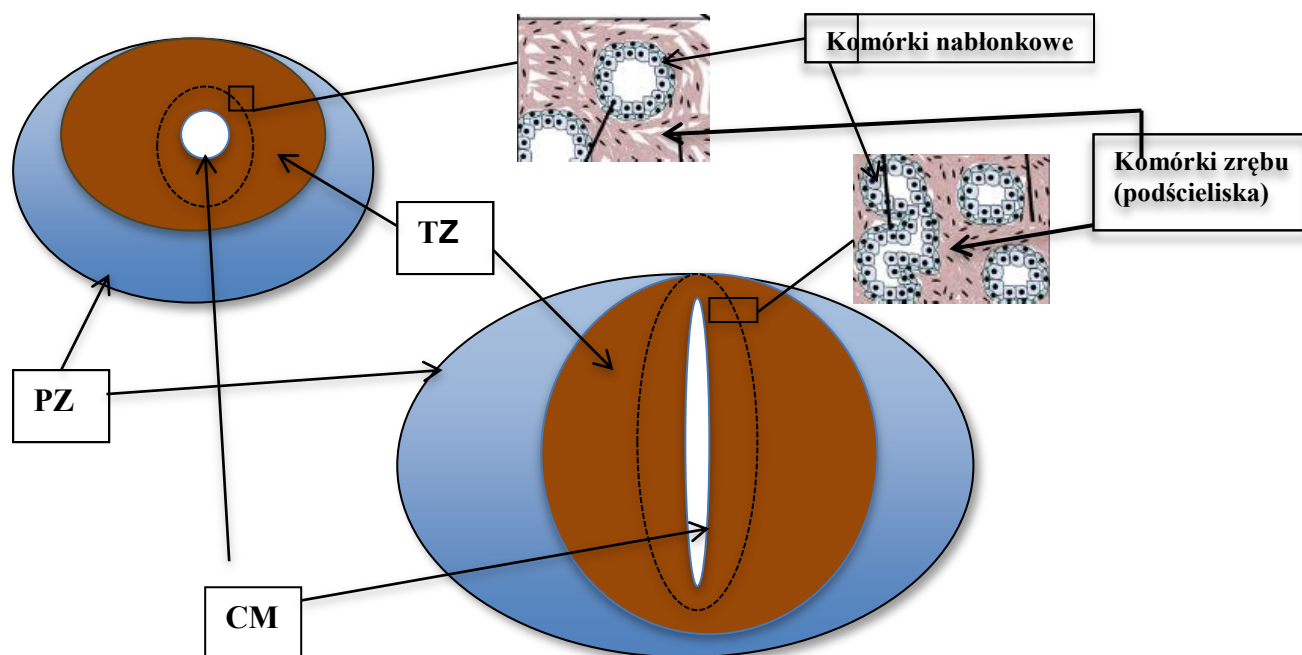


Ryc. 2. Najistotniejsze teorie tłumaczące etiopatogenezę BPH i występujące między nimi zależności [wg Briganti i wsp., 2009].

1.4.1. Teoria indukcji przebudowy tkanek gruczołu krokowego

Teoria podnosząca rozregulowanie homeostazy interakcji komórek podścieliska i komórek nabłonkowych stercza jest uznawana za jedną z najistotniejszych dla rozwoju BPH [Ryc. 3.] [Cunha i wsp., 1978; Cunha i wsp., 2004; Schauer i wsp., 2011; Cunha i wsp., 2011; Ricke i wsp., 2011]. U starzejących się mężczyzn dochodzi do znacznej przebudowy tkanki w obrębie gruczołu krokowego, w szczególności w strefie przejściowej (ang. *transition zone*, TZ). Dochodzi wówczas do swoistego rodzaju ingerencji w sieć wzajemnych oddziaływań czynników wzrostu w tkance podścieliska i nabłonka gruczołu krokowego prowadzącej do wzrostu jego objętości. Do najbardziej znaczących “modyfikacji” dochodzi w komórkach podstawnych nabłonka powierzchniowego stercza, w obrębie których zachodzi zmiana wewnątrzkomórkowego metabolizmu, wskutek czego ulegają one powiększeniu i/lub proliferacji prowadząc do przerostu [Briganti i wsp., 2009; Cunha i wsp., 2011]. W rozwoju BPH odnotowuje się również występowanie inkrustacji, struktur tzw. *corpora amylacea* i kamieni prostaty (ang. *prostatic calculi*) zawierających zazwyczaj fosforanowe sole wapnia,

magnezu, potasu, węglanu lub szczawianu wapnia. Następnie dochodzi do zmian czynności wydzielniczych komórek, a obecność wspomnianych struktur (*corpora amylacea* i kamieni prostaty) prowadzi do zwapnienia i zatkania przewodów wydzielniczych w części gruczołowej stercza [Briganti i wsp., 2009; Schauer i wsp., 2011; Ricke i wsp., 2011]. Procesy te prowadzą zatem przebudowy tkanek oraz zmian wysoce wyspecjalizowanych typów komórek odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy poszczególnych tkanek, stref w obrębie prostaty i ich funkcji [Briganti i wsp., 2009]. Z uwagi na fakt, iż wzrost komórek może być konsekwencją albo zwiększonej proliferacji komórek albo zahamowania procesu ich programowanej śmierci, stąd regulacja aktywności apoptotycznej komórek w obrębie stercza może stanowić kluczowy czynnik indukcji patogenezы BPH i jego progresji [Briganti i wsp., 2009]. Który z tych procesów przeważa sumarycznie w toku rozwoju choroby, tj. proliferacja czy apoptoza, jakie jest podłoże owych zmian? Zagadnienia te są nadal przedmiotem badań wskazując na potencjalny udział wzmożonej ekspresji białek antyapoptycznych w procesie deregulacji programowanej śmierci komórek prostaty prowadzącej w konsekwencji do nie zrównoważonego wzrostu i proliferacji komórek. Stąd też procesy indukcji apoptozy i / lub nekrozy stają się coraz bardziej atrakcyjne dla badaczy w aspekcie projektowania i testowania nowych terapii chorób gruczołu krokowego [Briganti i wsp., 2009; Schauer i wsp., 2011].



Ryc. 3. Schemat zmian w strukturze prostaty w patomechanizmie BPH; wg Izumi i wsp., zmodyfikowane [Izumi i wsp., 2013]. PZ – strefa obwodowa (ang. peripheral zone; PZ); TZ – strefa przejściowa (ang. transition zone; TZ); CM – cewka moczowa.

1.4.2. Teoria zmian hormonalnych - udział genów regulujących metabolizm androgenów i estrogenów

1.4.2.1. Metabolizm i rola androgenów, udział w patogenezie BPH

Androgeny i inne steroidowe hormony płciowe są syntetyzowane z cholesterolu - prekursora steroli. Testosteron (T), główny androgen u mężczyzn, produkowany jest przez komórki Leydiga w jądrach, (zaledwie 1% obwodowego testosteronu ulega syntezie i metabolizmowi w nadnerczach) i odrywa kluczową rolę m.in. w procesie wirylicacji struktur androgenno-zależnych w toku ontogenezy, w spermatogenezie [Veltri i wsp., 2007]. Jego obecność powoduje zahamowanie produkcji hormonów płciowych wskutek ujemnego sprzężenia zwrotnego osi podwzgórze – przysadka - jądra [Veltri i wsp., 2007; Arnold, 2009; Nicholson i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2013].

W prostaty testosteron przekształcany jest przy udziale jądrowego błonowego enzymu 5 α -reduktazy steroidowej (*SRd5ar*) [EC 1.3.99.5] do dihydrotestosteronu (ang. *dihydrotestosterone*, DHT), głównego androgeny w gruczole [McConnell i wsp., 1991; McConnell i wsp., 1995], na drodze enzymatycznej konwersji przy udziale fosforanu dinukleotydu nikotynoadeninowego (NAPDH) [Russell i wsp., 1994] [Ryc. 6.]. Wyróżnia się obecnie trzy izoformy tego enzymu: 5 α -reduktazę steroidową typu 1, typu 2 i typu 3.

Najdokładniejszą charakterystykę tego enzymu opisano jak dotąd w stosunku do izoformy 1 i 2 [Zhu i wsp., 2009]. Różnią się one m. in. chromosomalną lokalizacją genu ich kodującego, dystrybucją w organizmie człowieka, parametrami kinetycznymi (stałą kinetyczną K_m), czy też optimum aktywności w zależności od pH [Jenkins i wsp., 1992; Thigpen i wsp., 1993; Russell i wsp., 1994]. Obecność izoformy typu 3 enzymu stwierdzono, jak dotąd, w komórkach nowotworowych prostaty [Godoy i wsp., 2011; Izumi i wsp., 2013]. Krótką charakterystykę dwóch pierwszych rodzajów 5 α -reduktazy steroidowej przedstawiono w tabeli poniżej [Tab. 1.].

Tab. 1. Charakterystyka izoform 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 i typu 2 [wg Kumar i wsp., 2008; Gravas i wsp., 2010].

izoforma	Typ 1	Typ 2
lokalizacja chromosomalna	chromosom 5	chromosom 2
lokalizacja w organizmie człowieka	szeroko rozpowszechniony – w komórkach skóry, wątroby, prostaty, gruczołu łojowego, w mózgu	komórki ukł. płciowego i narządów płciowych, w tym: gruczołu krokowego, najądrza, pęcherzyków nasiennych, narządów skóry, mieszków włosowych, macicy, wątroby, piersi, łożyska, mózgu
optimum pH	6 - 8.5	5.5
wartość K_m	10 μ M	0.4 μ M
inhibitor	dutasteryd	finasteryd, dutasteryd

Okolo 90% całkowitej gruczołowej puli androgenów (głównie w postaci dihydrotestosteronu; DHT) syntetyzowana jest zasadniczo w jądrach, dalsze 10% stanowią mogą androgeny pochodzenia nadnerczowego, chociaż tej puli przypisuje się mniejsze znaczenie w etiologii BPH [Roehrborn i wsp., 2008; Roehrborn i wsp., 2011]. Wewnątrz komórki, zarówno testosteron i DHT, wiążą się efektywnie do receptora androgenowego, jednakże powinowactwo DHT do receptora jest znacznie większe [Andriole i wsp., 2004]. Obecność tego hormonu podczas rozwoju płodu napędza m. in. zróżnicowanie płciowe zatoki i przekształcanie w prostatę w toku ontogenezy, odpowiedzialna jest również za powstawanie genitaliów męskich i drugorzędnych cech płciowych w procesie wirylizacji [Chatterjee, 2003; Nicholson i wsp., 2011]. Te właśnie właściwości biologiczne sprawiają, iż uznaje się go jako najistotniejszy androgen prostaty, kluczowy w procesie rozwoju i starzenia się tego gruczołu [Roehrborn i wsp., 2008; Nicholson i wsp., 2011].

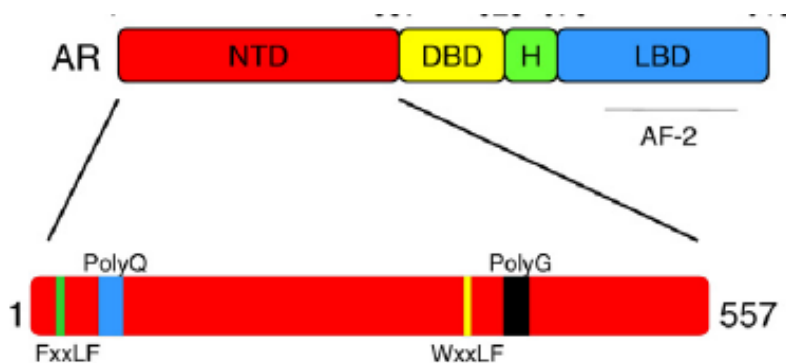
Badacze zajmujący się problematyką schorzeń układu moczowo - płciowego są zgodni, iż u podłoża etiopatogenezy BPH leży generalnie proces starzenia się przy jednoczesnym udziale hormonów płciowych: androgenów i estrogenów, choć ich udział w patogenezie BPH, w szczególności androgenów, wydaje się mieć charakteru permissywny, tj. predysponujący, niejako ułatwiający, czy też przyśpieszający progresję schorzenia, ale go nie indukujący [Huggins i wsp., 2002; Cunha i wsp., 2004; Ho i wsp., 2011]. Stąd też coraz częściej formowane jest przekonanie, iż rozwój schorzenia wymagać może obecności androgenów syntetyzowanych w jądrach już w toku rozwoju czy dojrzewania, a nie tylko w okresie starzenia się mężczyzn [Cunha i wsp., 2004].

Badania nad wewnątrzgruczołowymi zmianami stężeń hormonów płciowych wykazały, że zawartość testosteronu w prostatie ulega zmniejszeniu wraz z wiekiem wskutek przebiegu okresu przekwitania u mężczyzn, w wyniku czego dochodzi do obniżenia tempa syntezy testosteronu w jądrach, w konsekwencji jego stężenia w surowicy [Russell i wsp., 1994; Briganti i wsp., 2009], a na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego prowadzi do zwiększenia produkcji hormonów tropowych przysadki [Briganti i wsp., 2009]. Dochodzi także do zaburzeń metabolizmu testosteronu w sterczu oraz rozregulowania systemu wewnątrzwydzielniczego: podwzgórze-przysadka-gonady [Lepor, 2004; Lepor, 2005]. Doprowadza to do zmniejszania a następnie zaniku strefy zewnętrznej gruczołu krokowego, zwiększenia biosyntezy m.in. estrogenów indukujących rozrost strefy przejściowej [Briganti i wsp., 2009; Ricke i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2013]. Komórki sekrecyjne wyścielające przewody wydzielnicze gruczołów (tzw. luminalne) wymagają obecności androgenów, zwłaszcza wewnątrzkomórkowo DHT, regulującego końcowe procesy różnicowania i wydzielnicze w obrębie stercza, syntetyzowanego m.in. w komórkach głównie w fibroblastach zrębu i w komórkach podstawnych nabłonka gruczołu krokowego [Russell i wsp., 1994; Briganti i wsp., 2009]. DHT, uznawany za kluczowy w patogenezie BPH, oddziałując z receptorami androgenowymi, reguluje transkrypcję szeregu genów promujących proliferację komórek stercza i zwiększanie ich objętości [Wilson i wsp., 1980; Wilson, 1980; Thigpen, 1992; Briganti i wsp., 2009; Ricke i wsp., 2011; Yadav i wsp., 2012; Izumi i wsp., 2013].

Do innych androgenów ulegających przekształceniu w aktywne hormony steroidowe oddziałujących bezpośrednio na aktywność metaboliczną gruczołu krokowego zalicza się takie hormony nadnerczy jak: dehydroepiandrosteronu (DHEA), androstendion, i 5 α -androstendion [Weihua i wsp., 2002; Arnold, 2009; Oliveira i wsp., 2007].

Niecałkowicie wyjaśniony charakter udziału androgenów w etiopatogenezie BPH wynikać może ze skomplikowanej budowy samego receptora androgenowego (ang. *androgen receptor*; AR), fizjologicznego, komórkowego i molekularnego podłoża jego działania, regulacji jego aktywności [Briganti i wsp., 2009; Benett i wsp., 2010; Yadav i wsp., 2012; Green i wsp., 2012; Izumi i wsp., 2013; Nicholson i wsp., 2013; Schrecengost i wsp., 2013]. Receptor androgenowy należy do tzw. klasy I (steroidowej) podrodziny jądrowych receptorów (ang. *nuclear receptor superfamily*; NRSF), do której należą także receptory dla glikokortykoidów, mineralokortykoidów, receptory estrogenowe oraz progesteronu [Benett i wsp., 2010]. Wspólnie wchodzi w skład większej nadrodziny receptorów jądrowych (ang. *nuclear receptors family*; NRF) [Detera-Wadleigh i wsp., 1994; Heinlein i wsp., 2002; Montgomery i wsp., 2001; Yadav i wsp., 2012; Green i wsp., 2012].

Podobnie, jak większość innych członków rodziny receptorów jądrowych, AR posiada kilka domen wykazujące określone funkcje aktywujące (ang. *activation function*, AF; syn. *transcription activation unit*; TAU). W jego strukturze można wydzielić 4 funkcjonalne domeny: N-kończącą, zmienną domenę NTD – tzw. transaktywacyjną (ang. *amino-terminal transactivation domain*; NTD) zawierającą domenę warunkującą funkcję aktywacyjną AF-1 (ang. *activation function domain 1* AF-1) [Chamberlain i wsp., 1996]; silnie konserwatywną (pod względem sekwencji aminokwasowej) domenę DBD – wiążącą DNA (ang. *DNA binding domain*; DBD) zawierającą trzy alfa-helisy białkowe tworzące dwa motywy “palca cynkowego” (ang. *zinc finger motifs*); domenę (region) zawiasową zawierającą tzw. “sygnał lokalizacji jądrowej” (ang. *nuclear localization signal*, NLS); domenę wiążącą ligand (ang. *ligand binding domain*; LBD), w obrębie której znajduje się również domena warunkująca funkcję aktywacyjną - AF-2 (ang. *activation function domain 2*, AF-2) - o bardzo zmiennej sekwencji aminokwasowej decydującej o specyficzności odpowiedzi AR na działanie liganda [Jenster i wsp., 1993; Jenster i wsp., 1995; Chamberlain i wsp., 1996; Nicholson i wsp., 2011; Yadav i wsp., 2012; Izumi i wsp., 2013] [Ryc.4].



Ryc. 4. Schemat budowy receptora androgenowego (AR) z podziałem na poszczególne domeny [wg van de Wijngaart i wsp., 2012].

W odróżnieniu od wysoce konserwatywnych sekwencji aminokwasowych domen DBD i LBD, domena transaktywacyjna NTD jest najmniej konserwatywnym regionem AR. Region ten składa się z szeregu powtórzeń poliglutaminianowych (poli-Q), poliprolinowych (poli-P) i poliglicynowych (poli-G) [Green i wsp., 2012]. Obie wspomniane domeny AF-1 i AF-2 wykazują zróżnicowaną zależność od liganda. Domena AF-1 wykazuje swoją aktywność niezależnie od jego obecności, natomiast aktywność AF-2 wymaga specyficznego wiązania się liganda. Sugeruje się również kluczową rolę wzajemnych interakcji pomiędzy domenami NTD i LBD w aktywacji molekularnej receptora androgenowego [He i wsp., 2000; Langley i wsp., 1995; Chang i wsp., 1999; Chang i wsp., 2005; Wang i wsp., 2005]. U ludzi gen kodujący AR zlokalizowany jest na chromosomie X, wielkości 75–90 tys. par zasad (kb) DNA. Region kodujący obejmuje 8 egzonów [Benett i wsp., 2010; Culig i wsp., 2012; van de Wijngaart i wsp., 2012] [Ryc. 4.].

W stanie niezwiązanym z ligandem AR występuje w cytoplazmie komórkowej w połączeniu z tzw. białkami szoku cieplnego (opiekuńczymi; syn. szaperonowymi; ang. *heat shock proteins*; HSP. Minimalny zestaw białek warunkujących stabilizację receptora obejmuje białka: Hsp70 (hsc70), Hsp40 (Ydj1), Hop (p60), Hsp90 i p23 [Pratt i wsp., 1997; Dittmar i wsp., 1998; Kosano i wsp., 1998; Prescott i wsp., 2006]). W tym stanie AR jest uważany za nieaktywny, niezdolny do wiązania się z innymi białkami, ani do wpływu na transkrypcję genów [Prescott i wsp., 2006; Chmelar i wsp., 2007; Culig i wsp., 2012; van de Wijngaart i wsp., 2012].

W klasycznej, tzw. “kanonicznej”, genomowej drodze działania AR (ang. *canonical pathway*; syn. *genomic pathway*) w komórkach stercza, indukcja aktywności molekularnej odbywa się wskutek wiązania się z androgenami prowadząc do określonej kaskady zdarzeń. Wiązania się liganda (testosteronu, dihydrotestosteronu) do swego rodzaju “kieszoni” w

obrębie C-końcowej domeny wiążącej ligand (LBD) inicjuje skomplikowane zmiany konformacyjne AR [Jenster i wsp., 1993; Wang i wsp., 2005; Benett i wsp., 2010; Nicholson i wsp., 2011], dysocjację AR z kompleksu z białkami HSP, a w konsekwencji translokację do jądra komórkowego, sterowaną przez domenę NLS [Simental i wsp., 1991; Jenster i wsp., 1993; Benett i wsp., 2010; Nicholson i wsp., 2011; Yadav i wsp., 2012; van de Wijngaart i wsp., 2012; Green i wsp., 2012]. W strukturze dimeru AR dwie domeny DBD rozpoznają specyficznym określone, konstytutywne sekwencje DNA określane terminem “elementami odpowiedzi androgenów” (ang. *androgen response elements*; ARE) składających się z dwóch palindromowych sekwencji przedzielonych trójką nukleotydową AGAACAnnnTGTTCT [Verrijdt i wsp., 2003; Gao, 2010; van de Wijngaart i wsp., 2012] [Ryc. 5.].

Receptory steroidowe, w tym AR, w komórkach prostaty nie oddziałują samodzielnie na geny będące pod ich kontrolą lecz pośredniczą w sieci interakcji z czynnikami transkrypcyjnymi [Lee i wsp., 2000], z kompleksem polimerazy RNA II [Lee i wsp., 2003] oraz białkami warunkującymi modyfikację (relaksację) struktury chromatyny. W pierwszej fazie tego etapu dochodzi m.in. do utworzenia tzw. kompleksu preinicjującego; ang. *preinitiation complex*, PIC [Lee i wsp., 2000]) prowadzącymi do inicjacji syntezy mRNA genów docelowych w komórkach gruczołu krokowego, m. in. PSA (określane również symbolem PSAT1; ang. *phosphoserine aminotransferase 1* – aminotransferaza fosfoserynowa 1) [Montgomery i wsp., 1992;] i TGFβ [Kyprianou i wsp., 1989] i innych [O'Malley i wsp., 2009].

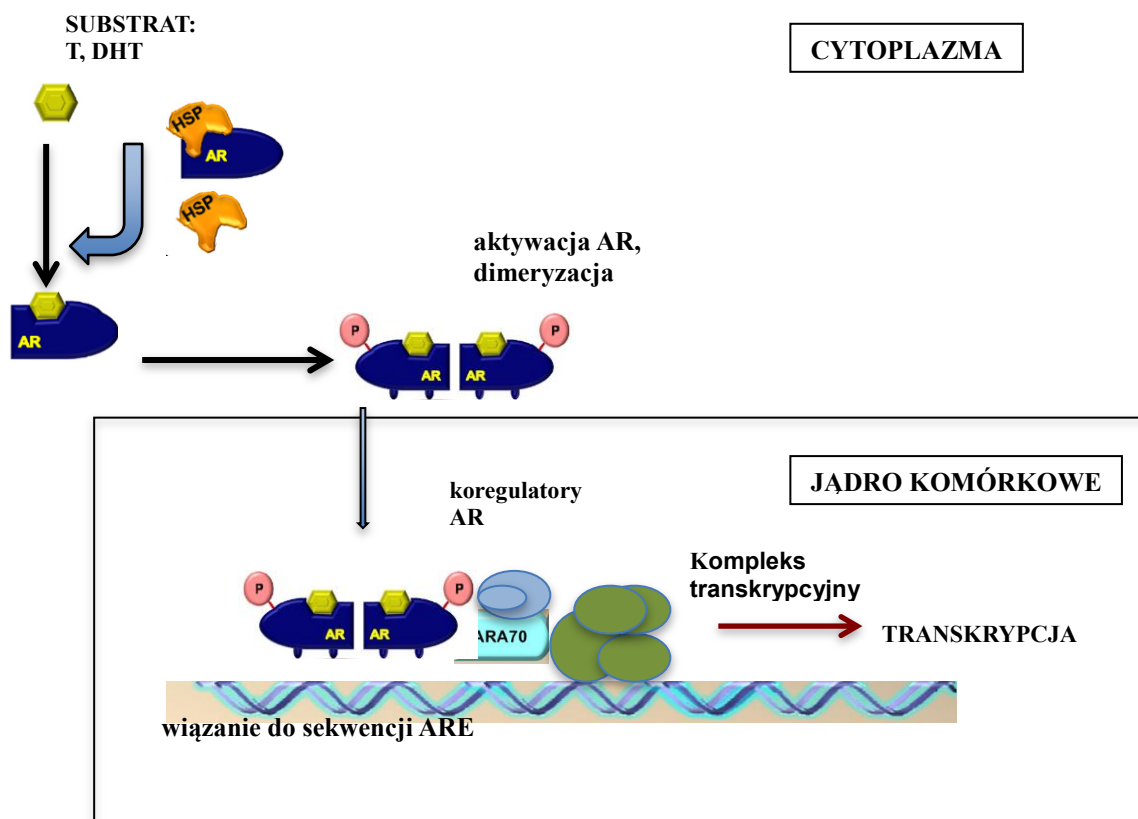
Oprócz wpływu bezpośredniego oddziaływania z białkami komórkowej maszynery transkrypcyjnej na aktywność molekularną AR kluczową rolę w tym procesie odgrywają tzw. białka regulatorowe (syn. koregulatorowe; ang. *co-regulators*) [Lee i wsp., 2000]. W skład ich wchodzi tzw. koaktywatory (ang. *co-activators*) - czynniki bezpośrednio oddziałujące z AR i prowadzące do zwiększenia jego aktywności transkrypcyjnej, oraz hamujące ich działanie białka korepresorowe (ang. *corepressors*) - na drodze różnych mechanizmów [Wang i wsp., 2005; Gao, 2010; Culig i wsp., 2012; van de Wijngaart i wsp., 2012; Izumi i wsp., 2013] [Ryc. 5.]. Oba typy koregulatorów są niezbędne do efektywnej regulacji aktywności AR, w tym regulacji transkrypcji genów docelowych [Chang i wsp., 2005; Wang i wsp., 2005; Chmelar i wsp., 2007].

Obecnie samych koaktywatorów receptora androgenowego, których umownie dzieli się na dwie klasy, zidentyfikowano ponad 300 [Culig i wsp., 2012; van de Wijngaart i wsp., 2012], a wiele z nich jest składnikami lub wchodzi w oddziaływania z białkowymi kompleksami warunkującymi m. in. kowalencyjne modyfikacji histonów (tzw. enzymy

modyfikujące histony; ang. *histone modifying enzymes*, HME) [Chen i wsp., 1997; Spencer i wsp., 1997; Blanco i wsp., 1998; Heemers i wsp., 2007; Kinyamu i wsp., 2004; Powell i wsp., 2004; Tan i wsp., 2000; Wang i wsp., 2005; van de Wijngaart i wsp., 2012; Culig i wsp., 2012].

Pierwsza klasa koaktywatorów wpływa na funkcjonalną aktywność receptorów steroidowych, wpływając na aktywność komórkowych procesów transkrypcyjnych [Heinlein i wsp., 2002; Hofman i wsp., 2001; Lewis i wsp., 2003; Culig i wsp., 2004; Culig, 2004]. Białka koaktywatorowe należące do drugiej klasy wykazują aktywność modyfikującą strukturę chromatyny poprzez zmiany aktywności acetylotransferazy histonów lub biorą udział w przebudowie (zmianach konformacji) chromatyny zależnej od ATP [Heinlein i wsp., 2002; Dilworth i wsp., 2001; Culig i wsp., 2004; Wang i wsp., 2005; Lee i wsp., 2003; Chmelar i wsp., 2007; Culig i wsp., 2012; van de Wijngaart i wsp., 2012]. Wykazano ponadto, że aktywacja AR i inicjacja transkrypcji genów wiąże się z jego przyłączeniem do innych czynników transkrypcyjnych - w tym przypadku receptor działa zasadniczo jak koaktywator wiążący się z innymi koaktywatorami [Green i wsp., 2012]. Przykładami koaktywatorów, których nadekspresja w komórkach prostaty koreluje z aktywnością receptora androgenowego są białka: ARA70, FHL2, TIF2, FHL2 [Heemers i wsp., 2007; Agoulnik i wsp., 2006]. Natomiast przykładami androgenoniezależnych koaktywatorów AR są m. in. białka p300, CBP [Culig i wsp., 2012] i Tip60 [Halkidou i wsp., 2003]. Przedstawicielami korepresorów receptora androgenowego są m.in. kompleksy ARA67/PAT1 [Zhang i wsp., 2004], kalretikulina [Dedhar i wsp., 1994], białko Akt [Lin i wsp., 2001] czy też białko ARR19 [Jeong i wsp., 2004].

Trudności w zrozumieniu roli jaką odgrywają androgeny i receptor androgenowy w etiopatogenezie BPH przysparza również fakt złożonej enzymatycznej regulacji aktywności molekularnej tego receptora [Benett i wsp., 2010; Green i wsp., 2012]. Białko to podlega szeregu procesom fosforylacji i jest substratem dla enzymów należących do grup kinaz białkowych, w tym dla kinaz tyrozynowych czy w szlaku sygnalizacji komórkowej za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkiem G (GPCR) [Cao i wsp., 2006; Benett i wsp., 2010]. W obu przypadkach obserwuje się fosforylację (aktywację) szeregu specyficznych reszt serynowych w strukturze AR, w obecności lub niezależnie od obecności liganda (androgenów) [Blok i wsp., 1998; Yeh i wsp., 1999; Scheid i wsp., 2001; Gioeli i sp., 2002; Manin i wsp., 2002; Cao i wsp., 2006; Chmelar i wsp., 2007; Benett i wsp., 2010; Mazaris i wsp., 2013; Ahmed i wsp., 2014].



Ryc. 5. Schemat genomowej drogi działania receptora androgenowego [Li i wsp., 2009 - zmodyfikowane]. AR – receptor androgenowy; HSP – białka szoku termicznego (ang. *heat shock proteins*); ARA70 – przykład białka aktywatora AR.

Wyniki naukowych obserwacji poczynionych w ostatnich dwóch dekadach, w przeważającej ilości przeprowadzone na hodowlach komórkowych [Foradori i wsp., 2007; Foradori i wsp., 2008; Benett i wsp., 2010] wskazują, iż androgeny (podobnie jak progesteron i estrogeny), oprócz wspomnianej powyżej klasycznej, genomowej, drogi działania mogą wywoływać komórkowe i fenotypowe efekty (m.in. wynikające z faktu aktywacji zmian androgenno-zależnych pomimo obecności inhibitorów transkrypcji) świadczące o istnieniu innej, tzw. niegenomowej (syn. pozagenomowej; ang. *nongenomic pathway*) drogi ich działania [Linja i wsp., 2004; Chmelar i wsp., 2007; Benett i wsp., 2010; Nicholson i wsp., 2011; Green i wsp., 2012; Kamrath i wsp., 2013; Mazaris i wsp., 2013; Ahmed i wsp., 2014]. Jako przykład niegenomowego mechanizmu działania hormonów steroidowych (w tym AR) można przytoczyć wyniki obserwacji świadczących m.in. o tym, iż kompleksy hormony-zaktywowane receptory jądrowe (w tym AR) są w stanie oddziaływać wraz z innymi czynnikami transkrypcyjnymi w obrębie sekwencji promotorowych genów docelowych bez bezpośredniego wiązania się z DNA [Gottlicher i wsp., 1998]. Innym przykładem omawianej

drogi działania hormonów steroidowych jest aktywacja kinazy aktywowanych mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases*, MAPK): głównie kinaz Raf oraz ERK1/2 [Unni i wsp., 2004] z wyłączeniem bezpośredniej indukcji procesów transkrypcyjnych w procesie transdukcji sygnałów w komórkach docelowych [Migliaccio i wsp., 1996; Migliaccio i wsp., 1998; Castoria i wsp., 1999] oraz często występujący w wielu różnych typach komórek szybki wzrost stężenia wewnątrzkomórkowego wapnia [Ca²⁺] [Steinsapir i wsp., 1991; Lieberherr i wsp., 1993; Audy i wsp., 1996; Benten i wsp., 1998; Benten i wsp., 1999; Liu i wsp., 2005; Foradori i wsp., 2007] . Efekty te pojawiają się zwykle w ciągu kilku sekund do minut i zostały opisane dla wszystkich klas hormonów steroidowych [Baulieu i wsp., 1995; Wehling i wsp., 2006; Foradori i wsp., 2008; Nicholson i wsp., 2011].

Kluczowa rolę w niegenomowej drodze działania hormonów steroidowych, oprócz wspomnianych kinaz, odgrywają komórkowe szlaki sygnalizacyjne, w których pośredniczą także kinazy Akt, niereceptorowe kinazy tyrozynowe Src [Migliaccio i wsp., 1996; Migliaccio i wsp., 2000; Kousteni i wsp., 2001], drugorzędowe przekaźniki informacji cAMP czy kinazy białkowe A, C (ang. *protein kinases A, C*; PKA, PKC) [Ikonen i wsp., 1994; Nazareth i wsp., 1996; Sadar i wsp., 1999] przy udziale białek transportujących androgeny SHBG (ang. *sexual hormone binding globulins*) wiążących się z receptorem AR oraz testosteronem [Ikonen i wsp., 1994; Nazareth i wsp., 1996; Rowan i wsp., 2000; Wang i wsp., 2002; Linja i wsp., 2004; Foradori i wsp., 2008]. Coraz częściej w pozagenomowej, komórkowej drodze działania androgenów bierze się również pod uwagę istnienie nowego, błonowego receptora steroidowego (osadzonego w błonie, związanego z nią bezpośrednio lub pośrednio przy udziale białek SHBG), w tym androgenowego [Kampa i wsp., 2002; Pedram i wsp., 2002; Foradori i wsp., 2008; Michels i wsp., 2008].

1.4.2.2. Estrogeny – ich metabolizm, udział w patogenezie BPH

Jak wspomniano uprzednio, na rozwój i czynność gruczołu krokowego wpływają również estrogeny, w szczególności estradiol (oznaczenie skrótowe - E2), który do stercza dostarczany może być krwiobiegem, jest syntetyzowany wskutek enzymatycznej konwersji (aromatyzacji) z testosteronu i androgenów nadnerczowych w komórkach mięśniowych i tłuszczowych katalizowanej przez enzym aromatazę (syn. CYP19) [Griffiths, 2000; Ellem i wsp., 2009]. Szacuje się, iż około 70% puli ww. hormonów wytwarzanych jest na tej drodze, względnie powstaje bezpośrednio w jądrach (około 30%) [Weihua i wsp., 2001; Smith i wsp., 2002; Ellem i wsp., 2009; Ellem i wsp., 2010] [Ryc. 6.].

W przeciwieństwie do obniżającej się wraz z wiekiem puli testosteronu w surowicy starzejących się mężczyzn [Vermeulen i wsp., 1972], pula estradiolu w surowicy pozostaje zwykle niezmieniona lub może ulec podwyższeniu [Briganti i wsp., 2009]. Jednakże u starzejących się mężczyzn często obserwuje się przyrost masy ciała wynikający, po części, ze zwiększonej ilości podskórnej tkanki tłuszczowej [Zumoff i wsp., 1982; Griffiths i wsp., 2000; Briganti i wsp., 2009]. W komórkach adipocytów dochodzi wówczas do nadmiernej aktywacji aromatazy o nie w pełni poznanym podłożu, co prowadzi może następnie do zwiększenia ilości obwodowego DHT powstającego na drodze aromatyzacji [Vermeulen i wsp., 2002], zwiększonej dystrybucji tego hormonu do gruczołu krokowego prowadzącej do reaktywacji, bądź też indukcji proliferacji komórek stercza [Thomas i wsp., 1994; Stettner i wsp., 2007; Vermeulen i wsp., 2002; Briganti i wsp., 2009; Izumi i wsp., 2013].

W konsekwencji obserwuje się znaczący spadek stosunku obwodowego testosteronu do estradiolu, który jest tymczasowo związany z występowaniem schorzeń prostaty, w szczególności postaci nowotworowej [Ellem i wsp., 2009]. Indukowane obecnością estrogenów aberracje gruczołu krokowego wywołane rozrostem nabłonka prostaty odnotowano, oprócz ludzi, również u małp i psów [Coffey i wsp., 1990; Prins i wsp., 2006; Prins i wsp., 2008; Briganti i wsp., 2009; Ellem i wsp., 2010].

Kolejnym przykładem wpływu estrogenów na gruczoł krokowy przytoczyć mogą być wyniki obserwacji świadczących o tym, iż estradiol pochodzenia matczynego powoduje metaplastę nabłonka płaskokomórkowego w rozwijającym się gruczole krokowym w męskim potomstwie [Prins i wsp., 2008]. Eksperymentalnie wykazano możliwość indukcji rozrostu prostaty u psów otrzymujących *per os* testosteron i estradiol (również dihydrotestosteron) [Juniewicz i wsp., 1989; Winter i wsp., 1995; Winter i wsp., 1996], jak i u szczurów [Noble i wsp., 1977] - w obu rodzajach badaniach modelowych obecność estradiolu była kluczowym czynnikiem warunkującym występowanie indukowanej postaci BPH [Kawashima i wsp., 2012].

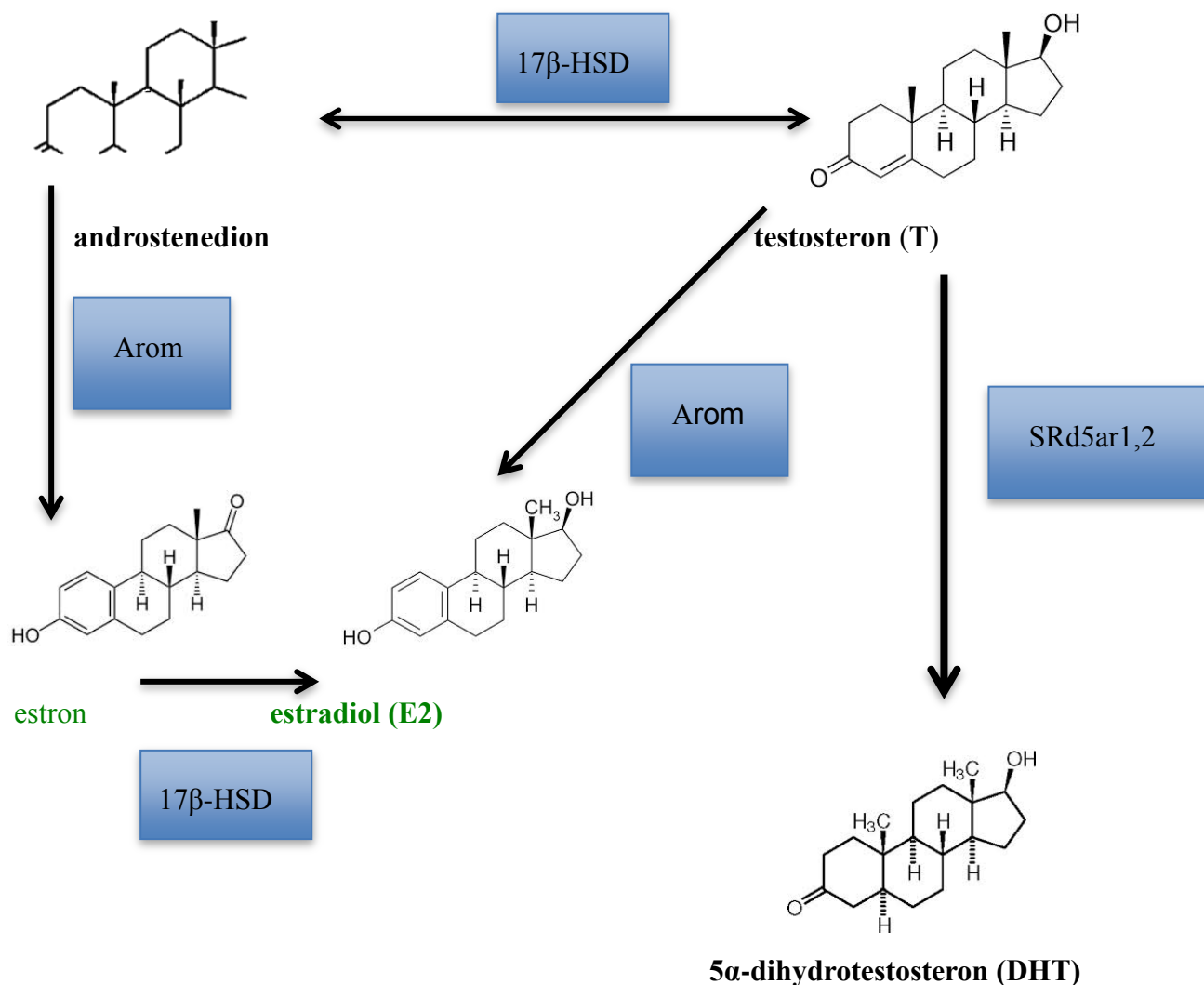
Przytoczone powyżej informacje oraz wyniki szeregu innych prac eksperymentalnych wskazują, iż również estrogeny, a nie tylko hormony androgenowe, odgrywać mogą istotną rolę w patomechanizmie BPH [Prins i wsp., 2006], indukując estrogenozależną proliferację komórek [Coffey i wsp., 1990; Prins i wsp., 2006; Prins i wsp., 2008; Briganti i wsp., 2009], oddziałując na środowisko komórkowe stercza poprzez aktywację receptorów estrogenowych i androgenowych [Weihua i wsp., 2002; Smith i wsp., 2002] oraz wpływ na produkcję w wątrobie globulin wiążących hormonów płciowych [Von Schoultz i wsp., 1989; Farnsworth, 1999; Gupta i wsp., 2000; Smith i wsp., 2002] jak i czynników wzrostu tkanek [Gupta i wsp.,

2000; Weihua i wsp., 2001; Smith i wsp., 2002]. Dotychczas fizjologiczne i molekularne podłoże aktywności estrogenów i ich rola w patogenezie BPH nie zostały w pełni wyjaśnione. W świetle aktualnego stanu wiedzy oprócz ich wpływu na komórki nabłonka gruczołu krokowego uważa się, że estrogeny mogą stymulować również proliferację komórek zrębu [Coffey i wsp., 1990; Prins i wsp., 2006; Prins i wsp., 2008; Briganti i wsp., 2009; Ellem i wsp., 2009; Ho i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2011].

W komórkach docelowych hormony estrogenowe wiążą się do receptorów estrogenowych występujących w postaci dwóch izoform: receptor estrogenowy alfa (ang. *estrogen receptor alpha*; ER α ; syn. ER α , ER1) i receptor estrogenowy beta (ang. *estrogen receptor beta*; ER β ; syn. ER β , ER2), zróżnicowanych pod względem strukturalnym czy lokalizacji tkankowej (ER α ulega ekspresji głównie w zrębie prostaty, a ER β jest zlokalizowany przede wszystkim, ale nie wyłącznie, w komórkach nabłonka) [Weihua i wsp., 2001; Weihua i wsp., 2002; Bonkhoff i wsp., 2003; Bosland, 2005; Ho i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2013]), funkcjonalnym [Bosland, 2005; Ho i wsp., 2011] oraz potencjalnego znaczenia w schorzeniach prostaty [Kawashima i wsp., 2012]. Izoformie ER α przypisuje się generalnie funkcję stymulującą proliferację komórek, podczas gdy ER β funkcję pośredniczącą w procesie, z jednej strony biorącej udział w procesie różnicowania komórek nabłonka gruczołu krokowego, z drugiej natomiast wskazuje się na jej właściwości antyproliferacyjne / apoptotyczne w komórkach nowotworowych [Bosland, 2005; Bonkhoff i wsp., 2009; Kawashima i wsp., 2012]. Prowadzone w tym zakresie badania wskazują ponadto na potencjalne znaczenie białkowych czynników wzrostu, w szczególności FGF2 [Smith i wsp., 2002], ulegającemu aktywacji wraz z ER α w komórkach zrębu gruczołu krokowego [Prins i wsp., 2008; Briganti i wsp., 2009; Ellem i wsp., 2009].

Postęp wiedzy w tej materii wskazuje na swoistego rodzaju dualistyczny charakter estrogenów w patomechanizmie schorzeń prostaty, w szczególności postaci nowotworowej, nie wykluczone jednak, że również w łagodnym rozroście gruczołu krokowego [Ellem i wsp., 2009; Ho i wsp., 2011; Kawashima i wsp., 2012; Nicholson i wsp., 2013]. Uważa się, iż postępujący wraz z wiekiem relatywny stabilny poziom lub nadmiar estrogenów u mężczyzn (będący przynajmniej częściowo konsekwencją, jak wspomniano uprzednio, konwersji T pochodzącego z nadnerczy do 17 β -estradiolu), zaburzenie homeostazy stosunku obwodowej i tkankowej puli androgenów / estrogenów mogą być sygnałem do hiperplazji strefy komórek zrębu gruczołu krokowego [Griffiths i wsp., 2000; Weihua i wsp., 2002; Roberts i wsp., 2004; Lopor, 2005]. Sugeruje się ponadto, że aktywacja ER α w zrębie przez estrogeny promować może proliferację komórek tej strefy [Griffiths i wsp., 2000; Imamov i wsp., 2004; King i

wsp., 2006; Zhao i wsp., 2007; Zhang i wsp., 2008; Kawashima i wsp., 2012]. Podobnie jak w przypadku androgenów, niecałkowicie wyjaśniony charakter udziału estrogenów w etiopatogenezie BPH również wynikać może ze skomplikowanej budowy receptorów, czy też regulacji ich aktywności [Ellem i wsp., 2009; Ho i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2013].



Ryc. 6. Schemat metabolizmu wybranych androgenów i estrogenów w komórkach zrębu prostaty z udziałem kluczowych enzymów patogenezy BPH. Opracowanie własne.

SRd5ar1,2 - 5 α -reduktaza steroidowa (izoformy typu 1,2); *Arom* – aromataza; *17 β -HSD* – reduktaza 17 β -hydroksysteroidowa; czarny kolor – androgeny; zielony kolor – estrogeny.

1.4.2.3. Kontrowersje w klinicznym obrazie obwodowego stężenia androgenów / estrogenów w patomechanizmie BPH

Badania dowodzą, że u starszej wiekiem populacji mężczyzn cierpiących na BPH może dochodzić do dodatnich korelacji pomiędzy stężeniem wolnego z estradiolu,

biodostępnego testosteronu w obwodzie, poszczególnymi symptomami dolegliwości LUTS a objętością gruczołu krokowego, co, zdaniem przynajmniej części badaczy, może być spójne z założeniem synergicznego związku między estrogenami a androgenami w patogenezie BPH u mężczyzn w wieku starszym [Roberts i wsp., 2004; Ellem i wsp., 2010].

Dokładna analiza zmian stężeń biodostępnego testosteronu, estradiolu w surowicy, w homogenatach tkanek gruczołu krokowego, białkowego markera PSA (ang. *prostate specific antigen*) w surowicy pacjentów, intensywności występowania określonych dolegliwości LUTS i tempa wzrostu masy i objętości gruczołu krokowego w określonych grupach wiekowych pacjentów ze zdiagnozowanym BPH nie musi jednak wskazywać na oczywiste, łatwe w identyfikacji korelacje [Lepor, 2005; Nicholson i wsp., 2011]. W badaniach Roberts i wsp. stwierdzono m.in., iż występowanie u starszych mężczyzn podwyższonego poziomu biologicznie dostępnego testosteronu i estradiolu w surowicy może być wyrazem dodatniej (pozytywnej) korelacji z procesem powiększenia rozmiarów prostaty i stężenia markera PSA w surowicy, ale już ujemnie (negatywnie) związane z wartościami urodynamicznymi (m.in. tzw. parametru Qmax) u pacjentów i stopniem nasilenia objawów LUTS [Robert i wsp., 2004]. Na możliwości wystąpienia problemów w dążeniu do ustalenia stopnia progresji BPH na podstawie pomiaru zmian obwodowych androgenów i estrogenów wskazują kolejne obserwacje dokonane m.in. przez Roberts i wsp. świadczące, iż u mężczyzn z niskim poziomem biodostępnego testosteronu wartości poziomu estradiolu mogą być skorelowane wprost proporcjonalnie z wartościami Qmax, jednakże bez związku ze zmianami objętości gruczołu krokowego [Robert i wsp., 2004].

Fizjologiczne i molekularne mechanizmy leżące u podstaw wpływu hormonów płciowych na zmiany objętości gruczołu krokowego, stężenia PSA w surowicy, parametry urodynamiczne prostaty, mogą być osobniczo zmienne i, pomimo przeprowadzonych w ostatnich latach badań eksperymentalnych i klinicznych w tym obszarze, pozostają nadal nie w pełni poznane i wymagają wyjaśnienia. Szereg prac wykonanych na przestrzeni minionych lat nie wykazała bowiem istotnej korelacji pomiędzy zmianami stężeń estradiolu (transportowanego z białkami SHBG oraz w postaci wolnej, niezwiązanej, często określanego terminem „całkowitego”) [Cochran i wsp., 1981; Rannikko i wsp., 1983; Hulka i wsp., 1987; Suzuki i wsp., 1992], wolnego [Rannikko i wsp., 1983] i biologicznie dostępnego T [Partin i wsp., 1991; Parson i wsp., 2006] w osoczu lub surowicy starzejących się mężczyzn z objawami BPH. Nie znaleziono bowiem istotnego związku między stężeniem całkowitego T w osoczu u pacjentów ze stwierdzonym BPH [Rannikko i wsp., 1983; Parson i wsp., 2006], u pacjentów cierpiących na BPH poddanych zabiegowi chirurgicznemu [Gann i wsp., 1995;

Platz i wsp., 1999] lub z nasilonymi objawami LUTS świadczącymi o powiększeniu prostaty [Platz i wsp., 1999]. Również udział wpływu zmian stężeń obwodowego estradiolu na stopień progresji BPH, nasilenia symptomów LUTS i zmian objętości gruczołu krokowego wymaga dalszych ustaleń w celu potwierdzenia pozytywnego lub udowodnienia negatywnego związku przyczynowo - skutkowego. Postulowana rosnąca rola oszacowania stosunku estradiolu do objętości prostaty, stężenia markera PSA w surowicy u mężczyzn i wysokiej zawartości biodostępnego T w diagnostyce przebiegu rozrostu prostaty, cieszy się w środowisku urologów i endokrynologów coraz większym zainteresowaniem [Robert i wsp., 2004; Lepor, 2005]. Przypuszcza się, że obserwowane relacje mogą być wynikiem wpływem estradiolu i/lub ww. androgeny nie tylko na wielkość gruczołu krokowego ale i powodować zaburzenia funkcjonowania pęcherza moczowego umiejscowionego w bezpośrednim anatomicznym sąsiedztwie stercza, która to zmiana może zwrotnie promować patogenezę BPH [Robert i wsp., 2004].

Jakkolwiek przytoczone powyżej przykłady badań wskazują na pewnego rodzaju zależności pomiędzy zmianami stężenia całkowitego estradiolu, biodostępnego T a występowaniem zmian masy i objętości gruczołu krokowego u starzejących się mężczyzn, to jednak bez wątpienia mają one skomplikowany charakter, ciągle nie w pełni poznany. Świadczą o tym, iż u podłoża indukcji / progresji łagodnego rozrostu gruczołu krokowego leżeć mogą także inne fizjologiczno - molekularne patomechanizmy [Lepor, 2005].

1.4.3. Procesy zapalne w przebiegu BPH

Procesy zapalne przebiegające w obrębie stercza mogą w znaczący sposób wpływać na powstawanie zmian rozrostowych zachodzących w gruczole krokowym i w jego bezpośrednim anatomicznym otoczeniu [Briganti i wsp., 2009; Gandaglia i wsp., 2013; Corona i wsp., 2014].

Szereg badań klinicznych, autopsyjnych (histopatologicznych) potwierdziło, oprócz obecności limfocytów T, B, makrofagów i komórek tucznych w zakresie fizjologicznych wartości [Steiner i wsp., 1994; Bierhoff i wsp., 1996; Bostwick i wsp., 2003], występowanie lokalnych procesów zapalnych w obrębie gruczołu krokowego u pacjentów z objawami BPH [Briganti i wsp., 2009]. Postęp wiedzy jaki dokonał się w tym obszarze skłania badaczy do przekonania znacznego udziału przewlekłego zapalenia stercza w promocji włóknisto – mięśniowego rozrostu w obrębie prostaty w patomechanizmie BPH [Kramer i wsp., 2002; Briganti i wsp., 2009]. Jako przykład można przytoczyć badania Kohnen i wsp. [Kohnen i

wsp., 1979], badania REDUCE (ang. *Reduction by Dutasteride of Prostate Cancer Events trial*) [Nickel i wsp., 2007; Nickel i wsp., 2008], MTOPI (ang. *Medical Therapy of Prostate Symptoms Study*) [Kramer i wsp., 2006; Kramer i wsp., 2007], w których poziom infiltracji komórek procesu zapalnego w obrębie stref gruczołu krokowego sięgał 43% - 98%. Nierzadko stwierdza się dodatnią korelację pomiędzy znacznym rozrostem stercza, podwyższonym poziomem PSA, zwiększonym ryzykiem występowania ostrego nietrzymania moczu a progresją stanu zapalnego [Kramer i wsp., 2006; Kramer i wsp., 2007].

Istnieje wiele hipotez dotyczących nagromadzenia czynników wzrostowych i cytokin, które indukują powstawanie stanów prozapalnych w obrębie stercza [Briganti i wsp., 2009; Chughtai i wsp., 2011; Chughtai i wsp., 2013; Gandaglia i wsp., 2013; Corona i wsp., 2014]. Jedną z najbardziej wiarygodnych wydaje się być hipoteza oparta na etiologii infekcyjnej. W kilku badaniach wykazano bowiem obecność różnorodnych bakterii i szczepów wirusowych w próbkach BPH. Szczepy te mogą prowadzić do wytwarzania prozapalnych cytokin i chemokin w obrębie komórek zrębu, co z kolei może prowadzić do rozrostu gruczołu prawdopodobnie na skutek reakcji autoimmunologicznych wobec własnych antygenów uwolnionych w wyniku uszkodzenia tkanki [Mishra i wsp., 2007]. Spośród autoantygenów, które uważa się za najbardziej prawdopodobne należy wskazać na antygen PSA, którego obecność przyczyniała się do aktywacji receptorów CD4⁺ komórek T [Robert i wsp., 2009]. Istnieją badania wykazujące, że interleukiny prozapalne mogą prowadzić do progresji BPH [Briganti i wsp., 2009; Corona i wsp., 2014].

Coraz powszechniej postulowane jest założenie, iż odnotowywane zmiany zapalne spowodowane mogą być mikrouszkodzeniami w obrębie stercza na poziomie lokalnym, a cytokiny produkowane przez komórki zapalne mogą służyć do kierowania w miejsca mikrouszkodzeń tkanek gruczołu krokowego i lokalnej produkcji czynników wzrostu i/lub procesu angiogenezy w tkance w sposób zbliżony do obserwowanego w procesie gojenia się ran [Briganti i wsp., 2009; Corona i wsp., 2014]. Stwierdzano bowiem podwyższone stężenia szeregu cytokin prozapalnych w tkankach BPH, m. in. w komórkach zrębu interleukin IL-15 [Handisurya i wsp., 2001], w komórkach bazalnych i zrębu stercza – cytokin IL-17, limfocytów T [Steiner i wsp., 2003], a w komórkach epitelialnych interleukin IL-8 [Royuela i wsp., 2000; Giri i wsp., 2001; Briganti i wsp., 2009]. W testach *in vitro* obserwowano, że receptory CD4⁺ na limfocytach T aktywowane przez rozrastające się komórki zrębu prostaty przyczyniały się do znacznego wzrostu wydzielania m. in. interleukin IL-12, 17 i IL-23 [Penna i wsp., 2009; Xu i wsp., 2010]. McDowell i wsp. wykazali, że komórki zapalne mogą być przyciągane do mikrośrodowiska tkanki gruczołu krokowego i mogą selektywnie

promować procesy proliferacji nabłonka prostaty [McDowell i wsp., 2009]. Wang i wsp. obserwowali natomiast, że cyklooksygenaza 2 (COX-2) może również w znaczący sposób przyczyniać się do powstawania stanu zapalnego w obrębie stercza [Wang i wsp., 2004]. W badaniu z udziałem ludzkich komórek nabłonka zrębu gruczołu prostaty wykazano, że starzenie zrębu prostaty powoduje aktywację kilku genów kodujących mediatory zapalne, takie jak chemokiny (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL6, CXCL12) i interleukiny, np. IL-11, IL-33 [Begley i wsp., 2008]. Procesy te mogą przebiegać na niskim poziomie i narastać w czasie, prowadząc z czasem do promowania i proliferacji zarówno komórek nabłonka jak i fibroblastycznych / miofibroblastycznych typów komórek w starzejącym się gruczole BPH [Robert i wsp., 2009; Briganti i wsp., 2009; Corona i wsp., 2014].

Zarówno przewlekłe jak i ostre zapalenie może prowadzić do sytuacji prowadzących do proliferacji komórek tkanki gruczołu krokowego przy udziale procesów utleniających [Naber i wsp., 2000]. Wiadomym jest, iż zapalenie gruczołu krokowego może prowadzić również do powstawania wolnych rodników, powiązanych z tlenkiem azotu (ang. *nitric oxide*, NO) i różnych innych reaktywnych form tlenu [Naber i wsp., 2000]. Makrofagi i neutrofile, które są źródłem wolnych rodników, mogą wywoływać zmiany rozrostowe, zmiany tkankowe i mutacje DNA oraz prowadzić do uwalniania kwasu arachidonowego z błon. Uważa się, że aktywność NO i COX może odgrywać ważną rolę w określaniu związku pomiędzy zapaleniem i rozrostem prostaty [Naber i wsp., 2000].

1.4.4. BPH jako zespół metaboliczny

Na przełomie ostatnich dwóch dziesięcioleci coraz częściej podkreśla się możliwy związek między częstością zapadalności na BPH, występowaniem objawów LUTS oraz kilku zaburzeń metabolicznych sygnowanych pod wspólną nazwą “zespołu metabolicznego” (ang. *metabolic syndrome*, MetS) [Briganti i wsp., 2009; Abdollah i wsp., 2011]. Zdaniem przynajmniej części środowiska naukowego wspomniany zbiór stanów chorobowych, związanych również z upośledzonym insulinozależnym wychwytem glukozy, staje się coraz bardziej rozpowszechnionym zaburzeniem na całym świecie [Hammarsten i wsp., 2001]. Obejmuje on zespół metabolicznych zaburzeń takich jak: otyłość, dyslipidemia, miażdżycy, nadciśnienie i oporność na insulinę wraz z następującą hiperinsulinemią i zaburzeniem metabolizmu glukozy [Huang, 2009; Gorbachinsky i wsp., 2010]. Spośród istniejących opisów MetS jest obecnie jednym z najbardziej uznawanych. Zawiera bowiem podstawowe

kryteria oceny zmian metabolicznych i opiera się na stosunkowo łatwych do zdiagnozowania parametrach klinicznych [Tab. 2.] [Abdollah i wsp., 2011].

Tab. 2. Kryteria oceny zespołu metabolicznego [wg Abdollah i wsp., 2011].

Kryteria
1. Otyłość brzuszna (dla mężczyzn, obwód w talii > 102cm)
2. Hipertriglicydemia (> 1,69 mmol / L,> 150 mg/dl) lub leczenie
3. Niski poziom cholesterolu o wysokiej gęstości lipoprotein (dla mężczyzn, <1,04 mmol/l, <40 mg/dl) lub leczenie
4. Wysokie ciśnienie tętnicze (> 130/85 mmHg) lub leczenie
5. Wysokie stężenie glukozy na czczo (> 6,1 mmol/L,> 110 mg/dl) lub leczenie

Na możliwość korelacji zaburzenia metabolizmu glukozy, cukrzycy z występowaniem BPH u pacjentów wskazywano już w latach 60-tych. Stwierdzenia te wysuwano w oparciu o wyniki obserwacji wskazujących na większą częstotliwość występowania przypadków cukrzycy u starszych mężczyzn (której stopień nasilenia wzrastał proporcjonalnie do wieku badanych pacjentów) poddanych zabiegowi prostatektomii, w stosunku do przebadanej przez Bourke i wsp. populacji męskiej [Bourke i wsp., 1968].

1.5. Patofizjologia BPH

Schorzenie to charakteryzuje hiperplastyczny wzrost nabłonka i podścieliska gruczołu krokowego widoczny w obrazie mikroskopowym i makroskopowym w postaci pojawiających się guzków [McNeal, 1990]. Biorąc pod uwagę charakterystykę histologiczną, umiejscowienie występowania i częstość powstających guzków wyszczególniono pięć typów BPH: 1. włóknisto-mięśniowo-gruczolakowy (często), 2. włóknisto-gruczolakowy, 3. włóknisto/włóknisto-pęcherzykowy, 4. włóknisty i 5. mięśniowy (rzadko) [Shapiro i wsp., 1992]. Najczęściej obserwuje się w obrazie histopatologicznym BPH tzw. postać "nabłonkową" (o przeważającej liczbie komórek nabłonka prostaty w rozrośniętym gruczole), względnie "mieszaną" (zawierającą komórki nabłonka i zrębu) i typu zrębu (zawierające tylko komórki zrębowe) [Franks, 1953; Shapiro i wsp., 1992]. Tworzące się guzki pojawiają się zwykle początkowo w strefie okołocewkowej i są typu "zrębu" (składają się z włóknistej tkanki łączącej włókna mięśni gładkich) [Franks, 1953]. Nieco rzadziej struktury guzkowe znaleźć można w obwodowej strefie (te właśnie formy można wyczuć w badaniu

przezodbytniczym) składające się zazwyczaj z elementów gruczołowych nabłonka [McNeal, 1990]. Progresa zmian rozrostowych w strefie przejściowej stercza prowadzi do powstania struktury określanej terminem “gruczolaka”, objętej przez tzw. torebkę chirurgiczną, a utworzoną przez zepchniętą na zewnątrz strefy obwodowej tkankę i tkankę tzw. spoidła przedniego. Zwiększająca rozmiary strefa przejściowa o guzkowatej etiologii prowadzi w konsekwencji do utrudnienia przepływu moczu przez sterczową część cewki moczowej [Dutkiewicz, 2009; Dutkiewicz, 2010].

Badacze zajmujący się problematyką schorzeń układu moczowo-płciowego u starzejących się mężczyzn podkreślają, iż w naturalnym przebiegu omawianego schorzenia rozróżnić można dwie fazy (etapy): 1) patologiczną; 2) kliniczną. W fazie patologicznej wyróżnić można etap: a) mikroskopowy i b) makroskopowy [Dutkiewicz, 2009; Dutkiewicz, 2010]. W etapie mikroskopowym dochodzi do inicjacji i progresji drobnych zmian rozrostowych w strefie przejściowej (zwykle u mężczyzn w wieku ok. 30 lat) zauważalnych jedynie w obrazie mikroskopowym [Dutkiewicz, 2009; Dutkiewicz, 2010]. Do zwiększenia tempa rozrostu gruczołu (zachodzącego początkowo w obrębie tkanki zrębu – głównie w mięśniówce gładkiej, następnie także w obrębie nabłonka gruczołowego), a następnie powiększenia jego masy dochodzi w etapie makroskopowym. Szacuje się, iż stan ten występuje u blisko połowy mężczyzn, u których uprzednio wystąpił etap mikroskopowy [Dutkiewicz, 2009; Dutkiewicz, 2010].

W środowisku urologów podkreśla się wiek mężczyzn - 50 lat - jako ta dekada życia, w toku, lub po przekroczeniu której, istnieje zwykle możliwość fizycznego stwierdzenia w badaniu *per rectum* powiększonej objętości stercza [Borkowski, 2011; Roehrborn, 2011]. Uważa się ponadto, iż tempo progresji objętości stercza nie jest stała, rośnie bowiem wraz z wiekiem i zależy także od jego wyjściowej objętości oraz wyjściowego stężenia PSA [Rhodes i wsp., 1995; Roehrborn i wsp., 1999; Roehrborn i wsp., 2000; Roehrborn, 2002; Roehrborn i wsp., 2008; Roehrborn, 2011; Borkowski, 2011; Rhodes i wsp., 2012].

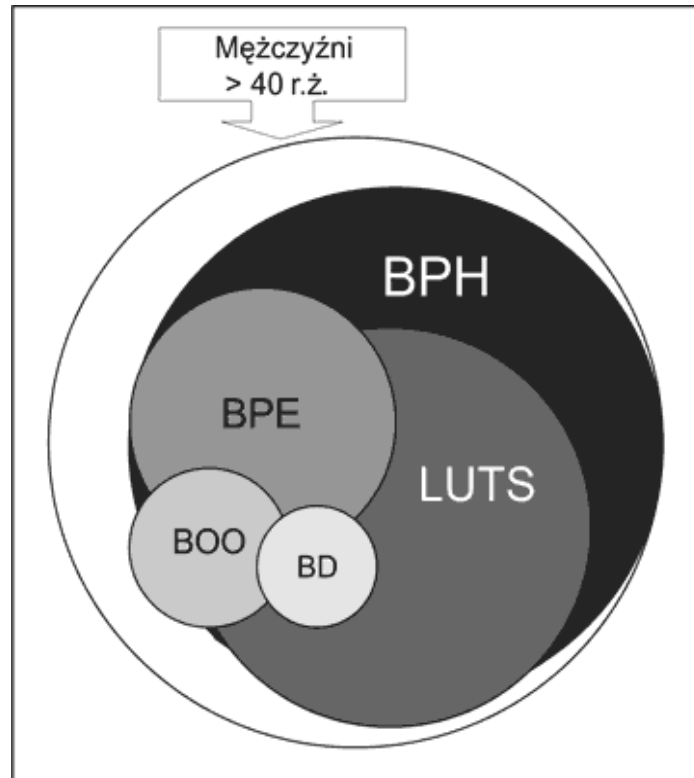
Na fazę kliniczną BPH składa się niejednorodny zespół zmian patofizjologicznych, dolegliwości i objawów: 1) powiększenie gruczołu krokowego (ang. *benign prostatic enlargement*, BPE; syn. *enlarged prostate*, EP - proces prowadzący do zwiększenia objętości, a w konsekwencji i masy stercza); 2) przeszkoda podpęcherzowa (upośledzenie przepływu cewkowego) (ang. *benign prostatic obstruction*, BPO; syn. *bladder outlet obstruction*, BOO), na którą składają się dwa komponenty, tj. mechaniczny (statyczny) wynikający z powiększenia rozmiarów stercza oraz ucisku cewki moczowej oraz dynamiczny – spowodowany przez zwiększenie tonusu mięśniówki gładkiej w obrębie zrębu gruczołu

krokowego, części sterczowej cewki moczowej, szyi pęcherza; 3) zaburzenie czynności mięśnia wypieracza pęcherza (*bladder dysfunction* – BD; syn. *detrussor disfunction* – DD; syn. *detrusor overactivity*; DO - określane potocznie „podrażnieniem mięśniówki wypieracza”) będące konsekwencją trwającego przez długi czas stanu BPE, a także związane ze starzeniem się; 4) często również subiektywne dolegliwości (objawy) ze strony dolnych dróg moczowych (ang. *lower urinary tract symptoms* – LUTS) [Kaplan, 2004; Lopor, 2005; Bushman, 2009; Dutkiewicz, 2010; McVary i wsp., 2010]. Objawy przeszkody podpęcherzowej oraz podrażnienia pęcherza scharakteryzowano w tabeli poniżej [Tab. 3.].

Tab. 3. Objawy i dolegliwości towarzyszące podrażnieniu pęcherza (BD) oraz przeszkody podpęcherzowej (BPO) [wg Dutkiewicz, 2009].

Objawy podrażnienia pęcherza - fazy gromadzenia moczu w pęcherzu	Objawy przeszkody podpęcherzowej - fazy usuwania moczu z pęcherza
<ul style="list-style-type: none"> - częstomocz dzienny i nocny - gwałtowne parcie na mocz - brak możliwości powstrzymania mikcji - ból w czasie mikcji - uczucie niecałkowitego opróżnienia pęcherza 	<ul style="list-style-type: none"> - niezdecydowany początek na mikcję - zwężenie strumienia moczu - wydłużenie czasu mikcji - przerywany strumień moczu - kroplowe oddawanie moczu z cewki po mikcji - zatrzymanie moczu

Trudności w trafnym zdiagnozowaniu BPH przysparza fakt, iż objawy przeszkody podpęcherzowej, zaburzenia mięśnia wypieracza, oraz dolegliwości LUTS mają charakter niepatognomiczny (nieswoisty), a ich nasilenie i wzajemny udział w patogenezie BPH zachodzi w zróżnicowany sposób u chorych [Lopor, 2004; Lopor, 2005; Dutkiewicz, 2009] [Ryc. 7.]. Jako przykład mogą posłużyć międzyośrodkowe, międzypopulacyjne (przeprowadzone w Kanadzie, Niemczech, Szwecji, Włoszech i Wielkiej Brytanii w okresie od kwietnia do grudnia 2005 roku na ponad 19000 pacjentach obu płci) badania Irwin i wsp. mające ocenić stopień współwystępowania objawów LUTS i nietrzymania moczu (ang. *urinary incontinence*; IU) oraz nadreaktywnego pęcherza moczowego (ang. *overactive bladder*; OAB) [Irwin i wsp., 2006]. Wyniki tych badań wskazywały, iż u 64.3% pacjentów stwierdzono więcej niż jeden objaw LUTS, a u blisko 2/3 mężczyzn z LUTS stwierdzono symptomy związane z fazą napełniania i opróżniania pęcherza. Powszechnie jest zatem współwystępowanie objawów BOO i DD u pacjentów [Oelke i wsp., 2008; Barkin, 2011; Barkin, 2012]. Symptomy LUTS, w świetle obecnego stanu wiedzy, dzieli się zwykle na trzy fazy, tj. na należące do tzw. fazy gromadzenia (ang. *storage*), opróżniania (ang. *voiding*) i fazy po opróżnieniu, tzw. pomikcyjnej (ang. *postmicturition*) [Abrams i wsp. 2002; Borkowski, 2011].



Ryc. 7. Schemat współzależności poszczególnych objawów klinicznych u chorych cierpiących na BPH: **BPE** – powiększenia gruczołu krokowego; **BOO** – przeszkody podpęcherzowej; **BD** – dysfunkcji mięśnia wypieracza; **LUTS** – objawów ze strony dolnych dróg moczowych [wg Borkowski i wsp., 2011].

Na kliniczne przejawy procesu rozrostu stercza składać się również mogą niekompletne opróżnianie pęcherza moczowego, ostre i przewlekłe nietrzymanie moczu, zakażenie dróg moczowych (ang. *urinary tract infection*; UTI), urosepsis, kamienie pęcherza moczowego oraz krwimocz [Jepsen i wsp., 2000; Lopor, 2004; Lopor, 2005]. Istnieje ponadto wiele urologicznych i neurologicznych schorzeń, w toku rozwoju których pojawiają się symptomy mogące świadczyć o pojawieniu się dolegliwości LUTS, m. in. rak prostaty, zapalenie gruczołu krokowego, rak pęcherza moczowego, kamica pęcherza moczowego, nadreaktywność pęcherza, śródmiąższowe zapalenie pęcherza, infekcje przewodów moczowych (ang. *urinary tract infection*, UTI), pierwotny przerost szyi pęcherza moczowego, zapalenie cewki moczowej, cukrzyca, choroba Parkinsona, dyskopatia odcinka lędźwiowego oraz stwardnienie rozsiane [Jepsen i wsp., 2000; Lopor, 2004; Dutkiewicz, 2009]. Nierzadko specjaliści dokonują diagnozy BPH na podstawie parametrów LUTS po uprzednim wykluczeniu ww. schorzeń [Lopor, 2004; Lopor, 2011]. Stąd też diagnostyka różnicowa LUTS znalazła powszechne zastosowanie w starzejącej się populacji męskiej do identyfikacji urologicznych i neurologicznych stanów patofizjologicznych.

W miarę dalszego powiększania rozmiarów stercza obserwuje się zmiany patologiczne w układzie moczowym - dochodzi bowiem do przerostu mięśnia wypieracza pęcherza moczowego i tworzą się tzw. „uchyłki rzekome” [McConnell, 1991; Hanecki, 2003; Kirby i wsp., 2005; Ricke i wsp., 2011; Priest i wsp., 2012] w wyniku czego zdolności kompensacyjne pęcherza moczowego ulegają stopniowemu wyczerpaniu i dochodzi do coraz większego zalegania moczu w pęcherzu moczowym po mikcji, następnie do kroplowego wykapywania moczu (łac. *ischuria paradoxa*), względnie do jego zatrzymania. Następnie zwiększenie ciśnienia podpęcherzowego może powodować powiększenie moczowodów, układów kielichowo – miedniczkowych nerek, stopniowego zanikania ich mięszu i ich niewydolności [Hanecki, 2003; Kirby i wsp., 2005].

Ze względu na fakt, iż nie w pełni pozostaje poznany mechanizm inicjujący BPH, przyczynowy związek między procesem powiększenia gruczołu krokowego a pojawieniem się symptomów klinicznych utrudniających swobodne oddawanie moczu, objawów LUTS czy też przeszkody podpęcherzowej, podkreśla się coraz częściej konieczność lepszego zrozumienia owych zależności a korzyści płynące z wyników badań w znaczny sposób przyczynić się mogą do zwiększenia skuteczności profilaktyki i farmakoterapii wśród pacjentów ze zdiagnozowanym BPH bez potrzeby kierowania ich do wykonania zabiegów operacyjnych.

1.6. Farmakoterapia BPH

Aktualnie obowiązują cztery sposoby postępowania z chorymi cierpiącymi na BPH [Dutkiewicz, 2009; McVary i wsp., 2011; Szopiński i wsp., 2012]:

- baczna obserwacja (ang. *watchful waiting*; skrót Wa-Wa, syn. WW),
- leczenie farmakologiczne,
- leczenie zabiegowe minimalnie inwazyjne,
- leczenie operacyjne.

W ostatnich latach zauważalne jest zwiększenie zainteresowania, zarówno w środowisku lekarskim, jak i u pacjentów, w szczególności w krajach rozwiniętych, a także i w Polsce, problematyką ogólnie rozumianej profilaktyki i leczenia schorzeń prostaty, w tym łagodnego rozrostu stercza. Wzrost świadomości i wiedzy w tym aspekcie skutkuje postępowaniem we wdrażaniu i usprawnianiu metod diagnostyki i leczenia BPH, także w Polsce [Kwias i wsp., 2001; Dutkiewicz, 2009, Dutkiewicz, 2010]. Konieczność leczenia farmakologicznego staje się coraz bardziej akceptowana przez pacjentów cierpiących na BPH, ze względu na

coraz lepsze efekty terapeutyczne ordynowanych leków wraz ze zmniejszającą się liczbą powikłań [Dutkiewicz, 2008].

Istotą farmakoterapii, w świetle obecnego stanu wiedzy, jest dążenie do przeciwdziałania występowania bądź złagodzenia symptomów LUTS i/lub zapobieżenie lub eliminacja przeszkody podpęcherzowej, w stanach znacznej progresji schorzenia również przeciwdziałanie zatrzymaniu moczu i leczenia operacyjnego [Husiatyński i wsp., 1999; Dutkiewicz, 2009, Dutkiewicz, 2010; de la Rosette i wsp., 2009; Kaplan, 2006; McVary i wsp., 2011; Szopiński i wsp., 2012]. Kluczowe jest również dążenie do zahamowania progresji abnormalnego rozrostu stercza. Kwalifikacja pacjenta do odpowiedniego postępowania terapeutycznego zależy jest, przede wszystkim, od jego wieku, ogólnego stanu pacjenta, stopnia progresji schorzenia i nasilenia ww. objawów, występowania chorób współistniejących oraz akceptacji proponowanej metody leczenia przez pacjenta [de la Rosette i wsp., 2001; Dutkiewicz, 2008; Dutkiewicz, 2009, Dutkiewicz, 2010; de la Rosette i wsp., 2009; Kaplan, 2006; McVary i wsp., 2010; McVary i wsp., 2011].

Do leczenia farmakologicznego BPH kwalifikują się zwykle chorzy z umiarkowanie lub średnio nasilonymi dolegliwościami LUTS, nie obejmujący zaburzeń tych okolic o podłożu neurogennym, bez powikłań przeszkody podpęcherzowej oraz chorzy, którzy, pomimo występowania u nich wskazań do leczenia zabiegowego, nie wyrażają na nie zgody, lub u których nie można go zastosować z powodu nadmiernego ryzyka powikłań okołoperacyjnych związanego z obciążeniami nie będącymi następstwem BPH [de la Rosette i wsp., 2009; Kaplan, 2006; McVary i wsp., 2011; Szopiński i wsp., 2012]. W stosunku do pacjentów z symptomami LUTS o niewielkim stopniu nasilenia, niewielkim pogorszeniem jakości życia (ang. *quality of life*; QoF) przewiduje się zwykle inną formę leczenia zachowawczego [Borkowski i wsp., 2011; Dutkiewicz, 2010; Szopiński i wsp., 2012].

W farmakoterapii BPH stosuje się głównie następujące grupy leków [Eure, 2005; Dadej i wsp., 2008; Dutkiewicz, 2009; Dutkiewicz, 2010; McVary i wsp., 2011; Borkowski i wsp., 2011; Barkin i wsp., 2011; Elterman i wsp., 2012; Szopiński i wsp., 2012; Schmidt i wsp., 2011; Azzouni i wsp., 2012; Hamilton i wsp., 2012; Filson i wsp., 2013; Oelke i wsp., 2013]:

- 1) leki blokujące receptory α_1 -adrenergiczne, tzw. ARA (ang. *adrenergic receptors antagonists*), np. doksazosyna, terazosyna, alfuzosyna, tamsulozyna, silodosyna,

- 2) leki wpływające na środowisko hormonalne stercza, głównie inhibitory 5 α -reduktazy steroidowej, tzw. 5ARI (ang. *5 α -steroid reductase inhibitors*): finasteryd, dutasteryd,
- 3) leki antymuskarynowe,
- 4) inhibitory fosfodiesterazy.

Do najczęściej rekomendowanych leków należące do 5ARI oraz do ARA. Skuteczność, bezpieczeństwo, profile farmakokinetyczne i farmakodynamiczne właśnie tych dwóch grup leków najobszerniej opisano w literaturze [McConnell i wsp., 2003; Greco i wsp., 2008; Lepor, 2009; Nickel i wsp., 2010; Lepor, 2011; Szopiński i wsp., 2012; McVary i wsp., 2011; Borkowski i wsp., 2011; Barkin, 2011; Barkin i wsp., 2012; Hamilton i wsp., 2012; Filson i wsp., 2013; Oelke i wsp., 2013; Hennenberg i wsp., 2014].

Leki będące inhibitorami 5 α -reduktaz steroidowych, należące do grupy tzw. 4 α -steroidów, powodują zahamowanie enzymatycznej konwersji T do aktywnego metabolitu DHT, stymulującego wzrost gruczołu krokowego [Wilson, 1980; Thigpen, 1992; Briganti i wsp., 2009]. W leczeniu przyczynowym BPH stosuje się obecnie dwa inhibitory reduktazy steroidowej – finasteryd i dutasteryd – różniące się aktywnością, powinowactwem substratowym i biodostępnością [Tab. 4]. Wysokim powinowactwem do 5 α -reduktazy typu 2 charakteryzuje się finasteryd, dutasteryd natomiast hamuje aktywność obu izoform tego enzymu [Gruntmanis, 2012; Kang i wsp., 2013].

Tab. 4. Wybrane parametry farmakokinetyczne finasterydu i dutasterydu [wg Kumar i wsp., 2008; Oelke i wsp., 2013, zmodyfikowane].

Parametr	finasteryd	dutasteryd
Biodostępność po podaniu doustnym	63%	60%
Maksymalne stężenie w surowicy	1 – 2 h	2 – 3 h
Stan równowagi	> 30 h	> 3 mies.
Okres półtrwania	6 h	5 tygodni
Zdolność do wiązania białek osocza	90%	99.5%

Opublikowano wyniki szeregu randomizowanych, kontrolowanych placebo badań klinicznych z użyciem obu inhibitorów [finasterydu zwykle w dawce 5 mg/dobę; dutasterydu – zwykle w dawce 0,5 mg/dobę], w wyniku których stwierdzano m.in. redukcję objętości gruczołu krokowego, zahamowanie progresji bądź też uwstecznienie objawów przeszkody podstępcherzowej, obniżenie ryzyka wystąpienia ostrego zatrzymania moczu, objawów LUTS, a także poprawę przepływu przezcewkowego, parametrów urodynamicznych, poprawę jakości

życia według oceny kwestionariusza Międzynarodowej Oceny Symptomów Prostaty (IPSS, ang. *International Prostate Symptoms Score*) w stopniu znacznie większym aniżeli placebo [McVary i wsp., 2011; Barkin, 2011; Barkin i wsp., 2012; Hamilton i wsp., 2012; Filson i wsp., 2013; Oelke i wsp., 2013]. Strategia terapii 5ARI prowadziła w konsekwencji do obniżenia ryzyka konieczności interwencji chirurgicznej [Goomley i wsp., 1992; Andresen i wsp., 1993; Gormley i wsp., 2002; Kaplan, 2006; Kaplan i wsp., 2006; Ravish i wsp., 2007; Kumar i wsp., 2008; Gravas i wsp., 2010; Barkin, 2011; Hamilton i wsp., 2012; Filson i wsp., 2013; Oelke i wsp., 2013].

Ograniczeniem skuteczności terapii tymi lekami jest m. in. potrzeba długiego okresu ich zażywania (minimalny czas ich stosowania po jakim obserwuje się zwykle wystąpienie pełnego działania wynosi 6 miesięcy), największa efektywność u pacjentów o objętości stercza przekraczającej 31 ml oraz wzrost prawdopodobieństwa wystąpienia działań niepożądanych w miarę wydłużenia terapii z udziałem 5ARI [Dadej i wsp., 2008; Dutkiewicz, 2009; Lepor, 2004; Hamilton i wsp., 2012; Filson i wsp., 2013; Kang i wsp., 2013]

Obecnie na znaczeniu zyskuje stosowanie terapii skojarzonej z użyciem poszczególnych 5ARI oraz ARA [Lepor, 2009; Gravas i wsp., 2010; Barkin, 2011; Woo i wsp., 2011; Woo, 2011; Hamilton i wsp., 2012; Filson i wsp., 2013; Oelke i wsp., 2013]. Początkowe, krótkoterminowe (nie przekraczające zwykle 1 roku) badania kliniczne, m. in. badanie *PRE-DICT* [Kirby i wsp., 2003], *Veterans Affairs Cooperative Studies Benign Prostatic Hyperplasia Study* [Lepor i wsp., 1996] nie wykazały istotnego polepszenia parametrów urodynamicznych oddawanego moczu, redukcji objawów LUTS czy też objętości gruczołu krokowego u pacjentów ze zdiagnozowanym BPH, u których stosowano komedykację (finasterydu łącznie lub osobno z terazosyną) w stosunku do pacjentów leczonych jedynie α 1-blokerami. Kolejne badania, np. *MTOPS* (ang. Medical Therapy of Prostatic Symptoms Research Group) (ocena skuteczności terapii finasterydem i doksazosyną podawanych osobno lub łącznie) i *CombAT* (ang. Combination of Avodart and Tamsulosin) (ocena skuteczności terapii dutasterydem i tamsulozyną podawanych osobno lub łącznie), obejmujące już okres 4 - 5 lat wykazały m. in. znaczną poprawę parametrów urodymicznych oddawanego moczu, parametrów jakości życia według oceny na podstawie kwestionariusza IPSS, obniżenia stopnia objawów ostrego zatrzymania moczu, czy też ryzyka konieczności wykonania zabiegu chirurgicznego [de la Rosette i wsp., 2001; McConnell i wsp., 2003; Kaplan i wsp., 2006; Roehrborn i wsp., 2008; Roehrborn i wsp., 2010; Lepor, 2011; Roehrborn i wsp., 2013].

1.7. Fitoterapia schorzeń prostaty

Pierwsze wzmianki dotyczące stosowania fitoterapii w leczeniu symptomów związanych z oddawaniem moczem, będących w związku z występowaniem u pacjentów BPH pochodzą z Egiptu w XV wieku p.n.e. [Lowe i wsp., 1996; Wilt i wsp., 2000]. Obecnie profilaktyka BPH / LUTS i terapia oparta na bazie substancji pochodzenia roślinnego staje się coraz bardziej powszechnie braną pod uwagę koncepcją stanowiącą alternatywę dla klasycznej farmakoterapii schorzeń prostaty oraz objawów LUTS, szczególnie na półkuli zachodniej, głównie w Europie i w USA [Wilt i wsp., 2000; Fong i wsp., 2005; Madersbacher i wsp., 2005; Madersbacher i wsp., 2008; Dedhia i wsp., 2008; Wehrberger i wsp., 2012; Azimi i wsp., 2012; Kim i wsp., 2012; Morán i wsp., 2013; Oelke i wsp., 2013]. Badania przeprowadzone w USA pod koniec lat 90-tych wykazały, iż 14% pacjentów z objawami LUTS wtórnych do BPH stosowało wyłącznie ziołolecznictwo jako strategię leczniczą ww. objawów, a dalszych 20% sięgało po preparaty pochodzenia roślinnego, adjuwantowo do stosowanej jednocześnie klasycznej farmakoterapii [Bales i wsp., 1999; Gerber, 2002; Dedhia i wsp., 2008]. Obliczono, iż w samym tylko 1998 roku w USA blisko 70% dorosłych mężczyzn dokonało zakupu różnego rodzaju fitopreparatów. W znacznej mierze były one kupowane w ramach samoleczenia, często poza kontrolą lekarza, nierzadko w celu zapobieżenia objawów LUTS lub też „w celu zachowania zdrowej prostaty“ [Ernst i wsp., 1998; Lowe i wsp., 1999; Lowe, 2000; Katz, 2002; Wilt i wsp., 2000; Dreikorn, 2002]. Szacuje się, iż obecnie na światowym rynku dostępnych jest około 100 preparatów rekomendowanych w terapii i profilaktyce BPH/LUTS [Cristoni i wsp., 2000; Kim i wsp., 2012; Morán i wsp., 2013]. Zainteresowanie fitoterapią schorzeń prostaty wzrasta szczególnie w ostatnich dwudziestolecie [Madersbacher i wsp., 2005; Madersbacher i wsp., 2008]. W takich krajach jak Niemcy, Austria czy Francja spowodowało to m. in. blisko 30 – 50% wzrost sprzedaży różnego rodzaju fitopreparatów [Berges i wsp., 1999; Berges i wsp., 2003; Madersbacher i wsp., 2005; Madersbacher i wsp., 2008].

Do surowców roślinnych stosowanych zapobieganiu i leczeniu BPH oraz łagodzeniu objawów LUTS, w oparciu głównie o tradycje medycyny naturalnej, ale i o wzrastającą liczbę doniesień naukowych, zgodnie z zasadami zdobyczy medycyny opartej na faktach (ang. *Evidence Based Medicine*; EBM), zalicza się przede wszystkim *Serenoa repens* (bocznik piłkowany), *Pygeum africanum* (śliwę afrykańską), *Cucurbita pepo* (dynię zwyczajną), ale także następujące: *Urtica dioica* (pokrzywę zwyczajną), *Zea mays* (kukurydzę zwyczajną), *Secale cereale* (żyto zwyczajne), *Hypoxis rooperi* (jeden z gatunków traw południo-

afrykańskich) [Wilt i wsp., 2000; Cristoni i wsp., 2000; PDR, 2007; Dedhia i wsp., 2008; Wehrberger i wsp., 2012; Azimi i wsp., 2012; Kim i wsp., 2012].

Surowcom tym przypisuje się właściwości antyproliferacyjne, normalizujące gospodarkę hormonów steroidowych (przeciwandrogenowe, przeciwestrogenowe), obniżające pulę białkowych transporterów androgenów (głównie białek SHBG), relaksację mięśniówki gładkiej gruczołu krokowego i pęcherza moczowego, czy też właściwości przeciwzapalne i antyoksydacyjne [Lowe i wsp., 1999; Wilt i wsp., 2000; Dreikorn, 2002; PDR, 2007; Azimi i wsp., 2012; Morán i wsp., 2013]. Mechanizm działania wyciągów opartych na ich bazie jest wielokierunkowy i opiera się przede wszystkim na zmianie aktywności enzymatycznej 5 α -reduktazy steroidowej, aromatazy, białkowych czynników wzrostu, lipoosygenaz, receptorów androgenowych, estrogenowych, α -adrenergicznych, muskarynowych, białek regulujących proces apoptozy (w tym kaspaz, duetu *Bcl2/Bax*) [Madersbacher i wsp., 2008; Dedhia i wsp., 2008; Kujawski i wsp., 2010; Wehrberger i wsp., 2012; Kim i wsp., 2012; Morán i wsp., 2013].

Należy podkreślić, iż dostrzegalne zainteresowanie fitoterapią, wynika przede wszystkim, oprócz tradycji ziołolecznictwa potwierdzonej przez wiele pokoleń, z naturalnego pochodzenia surowców roślinnych – a więc powszechnego dostępu do surowca leczniczego. Wynika również z wielokierunkowego mechanizmu działania preparatów opartych na bazie surowców roślinnych oraz powszechnego akceptowania stosowanych ziół i fitopreparatów jako stosunkowo bezpieczne [Dadej i wsp., 2008; Hurkacz, 2010; Kim i wsp., 2012; Morán i wsp., 2013; Oelke i wsp., 2013], co niejednokrotnie wydaje się być bardziej korzystnym dla pacjenta, aniżeli wyłączenie stosowanie klasycznej farmakoterapii.

Pomimo zwiększonego zainteresowanie medycyną alternatywną nie tylko wśród pacjentów, to jednak w obecnych realiach nie można mówić o powszechnym uznaniu przez środowisko medyczne fitoterapii BPH/LUTS jako obowiązującej alternatywy dla klasycznej ich farmakoterapii [Dadej i wsp., 2008; Oelke i wsp., 2013]. Wątpliwości dotyczą przede wszystkim kwestii skuteczności leków ziołowych. Konsekwencją tego stanu rzeczy może być nie tylko brak odpowiednich rekomendacji WHO, czy też w amerykańskich, brytyjskich, niemieckich czy polskich opracowaniach farmakopealnych, ale także niewystarczająca liczba badań przedklinicznych i klinicznych (w szczególności długoterminowych) z wykorzystaniem potencjalnych fitoterapeutyków, które spełniałyby wymagania metodyczne i formalne, zgodne z dobrą praktyką badawczą (Good Laboratory Practice - GLP; Good Clinical Practice - GCP), na których można oprzeć wiedzę o ich skuteczności i bezpieczeństwie stosowania [Hurkacz, 2010; Wehrberger i wsp., 2012; Oelke i wsp., 2013]. Zarówno amerykańskie (American

Urology Association) jak i europejskie (European Association of Urology) towarzystwa urologiczne, podkreślają wagę, potrzebę i znaczenie prowadzenia dalszych prospektywnych badań, według standardów WHO, zmierzających do określenia skuteczności ekstraktów roślinnych w profilaktyce i leczeniu BPH / LUTS [Oelke i wsp., 2013].

1.8. *Serenoa repens* – charakterystyka surowca, właściwości farmakologiczne, stan badań

Serenoa repens (Bartr.); syn. *Sabal serrulata* (Michx. Nichols)– boczniak piłkowany; syn. palma sabalowa; palma sabałowa (ang. Saw Palmetto; syn. Sabal Palm; Dwarf Palm; American Palm) jest niską, skarlłowaciałą palmą należącą do rodziny palm karłowatych (arekowych), naturalnie występującą na południowo-wschodnim obszarze USA, od południowej Karoliny do Florydy, oraz na terenie Europy Południowej i Afryki Północnej. Roślina ta rośnie do wysokości od sześciu do dziesięciu metrów, posiada charakterystyczne rozłożyste liście ułożone w kształt wachlarza (albo korony). Owocem są ciemnoczerwone jagody, zmieniające kolor w czarny, rozmiarami przypominające oliwki [Czap, 2002; ESCOP, 2003; PDR, 2007; Nawrot, 2009].

Do metabolitów zidentyfikowanych w owocach *Serenoa repens* i w wyciągach lipofilnych (n-heksanowych, etanolowych) z nich uzyskanych zalicza się głównie kwasy tłuszczowe (kwasy kapronowy, kaprylowy, kaprynowy, laurynowy, mirystynowy, palmitynowy, oleinowy, linolowy, linolenowy, ferulowy, oleomirystynowy) i ich etylowe estry oraz fitosterole (głównie β -sitosterol, D-glikozyd β -sitosterolu, kempesterol, stigmasterol oraz cykloartenol, lupeol, lupenol, metylocykloartenol) i ich estry etylowe [Duke, 1985; Murray i wsp., 1994; Plosker i wsp., 1994; Lowe, 2000; Czap, 2002; ESCOP, 2003; Nawrot, 2009; Gryszczyńska i wsp., 2011]. Wykazano też obecność m. in. triglicerydów, monoglicerydów (1-monolaurynę i 1-monomirystynę), triterpenów, alkanoli, polisacharydów, flawonoidów i olejków eterycznych [Shimada i wsp., 1997; Czap, 2002; ESCOP, 2003; British Pharmacopoeia, 2009; Geavlete i wsp., 2011].

Tradycyjne stosowanie *Serenoa repens* obejmuje leczenie zapalenia pęcherza moczowego, przewlekłego zapalenie oskrzeli, astmy, cukrzycy, biegunek, niestrawności, sugeruje się również użycie u kobiet ze słabo rozwiniętymi piersiami [Blumenthal i wsp., 2000; Czap, 2002; ESCOP, 2003], a jagody były również uważane za afrodyzjak [Czap, 2002; PDR, 2007].

Obecnie *Serenoa repens* jest surowcem zielarskim najczęściej wykorzystywanym do leczenia objawowego BPH/LUTS [Murray i wsp., 1994; Blumenthal i wsp., 2000; Czap, 2002; ESCOP, 2000; PDR, 2007]. Zgodnie z monografią PDR [*Physician's Desk Reference*] [PDR, 2007] i ESCOP [ang. *European Scientific Cooperative On Phytotherapy*] [ESCOP, 2000] wskazanie terapeutyczne *S. repens* obejmuje objawowe leczenie zaburzeń oddawania moczu (trudności w oddawaniu moczu, częstomocz, nocne oddawanie moczu, czy też zatrzymanie moczu) w łagodnym do umiarkowanego stadium rozrostu prostaty (BPH) – wg. klasyfikacji Alkena: w I i II stadium progresji schorzenia [Alken, 1973] lub porównywalnych objawów o zbliżonej dotkliwości według parametrów ocenianych przez IPSS i powiązanych badań diagnostycznych [Cockett i wsp., 1993; Plosker i wsp., 1994].

Spśród surowców roślinnych będącym przedmiotem analizy pod kątem oceny mechanizmu działania, skuteczności i bezpieczeństwa w terapii BPH, biochemiczny i fizjologiczny aspekt działania preparatów i wyciągów opartych na bazie *Serenoa repens* udokumentowano najobszerniej. W badaniach tych przeważały lipofilne ekstrakty heksanowe oraz etanolowe.

Wykazano m. in. zmiany w metabolizmie cholesterolu pod wpływem *S. repens* [Christensen i wsp., 1990]. W minionych latach opublikowano wyniki szeregu badań, przeprowadzonych w przeważającej liczbie w modelu hodowli komórkowych *in vitro*, wskazujących na właściwości antyandrogenowe i antyestrogenowe lipidowo-sterolowego wyciągu z owoców *S. repens* (w badaniach tych dominował lipidowo-sterolowy ekstrakt z owoców *S. repens* opisywany skrótami: „LSES“, „LSESr“ albo „PC-SPES“, a obejmował on zwykle komercyjny preparat Permixon) [Dreikorn i wsp., 1990; Marwick, 1995; Wilt i wsp., 2002; Tacklind i wsp., 2009; Tacklind i wsp., 2012; Kim i wsp., 2012; Macdonald i wsp., 2012]. Mechanizm działania miał polegać m. in. na niekompetycyjnej inhibicji aktywności 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 i/lub 2 w komórkach fibroblastów, zrębu i nabłonka gruczołu krokowego [Sultan i wsp., 1984; Bayne i wsp., 1999; Weisser i wsp., 1997], objawiający się hamowaniem konwersji testosteronu do DHT [Dedhia, 2008].

Badania stawiające sobie za cel ustalenie czy ekstrakt ten wpływa na androgenno-zależne procesy biochemiczne zachodzące przy udziale tylko wspomnianych reduktaz steroidowych nie były jednoznaczne. Otrzymywano bowiem niejednoznaczne wyniki wskazujące na wpływ badanego wyciągu na zdolności sekrecyjne markera PSA przez komórki prostaty [Bayne i wsp., 1999; Habib i wsp., 2005; Habib, 2009].

Jako przykład można przytoczyć badania z użyciem preparatu Permixonu (w stężeniu 10 μ g/ml) przeprowadzone przez Bayne i wsp. na kulturach komórek nabłonkowych

i fibroblastów wykazały, że działa on jako inhibitor niekompetycyjny na obie izoformy 5- α -reduktazy (1 i 2 typu) (obserwowano bowiem degradację frakcji śródkomórkowych błon (głównie mitochondrialnych i jądra komórkowego). Wskazywało to na hamowanie aktywności enzymatycznej katalizowanej przez 5 α -reduktaz steroidowych), bez wpływu na sekrecję PSA, co mogłoby sugerować, że preparat ten zasadniczo nie ma wpływu na inne androgenno-zależne procesy w komórkach prostaty i na proces wiązania się androgenów ze specyficznym receptorem [Bayne i wsp., 1999]. Obserwowano również hamowanie aktywności enzymatycznej katalizowanej przez inny, hormono-zależny enzym (odpowiadający za odwracalną reakcję przekształcania T w androstendion) - dehydrogenazę 17- β -hydroksysteroidową (17 β -HSD) [Bayne i wsp., 1999]. Także badanie przeprowadzone przez Habib i wsp. obejmujące ocenę wpływu preparatu Permixon na aktywność androgenów w komórkach raka ludzkiej prostaty zależnych od androgenów LNCaP wskazywało, iż badany preparat nie zaburza stężenia PSA [Habib i wsp., 2005]. Nie zawsze jednak obecność standaryzowanego ekstraktu z palmy sabalowej w komórkach prostaty pozostawało bez wpływu na poziom wewnątrzkomórkowego i zewnątrzkomórkowego PSA. Eksperyment przeprowadzony przez Hsieh i wsp. wykazał, że ekstrakt z *Serenoa repens* w dawce 5 μ l/ml skutkowało zwiększenie stężenia pozakomórkowego PSA [Hsieh i wsp., 2002].

Ponadto, znaczne zahamowanie aktywności obu izoform 5 α -reduktazy steroidowej w hodowli komórek owadzych w warunkach *in vitro*, pod wpływem LSEsr, wykazały badania Iehle i wsp. [Iehle et al., 1995]. Podobne efekty stwierdzono w badaniach Delos i wsp. w linii ludzkich komórek raka prostaty DU-145 o niskiej wrażliwości androgenowej. W tym przypadku badany wyciąg *S. repens* charakteryzował się trzykrotnie silniejszą, niekompetycyjną inhibicją ekspresji 5 α -reduktazy typu 1 (w mniejszym stopniu izoformy typu 2), w stosunku do referencyjnego finasterydu [Delos et al., 1994]. Nieco odmienne efekty zaobserwowano w badaniach Hill i wsp. na androgenno-zależnych komórkach prostaty (PC-3) i androgenno-niezależnych (LNCaP) oraz komórkach raka piersi (MCF-7), w toku których stwierdzono, iż Permixon w dawkach 10 i 100 μ g/ml wykazywał silną inhibicję proliferacji badanych komórek przy jednoczesnym słabym oddziaływaniu na 5 α -reduktazy typu 2 [Hill i wsp., 2004]. Badania z zastosowaniem innego ekstraktu z owoców palmy sabalowej - preparatu IDS 89 wykazały hamujące, zależne od zastosowanej dawki, działanie na aktywność 5 α -reduktazy w komórkach nabłonka i zrębu ludzkiej prostaty. Najsilniejsze działanie wykazały wolne kwasy tłuszczowe znajdujące się w jednej z subfrakcji preparatu zawierające cząsteczki kwasu laurynowego, oleinowego, mirystynowego, palmitynowego [Weiiser i wsp., 1996; ESCOP, 2003]. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Raynaud i

wsp. wykazano również, że to kwasy tłuszczowe z długimi nienasyconymi łańcuchami silniej hamują izoformę typu 1 enzymu 5 α -reduktazy steroidowej (w eksperymencie tym 5 α -reduktazę typu 2 hamował jedynie kwas mirystynowy) [Raynaud i ws., 1992]. Rezultaty doświadczenia Di Silverio i wsp. na komórkach prostaty pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym BPH wskazywały na zróżnicowaną aktywność lipido-sterolowego ekstraktu z *S. repens* (LSEsR) w zależności od obszaru gruczołu [Di Silverio i wsp., 1998]. W grupie pacjentów otrzymujących badanych ekstrakt [320mg LSEsR/dobę/3 miesiące] stwierdzono znaczne obniżenie poziomu DHT oraz naskórkowego czynnika wzrostu (ang. epithelial growth factor, *EGF*) w obszarze okołocewkowym (którego powiększenie odpowiedzialne jest m.in. za wystąpienie zaburzenia oddawania moczu) oraz złagodzenie symptomów choroby, z jednoczesnym wzrostem stężenia testosteronu, co zdaniem badaczy, może wskazywać na zdolności tego preparatu do hamowania aktywności obu izoform enzymu 5- α -reduktazy [Di Silverio i wsp., 1998]. Potwierdzono również zdolność lipidowo-sterolowego wyciągu do blokowania wiązania się androgenów do receptorów androgenowych w ludzkich komórkach fibroblastów oraz w ludzkich i szczurzych komórkach prostaty [Sultan i wsp., 1984; Carilla i wsp., 1984; Magdy i wsp., 1988; Goepel i wsp., 1999; Levin i wsp., 2000].

Wykazano również m.in. właściwości przeciwzapalne ekstraktów z owoców *S. repens* [McGuire 1987; Buck, 2004; Vela-Navarrete i wsp., 2003], zdolność do obniżenia stężenia frakcji wolnych białek SHBG [Di Silverio i wsp., 1993], właściwości proapoptotyczne skutkujące hamowaniem proliferacji komórkowej [Marwick, 1995; Buck 2004; Vacherot i wsp., 2000; Vela-Navarrete 2005], a także hamowanie aktywacji α 1-adrenergicznej [Goepel i wsp., 1998; Goepel i wsp., 1999].

Przytoczone powyżej informacje są efektem, jak już wspomniano, prac eksperymentalnych przeprowadzonych głównie w modelu *in vitro*. Pomimo wzrastającej liczby publikacji danych z doświadczeń *in vivo* wyjaśnienie mechanizmu działania wyciągów i preparatów opartych na bazie *S. repens* w tkankach gruczołu krokowego pozostaje nadal kwestią wymagającą intensywnych badań.

Zdaniem części środowiska naukowego niedostateczna liczba badań z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych może być przyczyną naukowego sceptycyzmu w kwestii zdolności lipofilnych wyciągów z *S. repens* do promowania apoptozy w tkankach BPH lub chociażby hamowania aktywności 5 α -reduktaz steroidowych w sposób porównywalny do np. finasterydu [Geavlete i wsp., 2011].

W minionych latach wyciągi z *S. repens* poddano również szeregu badań klinicznych, trwających zwykle 4 tygodnie, 2 i 3 miesiące, 6, 12 miesięcy i dłużej (2 lub 3 lata),

definiujących mechanizm ich działania w gruczole krokowym. Wyniki tych badań wskazują, generalnie, na umiarkowaną ich skuteczność w terapii łagodnego rozrostu gruczołu krokowego [ESCOP, 2003]. W dobrze metodologicznie skonstruowanym trzy miesięcznym badaniu (podwójnie ślepa próba, placebo kontrolowanym) wykazano m. in., iż heksanowy ekstrakt [320mg/dobę/3 miesiące] powodował obniżenie ilości receptorów progesteronu i estrogenu w próbkach tkanek gruczołu krokowego pobranych od pacjentów ze stwierdzonym BPH [Di Silverio i wsp., 1992]. W badaniach Weiiser i wsp. pod wpływem ekstraktu [1920mg/dobę/3 miesiące; preparat Sabal serrulata extract IDS 89 (Strogen)] wykazano także zahamowanie aktywności enzymycznej 5 α -reduktazy steroidowej oraz nieznacznie oksydoreduktazy 3 α - i 3 β -hydroksysteroidowej w komórkach nabłonka gruczołu krokowego pacjentów ze stwierdzonym BPH [Weisser i wsp., 1997].

W kolejnym sześciomiesięcznym, randomizowanym, kontrolowanym podwójną ślepą próbą, badaniu na 1098 pacjentach z BPH stwierdzono, iż heksanowy ekstrakt [320mg/dobę] wpływał pozytywnie na subiektywną ocenę poprawy jakości życia (ang. *quality of life*; QoF), zgodnie z wytycznymi uznawanego powszechnie w środowisku urologów kwestionariusza oceny symptomów zmian rozrostowych stercza, tzw. IPSS powodując m. in. redukcję zmian objętości stercza, poprawę cewkowego przepływu moczu (ang. *peak urinary flow rate*) [Carraro i wsp., 1996]. Przeprowadzono także szereg innych badań z wykorzystaniem heksanowego wyciągu [160 mg lub 320mg/dobę], w toku których zaobserwowano korzystne zmiany urodynamiczne u pacjentów ze stwierdzonym BPH, m.in. w częstotliwości dziennego i nocnego oddawania moczu, objętości oddawanego moczu i zalegającego w pęcherzu moczowym, czy też eliminację dysurii [Tab. 5].

Przykładem randomizowanego wielośrodkowego badania klinicznego kontrolowanego placebo, z podwójną ślepą próbą, z wykorzystaniem ekstraktu z *S. repens* jest badanie przeprowadzone przez Hutchinson i wsp. [Hutchinson i wsp., 2007]. W rocznym badaniu TRIUMPH przeprowadzonym w sześciu ośrodkach europejskich na 2351 pacjentach z objawami BPH/LUTS wykazano m.in., że spośród grupy pacjentów poddanych ocenie skuteczności fitoterapii istotnie statystyczne poprawy parametrów jakości życia, według kwestionariusza IPSS, nastąpiły u 42,7% pacjentów otrzymujących *S. repens*. W tym przypadku farmakoterapia finasterydem i wybranymi adrenolitykami charakteryzowała się jednak większą skutecznością w porównaniu do badanych surowców roślinnych [Hutchinson i wsp., 2007]. Wyniki szeregu innych badań wskazują na niewielkie zmiany w objętości stercza, parametrach urodynamicznych czy też wynikające oceny kwestionariusza IPSS lub AUASI (syn. AUA-SI) (ang. *American Association of Urology Symptom Index*) w

porównaniu z placebo czy klasyczną farmakoterapią [Debruyne i wsp., 2002; Debruyne i wsp., 2004; Djavan i wsp., 2005; Shi i wsp., 2008].

Podjęto próby usystematyzowania wiedzy na temat skuteczności i bezpieczeństwa fitoterapii BPH/LUTS z uwzględnieniem *Serenoa repens* stosowanej osobno i/lub łącznie z lekami syntetycznymi [Lowe i wsp., 2009; Habib i wsp., 2009; McDonadl i wsp., 2012; Tacklind i wsp., 2009; Tacklind i wsp., 2012; Kim i wsp., 2012; Moran i wsp., 2013]. Kompleksowe metaanalizy badań klinicznych, trwających zwykle przez okres od 4 tygodni do 3 lat (w tym 11 długotrwałych (1 rok i powyżej), dwa badania trwające przez okres 6 – 12 miesięcy oraz 13 krótkotrwałych (poniżej 6 miesięcy)), przeprowadzone m.in. przez Tacklind i wsp. [Tacklind i wsp., 2012] oraz McDonadl i wsp. [McDonadl i wsp., 2012], oprócz opisów dotyczących obniżenia objętości gruczołu krokowego, czy też poprawy poszczególnych parametrów urodynamicznych i jakości życia (na podstawie oceny kwestionariuszów IPSS i AUASI), wskazują na znaczną różnicę w skuteczności preparatów opartych na bazie *Serenoa repens* (głównie preparat Permixon) w porównaniu do finasterydu i wybranych α 1-adrenolityków, na rozbieżności we wpływie stosowanej fitoterapii (*S. repens*) na poprawę jakości życia, poszczególnych parametrów mikcji w zależności od stadium progresji symptomów LUTS u pacjentów [Tacklind i wsp., 2012; McDonadl i wsp., 2012]. Podsumowując, badacze, w świetle obecnego stanu wiedzy, skłaniają się raczej do zdefiniowania skuteczności stosowania preparatów na bazie *S. repens* na poziomie różniącym się w niewielkim stopniu od placebo, podkreślając przy tym konieczność prowadzenia dalszych, długotrwałych badań, w tym ze zwiększoną dawką wyciągu z *S. repens* [Tacklind i wsp., 2012; McDonadl i wsp., 2012].

Tab. 5. Zestawienie wybranych kontrolowanych, randomizowanych badań klinicznych z podwójną ślepą próbą z zastosowaniem grupy placebo [wg Wilt i wsp., 2000; McDonald i wsp., 2012; uzupełnione]

↑ – wzrost; ↓ – obniżenie.

Autor badania	Dawkowanie, podawania	czas	Pacjenci (BPH)/średnia wieku	Efekt
Cukier i wsp., 1985	Permixon – 2x/dobę/10 tyg.; finasteryd	160mg	168 chorych/69 lat	↓ objawów w grupie otrzymującej wyciąg z <i>S. repens</i> (o 37%) i finasteryd; ↑ szybkości odpływu moczu i obn objętości zalegającego moczu vs. grupa placebo
Reece Smith i wsp., 1986	Permixon - 2x/dobę/12 tyg.; finasteryd	160mg	80 chorych/55-80 lat	↓ częstotliwości oddawania moczu w ciągu dnia i w nocy w obu grupach
Roveda i wsp., 1994	Permixon - 160mg 4x/dobę lub 640mg 1x/dobę/30 dni		60 chorych/40-82 lata	↓ częstotliwości oddawania moczu w ciągu dnia i w nocy; obn zalegania moczu w obu grupach chorych otrzymujących wyciąg z <i>S. repens</i> . Biorównoważność stosowania większej dawki 1 raz na dobę z podawaniem wyciągu co 6 godzin
Descotes i wsp., 1995	Permixon - 2x/dobę/30 dni	160mg	215 chorych/66 lat	↑ szybkości mikiacji
Braeckman i wsp., 1997	Prostataserene		238 chorych/67 lat	↑ szybkości mikiacji; obn częstotliwości oddawania moczu w ciągu dnia i w nocy; ↓ objętości gruczołu krokowego i moczu zalegającego na podstawie formularza oceny jakości życia
Gerber i wsp., 1998; Gerber i wsp., 2001	Permixon – 2x/dobę/6 miesięcy	160mg	50 chorych/46-84 lata	↓ objawów w skali IPSS (z 19.5±5.5 do 12.5±7.0 pkt.)
Bauer i wsp., 1999	LG166/S – 2x/dobę/6 miesięcy	160mg	101 chorych/bd.	↓ objawów w skali IPSS (o 37%) w grupie otrzymującej wyciąg; brak zmian w objętości zalegającego moczu.
Al - Shukri i wsp., 2000	PA109 Permixon – 2x/dobę/9 tygodni	160mg	75 chorych/52-78 lat	↓ objawów w skali IPSS (o 26.8%); obn objętości zalegającego moczu (o 12.6%); ↑ Qmax (o 6%).
Pytel i wsp., 2002	Permixon – 2x/dobę/24 miesiące	160mg	155 chorych/52-87 lat	↓ objawów w skali IPSS po 24 miesiącach (o 41.4%); ↓ objętości stercza (o 14.6%); ↑ Qmax i poprawa jakości życia.

Giannakopoulos i wsp., 2002	Libeprosta – 160mg 2x lub 3x/dobę/6 miesięcy	100 chorych/63-67 lat, >45 lat	↓ objawów w skali IPSS (o 7.6 pkt); ↓ objętości gruczołu krokowego oraz ilości zalegającego moczu i nykturii w grupach otrzymujących wyciąg.
Pecoraro i wsp., 2004	Permixon – 160mg 2x/dobę/8 tygodni	88 chorych/67 lat	ocena wpływu wyciągu z <i>S. repens</i> na krwawienie po resekcji stercza (TURP przez moczowodowe); ↓ objętości gruczołu krokowego i krwawienia pooperacyjnego.
Bent i wsp., 2006	Wyciąg z <i>S. repens</i>	225 chorych w wieku >49 lat	brak znamienych różnic w indeksie AUASI, szybkości maksymalnej odpływu moczu, objętości gruczołu krokowego i stężenia PSA w obu grupach.
Lopatkin i wsp., 2005; Lopatkin i wsp., 2006	PRO 160/120 – 1 kaps. 2x/dobę/12 miesięcy	257 chorych/bd.	↓ objawów wg. oceny Międzynarodowej Skali Objawów Rozrostu Prostaty (IPSS), dobra tolerancja leku.
Avins i wsp., 2008	standaryzowany wyciąg – 160mg/2x/dobę/12 miesięcy	225 chorych	brak znamienych różnic w częstości występowania działań niepożądanych w porównaniu z grupą placebo.

1.9. *Epilobium* sp. – charakterystyka surowca, właściwości biologiczne

W obrębie rodziny *Onagraceae* (Luss.) (*Oenotheraceae*) występuje około 656 gatunków roślin należących do 22 rodzajów powszechnie występujących na kuli ziemskiej - na całym obszarze Europy, także na terenie Ameryki, Australii i Nowej Zelandii, na północnym, południowym i wschodnim obszarze Afryki (od strefy borealnej po lasy tropikalne), poza suchymi strefami Australii i Afryki - reprezentowanych przede wszystkim przez rośliny zielne, rzadziej przez krzewy i drzewa [Hansel i wsp., 1993; Mirek Z, 2002]. W obrębie rodzaju *Epilobium* stwierdzono ponad 200 [Hevesi i wsp., 2009], 250 [Leveille, 1910; Hansel i wsp., 1993] gatunków, z czego 27 rdzenie występuje na terenie Europy [Hevesi i wsp., 2009], a liczbę gatunków zidentyfikowanych w Polsce szacuje się na 14 [Mirek Z., 2002]. Ze względu na fakt, iż liście roślin z tego rodzaju przypominają wyglądem liście wierzby, w nomenklaturze angielskiej przedstawicieli tego rodzaju powszechnie określa się terminem „Willow herb” [Steenkamp i wsp., 2006; PDR, 2007], w szczególności należących do gatunku *Epilobium angustifolium* (wierzbowki kiprzyca). Innymi anglojęzycznymi terminami powszechnie przypisywanymi dla tego gatunku są określenia: „Fire weed” (syn. „Fireweed”) [Hansel i wsp., 1993; Pizorno i wsp., 2012], „French willow”, „rosebay”, „spiked willow herb” [Hansel i wsp., 1993].

W medycynie tradycyjnej surowce roślinne z rodzaju *Epilobium* mają ugruntowaną pozycję. Stosowane są bowiem od wielu lat przede wszystkim w profilaktyce i łagodzeniu symptomów występujących u pacjentów cierpiących na łagodny przerost gruczołu krokowego, z dysfunkcją układu moczopłciowego, w szczególności w stanach zapalnych cewki moczowej i zaburzeniach mikcji [Hostettmann i wsp., 1990; Volak i wsp., 1992; Hansel i wsp., 1993; Schaffner, 1996; Steenkamp, 2003; Vitalone i wsp., 2003; PDR, 2007; Pizorno i wsp., 2012]. Wiedza na temat właściwości przeciwzapalnych i antyseptycznych ekstraktów z *Epilobium* sp. wykorzystywana jest również w leczeniu grzybic, owrzodzeń i obrzęków skóry [Van-Hellefont, 1986; Foster i wsp., 2000; Wichtl, 2004]. Z kolei w tradycyjnej medycynie chińskiej substancje należące do tego rodzaju wykorzystuje się również leczniczo w celu złagodzenia objawów zaburzeń miesiączkowania, a przez rdzennych Amerykanów wykorzystywane są także przy krwawieniach odbytnicy [Hansel i wsp., 1993; Foster i wsp., 2000; Wichtl, 2004; PDR, 2007; Stolarczyk, 2013]. Młode pędy lub całą roślinę *Epilobium parviflorum* (wierzbowicy drobnokwiatowej) wykorzystywano również do uzyskiwania leków o właściwościach rozmiękczających, osłaniających i ściągających [Schaffner, 1996]. W medycynie tradycyjnej postuluje się również właściwości kojące układ nerwowy dla suchych

liści z *E. angustifolium*, a także dla naparów i odwarów opartych na bazie ww. surowca w leczeniu bólów migrenowych. Odwar i sproszkowane kłącza *E. angustifolium* używane są również zewnętrznie jako środek gojący [Volak i wsp., 1992]. Wyciągi z *E. angustifolium* zaleca się również do stosowania przy stanach zapalnych błony śluzowej żołądka i jelit [Hansel i wsp., 1993; PDR, 2007]. Pomimo szerokiego terapeutycznego znaczenia surowców opartych na bazie poszczególnych gatunków *Epilobium* sp. żaden z nich nie posiada jednakże monografii ESCOP, Komisji E ani też w europejskiej [Eur Ph, 2014] czy też polskiej Farmakopei IX [FP, 2011; Hevesi i wsp., 2009].

W miarę upływu lat wzrosła wiedza na temat biologicznego działania substancji biologicznie czynnych stwierdzonych u poszczególnych gatunków tego rodzaju, których skład i procentowa zawartość różni się w zależności m.in. od tego, jaki gatunek, surowiec poddano analizie, od stadium jego rozwoju, rodzaju badanego ekstraktu, użytej metodyki i techniki analitycznej.

Według monografii PDR for Herbal Medicines surowcem zielarskim jest część nadziemna (ziele) oraz korzeń rośliny a do substancji biologicznie czynnych zawartych w surowcach jak i wyciągach uzyskanych z poszczególnych gatunków rodzaju *Epilobium* zalicza się głównie: flawonoidy i ich pochodne (np. myricetynę, izokwercetynę, kwercetynę, guajawerynę, kwercetyno-3-O- β -D-glukoronid), taniny i ich pochodne (w szczególności należące do elagitanin, gł. oenoteina B i A oraz galotanin), kwasy tłuszczowe i ich sole (np. palmitynian), fitosterole i ich pochodne (m.in. β -sitosterol i jego pochodne) [PDR, 2007].

Obecność flawonoidów, ich pochodnych w analizowanych surowcach roślinnych i wyciągach *Epilobium* sp. wykazali Denford i wsp. [Denford i wsp., 1974; Denford, 1980], Rządowska-Podalska i wsp. [Rządowska-Podalska i wsp., 1987], Ducrey i wsp. [Ducrey i wsp., 1997], Hiermann i wsp. [Hiermann i wsp., 1986, Hiermann i wsp., 1991; Hiermann, 1995; Hiermann i wsp., 1998], Slacanin i wsp. [Slacanin i wsp., 1991], Ivancheva i wsp. [Ivancheva i wsp., 1992], Lesuisse i wsp. [Lessuisse i wsp., 1995], Barakat i wsp. [Barakat i wsp., 1997], Rauha i wsp. [Rauha i wsp., 2000], Vitalone i wsp. [20], Pelc i wsp. [Pelc i wsp., 2006], Kiss i wsp. [Kiss i wsp., 2010], Hevesi i wsp. [Hevesi i wsp., 2009], Stolarczyk i wsp. [Stolarczyk i wsp., 2013] i inni. Denford i wsp. przeprowadzili analizę chemotaksonomiczną, pod kątem obecności glikozydów flawonolowych, u osobników wchodzących w skład 239 populacji 17 gatunków rodzaju *Epilobium* występujących na terenie Kanady (*E. latifolium*, *E. angustifolium*, *E. glandulosum*, *E. paniculatum*, *E. hirsutum*, *anagallidifolium*, *E. platyphyllum*, *E. hornemanii*, *E. clavatum*, *E. lactiflorum*, *E. alpinum*, *E. luteum*, *E. davuricum*, *E. leptophyllum*, *E. palustre*, *E. palustre* var. *Grammadophyllum*, *E. palustre* var.

Monticolor). W obrębie przeanalizowanych przedstawicieli stwierdzono obecność mirycetyno-3-O-arabinozydu, -3-O-glukozydu, -3-O-ramnozydu; kwercetyno-3-O-arabinozydu, -3-O-glukozydu, -3-O-diglukozydu, -3-O-ramnozydu oraz kemferolo-3-O-glukozydu i -3-O-ramnozydu [Denford i wsp., 1980]. Hiermann i wsp. na początku lat 90-tych wykazali w ziele *Epilobium angustifolium* obecność m.in. kolejnej glikozydowej pochodnej mirycetyny, tj. mirycetyno-3-O- β -glukuronidu [Hiermann i wsp., 1991]. Obszerną analizę fitochemiczną trzynastu gatunków z rodzaju *Epilobium* (9 gatunków zebranych z terenu Szwajcarii, 4 pozostałych z Afryki) wykonał Ducrey wraz z zespołem, którzy dokonali identyfikacji w metanolowych ekstraktach z ziela *Epilobium angustifolium*, *E. dodonaei*, *E. capense*, *E. hirsutum*, *E. hirsutum*, *E. montanum*, *E. parviflorum*, *E. alpinum*, *E. roseum*, *E. salignum*, *E. stereophyllum*, *E. tetragonum* i gatunku mieszańcowego (którego organizmami rodzicielskimi są *E. roseum* i *E. parviflorum*) znacznej liczby glikozydów flawonolowych, w tym kwercetynę, izokwercetynę, guajawerynę, hiperozyd, mirycetynę, izomirycetynę. Reszty glikozydowe stanowiły: ramnoza, glukoza, galaktoza, galoilo-6-galaktoza i arabinoza [Ducrey i wsp., 1997]. Kompleksową ocenę fitochemiczną przeprowadziła Hevesi i wsp. analizując metanolowe ekstrakty uzyskane z pięciu gatunków rodzaju *Epilobium* natywnie występujących na terenie Węgier (*Epilobium parviflorum*, *E. angustifolium*, *E. montanum*, *E. tetragonum*, *E. roseum*) oraz dwóch dostępnych komercyjnie ekstraktów z *Epilobium parviflorum*, w wyniku czego potwierdzono obecność m.in. mirycetyno-3-O-heksogalusanu, mirycetyno-3-O-heksozydu, kwercetyno-3-O-heksogalusanu, pentozydu kwasu elaginowego, mirycetyno-3-O-pentozydu i -3-O-ramnozydu, kwercetyno-7-O-glukuronidu, heksozydu kwasu elaginowego, kwercetyno-3-O-pentozydu, kemferolo-3-O-heksozydu i kwercetyno-3-O-ramnozydu [Hevesi i wsp., 2009]. Występowanie ww. metabolitów wtórnych potwierdzono również w ekstraktach etanolowych z *E. parviflorum*, *E. angustifolium* i *E. hirsutum*.. Zróznicowany profil ww. związków w fazie wegetatywnej i generatywnej w ziele *E. angustifolium* i *E. hirsutum* wykazały ponadto badania Pelc i wsp. [Pelc i wsp., 2006]. W badaniach tych zidentyfikowano m.in. obecność flawonów: 7-glikozydu luteoliny (dominujący), 7-glikozydu apigeniny, luteolinę oraz flawonole: kwercetynę i pochodne: rutynę (3-rutynozyd kwercetyny), kwercetrynę, izokwercetrynę, 3-glikozyd izoramnetyny, mirycetynę i kemferol [Pelc i wsp., 2006]. W ostatnim czasie szerokie spektrum flawonoidów wykazano również w wodnych i etyleno-octowych wyciągach ww. *E. angustifolium* i *E. hirsutum* oraz *E. parviflorum* [Stolarczyk i wsp., 2013].

Kolejną grupą związków, których obecność stwierdzono w surowcach lub ekstraktach uzyskiwanych z roślin omawianego rodzaju, stanowią taniny, należące głównie do elagitanin i

galotanin. Ich obecność w wodno-etanolowym wyciągu z zieleń *Epilobium hirsutum* wykazała m.in. Ivancheva i wsp. [Ivancheva i wsp., 1992], Lesuisse i wsp., którzy w wodnych i etanolowych wyciągach z łodygi i zieleń *Epilobium angustifolium* stwierdzili obecność makrocyklicznej taniny hydrolizującej - oenoteiny B [Lessuisse i wsp., 1995]. Vitalone i wsp. obecność jej wykazali natomiast w etanolowych wyciągach otrzymanych z części nadziemnych kolejnych trzech gatunków (*Epilobium rosmarinifolium*, *E. spicatum* i *E. tetragonum*) [Vitalone i wsp., 2003]. Również w nadziemnych częściach przedstawiciele siedmiu gatunków roślin z rodzaju *Epilobium* (*Epilobium angustifolium*, *E. hirsutum*, *E. fleischeri* Hochst., *E. roseum*, *E. parviflorum*, *E. montanum* i *E. lanceolatum*) wykazano obecność wspomnianej powyżej makrocyklicznej dimerycznej oenoteiny B oraz jej trimerycznego analogu – oenoteiny A [Ducrey i wsp., 1995]. Obecność elagitanin, w szczególności oenoteiny B w wyciągach z zieleń przede wszystkim *E. angustifolium*, *E. parviflorum* i *E. hirsutum* a także *E. montanum*, *E. rosmarinifolium* i *E. tetragonum* wykazały również badania m.in. Kiss i wsp. [Kiss i wsp., 2004; Kiss i wsp., 2006; Kiss i wsp., 2010], Granica i wsp. [Granica i wsp., 2012] oraz Stolarczyk i wsp. [Stolarczyk i wsp., 2013].

Niewielką ilość steroli i ich estrów (głównie β -sitosterolu, kampesterolu, stigmasterolu, cholesterolu, brasikasterolu) w zieleń lub oleju z nasion roślin z rodzaju *Epilobium* (*E. tetragonum*, *E. hirsutum*, *E. angustifolium*) stwierdzono w pracach prowadzonych m.in. przez Hiermann i wsp. [Hiermann i wsp., 1997], Nowak i wsp. [Nowak i wsp., 1998], Pelc i wsp. [Pelc i wsp., 2005], Mrozikiewicz i wsp. [Mrozikiewicz i wsp., 2005], Węglarz i wsp. [Węglarz i wsp., 2011]. W oleju z nasion *Epilobium* sp. stwierdzono również obecność kwasów tłuszczowych (kwas palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego, γ -linolenowego i α -linolenowego) i ich pochodnych [Hiermann i wsp., 1997], Nowak i wsp. [Nowak i wsp., 1998], Pelc i wsp. [Pelc i wsp., 2005].

W szeregu analizach potwierdzono również obecność kwasów fenolowych i ich pochodnych, w tym kwasu elaginowego, kwasu galusowego, pentozydu i heksozydu kwasu elaginowego, kwasu chlorogenowego, estru pentozowego kwasu kawowego i innych [Hevesi i wsp., 2006; Hevesi i wsp., 2009; Jürgenson i wsp., 2012; Huttunen i wsp., 2013]. W tabeli nr 6 zestawiono gatunki *Epilobium* sp., które poddano analizie fitochemicznej wraz ze zidentyfikowanymi metabolitami wtórnymi [Tab. 6.].

Tab. 6. Zestawienie gatunków rodzaju *Epilobium* wraz z najistotniejszymi zidentyfikowanymi metabolitami wtórnymi. Opracowanie własne.

Grupa związków	Badane związki	Badany gatunek	Autor
flawonoidy i ich pochodne	glikozydowe pochodne: mirycetyno-3-O-arabinozyd, 3-O-glukozyd i 3-O-ramnozyd; kwercetyno-3-O-arabinozyd, 3-O-glukozyd, 3-O-digluukozyd, 3-O-ramnozyd; kemferolo-3-O-glukozyd i 3-O-ramnozyd	<i>E. latifolium</i> , <i>E. angustifolium</i> , <i>E. glandulosum</i> , <i>E. paniculatum</i> , <i>E. hirsutum</i> , <i>anagallidifolium</i> , <i>E. platyphyllum</i> , <i>E. hornemanii</i> , <i>E. clavatum</i> , <i>E. lactiflorum</i> , <i>E. alpinum</i> , <i>E. luteum</i> , <i>E. davuricum</i> , <i>E. leptophyllum</i> , <i>E. palustre</i> , <i>E. palustre</i> var. <i>Grammadophyllum</i> , <i>E. palustre</i> var. <i>Monticolor</i>	Denford, 1980
	kemferol, mirycetyna, kwercetyna i ich 3-O-β-glikozydowe pochodne: kemferolo-3-O-ramnozyd, kemferolo-3-O-glukozyd, mirycetyno-3-O-ramnozyd, kwercetyno-3-α-L-arabopiranozyd, kwercetyno-3-O-ramnozyd, 3-O-galaktozyd, 3-O-glukozyd	<i>E. parviflorum</i>	Rządkowska-Podalska i wsp., 1987; Hiermann, 1982
	mirycetyno-3-O-β-glukuronid	<i>E. angustifolium</i> , <i>E. parviflorum</i> , <i>E. hirsutum</i> , <i>E. dodanaei</i>	Hiermann i wsp., 1986; Hiermann i wsp., 1991; Slacanin i wsp., 1991; Ivancheva i wsp., 1992; Hiermann, 1993; Hiermann i wsp., 1998
	kemferol, kwercetyna, mirycetyna, guajaweryna, hiperozyd, izokwercetyna, izomirycetyna i 3-O-glikozydowe pochodne kemferolu, kwercetyny i mirycetyny (reszty glikozydowe: ramnoza, glukoza, galoilo-6-glukoza)	<i>E. angustifolium</i> , <i>E. dodanaei</i> ; <i>E. campestre</i> , <i>E. hirsutum</i> , <i>E. montanum</i> , <i>E. parviflorum</i> ; <i>E. alpinum</i> , <i>E. roseum</i> , <i>E. salignum</i> , <i>E. stereophyllum</i> , <i>E. tetragonum</i> ; hybryda: <i>E. roseum</i> i <i>E. parviflorum</i>	Ducrey i wsp., 1997
	kwercetyno-3-O-glukuronid, mirycetyno-3-O-ramnozyd	<i>E. angustifolium</i> , <i>E. hirsutum</i> , <i>E. parviflorum</i>	Kiss i wsp., 2010
	mirycetyna, kwercetyna, hiperozyd i ich 3-O-glikozydowe pochodne (reszta glikozydowa: glukoza, ramnoza)	<i>E. parviflorum</i> , <i>E. hirsutum</i> , <i>E. roseum</i> , <i>E. montanum</i> , <i>E. roseum</i> , <i>E. tetragonum</i>	Hevesi i wsp., 2006

	flawony: 7-glikozyd luteoliny (dominujący), 7-glikozyd apigeniny, luteolina; flawonole: kwercetyna i pochodne: rutyna (3-rutynozyd kwercetyny), kwercetryna, izokwercetryna, 3-glikozyd izoramnetyny, mirycetyna, kemferol	<i>E. angustifolium</i> , <i>E. hirsutum</i>	Pelc i wsp., 2006
	mirycetyno-3-O-hekso-gallusan, mirycetyno-3-O-heksozyd, kwercetyno-3-O-heksogallusan, mirycetyno-3-O-pentozyd, mirycetyno-3-O-ramnozyd, , kwercetyno-3-O-penozyd, kemferolo-3-O-heksozyd, , kwercetyno-3-O-ramnozyd i kemferolo-3-O-ramnozyd	<i>E. parviflorum</i> , <i>E. montanum</i> , <i>E. tetragonum</i> , <i>E. roseum</i>	Hevesi i wsp., 2009
	kwercetyno-7-O-glukuronid, kemferolo-7-O-glukuronid	<i>E. angustifolium</i>	Hevesi i wsp., 2009
	glikozydowa forma mirycetyny, mirycetyna, glikozydy: kwercetyny i kemferolu	<i>E. parviflorum</i>	Arredondo i wsp., 2004
	zawartość frakcji fenolowej	<i>E. hirsutum</i> , <i>E. palustre</i> , <i>E. rosmarinifolium</i> , <i>E. spicatum</i> , <i>E. tetragonum</i>	Vitali i wsp., 2006
	całkowita zawartość flawonoidów	<i>E. angustifolium</i>	Jürgenson i wsp., 2012
	całkowita zawartość flawonoidów (glikozyd kwercetyny)	<i>E. angustifolium</i>	Huttunen i wsp., 2013
	całkowita zawartość flawonoidów	<i>E. parviflorum</i> , <i>E. angustifolium</i> , <i>E. hirsutum</i>	Stolarczyk i wsp., 2013
	mirycetyno-3-O-galoilo-heksozyd, mirycetyno-3-O-galaktozyd, mirycetyno-O-heksozyd, kwercetyno-3-O-(6''-galoilo)-galaktozyd, mirycetyno-3-O-arabinozyd, kwercetyno-O-galoilo-heksozyd, mirycetyno-3-O-ramnozyd, kwercetyno-3-O-galaktozyd, kwercetyno-3-O-glukozyd, kwercetyno-3-O-glukuronid, kwercetyno-3-O-arabinozyd, kemferolo-O-galoilo-heksozyd, kwercetyno-3-O-ramnozyd, kwercetyno-O-galoilo-glukuronid	<i>E. parviflorum</i> , <i>E. angustifolium</i> , <i>E. hirsutum</i>	Stolarczyk i wsp., 2013
fitosterole i ich pochodne	β -sitosterol, kempesterol, stigmasterol, cholesterol	<i>E. parviflorum</i>	Hiermann, 1983; Hiermann, 1985
	β -sitosterol, kempesterol, stigmasterol, brasikasterol	<i>E. tetragonum</i> , <i>E. hirsutum</i>	Pelc i wsp., 2005
	β -sitosterol, kempesterol, stigmasterol	<i>E. angustifolium</i>	Mrozikiewicz i wsp., 2005

	β -sitosterol	<i>E. angustifolium</i>	Nowak i wsp., 1998
	β -sitosterol, β -sitosterolo-D-glukuronid, kempesterol, stigmasterol, brasikasterol, cholesterol		Węglarz i wsp., 2011
	kemferolo-O-galoilo-heksozyd, kemferolo-3-O-glukuronid, kemferolo-3-O-ramnozyd	<i>E. parviflorum, E. angustifolium, E. hirsutum</i>	Stolarczyk i wsp., 2013
kwasy tłuszczowe i ich pochodne	kwasy linolowy, palmitynowy, kaproinowy, kaprylowy, kaprynowy, laurynowy, mirystynowy, stearynowy, linolenowy, arachidonowy, behenowy, lignocerowy, cerotowy, montanowy i melisynowy	<i>E. angustifolium</i> (?)	Hiermann i wsp., 1997
	kwasy palmitynowy, stearynowy, oleinowy, linolowy, γ -linolenowy i α -linolenowy	<i>E. tetragonum, E. hirsutum</i>	Pelc i wsp., 2005
	kwasy linolowy, palmitynowy, mirystynowy, stearynowy, linolenowy	<i>E. parviflorum, E. angustifolium</i>	Nowak i wsp., 1998
	kwasy palmitynowy	<i>E. tetragonum, E. hirsutum</i>	Vitalone i wsp., 2003
kwasy fenolowe i ich pochodne	pochodne kwasu kawowego, kwas elaginowy	<i>E. roseum, E. tetragonum, E. parviflorum, E. montanum, E. hirsutum</i>	Hevesi i wsp., 2006
	pentozyd kwasu elaginowego, heksozyd kwasu elaginowego, kwas chlorogenowy, ester pentozowy kwasu kawowego	<i>E. parviflorum, E. angustifolium, E. montanum, E. tetragonum, E. roseum</i>	Hevei i wsp., 2009
	całkowita zawartość polifenoli	<i>E. angustifolium</i>	Jürgenson i wsp., 2012
	kwasy benzoesowy, kwas hydroksybenzoesowy, kwas hydroksycynamonowy	<i>E. angustifolium</i>	Huttunen i wsp., 2013
	całkowita zawartość polifenoli	<i>E. parviflorum, E. angustifolium, E. hirsutum</i>	Stolarczyk i wsp., 2013

	kwasy galusowy, kwas 3-O-kawoilochinowy, ester pentozowy kwasu kawowego, kwas 3-O-p-kumaroilochinowy, kwas 4-O-p-kumaroilochinowy, kwas 5-O-kawoilochinowy, kwas 3-O-feruloilochinowy, kwas 5-O-p-kumaroilochinowy, kwas 5-O-p-feruloilochinowy, dilakton kwasu walonowego, kwas elaginowy, pochodne kwasu elaginowego	<i>E. parviflorum, E. angustifolium, E. hirsutum</i>	Stolarczyk i wsp., 2013
taniny	oenoteina B	<i>E. hirsutum</i>	Ivancheva i wsp., 1992
	oenoteina A i B	<i>E. angustifolium, E. dodonaei; E. campestre, E. hirsutum, E. montanum, E. parviflorum; E. alpinum, E. roseum, E. salignum, E. stereophyllum, E. tetragonum</i> ; hybryda: <i>E. roseum</i> i <i>E. parviflorum</i>	Ducrey i wsp., 1995
	oenoteina B	<i>E. rosmarinifolium, E. spicatum, E. tetragonum</i>	Vitalone i wsp., 2003
	oenoteina B	<i>E. angustifolium</i>	Kiss i wsp., 2004
	oenoteina B	<i>E. angustifolium</i>	Kiss i wsp., 2006
	oenoteina B	<i>E. angustifolium</i>	Bazyłko i wsp., 2007
	oenoteina B	<i>E. parviflorum, E. hirsutum</i>	Kiss i wsp., 2010
	zawartość frakcji tanin	<i>E. hirsutum, E. palustre, E. rosmarinifolium, E. spicatum, E. tetragonum</i>	Vitali i wsp., 2006
	oenoteina B	<i>E. angustifolium</i>	Schetkin i wsp., 2007

	całkowita zawartość tanin	<i>E. angustifolium</i>	Jürgenson i wsp., 2012
	oenoteina B	<i>E. parviflorum, E. angustifolium, E. hirsutum, E. montanum, E. colinum</i>	Granica i wsp., 2012
	oenoteina B	<i>E. parviflorum, E. angustifolium, E. hirsutum</i>	Stolarczyk i wsp., 2013
	oenoteina B, nieznana ellagitanina, galoilo-heksahydroksydifenoilo (HDDP)-glukoza, pentagaloiloglukoza, digaloilo-HDDP-glukoza, bi-HHDP-glukoza	<i>E. parviflorum, E. angustifolium, E. hirsutum</i>	Stolarczyk i wsp., 2013

1.9.1. Właściwości biologiczne przedstawicieli *Epilobium* sp.

Analiza literaturowa przeprowadzonych dotychczas badań pozwala na przypisanie roślinom rodzaju *Epilobium* szeregu biologicznych właściwości, między innymi antyproliferacyjnych czy wpływających na gospodarkę hormonalną [Hiermann i wsp., 1997; Vitalone i wsp., 2001; Vitalone i wsp., 2006; Kiss i wsp., 2004; Kiss i wsp., 2006; Kujawski i wsp., 2010; Stolarzyk i wsp., 2013]. Wskazuje się też na działanie rozkurczające na mięśnie gładkie pęcherza moczowego oraz cewki moczowej, co wpływa na złagodzenie symptomów towarzyszących BPH [PDR, 2007]. Wykazano również dla ekstraktów uzyskanych z poszczególnych gatunków rodzaju *Epilobium* działanie przeciwzapalne, przeciwobrzękowe [Hiermann i wsp., 1986; Hiermann i wsp., 1991, Hiermann i wsp., 1998; Hevesi i wsp., 2009], immunomodulujące [Schepetkin i wsp., 2009, Kiss i wsp., 2011, Ramstead i wsp., 2012], antyoksydacyjne [Arredondo i wsp., 2004; Steenkamp i wsp., 2006; Stajner i wsp., 2007; Hevesi i wsp., 2009; Kiss i wsp., 2011], przeciwbiegunkowe i wykazujące wpływ na perystaltykę jelit [Vitali i wsp., 2006], właściwości przeciwbólowe [Hiermann i wsp., 1986; Hiermann i wsp., 1991; Tita i wsp., 2001; Pourmorad i wsp., 2007] oraz przeciwbakteryjne i przeciwgrzybiczne [Ivancheva i wsp., 1992; Rauha i wsp., 2000; Steenkamp i wsp., 2006; Bartfay i wsp., 2012; Smirnova i wsp., 2012; Huttunen i wsp., 2013; Głowacka i wsp., 2013; Kosalec i wsp., 2013].

Wyniki badań przeprowadzone przede wszystkim w modelu *in vitro*, wskazują głównie na potencjalne właściwości antyproliferacyjne i normalizujące gospodarkę hormonów, głównie płciowych (właściwości antyandrogenowe i antyestrogenowe) dla wyciągów opartych na bazie *Epilobium* sp., dla poszczególnych frakcji ekstraktów czy też zidentyfikowanych metabolitów wtórnych. I tak wyniki badań przeprowadzone przez Lesuisse i wsp. [Lesuisse i wsp., 1996] oraz Ducrey i wsp. [Ducrey i wsp., 1997] wskazały na możliwość oddziaływania kluczowych metabolitów wtórnych zawartych w poszczególnych frakcjach ekstraktów z *Epilobium* sp. na aktywność SRd5ar. Lesuisse i wsp. przeprowadzili pomiar wpływu poszczególnych frakcji etanolowych i wodnych ekstraktów uzyskanych z suchych, nadziemnych części *Epilobium parviflorum* na zmiany aktywności SRd5ar (SRd5a, syn. SRd5a; Sd5aR) w homogenatach tkanek pobranych z materiału klinicznego poprzez analizę zmian ilościowych metabolitów enzymu: DHT, 5 α -androstano-3 α ,17 β -diolu i 5 α -androstano-3 β ,17 β -diolu. Otrzymana frakcja wodna spowodowała spadek aktywności enzymu o 90% - współczynnik IC₅₀ dla wyizolowanej i oczyszczonej z tej frakcji przedstawiciela makrocyclicznej taniny hydrolizującej - oenoteiny B - wynosił 2,2x10⁻⁵, podczas gdy dla suchego wodnego wyciągu *E. parviflorum* - 0,16 g/L [Lesuisse i wsp., 1996]. Ducrey i wsp. wykazali działanie hamujące aktywność SRd5ar i aromatazy w homogenetach prostat ludzkich i szczurzych, zarówno dla ekstraktu wodno-metanolowego uzyskanego z części

nadziemnych *Epilobium campestre*, pojedynczej frakcji zawierającej taniny (głównie oenoteinę A i B) oraz podanym zwierzętom osobno tych dwóch związków. Oenoteina A, w stężeniu 50 uM, spowodowała zahamowanie aktywności aromatazy o 70%, oenoteina B natomiast o 33%. Odmienne działanie obu związków zaobserwowano w przypadku drugiego enzymu - 5 α -reduktazy steroidowej [Ducrey i wsp., 1997]. Zmiany w zachowaniu zdolności do proliferacji komórek pod wpływem wyciągów z *Epilobium* prowadzono również przez Vitalone i wsp. w badaniach w modelu komórkowych hodowli w warunkach *in vitro* [Vitalone i wsp., 2001; Vitalone i wsp., 2003]. W doświadczeniu na nienowotworowej linii komórkowej nabłonka prostaty – PZ-HPV-7 wykazano, iż najsilniejsze właściwości objawiające się obniżeniem liczby komórek w stosunku do grupy kontrolnej wykazał 0,65% etanolowy ekstrakt z *Epilobium angustifolium* w dawce 1900 μ g/ml zarówno po 1 - jak i 2 - dniowym okresie inkubacji (zahamowanie proliferacji o 68% po 24h, po 48h spadek o 67%) [Vitalone i wsp., 2001]. W kolejnym doświadczeniu tej grupy badaczy określano mechanizm antyproliferacyjnego działania etanolowych ekstraktów uzyskanych z kilku przedstawicieli rodzaju *Epilobium*: *Epilobium hirsutum*, *E. palustre*, *E. spicatum* (*E. angustifolium*), *E. rosmarinifolium* i *E. tetragonum* (Boiron Laboratories). Najsilniejszy efekt hamujący proliferację komórek, objawiający się zahamowaniem syntezy DNA komórkowego na etapie fazy G₀/G₁, wykazały ekstrakty pochodzące z *Epilobium tetragonum* i *E. rosmarinifolium*, jednak odznaczały się również niepożądanymi właściwościami cytotoksycznymi [Vitalone i wsp., 2003]. Wyciągi z *E. rosmarinifolium* (w stężeniach 0,05 -1 mg/ml), *E. tetragonum* (w stężeniu 0,25 mg/ml) i *E. spicatum* (w stężeniu 0,5 mg/ml) wykazywały średnio około 40% inhibicję proliferację badanych komórek bez efektów cytotoksycznych [Vitalone i wsp., 2003]. W kolejnym badaniu etanolowe wyciągi z nadziemnych części *E. rosmarinifolium*, *E. tetragonum* i *E. spicatum* wykazywały aktywność antyproliferacyjną w stosunku do komórek PZ-HPV-7 oraz ludzkich nowotworowych, androgenno-zależnych komórek prostaty LNCaP, ssaczyc komórek nabłonka HMEC i w linii komórkowej gwiazdździaka 1321N1 [Vitalone i wsp., 2003]. Najsilniejsze właściwości hamujące syntezę DNA, w powiązaniu z efektem cytotoksycznym, we wszystkich przebadanych liniach komórkowych wykazał ekstrakt z *Epilobium rosmarinifolium* o największym stężeniem oenoteiny B [Vitalone i wsp., 2003].

W pracach Kiss i wsp., przeprowadzonych również w modelu hodowli komórkowych *in vitro* (komórek LNCaP, komórek SK-N-SH charakteryzujących się wysokim poziomem aktywności NEP oraz nowotworowych komórek prostaty PC-3 o jej niskiej aktywności) wykazano ponadto hamujący charakter ekstraktów z *Epilobium angustifolium*, (głównie 70% metanolowy, etylooctowy, butanolowy), na aktywność enzymów należący do grupy metalopeptydaz - neutralnej endopeptydazy (NEP), enzymu konwertującego angiotensynę (ACE), w znacznie mniejszym stopniu aminopeptydazy P (APN) [Kiss i wsp., 2004; Kiss i wsp., 2006]. Jest to o tyle

ważne, ponieważ białka te znane są z udowodnionej roli w patogenezie wielu postaci nowotworów, m.in. nerek, pęcherza moczowego, prostaty, endometrium i płuc, czy też w przekształcaniu się komórek nowotworowych z formy androgenno-zależnej do androgenno-niezależnej [Papandreou i wsp., 1998; Albrecht i wsp., 2002]. Sugeruje się kluczowy udział dimerycznej, makrocyklicznej ellagitaniny – oenoteiny B, a także flawonoidów - hyperozydu, izokwercetyny, kwercetyny i ich pochodnych (glukuronidu kwercetyny, kwercetyno-3-O-(6''-galloilo)-galakotozydu, kemferolo-3-O-(6'-p-kumaroilo)-glukozydu) oraz kwasów fenolowych (m.in. kwas gallusowy, elaginowy) hamowaniu aktywności ww. enzymów [Kiss i wsp., 2004; Kiss i wsp., 2006].

Kluczowym badaniem przeprowadzonych w modelu zwierzęcym, podejmujących próbę ustalenia potencjalnych antyproliferacyjnych, hormono-zależnych właściwości wyciągów z przedstawicieli *Epilobium* sp. jest eksperyment przeprowadzony przez Hiermann i wsp. [Hiermann i wsp., 1997]. Oceniano w nim właściwości ekstraktu heksanowego i wodnego z ziela *Epilobium angustifolium* oraz frakcji powstałej na drodze ultrafiltracji wodnego ekstraktu badanego surowca zawierającą składniki o masie molowej nie przekraczającej 1000 Da (oznaczoną symbolem UF) [40mg/kg m.c./dobę/20 dni; p.o.; ekstrakt wodny i ww. frakcja] u 30 - dniowych szczurów kastrowanych i niepoddanych kastracji dokonując m.in. pomiarów zmian masy ich gruczołu krokowego, mięśnia dźwigacza odbytu (ang. *musculus laevator ani*, LAM) i pęcherzyków nasiennych [Hiermann i wsp., 1997]. U niekastrowanych szczurów odnotowano znaczące zmniejszenie masy pęcherzyków nasiennych (a więc androgenno-zależnych gruczołów) w stosunku do zwierząt kontrolnych otrzymujących testosteron. Silniejsze działanie obniżające masę pęcherzyków nasiennych, obserwowano w przypadku ekstraktu wodnego (spadek masy o 43%). Nieco odmienny efekt zaobserwowano u szczurów kastrowanych, tj. wzrost masy wszystkich badanych narządów (nieznaczne działanie proandrogenne). Wysunięto wniosek, iż zidentyfikowane w badanym ekstrakcie kwasy tłuszczowe aplikowane zwierzętom w ww. ilościach nie wywołały oczekiwanej hamującej aktywności wobec enzymu 5 α -reduktazy steroidowej [Hiermann i wsp., 1997]. Odmiennie działanie wodnego wyciągu z ziela *Epilobium angustifolium*, tzn. antyandrogenne działanie u zwierząt niekastrowanych i niewielkie proandrogenne u kastratów w stosunku do zwierząt kontrolnych stymulowanych testosteronem, Hiermann i wsp. tłumaczą obecnością komponentów (o masie cząsteczkowej przewyższającej 1000 Da) we frakcji wodnej, wzmacniających biodostępność podawanego egzogennie testosteronu [Hiermann i wsp., 1997]. W innych badaniach *in vivo*, w mysim modelu leukocytnego nowotworu P-388 i wodobrzusznego guza Ehricha, przeprowadzonych przez Voynova i wsp. alkoholowe wyciągi *Epilobium hirsutum*, w stężeniach 1 mg/kg and 3 mg/kg, wydłużyły długość życia myszy odpowiednio o 158 i 152% [Voynova i wsp., 1991]. W badaniach Kujawski i wsp. zaobserwowano zróżnicowany wpływ wodnego wyciągu z ziela *E. angustifolium* na ekspresję mRNA receptorów α i β receptora

estrogenowego w brzusznej płacie prostat indukowanych hormonalnie szczurów przy nieznacznym zwiększeniu stężenia wolnego estradiolu (E2) w osoczu [Kujawski i wsp., 2010].

W badaniach Stolarczyk i wsp. udowodniono właściwości antyproliferacyjne wodnych wyciągów *E. parviflorum*, *E. hirsutum* i *E. angustifolium* (20, 50 i 70 µg/ml; czas trwania eksperymentu – 72h) w stosunku do ludzkich nowotworowych komórek prostaty LNCaP (wartości IC50 wynosiły odpowiednio 32.2±5.6 mg/ml, 37.3±1.9 mg/ml i 44.6±7.3 mg/ml). Indukcja apoptozy pod wpływem badanych ekstraktów związana była proporcjonalna od użytego stężenia (najsilniejsze efekty obserwowano przy stężeniu 70 µg/ml), a objawiała się podwyższeniem aktywności kaspazy 3 do wartości odpowiednio: 1.08 ± 0.12 ng kaspazy 3/mg białka dla ekstraktu z *E. angustifolium*, 1.10 ± 0.8 ng dla wyciągu z *E. parviflorum* oraz do 1.39 ± 0.21 ng w przypadku ekstraktu z *E. hirsutum*. Stwierdzono ponadto, że ich aktywność apoptotyczna związana jest z redukcją komórkowych potencjałów mitochondrialnych. Badacze wysunęli wniosek, iż obserwowane efekty mogą być skutkiem wysokiej zawartości oenoteiny B, względnie kwasów ellagininowych, flawonoidów [Stolarczyk i wsp., 2013]. W kolejnym badaniu wykazano ponadto proporcjonalne do użytej dawki (20, 50 and 70 µg/ml) zahamowanie proliferacji nowotworowych komórek prostaty LNCaP, co może korelować z zahamowaniem sekrecji PSA oraz obniżeniem aktywności arginazy w ww. komórkach pod wpływem wodnych i etyleno-octanowych (w mniejszym stopniu) wyciągów z *Epilobium parviflorum*, *E. hirsutum* i *E. angustifolium* [Stolarczyk i wsp., 2013]. Wartości IC50 dla wodnych wyciągów wyniosły odpowiednio 32.2±5.6 µg/ml, 37.3±1.9 µg/ml i 44.6±7.3 µg/ml. Podobne efekty obserwowano w obecności zidentyfikowanych w nich oenoteiny B i mirycetyno-3-O-ramnozydu. Efektywniejsza w zahamowaniu proliferacji komórek LNCaP, inhibicji sekrecji PSA oraz aktywności arginazy była wspomniana ellagitanina (wartości IC50 wynosiły odpowiednio 7.8±0.8 µM, 21.9±3.2 µM i 19.2±2.0 µM) [Stolarczyk i wsp., 2013]

Problematyka ustalenia roli procesów zapalnych w patogenezie BPH zainicjowała wśród badaczy podjęcie prac zmierzających do ustalenia czy wyciągi uzyskane z przedstawicieli *Epilobium* sp. lub zidentyfikowane w nich metabolity wtórne powodować mogą zmiany w aktywności enzymów charakterystycznych dla procesu zapalnego. Na uwagę zasługują przede wszystkim wyniki badań *in vivo* przeprowadzonych przez Hiermann i wsp. [Hiermann i wsp., 1986; Hiermann i wsp., 1991, Hiermann i wsp., 1998] oraz Juan i wsp. [Juan i wsp., 1988]. I tak w modelu perfuzji ucha u królików (3 ml/min ekstraktu wodnego z *Epilobium angustifolium* lub *E. parviflorum*, odpowiadającego odpowiednio 1,5 albo 5 mg jego zaawartości w 1 ml) wykazano, iż wyciągi te w sposób proporcjonalny od użytej dawki redukują stężenie prostaglandyn typu PGE2, 6-keto PGE2_{1α}, PGD2 [Juan i wsp., 1988]. Szczególnie wodny ekstrakt z *E. angustifolium* w dawce 5 mg/1ml spowodował obniżenie uwalniania PGE2, 6-keto PGE2_{1α}, odpowiednio o 60 i 98% (n = 4; p<0,001). Odpowiedni wyciąg z *E. parviflorum* wykazywał 5-krotnie mniejszą aktywność.

Natomiast etanolowe i metanolowe wyciągi obu gatunków rodzaju *Epilobium* nie wykazywały badanych właściwości na oznaczalnym poziomie [Juan i wsp., 1988]. Na podstawie uzyskanych wyników postawiono hipotezę, iż za obserwowane efekty odpowiedzialne mogą być zawarte w ekstraktach flawonoidy i fitosterole [Hiermann i wsp., 1986; Hiermann i wsp., 1991]. Właściwości przeciwzapalne etanolowego wyciągu *E. angustifolium* objawiały się również zmniejszeniem obrzęku łapy szczura indukowanym karageniną [Hiermann i wsp., 1986]. Dalsze prace zespołu Hiermann i wsp. wskazały na możliwość udziału mirycetyno-3-O-glukuronidu w inhibicji cyklooksygenaz COX-1 i COX-2 oraz lipooksygenazy 5-LOX [Hiermann i wsp., 1991, Hiermann i wsp., 1998]. Dalsze badania, przeprowadzone przez Steenkamp i wsp. w modelu *in vitro*, wykazały blisko 10-krotne silniejsze właściwości przeciwzapalne ww. metabolitu głównie w etanolowych wyciągach *E. parviflorum* aniżeli syntetyczna indometacyna (w stężeniach, odpowiednio: 7,14 $\mu\text{g/ml}$ (20 μM) i 71,4 $\mu\text{g/ml}$ (200 μM)) [Steenkamp i wsp., 2006]. Również badania *in vitro* przeprowadzone przez Hevesi i wsp. wskazały na właściwości przeciwzapalne wodno-acetonowego ekstraktu z *E. parviflorum*, objawiające się zahamowaniem aktywności cyklooksygenazy i sekrecji prostaglandyny E2 [Hevesi i wsp., 2009]. W doświadczeniach tych badany ekstrakt wykazał hamowanie aktywności cyklooksygenazy przy niskim zakresie stężeń, względem ekstraktu etanolowego zbadanego uprzednio przez Steenkamp i wsp. [Steenkamp i wsp., 2006].

Wyniki prac różnych grup [Schepetkin i wsp., 2009, Kiss i wsp., 2011, Ramstead i wsp., 2012] sugerują, iż za właściwości immunomodulujące ekstraktów *Epilobium* sp. odpowiedzialna może być w szczególności oenoteina B. W badaniach *in vitro* przeprowadzonych na ludzkich monocytarnych komórkach THP-1Blue, komórkach białaczki HL-60 oraz *in vivo* w odniesieniu do komórek neutrofilii szpiku kostnego pobranych z myszy szepu BALB/c stwierdzono m.in. aktywację, indukcję chemotaksji monocytów/makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych oraz sekrecję wybranych cytokin (interferon- γ , IL-1 β , GM-CSF, TNF- α , IL-6) pod wpływem obecności oenoteiny B (10 μM , 25 μM) [Schepetkin i wsp., 2009]. Szczegółowe analizy wykazały, że oenoteina B, w sposób zależny od użytej dawki, indukuje m.in. wewnątrzkomórkowe podwyższenie stężenie jonów Ca²⁺ w neutrofilach co, zdaniem badaczy, wskazywać może na fakt, iż związek ten może być agonistą fagocytów. Takich efektów nie stwierdzono w przypadku związków strukturalnie powiązanych, będących niejako składową oenoteiny B (tj. pirokatechiny, kwasu galusowego, pirogalolu i kwasu 3,4-dihydroksybenzoesowego) [Schepetkin i wsp., 2009]. W kolejnych badaniach, przeprowadzonych przez Kiss i wsp., udokumentowano, iż etanolowe wyciągi z *Epilobium hirsutum*, *E. parviflorum* i *E. angustifolium* (o wysokim stężeniu tannin - oenoteiny B, a także flawonoidów – kwercetyno-3-O-glukuronidu, mirycetyno-3-O-ramnozydu) hamowały m.in. aktywność hialuronidazy i lipooksygenazy z (IC₅₀ = 3.3 - 6.5 $\mu\text{g/ml}$ i 16 – 28 $\mu\text{g/ml}$, odpowiednio). Hamowanie hialuronidazy związane było z obecnością oenoteiny B (IC₅₀ = 1,1 μM). Wykazano

ponadto zahamowanie uwalniania markera stanu zaplanego - mieloperoksydazy (MPO) przez stymulowane neutrofile, bez wpływu na uwalnianie elastazy pod wpływem badanych wyciągów roślinnych, jak również samej oenoteiny B (IC50 - 7,7 µg/ml) [Kiss i wsp., 2011]. W badaniach Ramstead i wsp. stwierdzono z kolei, że metabolit ten, wyizolowany z ziela *E. angustifolium*, w sposób zależny od użytej dawki może stymulować limfocyty (wołowego i ludzkiego komórki T typu: $\gamma\delta$ T, CD8+ oraz NK (CD25 i/lub CD69) co objawiało się podwyższeniem sekrecji m.in. interferonu γ (IFN γ) oraz interleukiny-18 (IL-18) przez komórki bydłące i ludzkie [Ramstead i wsp., 2012]. Badania *in vitro* (w indukowanym światłem UV procesie starzenia się ludzkich fibroblastów skóry NHDF (ang. *normal human dermal fibroblasts*)) i *in vivo* przeprowadzone przez Ruszová i wsp. wskazują ponadto na potencjalne dermoprotekcyjne właściwości wyciągów uzyskanych z *E. angustifolium* objawiające się zwiększeniem przeżywalności komórek w obecności ww. stresora [Ruszová i wsp., 2013].

Kolejnym z nurtów badań nad skutecznością fitoterapii BPH były prace zmierzające do oszacowania właściwości antyoksydacyjnych wyciągów otrzymywanych z przedstawicieli rodzaju *Epilobium*. Jak dotąd w tej materii przeanalizowano, w warunkach *in vitro*, głównie ekstrakty otrzymane z *Epilobium parviflorum* i *E. angustifolium*, w ostatnim czasie również *E. tetragonum*, *E. roseum* i *E. montanum*. Arredondo i wsp. w eksperymencie na komórkach linii komórek PC12 wykazali, iż napar z części nadziemnych *Epilobium parviflorum* o stężeniu w zakresie 12,5 – 200 µg surowca/ml charakteryzował się silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi (zmiatającymi rodnik ABTS•- (kwas 2,2'-azynobis-(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)) bez widocznego efektu cytoprotekcyjnego. Zidentyfikowana w naparze mirycetyna oraz jej glikozydowe postacie, a także kwercetyna i kemferol, gdy były podawane osobno do komórek w stężeniu 100 µg/ml również wykazały ww. właściwości [Arredondo i wsp., 2004]. Przebadano także właściwości zmiatające (redukujące) rodnik hydroksylowy (HO•) pod wpływem suchego wodnego i etanolowego (o stężeniu 4mg/ml) wyciągu ww. surowca. Obie formy wyciągów w 80% zredukowały ilość rodnika hydroksylowego (HO•) [Steenkamp i wsp., 2006]. W przypadku *E. angustifolium* wykazano w warunkach *in vitro*, iż komercyjnie dostępne wodne ekstrakty z tego surowca wykazują również właściwości antyoksydacyjne objawiające się redukcją jonów żelaza (III), zmiataniem wolnych rodników 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazylowych, hamowaniem degradacji fosfolipidów i 2-deoksy-D-rybozy indukowanej obecnością rodników hydroksylowych [Shikov i wsp., 2006]. Na podstawie uzyskanych wyników badacze zaproponowali, iż za owe właściwości odpowiedzialne mogą być zidentyfikowane w ww. wyciągach polarne związki fenolowe, m. in. hydroksylowane pochodne kwasu benzoowego i flawonoidy. W innych badaniach ekstrakty z liści (w szczególności) oraz łodygi i korzeni *E. angustifolium* wykazywały *in vitro* aktywności antyoksydacyjne objawiające się redukcją ilości malonyldialdehydu, zredukowanej postaci glutationu oraz wolnych rodników

O₂•⁻, OH• [Stajner i wsp., 2007]. Badania Hevesi i wsp. również potwierdziły zdolność wyciągu wodnego z *E. angustifolium* do hamowania *in vitro* aktywności cyklooksygenazy [Hevesi i wsp., 2009]. W komórkach ludzkich fibroblastów 70% metanolowy wyciąg z *E. angustifolium* (w stężeniach w zakresie 10, 20, 30, 40 and 50 µg/mL) obniżał ilość wolnych rodników, w sposób zależny od dawki hamował również w modelu liposomalnym proces peroksydacji lipidów ((IC₅₀ = 2.37±0.12 mg/ml) [Hevesi i wsp., 2009]. W dalszych badaniach zespół Hevesi i wsp. potwierdził zdolność do zmiatania rodników ABTS•⁻ przez 70% metanolowe ekstrakty (w ww. stężeniach) otrzymane z pięciu gatunków roślin (*Epilobium angustifolium*, a także *E. angustifolium*, *E. roseum*, *E. tetragonum* i *E. montanum*). Podjęto nawet próbę przypisania antyoksydacyjnych właściwości konkretnym zidentyfikowanym związkom [Hevesi i wsp., 2009].

Przeprowadzono również randomizowane, kontrolowane placebo badanie kliniczne z podwójnie zaślepioną próbą trwające przez okres od 1 do 3 miesięcy, w którym poddano ocenie skuteczności działania preparatu komercyjnego ProstateEZEMax w postaci kapsułek, w skład których wchodził m.in. ekstrakt z *Epilobium parviflorum* (odpowiadający 500 mg suchego ziela), a także olej z nasion *Cucurbita pepo* (160 mg), likopen (2,1 mg), wyciąg z *Pygeum africanum* (odpowiadający 15 g suchej łodygi, standaryzowany na β-sitosterol) oraz ekstrakt z *Serenoa repens* (odpowiadający 660 mg suchego liścia). Obserwowano między innymi znacząca, statystycznie istotną redukcję nasilenia objawów LUTS (ocenianych na podstawie kwestionariusza IPSS), redukcję częstotliwości dobowego oddawania moczu u pacjentów ze zdiagnozowanym BPH. Wyjaśnienie czy obserwowane efekty mogły być spowodowane obecnością ekstraktu z *E. parviflorum* pozostaje kwestią wymagającą dalszych badań [Coulson i wsp., 2013].

2. CELE PRACY

Celem pracy była ocena wybranych właściwości biologicznych i farmakologicznych oraz poznanie molekularnego mechanizmu działania ekstraktu wodnego z zieleń wierzbowicy wąskolistnej (*Epilobium angustifolium*) oraz lipidowo-sterolowego ekstraktu z owoców palmy sabalowej (*Serenoa repens*) w szczurzym modelu rozrostu prostaty u szczurów indukowanych testosteronem.

Do określenia właściwości biologicznych i farmakologicznych postanowiono wykonać następujące badania:

- 1) ocenę *in vivo* działania przeciwzapalnego;
- 2) ocenę właściwości hamujących diurezę (oszacowanie zmian objętości i częstotliwości oddawania moczu u szczurów) ekstraktu zieleń *Epilobium angustifolium*;
- 3) dokonanie pomiaru zmian mas prostat (oraz ich płatów brzusznych i grzbietowych) u zwierząt indukowanych testosteronem oraz nie poddanych indukcji hormonalnej, pod wpływem badanych wyciągów z *E. angustifolium* oraz *S. Repens*, a także referencyjnego leku syntetycznego – finasterydu.

Próbie poznania molekularnego mechanizmu działania ekstraktów roślinnych postanowiono zrealizować poprzez ocenę zmian:

- 1) w poziomie transkrypcji mRNA genów kandydujących do rozwoju tego schorzenia w gruczole krokowym szczura, tj. 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1), 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2), aromatazy (CYP19), receptora androgenowego (AR), receptora estrogenowego α (ER α) oraz receptora estrogenowego β (ER β), a także genów genomowego (genów kodujących białka p68 i Arip4) oraz niegenomowego (genów kodujących kinazy RafA, Mapk1, Mapk3) szlaku sygnalizacji białek wewnątrzkomórkowych zależnych od androgenów;
- 2) w stężeniach wybranych hormonów steroidowych (testosteronu (T), dihydrotestosteronu (DHT) oraz β -estradiolu (E2) w osoczu zwierząt doświadczalnych.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. Materiały

3.1.1. Odczynniki, bufor, roztwory

3.1.1.1. Bufory

- bufor do nanoszenia próbek DNA: 30% glicerol, 0, 25% barwnika Bromophenol blue
- bufor TBE 10 x stężony: 88 mM TRIS, 89 mM kwas borowy, 2 mM EDTA
- roztwór soli fizjologicznej - skład roztworu na 1000 ml: 0,351 g NaCl, 3ml środka zmniejszającego napięcie powierzchniowe („Desprej” - płyn do dezynfekcji małych powierzchni), woda destylowana

3.1.1.2. Odczynniki i roztwory

Preparaty:

- finasteryd (Proscar, tabl. 5 mg, Merck Sharp & Dohme, Niemcy)
- Testosteronum prolongatum (100 mg/ml, Jelfa)
- indometacyna (Metindol, inj. 0.06 g/2ml amp., Pliva Kraków, Polska)
- heksanowy lipidosterolowy wyciąg z owoców *Serenoa repens* (Fitoprost, Hasco-Lek)

Odczynniki:

- agaroz (ABO, Fermentas, Litwa)
- alkohol etylowy 75% (POCh, Polska)
- bromek etydy -10mg/ml (Sigma, USA)
- chloroform (Sigma, USA)
- DEPC (ang. diethylpyrocarbonate) (Sigma, USA)
- Dimetylosulotlenek - DMSO (Sigma, USA)
- EDTA (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) (Sigma, USA)
- izopropanol (Sigma, USA)
- karagenina (Carrageenan, Sigma- Aldrich, USA)
- kwas borowy (Sigma, USA)
- marker wielkości KBL (1kb DNA Ladder, Fermentas, Litwa)
- odczynnik TriPure Isolation Reagent (Roche Diagnostic, Niemcy)
- olej arachidowy rafinowany farmaceutyczny I
- polietylenoglikol - PEG 400 (Sigma, USA)
- TRIS (ang. trihydroxyaminmethane) base (Sigma, USA)
- zestaw (kit) Fast Start DNA Master Sybr Green I (Roche Diagnostic, Niemcy)
- zestaw (kit) Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostic, Niemcy)

3.1.2. Urządzenia laboratoryjne i aparatura badawcza

- amplifikator DNA z detekcją fluorescencji w czasie rzeczywistym LightCycler (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)
- czytnik mikroplótek Sunrise (Tecan, Austria)
- homogenizator tkankowy Power Gen 125 (Fisherbrand, Fisher Scientific, USA)
- komora do elektroforezy poziomej (BioRad, USA)
- komora laminarna Heraeus Herasafe KS (Kendro, Niemcy)
- komora PCR UV-CLEANER UVC/T-M-AR (Biosan, USA)
- komputerowy system wizualizacji i analizy obrazu UV: UVI-KS4000/Image PC (System Biotech Molecular Biology Instruments, USA)
- kuchenka mikrofalowa Electrolux EMS 2840 (Electrolux, Szwecja)
- lodówka ERE 3000 (Electrolux, Szwecja)
- pipety z nastawialną objętością (Eppendorf, USA)
- pipety z nastawialną objętością (Labmate, Wielka Brytania)
- pletyzmometr (UGO BASILE, Włochy)
- spektrofotometr BioPhotometer (Eppendorf, USA)
- termocykler PTC 200 (MJ Research, USA)
- termomikser Compact (Eppendorf, USA)
- waga elektroniczna WPE 600 (Radwag, Polska)
- wirówka Centrifuge 5415D/R (Eppendorf, USA)
- wirówka MiniSpin (Eppendorf, USA)
- wytrząsarka WL-1 (Biomix, Polska)
- wytwornica lodu płatkowego iShin IF 300-150 (Biocom, USA)
- zamrażarka EUC -2100 (Electrolux, Szwecja)
- zamrażarka niskotemperaturowa Joun VXE 380 (Kendromed, Polska)

3.2. Metodyka badań

3.2.1. Zakup zwierząt, kwarantanna

Zwierzęta, samce szczurów rasy Wistar o masie ciała 230 - 350 g w wieku 4 tygodni, zakupiono w Hodowli Zwierząt Laboratoryjnych w Brwinowie. Przechowywano je w osobnych klatkach z tworzywa sztucznego, w pomieszczeniu o wilgotności powietrza 65 – 75%, temperaturze 20 ± 2 °C ze swobodnym dostępem do wody przez cały okres czasu trwania doświadczenia i standardowej paszy laboratoryjnej (peletki, Labofeed B, Wytwórnia pasz

„Morawski”, Kcynia, Polska, ISO 22000).

Doświadczenie farmakologiczne wykonano we współpracy z Katedrą i Zakładem Farmakologii Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Obejmowało ono kastrację, podanie zwierzętom odpowiednich wyciągów, substancji czynnych, ich dekapitację, wypreparowanie i zabezpieczenie szczurzych prostat oraz pobranie krwi zwierzęcej, pomiar objętości i częstości oddawanego moczu oraz właściwości przeciwzapalnych suchego wyciągu wodnego z ziela *Epilobium angustifolium*.

Badania na zwierzętach przeprowadzone zostały zgodnie z ustawą o ochronie zwierząt z dnia 21 stycznia 2005 r. (Dz.Ust. nr 33 poz. 289, z dnia 24 lutego 2005). Uzyskano ponadto zgodę na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w Katedrze i Zakładzie Farmakologii Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (numer zgody Lokalnej Komisji Etycznej Do Spraw Doświadczeń Na Zwierzętach: 03/2008).

3.2.2. Otrzymanie i charakterystyka wyciągu z *Epilobium angustifolium*

Suchy wyciąg wodny z ziela *Epilobium angustifolium* przygotowano na zlecenie w Zakładzie Analityczno – Kontrolnym (później - Zakład Badania Jakości Produktów Leczniczych i Suplementów Diety) w Instytucie Włókien Naturalny i Roślin Zielarskich (poprzednio Instytut Roślin i Przetworów Zielarskich).

3.2.2.1. Uzyskanie surowca zielarskiego, ustalenie tożsamości

Materiał roślinny *Epilobium angustifolium* zebrano w okresie kwitnienia z upraw próbnych z terenu ogrodu roślin leczniczych Instytutu Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich. W ramach działalności statutowej Instytutu (projekt nr 3/P05F00425) wykonano wstępną ocenę zawartości substancji czynnych dla ujednoliconego surowca, która wynosiła odpowiednio:

- dla flawonoglikozydów w przeliczeniu na kwercetynę [%] – 0,44
- dla związków fenolowych w przeliczeniu na kwas galusowy [%] – 9,39
- dla tanin w przeliczeniu na pirogallol [%] – 4,03
- dla steroli w przeliczeniu na β -sitosterol [%] – 0,18.

3.2.2.2. Sporządzenie wyciągu z *Epilobium angustifolium*

Do 100 g sproszkowanego surowca dodano 1000 ml wody i ogrzewano pod chłodnicą zwrotną w temperaturze 90 - 95°C przez 8 godzin, a następnie pozostawiono do dnia następnego.

Sączono pod zmniejszonym ciśnieniem, a następnie liofilizowano. Otrzymano 22 g suchego wyciągu wodnego, a wyniki oznaczeń przedstawiono poniżej:

- postać: proszek
- barwa : żółto-beżowa
- strata masy po suszeniu [%] - 3,4
- zawartość flawonoidów w przeliczeniu na kwercetynę [%] - 0,91
- zawartości związków fenolowych w przeliczeniu na kwas galusowy [%] - 24,36
- zawartość fitosteroli w przeliczeniu na beta-sitosterol [%] - 0,09
- zawartość tanin w przeliczeniu na pirogallol [%] - 0,01.

3.2.3. Ocena *in vivo* właściwości przeciwzapalnych wyciągu z *Epilobium angustifolium*

Oszacowanie przeciwzapalnego efektu badanego ekstraktu z zieleń *Epilobium angustifolium* dokonano przy zastosowaniu pletyzmometru (Ugo Basile, Włochy) wg. Choudhary i wsp., 2005 [Choudhary i wsp., 2005]. Przed przeprowadzeniem doświadczenia sporządzono płyn elektrolitowy (roztwór chlorku I-wartościowego metalu alkalicznego o stężeniu ok.6 mmol/l; skład roztworu na 1000 ml: 0,351 g NaCl, 3ml środka zmniejszającego napięcie powierzchniowe („Desprej” - płyn do dezynfekcji małych powierzchni, woda destylowana).

Przebieg doświadczenia opisano poniżej:

Łapę każdego szczura zanurzano na taką samą, wcześniej ustaloną, głębokość w komorze pomiarowej; po 4 sekundach odczytywano wynik. Ilość płynu w komorze uzupełniano do poziomu zerowego po każdym pomiarze. Aby zapobiec zanieczyszczeniu płynu elektrolitowego w komorze pomiarowej, łapy szczura były przed pomiarem oczyszczane.

Stan zapalny wywoływano poprzez wstrzyknięcie do podszwy lewej łapy 1% roztworu karageniny w dawce 2000 µg [Hiermann i wsp., 1986, Okulicz-Kozaryn i wsp., 2004, Kędzia i wsp., 2007]. Do prawej łapy wstrzykiwano tę samą objętości soli fizjologicznej [Okulicz-Kozaryn i wsp., 2004]. Ekstrakt podawano w dawce 100 mg/kg m.c. (p.o.) (1/20 dawki toksycznej granicznej) podawano bezpośrednio po podaniu karageniny [Hiermann i wsp., 1986].

Do badań porównawczych użyto indometacynę (Metindol, inj, 0.06g/2ml amp., Pliva Kraków, Polska) jako leku referencyjnego o działaniu przeciwzapalnym podawanego w dawce 10 mg/kg; s.c. (bezpośrednio po podaniu karageniny).

Po okresie 1.5 i 3.0 h od podania ekstraktu i leku referencyjnego przeprowadzono pomiar działania przeciwzapalnego. W trakcie wszystkich pomiarów ograniczono do minimum czynniki mogące negatywnie wpływać na uzyskane wyniki (hałas, obecność osób postronnych, obecność innych zwierząt).

W opracowaniu wyników użyto wzoru wyrażającego różnicę w zmianach objętości prawej i lewej tylnej łapy po wywołaniu stanu zapalnego:

$$G = (L_t - L_o) - (P_t - P_o),$$

G - wartość wyrażająca różnicę w zmianach objętości prawej (P_t) i lewej (L_t) tylnej łapy po 1.5h lub 3h od wywołania stanu zapalnego w porównaniu z wartościami wyjściowymi

L_o - objętość wyjściowa lewej tylnej łapy

P_o - objętość wyjściowa prawej tylnej łapy.

3.2.4. Ocena właściwości przeciwdiuretycznych ekstraktu z *Epilobium angustifolium*

3.2.4.1. Dane eksperymentalne

Zwierzęta przeznaczone w wieku 4 tygodni poddano zabiegowi kastracji obustronnej w znieczuleniu ogólnym z zastosowaniem tiopentalu (40 mg/kg i.p.) przed przeprowadzeniem właściwego doświadczenia. Przerost gruczołu krokowego wywołano podawaniem testosteronu. Zwierzęta podzielono na 5 grup o liczebności 10 osobników.

Grupę kontrolną stanowiły szczury, którym podskórnie (s.c.) podawano równoważną objętość vehiculum (tj. równoważną objętość kwasu arachidowego (olej arachidowy rafinowany farmaceutyczny I) rozpuszczony w wodzie + PEG 400 1:1 (p.o.).

Kolejnym grupom zwierząt podawano sondą dożołądkową (p.o.) wyciąg rośliny, referencyjna substancje czynną – finasteryd, według następującego schematu:

- suchy wyciąg wodny z ziela *Epilobium angustifolium* rozpuszczonym w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.) w dawce 100 mg/kg m.c./dobę (1/20 dawki granicznej) przez 21 dni,
- testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1, p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg) [wg Kosowicz i wsp., 2004],
- testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1; p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg]) + wyciąg z ziela *Epilobium angustifolium* (rozpuszczony w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.); 100 mg/kg m.c./21 dni),
- testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1; p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg]) + finasteryd (50 mg/kg m.c., 7x co 3 dni, po zawieszeniu w mieszaninie DMSO-PEG300 (2 : 8); p.o.) [wg Verleye i wsp., 2005],

Przedstawione dane usystematyzowano w tabelach 7 i 8 poniżej.

Tab. 7. Schemat dawkowania wyciągu z *Epilobium angustifolium* oraz substancji syntetycznych.

Wyciąg / substancja czynna	Dawka i okres podawania zwierzętom
wyciąg wodny z ziela <i>Epilobium angustifolium</i>	100 mg/kg m.c., raz dziennie przez 21 dni
finasteryd (Proscar, tabl. 5 mg, Merck Sharp & Dohme)	50 mg/kg m.c., 7 razy, co 3 dzień
testosteron (testosteronum prolongatum, 100 mg/ml, Jelfa)	40 mg/kg m.c. 3 razy co 7 dzień

Tab. 8. Schemat dawkowania vehiculum, wyciągu z *Epilobium angustifolium*, finasterydu z podziałem na grupy.

Grupa zwierząt	Podawane wyciągi roślinne i substancje chemiczne
K (kontrola)	Olej arachidowy (podskórnie) + woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
E	wodny ekstrakt <i>Epilobium angustifolium</i> rozpuszczony w roztworze: woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
T	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
TE	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + wodny ekstrakt <i>Epilobium angustifolium</i> rozpuszczony w roztworze: woda + PEG 400 1:1 (dozależkowo)
TF	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + finasteryd (Proscar) w DMSO + PEG 300 1:4 (p.o.)

K – grupa zwierząt kontrolnych; E – szczury nieindukowane hormonalnie, otrzymujące ekstrakt z ziela *Epilobium angustifolium*; T – szczury indukowane testosteronem (kontrolne); TE – szczury otrzymujące testosteron wraz z ekstraktem z ziela *E. angustifolium*; TF - szczury otrzymujące testosteron wraz z lekiem syntetycznym – finasterydem.

3.2.4.2. Oszacowanie zmian ilości oraz częstotliwości oddawanego moczu

Zbiórkę moczu oraz badanie częstotliwości jego oddawania przeprowadzono w 20 - dniu doświadczenia po uprzednim obciążeniu zwierząt wodą (2.5 ml/100 g m.c.; p.o.) i umieszczeniu szczurów pojedynczo w klatkach metabolicznych na okres 6 godzin [Choo i wsp., 2000]. Ocenę zmian w częstości oddawanego moczu i jego objętości dokonano we wszystkich grupach zwierząt wg danych zamieszczonych w Tab. 8.

3.2.6. Ocena *in vivo* właściwości antyproliferacyjnych wyciągów z *Epilobium angustifolium* i *Serenoa repens*

3.2.6.1. Schemat doświadczenia

Zwierzęta przeznaczone do kastracji w wieku 4 tygodni poddano zabiegowi przed przeprowadzeniem właściwego doświadczenia. Przerost gruczołu krokowego wywołano podawaniem testosteronu. Zwierzęta podzielono na grupy o liczebności 10 szczurów.

Dwie grupy stanowiły grupy kontrolne zwierząt, którym podskórnie (s.c.) podawano równoważną objętość vehiculum (tj. równoważną objętość kwasu arachidowego (olej arachidowy rafinowany farmaceutyczny I) rozpuszczony odpowiednio w DMSO+PEG 300 1:4 (s.c.) (grupa K1) lub w wodzie + PEG 400 1:1 (p.o.) (grupa K2).

Kolejnym grupom zwierząt podawano sondą dożołądkową (p.o.) wyciągi roślinne i substancje syntetyczne według następującego schematu:

- testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1, p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg) [wg Kosowicz i wsp., 2004],
- testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1; p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg]) + wyciąg z zieleń *Epilobium angustifolium* (rozpuszczony w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.); 100 mg/kg m.c./21 dni),
- testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1; p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg]) + finasteryd (50 mg/kg m.c., po zawieszeniu w mieszaninie DMSO-PEG300 (2 : 8) , 7x co 3 dni; p.o.) [wg Verleye i wsp., 2005],
- testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1; p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg]) + wyciąg z owoców *Serenoa repens* (rozpuszczonym w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.); 100 mg/kg m.c./ 21 dni [wg Mitropoulos i wsp., 2002],

Przedstawione dane usystematyzowano w tabelach 9 i 10 poniżej.

Tab. 9. Podział na grupy w doświadczeniu nad oceną właściwości antyproliferacyjnych.

Grupa zwierząt	Podawane wyciągi roślinne i substancje chemiczne
K1 (kontrola 1)	Olej arachidowy (s.c.) + DMSO+PEG 300 1:4 (s.c.)
K2 (kontrola 2)	Olej arachidowy (s.c.) + Woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
T	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
TE	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + wodny ekstrakt <i>Epilobium angustifolium</i> rozpuszczony w roztworze: woda + PEG 400 1:1 (dożołądkowo)
TF	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + finasteryd (Proscar) w DMSO + PEG 300 1:4 (p.o.)
TS	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + heksanowy ekstrakt <i>Serenoa repens</i> (Fitoprost) rozpuszczony w roztworze woda + PEG 400 1:1 (p.o.)

K1, K2 – grupy zwierząt kontrolnych; T – szczury indukowane testosteronem; TE – szczury otrzymujące testosteron wraz z ekstraktem z zieleń *Epilobium angustifolium*; TS – zwierzęta otrzymujące testosteron wraz z komercyjnym wyciągiem z owoców *Serenoa repens* (Fitoprost); TF - zwierzęta otrzymujące testosteron wraz z lekiem syntetycznym – finasterydem.

Tab. 10. Zestawienie dawkowania oraz okresu podawania zwierzętom badanych wyciągów oraz substancji syntetycznych w doświadczeniu nad oceną właściwości antyproliferacyjnych.

Wyciąg / substancja czynna	Dawka i okres podawania zwierzętom
wyciąg wodny z ziela <i>Epilobium angustifolium</i>	100 mg/kg m.c., raz dziennie przez 21 dni
finasteryd (Proscar, tabl. 5 mg, Merck Sharp & Dohme)	50 mg/kg m.c., 7 razy, co 3 dzień
testosteron (testosteronum prolongatum, 100 mg/ml, Jelfa)	40 mg/kg m.c. 3 razy co 7 dzień
heksanowy ekstrakt <i>Serenoa repens</i> (<i>Fitoprost</i>)	100 mg/kg m.c. raz dziennie przez 21 dni

3.2.6.2. Pobieranie tkanki zwierzęcej

Po 21 dniach podawania substancji i ekstraktów roślinnych zwierzęta poddano dekapitacji, po czym pobrano prostaty (które podzielono niezwłocznie na część brzuszną i grzbietową) oraz krew obwodową. Szczurze prostaty oraz ich płyty poszczególnych osobników bezzwłocznie zważono i zamrożono w oparach ciekłego azotu, a krew posłużyła do analiz immunoenzymatycznych. W doświadczeniu użyto krew pobraną od zwierząt na tzw. „skrzep” w ilości 5-7 ml, tj. bezpośrednio pobraną od zwierząt w dniu dekapitacji, odstawioną na ok. 1 godzinę do skrzepnięcia, a następnie odwirowaną w 4000 obr/min przez 10 minut.

3.2.6.3. Oszacowanie wpływu wyciągów z *Epilobium angustifolium angustifolium* i *Serenoa repens* na poziom hormonów w osoczu badanych zwierząt

Ocenę zmian stężeń wolnego testosteronu, dihydrotestosteronu i estradiolu w surowicy badanych zwierząt dokonano metodą immunoenzymatyczną ELISA z użyciem komercyjnych zestawów (kitów) firmy Alpha Diagnostic International (Alpha Diagnostic International, Wielka Brytania).

Oznaczenie stężenia wolnego testosteronu przeprowadzono z zastosowaniem kitu Testosterone ELISA Kit, Cat. No. 1880 (instrukcja producenta zawierająca opis zawartości kitu oraz przebiegu oznaczenia - nr M-1880) o dolnej granicy oznaczalności 0,022 mg/ml.

Oznaczenie stężenia wolnego testosteronu przeprowadzono z zastosowaniem kitu Dihydrotestosterone (DHT) ELISA Kit, Cat. No. 1940 (instrukcja producenta zawierająca opis zawartości kitu oraz przebiegu oznaczenia - nr M-1940) o dolnej granicy oznaczalności 10 pg/ml.

Oznaczenie stężenia wolnego estradiolu przeprowadzono z zastosowaniem kitu Estradiol ELISA Kit, Cat. No. 1920 (instrukcja producenta zawierająca opis zawartości kitu oraz przebiegu oznaczenia - nr M-1920) o dolnej granicy oznaczalności 10 pg/ml.

Detekcję hormonów przeprowadzono przy pomocy czytnika mikroplitek SUNRISE-BASIC firmy Tecan umożliwiającego odczyt absorbancji, obsługiwanym przez oprogramowanie Magellan ver.

1.6, dopasowaniem krzywej stężeń według wartości wzorcowych oraz wyliczenia bezwzględnych ilości mierzonych substancji w poszczególnych próbkach. Pomiar dokonywano przy długości fali 450 nm.

3.2.6.4. Ocena wpływu wyciągów z *E. angustifolium* i *Serenoa repens* na ekspresję wybranych genów metabolizmu androgenów i estrogenów

3.2.6.4.1. Izolacja RNA i analiza zmian poziomu transkryptów

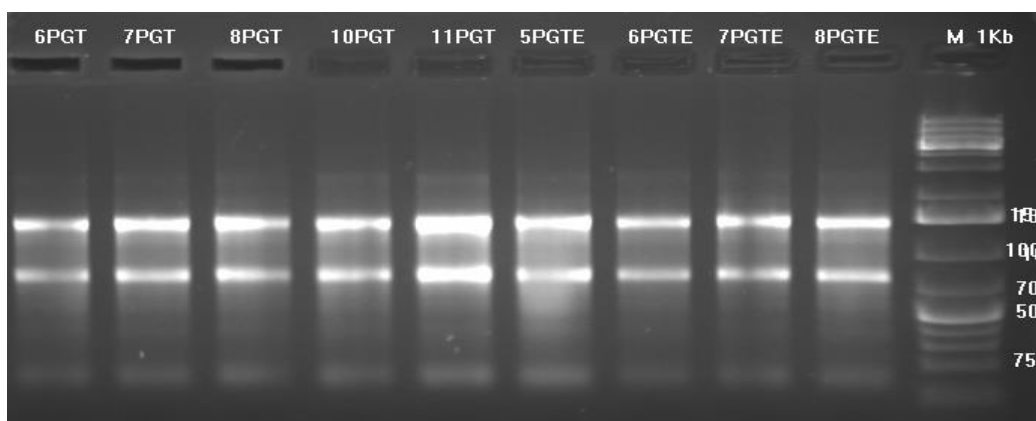
3.2.6.4.1.1. Izolacja całkowitego RNA z pobranego materiału biologicznego

Izolacja całkowitego RNA z płatów brzusznych i grzbietowych szczurzych prostat przeprowadzona została przy użyciu odczynnika TriPure Isolation Reagent (Roche) zgodnie z instrukcją nr udostępnioną przez producenta. W celu izolacji RNA wykorzystano fragmenty tkanek pozyskanych po dekapitacji zwierząt. Skrócony opis metodyki izolacji RNA z tkanek przedstawiono poniżej.

Pobraną materiał przeniesiono do płytkowych probówek o objętości ok. 15 ml umieszczonych na lodzie, po czym zalano je 1ml odczynnika TriPure Isolation Reagent i homogenizowano mechanicznie homogenizatorem. Następnie homogenat przeniesiono „tipsem” do probówek eppendorf, dodano 200 µl chloroformu i intensywnie wytrząsano, po czym wirowano w warunkach 12 000 x g, 4°C przez okres 15 min. Następnie zebrano górną fazę, w której znajdował się RNA, przeniesiono do świeżej probówki i podano do niej izopropanol w stosunku objętościowym 1:1. Zawartość probówek zmieszano i umieszczono na okres 30 min. w temperaturze -80°C. Po rozmrożeniu probówki z zawartością poddano wirowaniu w warunkach 12 000 x g, 4°C przez 10 min. W dalszym etapie usunięto nadsącz, a osad RNA jednokrotnie płukano w 1 ml 75% etanolu przygotowanego z użyciem wody dejonizowanej i autoklawowanej w obecności DEPC, mieszano i pozostawiano na lodzie w celu kilku minut inkubacji. Próby wirowano przez okres 5 min., w warunkach 7500 x g, 4°C, po czym usunięto etanol pod komorą laminarną, gdzie pozostawiono próby RNA w celu ich wysuszenia na okres 15 min. Po tym czasie do probówek podano 100 µl. wody wolnej od RNaz i w celu pełnego rozpuszczenia RNA probówki umieszczono w termobloku w temperaturze 65°C na czas 5 min. Po upływie inkubacji probówki z zawartością zworteksowano i zwirowano, po czym niezwłocznie umieszczono w warunkach głębokiego mrożenia, tj. w temperaturze -80°C do czasu przeprowadzenia ilościowych reakcji PCR.

3.2.6.4.1.2. Elektroforetyczne sprawdzenie wydajności izolacji całkowitego RNA z pobranego materiału tkankowego

Dokonano selektywnej spektrofotometrycznej oceny czystości i jakości wyizolowanego RNA z wybranych próbek z każdej z analizowanych grup, którą wykonywano z użyciem aparatu BioPhotometer (Eppendorf) w następującym układzie objętościowym: 2 µl próby RNA : 98 µl H₂O. Jakość wyizolowanego RNA oceniano również za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 0,8% żelu agarozowym [Ryc. 8].



Ryc. 8. Typowy rozdział elektroforetyczny wyizolowanego RNA wybranych prób pochodzących z płata grzbietowego szczurzych prostat w 0,8% żelu agarozowym.

Tory oznaczone symbolem PGT o numerach kolejno 6, 7, 8, 10, 11 – próby z płata grzbietowego prostat zwierząt otrzymujących sam testosteron

Tory oznaczone symbolem PGTE o numerach kolejno 6, 7, 8 – próby z płata grzbietowego prostat zwierząt indukowanych testosteronem otrzymujących ekstrakt z *Epilobium angustifolium*.

Do kalibracji spektrofotometru wykorzystano 100 µl. H₂O. Odczyt przeprowadzano przy trzech długościach fali:

260nm – maksimum absorpcji dla RNA

280nm – maksimum absorpcji dla białek

320nm – absorpcja dla drobin komórkowych (tzw. tło)

Do obliczeń posłużono się wartościami OD₂₆₀ i OD₂₈₀ po odjęciu wartości tła (OD₃₂₀).

Przyjmuje się, że wartość OD₂₆₀ (gęstość optyczna, ang. *optical density*) równa jest 1 dla dsDNA o stężeniu 50µg/ml., ssDNA o stężeniu 33µg/ml. oraz dla RNA o stężeniu 40µg/ml.

W związku z tym stężenie kwasów nukleinowych obliczano według podanego poniżej wzoru:

$$\text{Stężenie RNA } [\mu\text{g/ml.}] = \text{OD}_{260} \cdot 40 \cdot R$$

gdzie:

R – krotność rozcieńczenia.

Uzyskane preparaty posłużyły do syntezy cDNA z użyciem starterów oligo-dT w reakcji odwrotnej transkrypcji.

3.2.6.4.1.3. Reakcje odwrotnej transkrypcji

Reakcje odwrotnej transkrypcji (przepisania puli wyizolowanych mRNA na cDNA) prób RNA, pochodzących z płatów brzuszego i grzbietowego szczurzych prostat, prowadzono przy użyciu zestawu komercyjnego Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostic) zgodnie z zaleceniami producenta [Tab. 11]. Do reakcji brano 1µg całkowitej puli RNA. Dla oszacowania zmian w poziomie ekspresji badanych genów niezbędne było zaprojektowanie starterów specyficznych dla oznaczanego genu i komplementarnych do fragmentu kodującego oraz zoptymalizowanie warunków specyficznej syntezy produktów.

Tab. 11. Rodzaje składników mieszaniny reakcyjnej, ich stężenia oraz profil termiczny prowadzonych reakcji odwrotnej transkrypcji.

Substancja	Jednostka /wartość wyjściowa/	Jednostka /wartość końcowa/	Objętość w mieszaninie reakcyjnej [µl]
RNA			obj. odpowiadająca 1µg RNA
Oligo {dT}	50µM	2,5µM	1
H ₂ O	do 13µl		
Inkubacja 10', 65°C			
RT buffer	5x	1x [8mM Mg]	4
RNase Inhibitor	40U/µl	20U	0,5
dNTP	10mM	1mM	2
Reverse Transcriptase	20U	10U	0,5
Obj. końcowa 20µl			
Inkubacja: 30', 55°C mu10', 85°C do ochłodzenia, 4°C			

3.2.6.4.1.4. Ilościowa łańcuchowa reakcja polimerazy z detekcją w czasie rzeczywistym

Reakcje ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative real-time PCR*, qRT-PCR; qPCR) prowadzono w szklanych kapilarach, w końcowej objętości 10 µl, z wykorzystaniem cDNA pozyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji, specyficznych par starterów oraz kitu Fast Start DNA Master Sybr Green I (Roche). Po rozpipetowaniu reagentów kapilary zabezpieczone od zewnątrz przed wyparowaniem umieszczono w termocyklerze LightCycler w celu przeprowadzenia reakcji real-time PCR (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Oprogramowanie LightCycler3 Run Version 5.32 i LightCycler Data Analysis Version 3.5.28 pozwoliło na wygenerowanie krzywych standardowych, śledzenie bezpośrednie postępu prowadzonych reakcji, analizowanie uzyskanych wyników oraz porównanie względnych różnic ilości początkowej matrycy. Reakcję dla badanych genów prowadzono w stężeniach przedstawionych poniżej. Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **5α-reduktazy 1** (SRD5AR1):

- 6,7 µl wody wolnej od RNaz
- 0,8 µl MgCl₂ (stężenie końcowe 3 mM)
- 0,25 µl starter Forward (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 0,25 µl starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 1 µl Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 µl cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **5α-reduktazy 2** (SRD5AR2):

- 6,3 µl wody wolnej od RNaz
- 1,2 µl MgCl₂ (stężenie końcowe 4 mM)
- 0,25 µl starter Forward (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 0,25 µl starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 1 µl Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 µl cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **receptora androgenowego** (AR):

- 5,9 µl wody wolnej od RNaz
- 1,6 µl MgCl₂ (stężenie końcowe 5 mM)
- 0,25 µl starter Forward (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 0,25 µl starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 1 µl Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 µl cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **receptora estrogenowego α** (ERα = ER1):

- 6,7 µl wody wolnej od RNaz
- 0,8 µl MgCl₂ (stężenie końcowe 3 mM)
- 0,25 µl starter Forward (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 0,25 µl starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 1 µl Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 µl cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **receptora estrogenowego β** (ER β = ER2):

- 6,3 μ l wody wolnej od RNaz
- 1,2 μ l MgCl₂ (stężenie końcowe 4 mM)
- 0,25 μ l starter Forward (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 0,25 μ l starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 1 μ l Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 μ l cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **aromatazy** (CYP19):

- 7,1 μ l wody wolnej od RNaz
- 0,4 μ l MgCl₂ (stężenie końcowe 2 mM)
- 0,25 μ l starter Forward (stężenie końcowe 0,5 μ M)
- 0,25 μ l starter Reverse (stężenie końcowe 0,5 μ M)
- 1 μ l Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 μ l cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA **genu referencyjnego GAPDH** (ang. glicerylaldehyde-3-phosphate dehydrogenase - dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej):

- 5,9 μ l wody wolnej od RNaz
- 0,6 μ l MgCl₂ (stężenie końcowe 2,5 mM)
- 0,25 μ l starter Forward (stężenie końcowe 0,5 μ M)
- 0,25 μ l starter Reverse (stężenie końcowe 0,5 μ M)
- 1 μ l Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 μ l cDNA

Dla każdego z genów prowadzono z osobna reakcje łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym obejmującą następujące po sobie etapy o odmiennym profilu termicznym i czasie jego trwania, których warunki przedstawiono w tabeli poniżej.

Tab. 12. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla poszczególnych genów.

Gen	Liczba cykli	Warunki reakcji				
		Denaturacja wstępna	Denaturacja	Wiązanie starterów /annealing/	Synteza nici komplementarnej /elongacja/	Chłodzenie
GAPDH	30	95°C, 600s.	95°C, 4s.	56°C, 8s.	72°C, 8s.	40°C, 30s
SRD5AR1	55		95°C, 5s.	58°C, 6s.	72°C, 10s.	
SRD5AR2	55		95°C, 4s.	62°C, 4s.	72°C, 6s.	
AR	45		95°C, 12s.	65°C, 3s.	72°C, 3s.	
CYP19	50		95°C, 15s.	58°C, 5s.	72°C, 3s.	
ER α	50		95°C, 8s.	60°C, 3s.	72°C, 3s.	
ER β	45		95°C, 5s.	61°C, 3s.	72°C, 3s.	

Poszczególne reakcje prowadzono w odpowiedniej ilości cykli obejmujących kolejne etapy amplifikacji (denaturacji matrycy w temperaturze 95 °C, elongacji w specyficznej dla konkretnej pary starterów temperaturze, po czym następowała elongacja w stałej temperaturze 72 °C) [Tab. 10.]. Sekwencje użytych do reakcji primerów, wielkość amplikonu dla każdej z użytych par starterów zamieszczono w tabeli nr 13.

Tab. 13. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. GAPDH – gen dehydrogenaza gliceroaldehydofosforanowa.

Izoformy	Sekwencja startera Forward (5' → 3')	Sekwencja startera Reverse (5' → 3')	Wielkość produktu (pz)
SRD5AR1	TGGAGATTCAAGTCC	ATGAGGCTGTCTGTGATGTC	184
SRD5AR2	CAGGAGTTGCCTTCCTTTGTG	GTAAATAAATGTCCTGTGAAG	255
AR	GGCGCTTCTACCAGCTCA	GAATTGATGCAGCTCTCTTGC	223
ER α	TGGAGATTCAAGTCCCCAAA	GATGGGCTTATTGACCAACC	201
ER β	GAGGTGCTAATGGTGGGACT	CGAGGTCGGGAGCGAAA	238
CYP19	CCTTCCCTCTTCCCATCC	AACCTCCGCACATCCTTCC	278
GAPDH	GATGGTGAAGGTCGGTGTG	ATGAAGGGGTCGTTGATGG	108

Pobrany materiał biologiczny został właściwie zabezpieczony i odpowiednio oznaczony, co umożliwiło wykonanie ewentualnych powtórzeń analiz i zapobiegało przed popełnieniem błędu laboratoryjnego na pierwszych etapach badań. Z tkanki otrzymano wysokiej jakości RNA, a następnie zoptymalizowano procedurę odwrotnej transkrypcji z użyciem odpowiednich odczynników.

3.2.6.5. Ocena wpływu wyciągów z *E. angustifolium* i *Serenoa repens* na transkrypcję wybranych mRNA genów genomowej i niegenomowej drogi działania androgenów

3.2.6.5.1. Przebieg doświadczenia

Eksperyment na zwierzętach przeprowadzono w wieku 4 tygodni poddanych uprzednio zabiegowi kastracji obustronnej w znieczuleniu ogólnym z zastosowaniem tiopentalu (40 mg/kg

i.p.). Przerost gruczołu krokowego wywołano podawaniem testosteronu. Doświadczenie przeprowadzono na 10 grupy zwierząt o liczebności 10 szczurów, z czego 6 grup obejmowało zwierzęta wymienione w punkcie 3.2.6.1., które obejmowały one 2 grupy zwierząt kontrolnych (grupy K1, K2), 4 grupy indukowane testosteronem, tj. jedną grupę szczurów otrzymujących jedynie sam testosteron (grupa T) oraz 3 grupy zwierząt stymulowanych testosteronem, otrzymujących jednocześnie wyciąg z zioła *Epilobium angustifolium* (grupa TE) albo z owoców *Serenoa repens* (grupa TS), względnie syntetyczną substancję referencyjną – finasteryd (grupa TF). W celu lepszego zrozumienia molekularnego mechanizmu działania badanych ekstraktów doświadczenie uzupełniono o 4 kolejne grupy szczurów. Dwie z nich stanowiły szczury nieindukowane hormonalnie otrzymujące albo ekstrakt z *E. angustifolium* (grupa E), albo z *S. repens* (grupa S). Dwie kolejne obejmowały zwierzęta stymulowane hormonalnie, otrzymujące jednocześnie badane wyciągi roślinne, kolejno z *E. angustifolium*, jak i z *S. repens*, obie łącznie z finasterydem (odpowiednio grupy TFE i TFS).

Sumaryczny schemat doświadczenia z podziałem na poszczególne grupy przedstawiono poniżej:

- grupa K1 - Olej arachidowy (s.c.) + DMSO+PEG 300 1:4 (s.c.),
- grupa K2 - Olej arachidowy (podskórnice) + Woda + PEG 400 1:1 (p.o.),
- grupa E - suchy wyciąg wodny z zioła *Epilobium angustifolium* rozpuszczonym w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.) w dawce 100 mg/kg m.c./dobę przez 21 dni,
- grupa S - lipidosterolowy wyciągu z owoców *Serenoa repens* rozpuszczonym w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.) w dawce 100 mg/kg m.c./dobę przez 21 dni [wg Mitropoulos i wsp., 2002]
- grupa T - testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1, p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg) [wg Kosowicz i wsp., 2004],
- grupa TE - testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1; p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg) + wyciąg z zioła *Epilobium angustifolium* (rozpuszczony w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.); 100 mg/kg m.c./21 dni),
- grupa TFE - testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1; p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg) + wyciąg z zioła *Epilobium angustifolium* (rozpuszczony w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.); 100 mg/kg m.c./21 dni) + finasteryd (50 mg/kg m.c., 7x co 3 dni; p.o.) [wg Verleye i wsp., 2005],

- grupa TS - testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1; p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg]) + wyciąg z owoców *Serenoa repens* (rozpuszczonym w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.); 100 mg/kg m.c./ 21 dni,
- grupa TFS - testosteron ([Testosteronum prolongatum, 100 mg/ml w oleju arachidowym (s.c.)] + Woda + PEG 400 1:1; p.o., 3 - krotnie co 7 dni w dawce 40 mg/kg]) + wyciąg z owoców *Serenoa repens* (rozpuszczonym w roztworze wodnym + PEG 400 1:1 (p.o.); 100 mg/kg m.c./21 dni) + finasteryd (50 mg/kg m.c., 7x co 3 dni; p.o.) w DMSO.

Przedstawione dane usystematyzowano w tabelach 14 i 15.

Tab. 14. Podział na grupy w doświadczeniu nad wpływem wyciągów na transkrypcję wybranych mRNA genów genomowej i niegenomowej drogi działania androgenów.

Grupa zwierząt	Podawane wyciągi roślinne i substancje chemiczne
K1 (kontrola 1)	Olej arachidowy (s.c.) + DMSO+PEG 300 1:4 (s.c.)
K2 (kontrola 2)	Olej arachidowy (s.c.) + Woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
E	wodny ekstrakt <i>Epilobium angustifolium</i> rozpuszczony w roztworze: woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
S	heksanowy ekstrakt <i>Serenoa repens</i> (Fitoprost) rozpuszczony w roztworze woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
T	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
TE	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + wodny ekstrakt <i>Epilobium angustifolium</i> rozpuszczony w roztworze: woda + PEG 400 1:1 (dożłódkowo)
TF	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + finasteryd (Proscar) w DMSO + PEG 300 1:4 (p.o.)
TS	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + heksanowy ekstrakt <i>Serenoa repens</i> (Fitoprost) rozpuszczony w roztworze woda + PEG 400 1:1 (p.o.)
TFE	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + wodny ekstrakt <i>Epilobium angustifolium</i> rozpuszczony w roztworze: woda + PEG 400 1:1 (p.o.) + finasteryd (p.o.) w DMSO
TFS	Testosteronum prolongatum w oleju arachidowym (s.c.) + heksanowy ekstrakt <i>Serenoa repens</i> (Permixon) rozpuszczony w roztworze woda + PEG 400 1:1 (p.o.) + finasteryd (p.o.) w DMSO

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; E – szczury otrzymujące ekstrakt z ziela *Epilobium angustifolium*; S – szczury otrzymujące ekstrakt z owoców *Serenoa repens* (Fitoprost); T – szczury indukowane testosteronem; TE – szczury otrzymujące testosteron wraz z ekstraktem z ziela *E. angustifolium*; TS – zwierzęta otrzymujące testosteron wraz z komercyjnym wyciągiem z owoców *S. repens*; TF - zwierzęta otrzymujące testosteron wraz z lekiem syntetycznym – finasterydem; TFE - szczury indukowane testosteronem, otrzymujące ekstrakt z ziela *E. angustifolium* oraz finasteryd; TFS - szczury indukowane testosteronem, otrzymujące ekstrakt z *S. repens* oraz finasteryd

Tab. 15. Zestawienie dawkowania oraz okresu podawania zwierzętom badanych wyciągów oraz substancji syntetycznych w doświadczeniu nad wpływem wyciągów na transkrypcję wybranych mRNA genów genomowej i niegenomowej drogi działania androgenów.

.Wyciąg / substancja czynna	Dawka i okres podawania zwierzętom
wyciąg wodny z ziela <i>Epilobium angustifolium</i>	100 mg/kg m.c., raz dziennie przez 21 dni
wyciąg z owoców <i>Serenoa repens</i> (Fitoprost)	100 mg/kg m.c., raz dziennie przez 21 dni
finasteryd (Proscar)	50 mg/kg m.c., 7 razy, co 3 dzień
testosteron	40 mg/kg m.c. 3 razy co 7 dzień

3.2.6.5.2. Pobieranie szczurzych prostat

Po 21 dniach podawania substancji syntetycznych i roślinnych ekstraktów szczury poddano dekapitacji, po czym pobrano prostaty i niezwłocznie zważono, a następnie podzielono płaty brzuszny i grzbietowym, umieszczono tkanki w probówkach Eppendorf pojemności 1,5 ml i umieszczono w oparach ciekłego azotu do czasu izolacji całkowitego RNA.

3.2.6.5.3. Izolacja RNA

Izolacja całkowitego RNA z płatów brzusznych i grzbietowych szczurzych prostat przeprowadzona została przy użyciu odczynnika TriPure Isolation Reagent (Roche) zgodnie z instrukcją udostępnioną przez producenta. Poszczególne etapy izolacji RNA, oceny jakościowej i ilościowej wyizolowanej puli kwasów nukleinowych przebiegały w sposób zgodny z procedurą opisaną w punkcie 3.2.6.4.1.1.

3.2.6.5.4. Analiza zmian poziomu transkryptów genomowego i niegenomowego szlaku działania androgenów

Reakcje odwrotnej transkrypcji (przepisania puli wyizolowanych mRNA na cDNA) prób RNA, pochodzących z płatów brzusznych i grzbietowych szczurzych prostat, prowadzono przy użyciu zestawu komercyjnego Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostic) zgodnie z zaleceniami producenta [Tab. 17]. Do reakcji brano 1 µg całkowitego RNA.

Metodologię kwantyfikacji poziomu mRNA wybranych genów genomowego i niegenomowego szlaku działania androgenów z zastosowaniem reakcji ilościowego PCR w czasie rzeczywistym opisano w punkcie 3.2.6.4.1.4.

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA przedstawiono poniżej. Dla genu **p68** (p68) przedstawiał się w następujący sposób:

- 6,7 µl wody wolnej od RNaz
- 0,8 µl MgCl₂ (stężenie końcowe 3 mM)
- 0,25 µl starter Forward (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 0,25 µl starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 µM)
- 1 µl Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 µl cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **5 α -reduktazy 2 (Arip4)**:

- 6,3 μ l wody wolnej od RNaz
- 1,2 μ l MgCl₂ (stężenie końcowe 4 mM)
- 0,25 μ l starter Forward (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 0,25 μ l starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 1 μ l Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 μ l cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **kinazy RafA (RafA)**:

- 5,9 μ l wody wolnej od RNaz
- 1,6 μ l MgCl₂ (stężenie końcowe 5 mM)
- 0,25 μ l starter Forward (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 0,25 μ l starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 1 μ l Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 μ l cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **kinazy Mapk3 (Mapk3)**:

- 6,7 μ l wody wolnej od RNaz
- 0,8 μ l MgCl₂ (stężenie końcowe 3 mM)
- 0,25 μ l starter Forward (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 0,25 μ l starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 1 μ l Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)
- 1 μ l cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA genu **kinazy Mapk1 (Mapk1)**:

- 6,3 μ l wody wolnej od RNaz
- 1,2 μ l MgCl₂ (stężenie końcowe 4 mM)
- 0,25 μ l starter Forward (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 0,25 μ l starter Reverse (stężenie końcowe 0,25 μ M)
- 1 μ l Light Cycler Fast-Start Reaction Mix SYBR Green I (10x stężony)

- 1 µl cDNA

Skład mieszaniny reakcyjnej na pojedynczą próbę warunkującej prawidłową amplifikację określonego fragmentu cDNA **genu referencyjnego GAPDH** (ang. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase - dehydrogenazy gliceroaldehydofosforanowej) opisano w punkcie 3.2.6.4.1.4.

Dla każdego z genów prowadzono z osobna reakcje łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym obejmującą następujące po sobie etapy o odmiennym profilu termicznym i czasie jego trwania.

W tabeli poniżej podsumowano warunki termiczne prowadzonych reakcji qPCR oraz czas ich trwania.

Tab. 16. Warunki reakcji PCR w czasie rzeczywistym dla poszczególnych genów genomowej i niegenomowej drożki działania drogi androgenów w komórkach prostaty.

Gen	Liczba cykli	Warunki reakcji				
		Denaturacja wstępna	Denaturacja	Wiązanie starterów /annealing/	Synteza nici komplementarnej /elongacja/	Chłodzenie
GAPDH	30	95°C, 600s.	95°C, 4s.	56°C, 8s.	72°C, 8s.	40°C, 30s
p68	55		95°C, 5s.	58°C, 6s.	72°C, 10s.	
Arip4	55		95°C, 4s.	62°C, 4s.	72°C, 6s.	
RafA	45		95°C, 12s.	65°C, 3s.	72°C, 3s.	
Mapk3	50		95°C, 15s.	58°C, 5s.	72°C, 3s.	
Mapk1	50		95°C, 8s.	60°C, 3s.	72°C, 3s.	

Sekwencje użytych do reakcji primerów, wielkość ampliconu dla każdej z użytych par starterów zamieszczono w tabeli 17 poniżej.

Tab. 17. Sekwencje starterów użytych do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. GAPDH – gen referencyjny.

Izoformy	Sekwencja startera Forward (5' → 3')	Sekwencja startera Reverse (5' → 3')	Wielkość produktu (pz)
p68	TGGAGATTCAAGTCC	ATGAGGCTGTCTGTGATGTC	184
Arip4	CAGGAGTTGCCTTCCTTTGTG	GTAATAAATGTCCTGTGAAG	255
RafA	GGCGCTTCTACCAGCTCA	GAATTGATGCAGCTCTCTTGC	223
Mapk3	TGGAGATTCAAGTCCCAAA	GATGGGCTTATTGACCAACC	201
Mapk1	GAGGTGCTAATGGTGGGACT	CGAGGTCGGGAGCGAAA	238
GAPDH	GATGGTGAAGGTCGGTGTG	ATGAAGGGGTCGTTGATGG	108

3.2.6.4.5. Analiza statystyczna

Wyniki końcowego etapu badań z wykorzystaniem wyciągów roślinnych oraz substancji syntetycznych zostały opracowane w programie Microsoft Excel. Zmiany poziomów fluorescencji odzwierciedlających zmiany ilościowe badanych mRNA dla każdej z prób, zmierzone dwukrotnie, normalizowano względem tzw. genu referencyjnego należącego do rodziny tzw. *housekeeping*

genes – ulegających ekspresji w sposób kontyduwtywny. Do analiz molekularnych wybrano w tym celu gen GAPDH (ang. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* - dehydrogenazy gliceroaldehidofoforanowej). Uzyskane wyniki uśredniano (ustalono wartość średnią dla każdej z badanych grupy osobników), obliczono również wartości odchylenia standardowego oraz parametr SEM dla badanych grup. Rezultaty badań przedstawiono na wykresach obrazujących poziom ekspresji analizowanych genów w zależności od zastosowanego preparatu/wyciągu. Przy pomocy oprogramowania statystycznego SPSS wersja 17.0 PL for Windows z wykorzystaniem testu jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA określono istotność statystyczną dla wartości $P \leq 0,05$. W celu ustalenia różnic pomiędzy wartościami średnimi w badanych grupach zwierząt wykonano test Tukeya oparty na studentyzowanym rozstępie. Umożliwia on porównanie i określenie istotności różnic pomiędzy parami średnich przy jednakowym poziomie istotności dla wszystkich analizowanych par. Do analizy danych otrzymanych w badaniach nad częstotliwością oddawanego moczu przez szczury zastosowano ponadto test Mann-Whitney'a.

4. WYNIKI

4.1. Ocena działania przeciwzapalnego ekstraktu z zieleń *Epilobium angustifolium*

W toku badań nad określeniem działania przeciwzapalnego wyciągu z zieleń *Epilobium angustifolium* [100 mg/kg; p.o.] podawanego przez okres 21 dni stwierdzono, iż badany suchy wyciąg wodny po okresie 1,5 h od indukcji karageniną obrzęku łap zwierząt doświadczalnych spowodował obniżenie (choć słabo istotne statystycznie) jego objętości o $0,06 \pm 0,02$ ml (do objętości $0,18 \pm 0,08$ ml) względem grupy kontrolnej (objętość wyjściowa - $0,26 \pm 0,06$) ($p < 0,1$) [Tab. 19]. Efekt działania w tym przedziale czasowym był zbliżony do działania referencyjnej indometacyny [10 mg/kg; s.c.] – nastąpiło obniżenie objętości do wartości $0,18 \pm 0,05$ ml względem grupy kontrolnej ($p < 0,1$). Po upływie 3 h ekstrakt z *E. angustifolium* spowodował bardziej wyraźne i znamienne statystycznie zmniejszenie objętości obrzęku o $0,19 \pm 0,01$ ml (do wartości $0,27 \pm 0,05$ ml)), względem grupy kontrolnej (objętość wyjściowa = $0,46 \pm 0,06$ ml) ($p < 0,01$). Obecność indometacyny spowodowała zmniejszenie objętości obrzęku łap u zwierząt o $0,34 \pm 0,02$ ml (do wartości $0,12 \pm 0,04$) ($p < 0,01$). Badany wyciąg działał jednak słabiej, bowiem spowodował obniżenie objętości obrzęku o $0,15 \pm 0,01$ ml mniej aniżeli referencyjna indometacyna ($p < 0,01$).

Tab.18. Oszacowanie *in vivo* właściwości przeciwzapalnych ekstraktu z zieleń *Epilobium angustifolium* w modelu obrzęku łapy indukowanym karageniną u szczurów.

Ocena działania ekstraktu z <i>Epilobium angustifolium</i> po 1,5 h			
Parametr	Kontrola n = 7	indometacyna (10 mg/kg, s.c.) n = 8	Ekstrakt z <i>E. angustifolium</i> (100 mg/kg) n = 7
Różnica średniej grubości łap G [ml]	$0,26 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,05^*$	$0,18 \pm 0,08^*$
Ocena działania ekstraktu z <i>Epilobium angustifolium</i> po 3 h			
Parametr	Kontrola n = 7	indometacyna (10 mg/kg, s.c.) n = 8	Ekstrakt z <i>E. angustifolium</i> (100 mg/kg, p.o.) n = 7
Różnica średniej grubości łap G [ml]	$0,46 \pm 0,06$	$0,12 \pm 0,04^{**}$	$0,27 \pm 0,05^{**\#\#}$

W tabeli przedstawiono średnie wartości arytmetyczne wraz z wartościami SEM; n - liczba zwierząt w grupie. Wartości $p \leq 0,05$ przyjęto jako statystycznie znamienne (jednoczynnikowa ANOVA).

** - różnice znamienne statystycznie vs. kontrola, $p < 0,01$ lub $p < 0,1$, odpowiednio

- różnice znamienne statystycznie vs. indometacyna, $p < 0,01$.

4.2. Wpływ wyciągu z ziela *Epilobium angustifolium* na zmianę objętości i częstotliwości oddawania moczu u szczurów

W badaniu nad określeniem wpływu wyciągu z ziela *Epilobium angustifolium* na ilość oraz częstotliwość oddawanego moczu przez szczury zauważono, że u kontrolnych zwierząt poddanych kastracji objętość oddawanego moczu po upływie 6 godzin wynosiła 11.0 ± 1.6 ml; zwierzęta w tym czasie oddawały mocz z częstością wynoszącą 7.0 ± 1.1 raza [Tab. 20]. U zwierząt otrzymujących suchy wyciąg wodny z ziela *Epilobium angustifolium* nastąpiło zmniejszenie objętości (choć nieznamiennie) i częstości (znamiennie, $p \leq 0,05$) oddawanego moczu w badanym okresie, odpowiednio o $2,9 \pm 0,2$ ml i $3,5 \pm 0,3$ raza (tj. do wartości odpowiednio: $8,1 \pm 1,4$ ml objętości i $3,5 \pm 0,8$ krotnego oddawania moczu), w stosunku do kontrolnych szczurów. Indukcja hormonalna (testosteronem), w porównaniu do zwierząt kontrolnych (nieindukowanych hormonalnie), w niewielkim nieznamiennym stopniu wpłynęła na mikcję – zarówno na objętość wydalanego moczu, jak i jego częstość oddawania, ponieważ u zwierząt indukowanych testosteronem objętość oddawanego moczu u zwierząt wynosiła $11,9 \pm 2,7$ ml, a częstość jego oddawania wynosiła $8,7 \pm 2,1$ raza ($p > 0,05$). U indukowanych testosteronem szczurów otrzymujących wyciąg z *E. angustifolium* nastąpiło zmniejszenie objętości (nieznamiennie) i częstości (znamiennie statystycznie, $p \leq 0,05$) oddawanego moczu w badanym okresie, odpowiednio o $3,0 \pm 0,9$ ml i $3,7 \pm 1,0$ raza (tj. do wartości odpowiednio: $8,9 \pm 1,8$ ml objętości i $5,0 \pm 1,1$ krotnego oddawania moczu), w stosunku do kontrolnych (otrzymujących jedynie testosteron) szczurów. U szczurów poddanych indukcji hormonalnej efekt działania wyciągu z *E. angustifolium* był zbliżony do działania finasterydu. Zauważono bowiem u indukowanych testosteronem szczurów otrzymujących finasteryd zmniejszenie objętości (nieznamiennie) i częstości (znamiennie, $p \leq 0,05$) oddawanego moczu w badanym okresie, odpowiednio o $3,2 \pm 1,1$ ml i $3,7 \pm 1,5$ raza (tj. do wartości odpowiednio: $8,7 \pm 1,6$ ml objętości i $5,0 \pm 0,6$ krotnego oddawania moczu), w stosunku do kontrolnych (otrzymujących jedynie testosteron) szczurów.

Tab. 19. Ocena wpływu wyciągu z zioła *Epilobium angustifolium* (100 mg/kg, p.o.) podawanego osobno lub wraz z testosteronem (40 mg/kg, s.c.) i finasterydem (50 mg/kg, p.o.) na zmianę objętości i częstotliwości oddawania moczu u szczurów.

Grupa	Objętość moczu [ml/6 godzin]	Częstość oddawania moczu [ilość/6 godzin]
K	11,0±1,6	7,0±1,1
E	8,1±1,4	3,5±0,8*
T	11,9±2,7	8,7±2,1*
TE	8,9±1,8	5,0±1,1 [#]
TF	8,7±1,6	5,0±0,6 [#]

n= 10 szczurów w każdej grupie.

Wyniki wyrażono jako średnie arytmetyczne ± SEM.

K – zwierzęta kontrolne; E – zwierzęta nieindukowane hormonalnie, otrzymujące wyciąg z *Epilobium angustifolium*; T - zwierzęta indukowane testosteronem (kontrolne); TE- zwierzęta indukowane testosteronem, otrzymujące wyciąg z *E. angustifolium*; TF - zwierzęta indukowane testosteronem, otrzymujące finasteryd.

* - różnice znamienne statystycznie vs. K, $p \leq 0,05$

[#] - różnice znamienne statystycznie vs. T, $p \leq 0,05$.

4.3. Ocena molekularnego, antyproliferacyjnego działania wyciągów z *Epilobium angustifolium* i *Serenoe repens*

4.3.1. Optymalizacja warunków reakcji PCR w czasie rzeczywistym

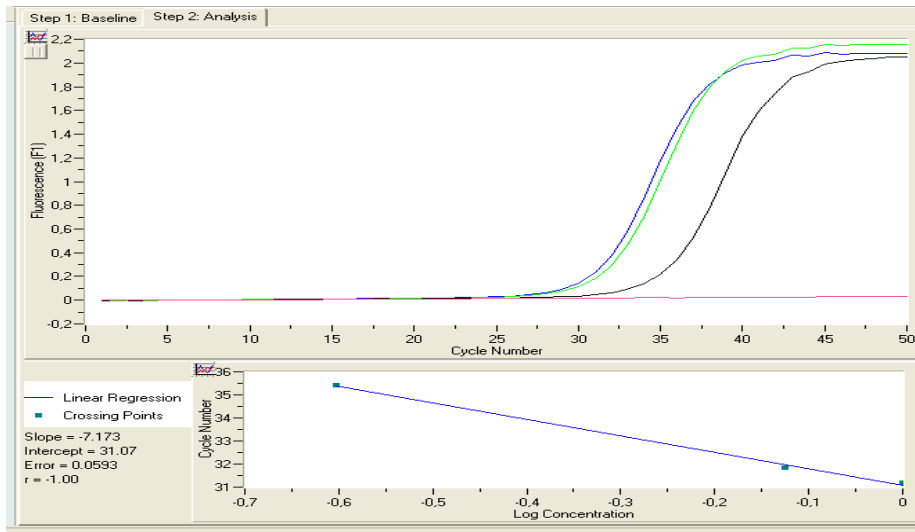
Optymalizację reakcji PCR w czasie rzeczywistym z użyciem starterów oligonukleotydowych o sekwencji komplementarnych do fragmentów sekwencji cDNA genów badanych i referencyjnego (zdeponowanych w bazie NCBI, ENSEMBL) prowadzono w systemie kapilarnym z użyciem termocyklera LightCycler (Roche).

4.3.1.1. Wyznaczanie krzywych standardowych dla reakcji qPCR

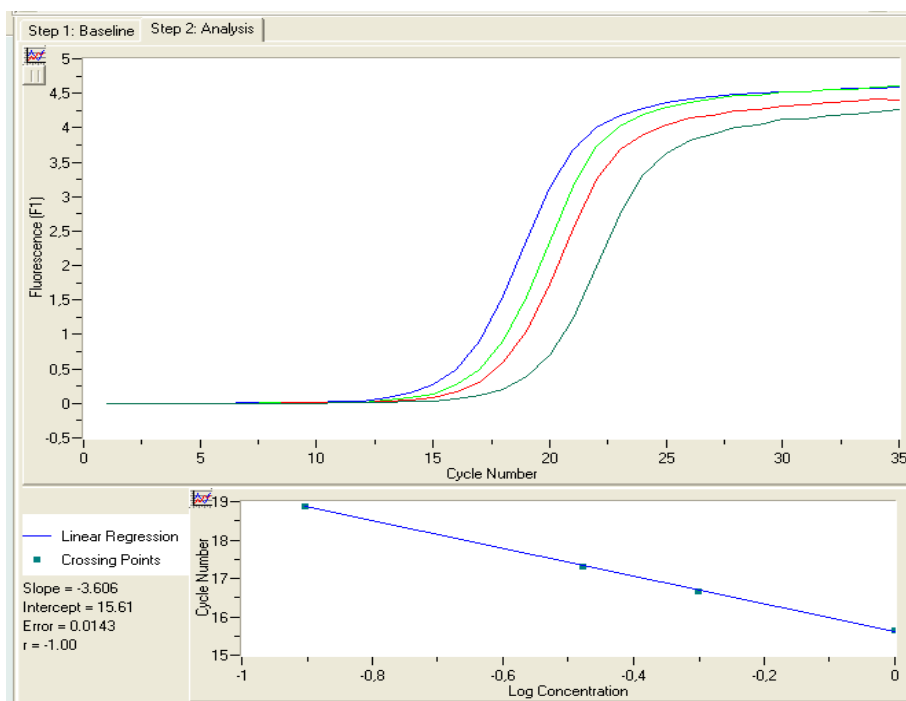
Ilość każdego z badanych transkryptów (mRNA) wyznaczano z krzywej standardowej (wzorcowej) uzyskanej poprzez przygotowanie serii rozcieńczeń mieszaniny cDNA (puli powstałej z wyniku zmieszania wybranych próbek cDNA z grup kontrolnych oraz grup badanych) genu badanego oraz referencyjnego uzyskanych w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji. Oznaczono jako wynik względny, stanowiący krotność zmiany ekspresji badanego genu względem genu referencyjnego. Uzyskany wynik dla analizowanego genu porównywano względem referencyjnego genu GAPDH, którego poziom ekspresji w warunkach danego doświadczenia jest względnie stały. Ilość transkryptów w próbach niepoddanych procedurze doświadczalnej, tj. w grupie kontrolnych (K1 i K2) uznano za stanowiący punkt odniesienia dla wartości poziomów badanych transkryptów w kolejnych grupach zwierząt i przyjęto dla nich wartość 1. Na Ryc. 9 zamieszczono wybrane

krzywe standardowe (wzorcowe) dla analizowanych genów: genu 5α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) [Ryc. 9a], 5α -reduktazy typu 2 (SRD5AR2) [Ryc. 9b], aromatazy (CYP19) [Ryc. 9c], receptora androgenowego (AR) [Ryc. 9d], receptora estrogenowego α (ER α) [Ryc. 9e] oraz receptora estrogenowego β (ER β) [Ryc. 9] z uwzględnieniem zmian poziomu fluorescencji (odzwierciedlające zmiany ilości produktów amplifikacji) w miarę wzrastającej wartości rozcieńczeń.

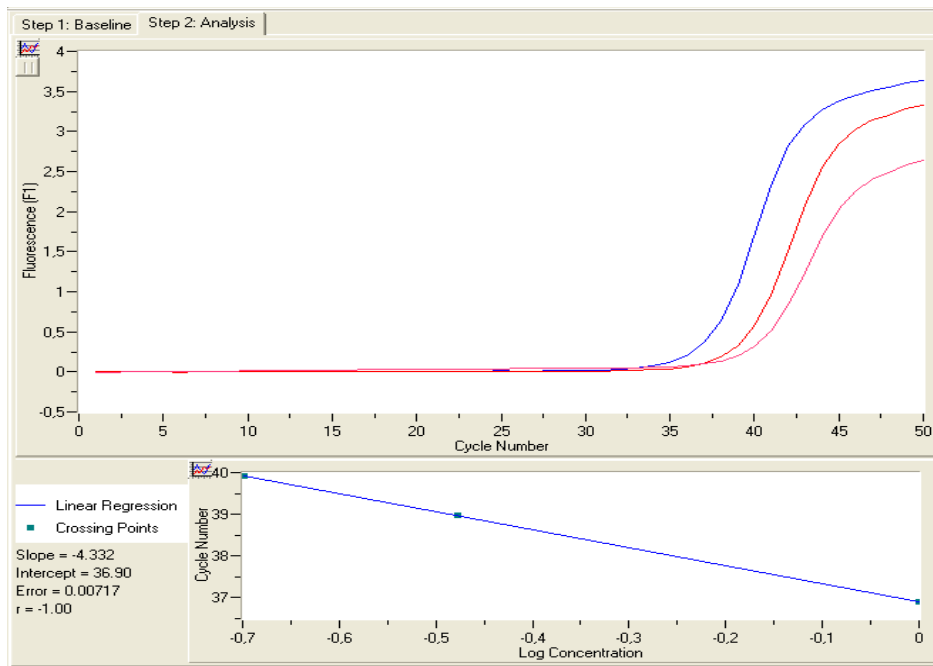
a) krzywa rozcieńczeń dla genu 5α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5A1)



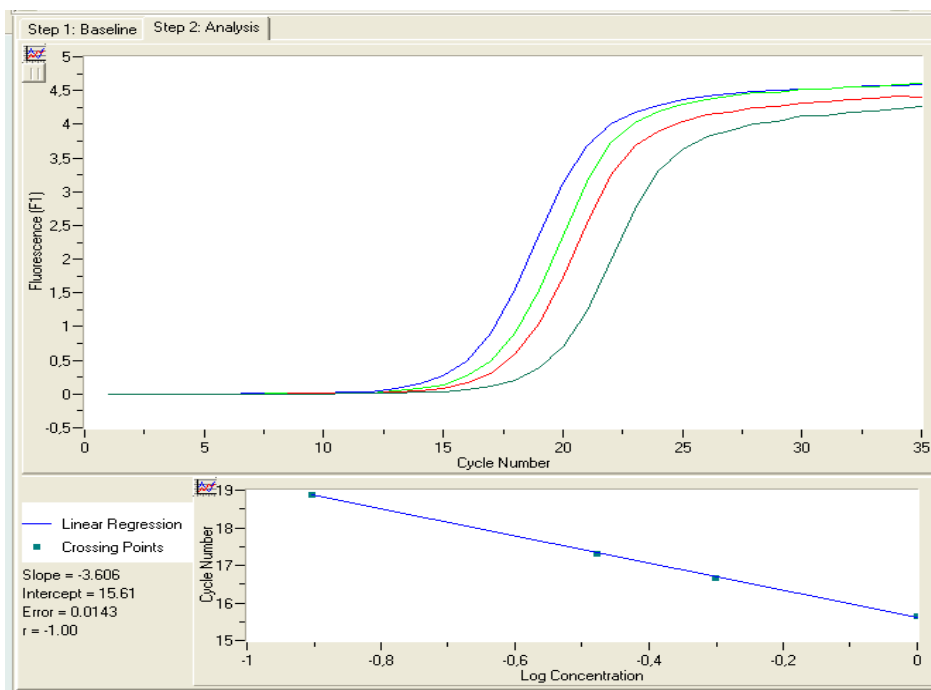
b) krzywa rozcieńczeń dla 5α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2)



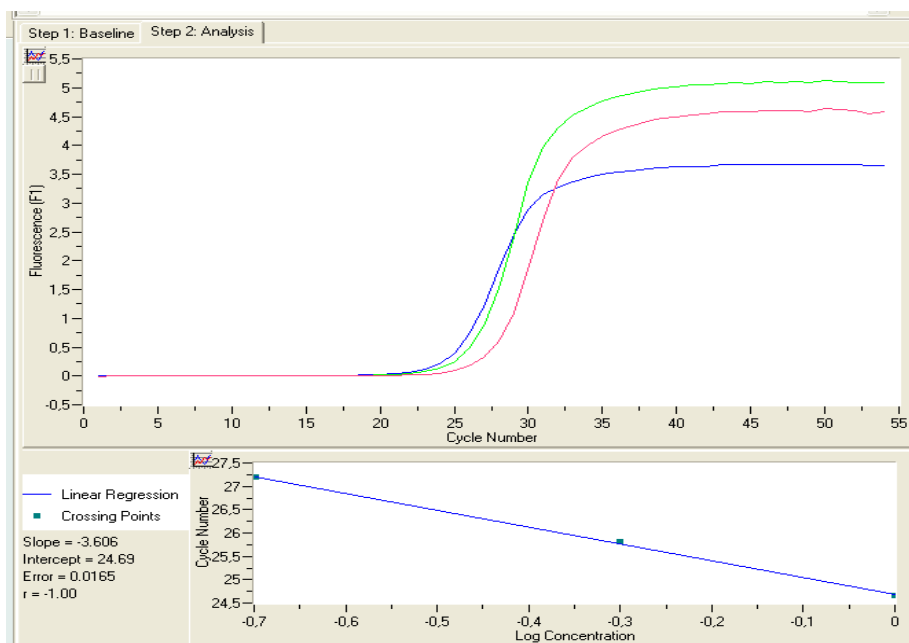
c) krzywa rozcieńczeń dla aromatazy (CYP19)



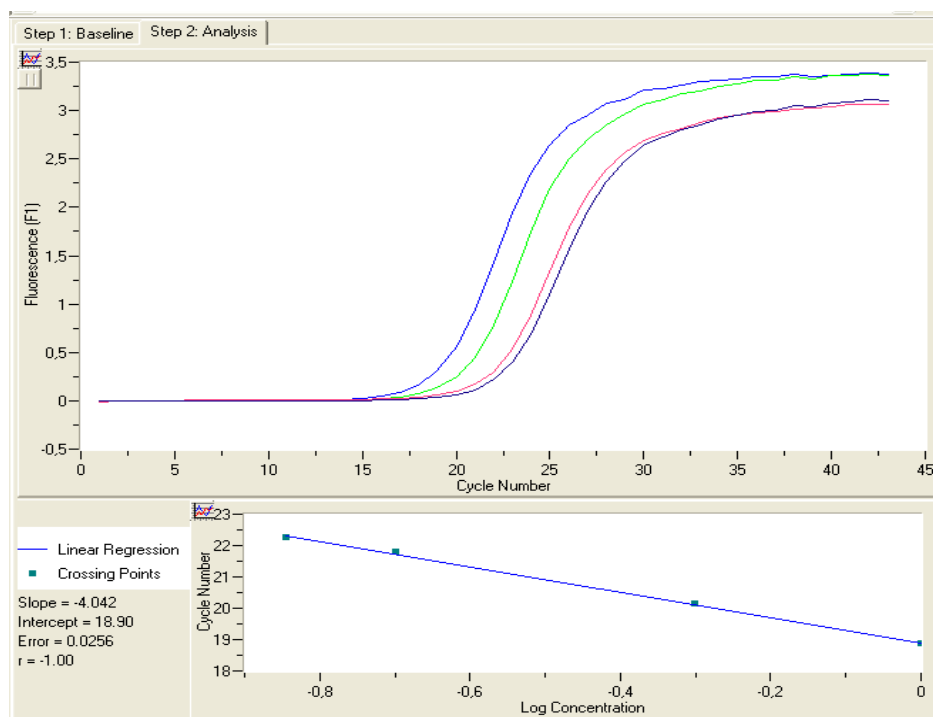
d) krzywa rozcieńczeń dla receptora androgenowego (AR)



e) krzywa rozcieńczeń dla receptora estrogenowego α (ER α)



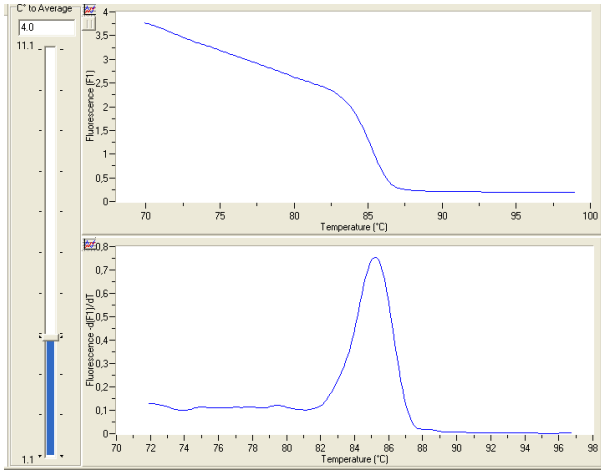
f) krzywa rozcieńczeń dla receptora estrogenowego β (ER β)



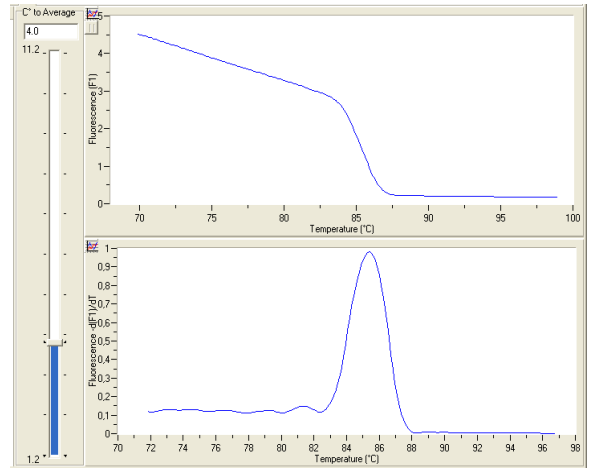
Ryc. 9 (a-f). Wykresy krzywych rozcieńczeń cDNA reakcji qPCR dla poszczególnych transkryptów a) 5 α -reduktazy 1 (SRD5AR1); b) 5 α -reduktazy 2 (SRD5AR2); c) aromatazy (CYP19); d) receptora androgenowego (AR); e) receptora estrogenowego α (ER α); f) receptora estrogenowego β (ER β).

4.3.1.2. Weryfikacja produktów amplifikacji na krzywych topnienia

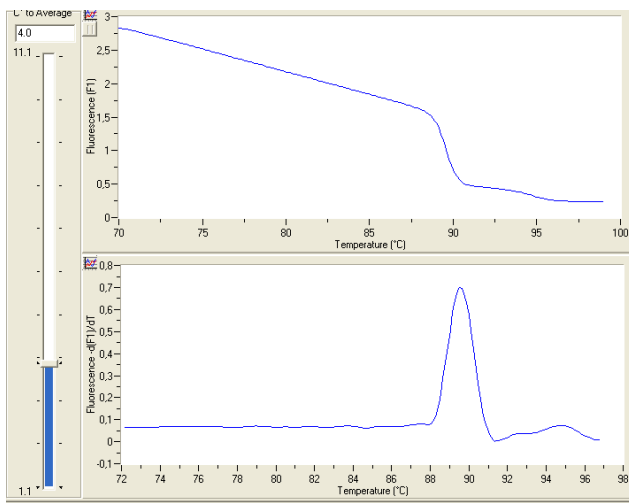
W toku etapu optymalizacji warunków reakcji PCR w czasie rzeczywistym weryfikowano ponadto specyficzność produktów amplifikacji poprzez analizowanie tzw. krzywych topnienia (ang. *melting curves*; T_m), których kształt zależny był od specyficzności wiązania się pary starterów do matrycy (cDNA) zgodnie z zasadą komplementarności zasad azotowych, długości i sekwencji amplikonu. Obecność pojedynczych wierzchołków (pików) krzywych topnienia świadczyła o optymalizacji warunków reakcji qPCR i uzyskaniu jednego, specyficznego dla danej sekwencji produktu amplifikacji. Na Ryc. 10 zamieszczono krzywe topnienia.



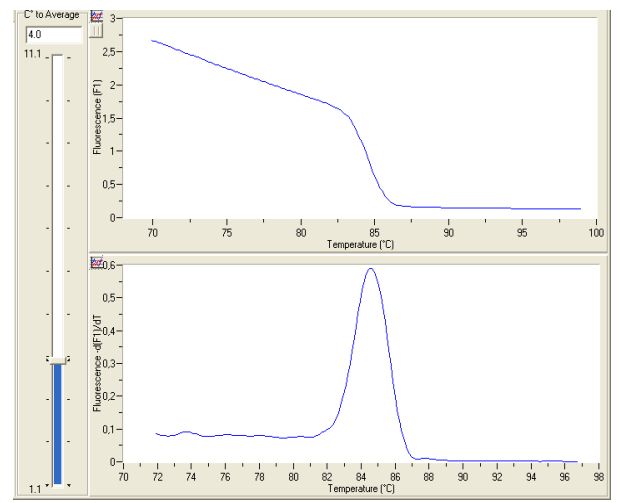
5a.



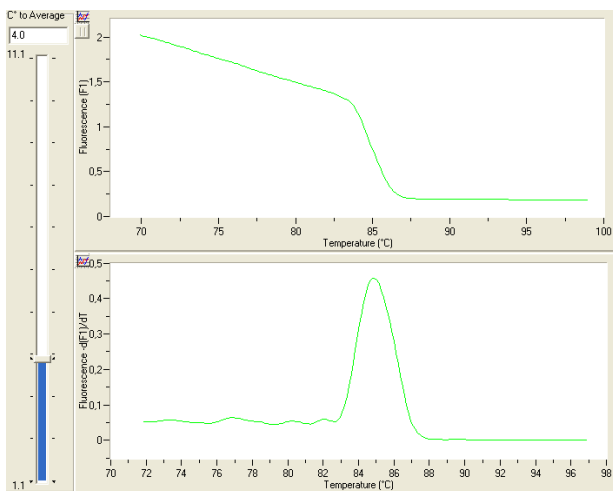
5b.



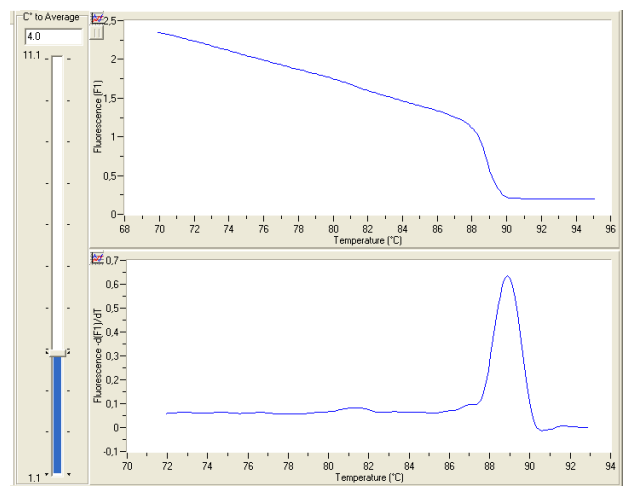
5c.



5d.



5e.



5f.

Ryc. 10(a-f). Wykresy krzywych topnienia produktów amplifikacji dla poszczególnych genów: a) (5 α -reduktazy 1 (SRD5AR1); b) 5 α -reduktazy 2 (SRD5AR2); c) aromatazy (CYP19); d) receptora androgenowego (AR); e) receptora estrogenowego α (ER α); f) receptora estrogenowego β (ER β)

4.3.2. Ocena zmian poziomu mRNA genów metabolizmu androgenów i estrogenów w płatach prostaty u szczurów

Ocenę zmian transkrypcji genów kodujących enzymy metabolizmu androgenów i estrogenów, tj. 5 α -reduktazy 1 (SRD5AR1), 5 α -reduktazy 2 (SRD5AR2), aromatazy (CYP19), receptora androgenowego (AR), receptora estrogenowego α (ER α , syn. ER1), receptora estrogenowego β (ER β , syn. ER2) dokonano w grupach kontrolnych, niestymulowanych hormonalnie zwierząt (grupy K1, K2), u szczurów indukowanych testosteronem (grupa T), u szczurów stymulowanych testosteronem otrzymujących ekstrakt z zioła *Epilobium angustifolium* (grupa TE) albo z owoców *Serenoa repens* (grupa TS) oraz u zwierząt indukowanych hormonalnie otrzymujących finasteryd (grupa TF).

4.3.2.1. Ocena zmian poziomu mRNA receptora androgenowego (AR)

4.3.2.1.1. Zmiany poziomu mRNA receptora androgenowego (AR) w płacie brzusznej

Oceniając zmiany ekspresji mRNA dla receptora androgenowego (AR) w płacie brzusznej prostaty szczurów zauważono, że u zwierząt indukowanych testosteronem (grupa T) nastąpiła indukcja transkrypcji mRNA AR o 133% względem zwierząt kontrolnych (T vs. K2, $p \leq 0.05$) [Tab. 20]. W pozostałych grupach zwierząt stymulowanych testosteronem, otrzymujących jednocześnie wyciągi z *Epilobium angustifolium* (grupa TE) lub *Serenoa repens* (grupa TS), a także finasteryd (grupa TF) również stwierdzono podwyższenie ilości transkryptów AR, kolejno o: TE vs K2 – 145% ($p \leq 0.05$), TS vs. K2 – 115% ($p \leq 0.05$), i TF vs. K1 – 44% ($p < 0.1$), względem zwierząt kontrolnych (K1 – grupa kontrolna dla zwierząt otrzymujących finasteryd, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych zwierząt). Najmniejszą indukcję transkrypcji badanego mRNA stwierdzono w przypadku grupy TF. U zwierząt TE stwierdzono nieznaczny wzrost poziomu mRNA receptora androgenowego o 5,15% względem grupy T. Obecność ekstraktu z *Serenoa repens* (grupa TS) oraz finasterydu (grupa TF) spowodowała obniżenie ilości transkryptów kolejno o 7,73% (nieznamienne) i 38,2% ($p \leq 0.05$).

Tab. 20. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora androgenowego (AR) w płacie brzusznej prostaty u szczurów

Poziomy mRNA receptora androgenowego (AR) u poszczególnych grup Zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia±SEM	P
K1	100%	2,05±0,44	
K2	100%	0,42±0,16	
T	233%	0,98±0,12	0,017
TE	245%	1,03±0,1	0,007
TS	215%	0,90±0,09	0,014
TF	144%	2,95±0,25	0,083
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA AR wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 133		
TE/K2	↑ 145		
TS/K2	↑ 115		
TF/K1	↑ 44		
Zmiany ekspresji mRNA w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA AR wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↑ 5,15		
TS/T	↓ 7,73		
TF/T	↓ 38,2		

n=10 szczurów w każdej grupie .

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.1.2. Zmiany poziomu mRNA receptora androgenowego (AR) w płacie grzbietowym

Oceniając zmiany ekspresji mRNA dla receptora androgenowego (AR) w płacie grzbietowym prostaty u szczurów grupy T zaobserwowano wzrost poziomu mRNA o 737% względem zwierząt kontrolnych ($p \leq 0.05$) [Tab. 21]. W pozostałych grupach zwierząt stymulowanych testosteronem, również stwierdzono podwyższenie ilości transkryptów AR względem zwierząt kontrolnych ($p < 0.001$) kolejno o: TE vs. K2 - 633%, TS vs. K2 – 779% i TF vs. K1 – 360%. Najmniejszą indukcję transkrypcji badanego mRNA stwierdzono w przypadku grupy TF. U zwierząt otrzymujących jednocześnie testosteron wraz z wyciągiem z *E. angustifolium* stwierdzono nieznamiennie obniżenie poziomu mRNA receptora androgenowego o 12,42% względem grupy T. Obecność ekstraktu z *Serenoa repens* (grupa TS) spowodowała nieznaczne podwyższenie ilości transkryptów o 5,02%, w porównaniu do grupy T. U zwierząt otrzymujących TF stwierdzono obniżenie poziomu mRNA AR o 45,04% względem grupy T.

Tab. 21. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora androgenowego (AR) w płacie grzbietowym prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA receptora androgenowego (AR) u poszczególnych grup Zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia±SEM	P
K1	100%	5,31±0,25	
K2	100%	5,65±2,84	
T	837%	47,3±2,99	<0,001
TE	733%	41,43±4,92	<0,001
TS	879%	49,68±6,16	<0,001
TF	460%	24,44±3,23	0,001
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA AR wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 737		
TE/K2	↑ 633		
TS/K2	↑ 779		
TF/K1	↑ 360		
Zmiany ekspresji mRNA w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA AR wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↓ 12,42		
TS/T	↑ 5,02		
TF/T	↓ 45,04		

n=10 szczurów w każdej grupie .

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.2. Ocena zmian poziomu mRNA receptora estrogenowego α (ER α)

4.3.2.2.1. Zmiany poziomu mRNA receptora estrogenowego α (ER α) w płacie brzuszny

Analizując zmiany ekspresji dla mRNA receptora estrogenowego α (ER α) w płacie brzuszny zauważono, że zwierzęta grupy T wykazywały niższy, choć słabo znamiennej poziom mRNA o 24%, w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p < 0,1$) [Tab. 22]. Nieznamienne obniżenie poziomu mRNA receptora estrogenowego α (ER α) o 15%, względem kontroli K2, stwierdzono również u szczurów TE. U zwierząt TS a także (TF) zaobserwowano z kolei podwyższenie, choć nieznamienne, ilości transkryptów ER α , kolejno o 16% (TS vs. K2) i 9% (TF vs. K1). U szczurów otrzymujących testosteron wraz z kolejno wyciągiem z *E. angustifolium*, *S. repens* oraz finasterydem nastąpiło nieznamienne podwyższenie poziomu mRNA ER α odpowiednio o 9% (nieznamienne), 40% (nieznamienne) i 33% ($p \leq 0,05$) w porównaniu do zwierząt T.

Tab. 22. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora estrogenowego α (ER α) w płacie brzusznej prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA receptora estrogenowego α (ER α) u poszczególnych grup Zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia \pm SEM	P
K1	100%	1,37 \pm 0,19	
K2	100%	0,69 \pm 0,07	
T	76%	0,52 \pm 0,07	0,071
TE	85%	0,58 \pm 0,07	0,27
TS	116%	0,80 \pm 0,25	0,59
TF	109%	1,5 \pm 0,11	0,55
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA ER α wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↓ 24		
TE/K2	↓ 15		
TS/K2	↑ 16		
TF/K1	↑ 9		
Zmiany ekspresji mRNA ER α w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA ER α wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↑ 9		
TS/T	↑ 40		
TF/T	↑ 33		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.2.2. Zmiany poziomu mRNA receptora estrogenowego α (ER α) w płacie grzbietowym

Oceniając zmiany ekspresji mRNA dla receptora estrogenowego α (ER α) u zwierząt T w grzbietowym płacie prostat stwierdzono bardzo nieznaczne obniżenie poziomu mRNA receptora estrogenowego α (ER α) o 2%, w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 [Tab. 23]. U szczurów grup TS), TE, TF nastąpiło podwyższenie poziomu mRNA ER α odpowiednio o 125% ($p \leq 0.05$), 12% (nieznamienne) i 3% (nieznamienne), w porównaniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych. W porównaniu do zwierząt otrzymujących jedynie testosteron, u indukowanych hormonalnie szczurów otrzymujących wyciągi z *S. repens*, *E. angustifolium* albo finasteryd nastąpiło podwyższenie poziomu mRNA ER α kolejno o: 129,6% ($p \leq 0.05$), 14,3% (nieznamienne) oraz 5,1% (nieznamienne).

Tab. 23. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora estrogenowego α (ER α) w płacie grzbietowym prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA receptora estrogenowego α (ER α) u poszczególnych grup zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia \pm SEM	P
K1	100%	0,75 \pm 0,12	
K2	100%	0,85 \pm 0,07	
T	98%	0,83 \pm 0,08	0,86
TE	112%	0,95 \pm 0,11	0,43
TS	225%	1,91 \pm 0,25	0,001
TF	103%	0,77 \pm 0,09	0,89
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA ER α wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↓ 2		
TE/K2	↑ 12		
TS/K2	↑ 125		
TF/K1	↑ 3		
Zmiany ekspresji mRNA ER α w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA ER α wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↑ 14,3		
TS/T	↑ 129,6		
TF/T	↑ 5,1		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.3. Ocena zmian poziomu mRNA receptora estrogenowego β (ER β)

4.3.2.3.1. Zmiany poziomu mRNA receptora estrogenowego β (ER β) w płacie brzuszny

Analizując zmiany ekspresji dla mRNA receptora estrogenowego β (ER β) w płacie brzuszny u zwierząt T stwierdzono podwyższenie poziomu mRNA o 299% w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p \leq 0.05$). U szczurów TE, TS, TF oraz TF zauważono również podwyższenie poziomu mRNA ER β odpowiednio o 263%, 277% i 299% w porównaniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych ($p \leq 0.05$). U indukowanych hormonalnie szczurów otrzymujących wyciągi z *E. angustifolium*, *S. repens* nastąpiło nieznamienne obniżenie poziomu mRNA ER β , kolejno o: 36% i 22%, w porównaniu do zwierząt T. W przypadku zwierząt TF odnotowano niewielki wzrost o 18% w poziomie transkrypcji ER β .

Tab. 24. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora estrogenowego β (ER β) w płacie brzusznej prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA receptora estrogenowego β (ER β) u poszczególnych grup zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia \pm SEM	P
K1	100%	1,23 \pm 0,22	
K2	100%	0,89 \pm 0,14	
T	399%	3,55 \pm 0,31	<0,001
TE	363%	3,23 \pm 0,40	<0,001
TS	377%	3,36 \pm 0,52	<0,001
TF	341%	4,20 \pm 0,20	<0,001
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA ER β wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 299		
TE/K2	↑ 263		
TS/K2	↑ 277		
TF/K1	↑ 241		
Zmiany ekspresji mRNA ER α w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA ER β wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↓ 36%		
TS/T	↓ 22%		
TF/T	↑ 18%		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.3.2. Zmiany poziomu mRNA receptora estrogenowego β (ER β) w płacie grzbietowym

Oceniając zmiany ekspresji mRNA dla receptora estrogenowego β (ER β) w grzbietowym płacie prostaty u zwierząt T stwierdzono podwyższenie poziomu mRNA o 323%, w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p \leq 0.05$) [Tab. 25]. U szczurów TE, TS, TF również wystąpiło podwyższenie poziomu mRNA ER β , odpowiednio o 383%, 561% i 209%, w porównaniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych ($p \leq 0.05$). U indukowanych hormonalnie szczurów otrzymujących oba wyciągi, tj. z *E. angustifolium* i *S. repens*, występował nieznamienny podwyższony poziom mRNA ER β , kolejno o: 14,18% i 32,62%, w porównaniu do zwierząt T. U zwierząt odnotowano obniżenie ilości badanego transkryptu o 27% ($p \leq 0.05$), w porównaniu do grupy T.

Tab. 25. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA receptora estrogenowego β (ER β) w płacie grzbietowym prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA receptora estrogenowego β (ER β) u poszczególnych grup zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia \pm SEM	P
K1	100%	0,52 \pm 0,13	
K2	100%	1,95 \pm 0,37	
T	423%	8,25 \pm 0,97	<0,001
TE	483%	8,27 \pm 1,24	0,001
TS	561%	10,95 \pm 1,13	0,094
TF	309%	1,60 \pm 0,56	<0,001
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA ER β wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 323		
TE/K2	↑ 383		
TS/K2	↑ 561		
TF/K1	↑ 209		
Zmiany ekspresji mRNA ER α w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA ER β wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↑ 14,18		
TS/T	↑ 32,62		
TF/T	↓ 27		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.4. Ocena zmian poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1)

4.3.2.4.1. Zmiany poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w płacie brzuszny

Analizując zmiany ekspresji dla mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w brzuszny płacie prostaty u zwierząt T stwierdzono podwyższenie poziomu mRNA o 723%, w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p \leq 0.05$) [Tab. 26]. U szczurów TE, TS również wystąpiło znaczne podwyższenie poziomu mRNA SRD5AR1, odpowiednio o 333%, 644%, w porównaniu do zwierząt K2 ($p \leq 0.05$). Wzrost poziomu mRNA SRD5AR1 w grupie zwierząt TS był o 311% większy niż u szczurów TE, chociaż otrzymana różnica nie była znamienne statystycznie. Indukcję transkrypcji mRNA o najmniejszym stopniu nasilenia obserwowano w grupie zwierząt TF. W tym przypadku nastąpiło nieznamienne podwyższenie poziomu badanego mRNA o 33% w stosunku do zwierząt kontrolnych K1. W porównaniu do zwierząt T, u szczurów TS wystąpiło nieznamienne obniżenie poziomu mRNA o 9,6%. Z kolei u szczurów TE lub TF nastąpiło, choć również

nieznamienne obniżenie ilości badanych transkryptów, kolejno o 47% i 68%, w odniesieniu do zwierząt T. W grupie TF obecność finasterydu spowodowała znaczniejsze obniżenie poziomu mRNA, tj. o 21% intensywniej aniżeli u zwierząt TE, choć różnica nie była znamienne statystycznie.

Tab. 26. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w płacie brzusznej prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) u poszczególnych grup zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia \pm SEM	P
K1	100%	1,22 \pm 0,25	
K2	100%	0,61 \pm 0,10	
T	823%	5,10 \pm 1,72	0,001
TE	433%	2,68 \pm 0,97	0,005
TS	744%	4,61 \pm 1,43	0,004
TF	133%	1,62 \pm 0,49	0,476
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA SRD5AR1 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 723		
TE/K2	↑ 333		
TS/K2	↑ 644		
TF/K1	↑ 33		
Zmiany ekspresji mRNA SRD5AR1 w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem (kontrolnej)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA SRD5AR1 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↓ 47		
TS/T	↓ 9,6		
TF/T	↓ 68		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.4.2. Zmiany poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w płacie grzbietowym

Oceniając zmiany ekspresji mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w grzbietowym płacie prostaty u zwierząt T stwierdzono bardzo znaczne podwyższenie poziomu mRNA, tj. o 2362%, w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p \leq 0.05$) [Tab. 27]. U szczurów TE, TS, TF również wystąpiło znaczne podwyższenie poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1, odpowiednio o 217% (znamienne, $p \leq 0.05$), 341% (znamienne, $p \leq 0.05$) i 29% (nieznamienne), w porównaniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych. Wzrost poziomu mRNA reduktazy typu 1 w

grupie zwierząt TF był o 188% mniejszy aniżeli w obserwowany u zwierząt TE i o 119% mniejszy niż obserwowany w grupie otrzymujących TS. W porównaniu do zwierząt T, u szczurów TE i TF nastąpiło znaczne, znamienne obniżenie poziomu mRNA, kolejno o 87% ($p=0,001$) i 91,8% ($p=0,001$). U szczurów TS także odnotowano znamienne obniżenie ilości transkryptów o 82,1% ($p=0,001$) w stosunku do grupy T.

Finasteryd u szczurów indukowanych testosteronem spowodował obniżenie poziomu mRNA w stopniu niewiele bardziej znacznym niż u szczurów TE i TS, tj. o 4,8% intensywniej niż było to widoczne u szczurów TE (nieznamienne) oraz o 9,7% w porównaniu do zwierząt TS ($p<0.05$).

Tab. 27. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) w płacie grzbietowym prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 (SRD5AR1) u poszczególnych grup zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia \pm SEM	P
K1	100%	2,90 \pm 0,70	
K2	100%	1,86 \pm 0,44	
T	2462%	45,80 \pm 8,7	<0,001
TE	317%	5,96 \pm 1,75	0,036
TS	441%	8,20 \pm 1,37	0,001
TF	129%	3,75 \pm 0,57	0,329
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA SRD5AR1 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 2362		
TE/K2	↑ 217		
TS/K2	↑ 341		
TF/K1	↑ 29		
Zmiany ekspresji mRNA SRD5AR1 w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA SRD5AR1 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↓ 87		
TS/T	↓ 82,1		
TF/T	↓ 91,8		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.5. Ocena zmian poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2)

4.3.2.5.1. Zmiany poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) w płacie brzuszny

Analizując zmiany transkrypcji mRNA w brzuszny płacie prostat u zwierząt T stwierdzono podwyższenie poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) o 703%, w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p \leq 0.05$) [Tab. 28].

U szczurów TE, TS, TF również wystąpiła znaczna, znamienna indukcja transkrypcji mRNA, odpowiednio o 615%, 700% i 94%, w porównaniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych ($p \leq 0.05$). Wzrost poziomu mRNA reduktazy typu 2 w grupie TF był o 521% mniejszy aniżeli w obserwowany u zwierząt TE i o 606% mniejszy niż obserwowany w grupie otrzymujących drugi ekstrakt (grupa TS). U szczurów TS nastąpiła indukcja transkrypcji genu reduktazy steroidowej o 85% bardziej intensywnie, aniżeli w przypadku zwierząt TE, choć otrzymana różnica nie była znamienna statystycznie.

Przyjmując szczury T jako grupę odniesienia, u zwierząt TE i nastąpiło nieznamienne, nieznaczne obniżenie ilości transkryptów SRD5AR2, tj. o 11%. Poziom mRNA w grupie TS praktycznie nie uległ zmianie – stwierdzono bardzo nieznaczne nieznamienne obniżenie mRNA, tj. o 0,4%. U szczurów TF nastąpiła indukcja transkrypcji mRNA o 125%, w porównaniu do zwierząt T, ale otrzymana różnica nie osiągnęła znamienności statystycznej.

Tab. 28. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) w płacie brzusznej prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) u poszczególnych grup zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia \pm SEM	P
K1	100%	3,1 \pm 0,69	
K2	100%	0,6 \pm 0,15	
T	803%	4,82 \pm 0,68	0,001
TE	715%	4,29 \pm 0,82	0,005
TS	800%	4,8 \pm 1,04	0,004
TF	194%	6,02 \pm 0,59	0,009
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA SRD5AR2 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 703%		
TE/K2	↑ 615%		
TS/K2	↑ 700%		
TF/K1	↑ 94%		
Zmiany ekspresji mRNA SRD5AR2 w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA SRD5AR2 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↓ 11%		
TS/T	↓ 0,4%		
TF/T	↑ 25%		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.5.2. Zmiany poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) w płacie grzbietowym

Oceniając zmiany ekspresji mRNA w grzbietowym płacie prostaty u zwierząt T stwierdzono podwyższenie poziomu mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) o 1263%, w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p < 0.001$) [Tab. 29]. U szczurów TE, TS, TF również wystąpiła znaczna indukcja transkrypcji mRNA SRD5AR2, odpowiednio o 1085% (znamiennie, $p < 0.001$), 974% (znamiennie, $p < 0.001$) i 1100% (znamiennie, $p < 0,05$), w porównaniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych. Wzrost poziomu mRNA reduktazy typu 2 w grupie zwierząt TF był o 15% wyższy aniżeli w obserwowany u zwierząt TE i o 126% wyższy niż w grupie TS. U zwierząt TS indukcja transkrypcji reduktazy steroidowej typu 2 była o 111% niższa aniżeli w przypadku zwierząt TE, ale otrzymana różnica nie osiągnęła znamienności statystycznej.

U zwierząt TS nastąpiło nieznamienne obniżenie poziomu mRNA reduktazy steroidowej typu 2 o 18,4%, w porównaniu do zwierząt T. Obniżenie liczby badanych transkryptów,

(nieznamienne o 13,1%) wystąpiło również u zwierząt TE, w porównaniu do zwierząt T. U zwierząt TF odnotowano znaczne obniżenie poziomu mRNA o 97% ($p < 0.001$), w odniesieniu do szczurów T.

Tab. 29. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) w płacie grzbietowym prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 2 (SRD5AR2) u poszczególnych grup zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia \pm SEM	P
K1	100%	0,27 \pm 0,12	
K2	100%	7,71 \pm 0,42	
T	1363%	105,1 \pm 3,92	<0,001
TE	1185%	91,4 \pm 8,25	<0,001
TS	1074%	82,8 \pm 4,16	<0,001
TF	1200%	3,24 \pm 1,16	0,020
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA SRD5AR2 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 1263		
TE/K2	↑ 1085		
TS/K2	↑ 974		
TF/K1	↑ 1100		
Zmiany ekspresji mRNA SRD5AR2 w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA SRD5AR2 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↓ 13,1		
TS/T	↓ 18,4		
TF/T	↓ 97		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.6. Ocena zmian poziomu mRNA aromatazy (CYP19)

4.3.2.6.1. Zmiany poziomu mRNA aromatazy (CYP19) w płacie brzuszny

Analizując zmiany ekspresji dla mRNA w brzuszny płacie prostaty u zwierząt T stwierdzono podwyższenie poziomu mRNA aromatazy (CYP19) o 471% w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p \leq 0.05$) [Tab. 30]. U szczurów TE, TS, TF również wystąpiła znaczna indukcja transkrypcji mRNA aromatazy, odpowiednio o 504%, 439% i 61% w porównaniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych ($p \leq 0.05$). Wzrost poziomu CYP19 mRNA w grupie zwierząt TF był o 443% niższy niż obserwowany u zwierząt TE i o 378% mniejszy niż obserwowany w grupie TS. U

zwierząt TS nastąpiła indukcja transkrypcji aromatazy o 65% w mniejszym stopniu niż obserwowana u zwierząt otrzymujących wyciąg z *E. angustifolium*.

U zwierząt TE nastąpiła nieznamienna indukcja transkrypcji aromatazy o 5,78%, w porównaniu do zwierząt T. U szczurów TS albo TF nastąpiło nieznamienne obniżenie poziomu CYP19 mRNA, kolejno o 5,6% i 71,8%, w porównaniu do zwierząt T. Obecność ekstraktu z *E. angustifolium* u zwierząt indukowanych testosteronem spowodowała podwyższenie poziomu aromatazy w stopniu o 11,38% większym w porównaniu do wyciągu z *S. repens*.

U zwierząt TF odnotowano obniżenie poziomu badanego mRNA o 66,2% bardziej intensywnie ($p \leq 0.05$) niż obserwowany spadek ilości transkryptów u szczurów TS.

Tab. 30. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA aromatazy (CYP19) w płacie brzusznej prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA aromatazy (CYP19) u poszczególnych grup Zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia±SEM	P
K1	100%	1,17±0,17	
K2	100%	0,27±0,12	
T	571%	1,54±0,14	<0,001
TE	604%	1,63±0,16	0,001
TS	539%	1,68±0,16	<0,001
TF	161%	1,87±0,19	0,038
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA CYP19 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 471		
TE/K2	↑ 504		
TS/K2	↑ 439		
TF/K1	↑ 61		
Zmiany ekspresji mRNA SRD5AR2 w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA CYP19 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↑ 5,78		
TS/T	↓ 5,6		
TF/T	↓ 71,8		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.6.2. Zmiany poziomu mRNA aromatazy (CYP19) w płacie grzbietowym

Oceniając zmiany ekspresji mRNA w grzbietowym płacie prostaty u zwierząt T stwierdzono podwyższenie poziomu mRNA aromatazy (CYP19) o 347%, w stosunku do zwierząt kontrolnych

K2 ($p \leq 0.05$) [Tab. 31]. U szczurów TE, TS, TF także wystąpiła znaczna indukcja transkrypcji mRNA aromatazy, odpowiednio o 297% (znamiennie, $p \leq 0.05$), 348% (znamiennie, $p \leq 0.05$) i 121% (nieznamiennie), w porównaniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych. Wzrost poziomu CYP19 mRNA w grupie zwierząt TF był o 176% niższy niż obserwowany u zwierząt TE i o 227% mniejszy niż obserwowany w grupie TS. U zwierząt TS nastąpiła indukcja transkrypcji aromatazy w stopniu o 51% większym niż obserwowana u zwierząt TE.

U zwierząt TE nastąpiło nieznamiennie zahamowanie transkrypcji aromatazy o 11,2%, w porównaniu do zwierząt T. U szczurów TS praktycznie nie było zmian w profilu transkrypcji badanego mRNA (nastąpiła indukcja o 0,22%), w porównaniu do zwierząt T. Znaczne zahamowanie transkrypcji (o 51% ($p \leq 0.05$), w porównaniu do zwierząt T stwierdzono u zwierząt TF. Obecność ekstraktu z *E. angustifolium* u zwierząt indukowanych testosteronem spowodowała obniżenie poziomu aromatazy w stopniu o 11,42% większym w porównaniu do wyciągu z *S. repens*.

U zwierząt TF odnotowano obniżenie poziomu badanego mRNA o 39,8% bardziej intensywnie niż obserwowany spadek ilości transkryptów u szczurów TE i o 51,22% bardziej intensywnie niż w przypadku zwierząt TS.

Tab. 31. Wpływ badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu na poziom mRNA aromatazy (CYP19) w płacie grzbietowym prostaty u szczurów.

Poziomy mRNA aromatazy (CYP19) u poszczególnych grup zwierząt			
Grupy	Zestawienie grup kontrolnych i badanych	Średnia±SEM	P
K1	100%	0,56±0,17	
K2	100%	1,10±0,28	
T	447%	4,92±0,73	0,001
TE	397%	4,37±1,30	0,003
TS	448%	4,93±0,62	<0,001
TF	221%	1,24±0,44	0,234
Porównanie badanych grup w stosunku do grup kontrolnych (K1, K2)			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA CYP19 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
T/K2	↑ 347		
TE/K2	↑ 297		
TS/K2	↑ 348		
TF/K1	↑ 121		
Zmiany ekspresji mRNA SRD5AR2 w grupach badanych względem grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany ilościowe mRNA CYP19 wyrażone w wartościach procentowych [%]		
TE/T	↓ 11,2		
TS/T	↑ 0,22		
TF/T	↓ 51		

n=10 szczurów w każdej grupie.

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.2.7. Podsumowanie zmian poziomów badanych mRNA w obu płatach prostaty u szczurów

W tabelach poniżej podsumowano wyniki z analiz profili transkrypcji poszczególnych mRNA. W tabeli poniżej [Tab. 32 a,b.] zestawiono profile transkrypcji mRNA 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 i 2 (SRD5AR1, SRD5AR2), aromatazy (CYP19), receptora androgenowego (AR), receptor estrogenowego α (ER α) oraz β (ER β) w obu płatach (brzusznym i grzbietowym) u szczurów kontrolnych (nieindukowanych (grupy K1, K2) i indukowanych hormonalnie (grupa T)) oraz otrzymujących wyciągi roślinne (grupy TE i TS) i referencyjną substancję – finasteryd (grupa TF) [Tab. 33 a,b.]. W kolejnej tabeli podsumowano wyniki analizy statystycznej uwzględniając średnie wartości dla poszczególnych prób, współczynnik SEM oraz poziomy istotności (test jednoczynnikowy ANOVA) dla poszczególnych grup [Tab. 34.].

Tab. 32. Zestawienie zmian transkrypcji mRNA białek metabolizmu androgenów / estrogenów w płacie brzusznej i grzbietowej prostaty u szczurów:

a) zmiany poziomu mRNA w grupach zwierząt indukowanych testosteronem względem zwierząt kontrolnych

Stosunek badanych grup do grupy kontrolnej	Zmiany poziomu ekspresji analizowanych mRNA w płacie brzuszny prostat szczurów wyrażone w wartościach procentowych [%]					
	SRD5AR1	SRD5AR2	AR	ER1	ER2	CYP19
T/K2	↑723	↑703	↑133	↓24	↑299	↑471
TE/K2	↑333	↑615	↑145	↓15	↑233	↑504
TS/K2	↑644	↑700	↑115	↑16	↑277	↑439
TF/K1	↑33	↑94	↑44	↑9	↑299	↑61
Stosunek badanych grup do grupy kontrolnej	Zmiany poziomu ekspresji analizowanych mRNA w płacie grzbietowym prostat szczurów wyrażone w wartościach procentowych [%]					
	SRD5AR1	SRD5AR2	AR	ER1	ER2	CYP19
T/K2	↑2362	↑1263	↑737	↓2	↑323	↑347
TE/K2	↑217	↑1085	↑633	↑12	↑383	↑297
TS/K2	↑341	↑974	↑779	↑125	↑561	↑348
TF/K1	↑29	↑1100	↑360	↑3%	↑209	↑121

b) zmiany poziomu mRNA w grupach zwierząt indukowanych testosteronem otrzymujących badane ekstrakty (z *Epilobium angustifolium* albo *Serenoa repens* lub finasteryd) względem zwierząt odniesienia, otrzymujących testosteron

Stosunek badanych grup do grupy odniesienia (indukowanej)	Zmiany poziomu ekspresji analizowanych mRNA w płacie brzuszny prostat szczurów wyrażone w wartościach procentowych [%]					
	SRD5AR1	SRD5AR2	AR	ER1	ER2	CYP19
TE/T	↓47	↓11	↑5,1	↑9	↓36	↑5,8
TS/T	↑9,6	↓0,4	↓7,7	↑40	↓22	↓5,6
TF/T	↓68	↑125	↓38	↑33	bez zmian	↓72
Stosunek badanych grup do grupy odniesienia (indukowanej)	Zmiany poziomu ekspresji analizowanych mRNA w płacie grzbietowym prostat szczurów wyrażone w wartościach procentowych [%]					
	SRD5AR1	SRD5AR2	AR	ER1	ER2	CYP19
TE/T	↓87	↓13	↓12	↑14	↑14	↓11
TS/T	↓82	↓18	↑5,0	↑130	↑36	↑0,2
TF/T	↓92	↓97	↓45	↑5,1	↓27	↓51

K1, K2 – kontrolne, nieindukowane hormonalnie grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd. “↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

Tab. 33. Zestawienie uzyskanych wyników pomiaru poziomu ekspresji badanych genów względem odpowiedniej grupy kontrolnej.

Gen	Grupa	Średnia ± SEM (%)	Poziom istotności (P)
AR	K1 płat brzuszny	2,05±0,44	
	K1 płat grzbietowy	5,31±0,25	
	TF płat brzuszny	2,95±0,25	0,083
	TF płat grzbietowy	24,444±3,23	0,001
	K2 płat brzuszny	0,42±0,16	
	K2 płat grzbietowy	5,65±2,84	
	T płat brzuszny	0,98±0,12	0,017
	T płat grzbietowy	47,30±2,99	< 0,001
	TS płat brzuszny	0,90±0,09	0,014
	TS płat grzbietowy	49,69±6,16	< 0,001
	TE płat brzuszny	1,02±0,10	0,007
	TE płat grzbietowy	41,42±4,92	< 0,001
ER-alfa	K1 płat brzuszny	1,34±0,19	
	K1 płat grzbietowy	0,75±0,12	
	TF płat brzuszny	1,50±0,11	0,547
	TF płat grzbietowy	0,77±0,09	0,893
	K2 płat brzuszny	0,70±0,07	
	K2 płat grzbietowy	0,85±0,07	
	T płat brzuszny	0,52±0,06	0,071
	T płat grzbietowy	0,83±0,08	0,859
	TS płat brzuszny	0,80±0,25	0,593
	TS płat grzbietowy	1,91±0,25	0,001
	TE płat brzuszny	0,58±0,07	0,269
	TE płat grzbietowy	0,95±0,11	0,433
ER-beta	K1 płat brzuszny	1,24±0,22	
	K1 płat grzbietowy	0,52±0,13	
	TF płat brzuszny	4,20±0,20	< 0,001
	TF płat grzbietowy	1,61±0,56	< 0,001
	K2 płat brzuszny	0,89±0,14	
	K2 płat grzbietowy	1,95±0,37	
	T płat brzuszny	3,55±0,31	< 0,001
	T płat grzbietowy	8,25±0,97	< 0,001
	TS płat brzuszny	3,36±0,52	< 0,001
	TS płat grzbietowy	10,9±1,137	0,094

	TE płat brzuszny	3,23±0,4	< 0,001
	TE płat grzbietowy	8,27±1,24	0,001
SRD5AR1	K1 płat brzuszny	1,22±0,25	
	K1 płat grzbietowy	2,91±0,70	
	TF płat brzuszny	1,62±0,49	0,476
	TF płat grzbietowy	3,75±0,57	0,329
	K2 płat brzuszny	0,61±0,1	
	K2 płat grzbietowy	1,86±0,44	
	T płat brzuszny	5,1±1,72	< 0,001
	T płat grzbietowy	45,8±8,7	< 0,001
	TS płat brzuszny	4,61±1,43	0,008
	TS płat grzbietowy	8,20±1,37	0,001
	TE płat brzuszny	2,68±0,97	0,061
	TE płat grzbietowy	5,96±1,75	0,036
SRD5AR2	K1 płat brzuszny	3,10±0,69	
	K1 płat grzbietowy	0,27±0,12	
	TF płat brzuszny	6,02±0,59	0,009
	TF płat grzbietowy	3,24±1,16	0,081
	K2 płat brzuszny	0,6±0,15	
	K2 płat grzbietowy	7,71±0,42	
	T płat brzuszny	4,82±0,68	0,001
	T płat grzbietowy	105,1±3,92	< 0,001
	TS płat brzuszny	4,80±1,04	0,004
	TS płat grzbietowy	82,8±4,16	< 0,001
	TE płat brzuszny	4,29±0,82	0,005
	TE płat grzbietowy	91,4±8,25	< 0,001
CYP19	K1 płat brzuszny	1,16±0,17	
	K1 płat grzbietowy	0,56±0,17	
	TF płat brzuszny	1,87±0,19	0,038
	TF płat grzbietowy	1,24±0,44	0,234
	K2 płat brzuszny	0,27±0,12	
	K2 płat grzbietowy	1,11±0,28	
	T płat brzuszny	1,54±0,14	< 0,001
	T płat grzbietowy	4,92±0,73	0,001
	TS płat brzuszny	1,68±0,16	< 0,001
	TS płat grzbietowy	4,93±0,62	< 0,001

	TE płat brzuszny	1,63±0,27	0,001
	TE płat grzbietowy	4,37±1,30	0,023

n=10 szczurów w każdej grupie

Przedstawiono średnie wartości dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM.

Wartości $p \leq 0,05$ (pogrubione) uznano za statystycznie istotne względem odpowiedniej grupy kontrolnej.

K1, K2 – kontrolne, nieindukowane hormonalnie grupy zwierząt; K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron (s.c.); TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

4.3.3. Zmiany poziomu transkrypcji wybranych mRNA genów genomowej i niegenomowej drogi działania androgenów

4.3.3.1. Zmiany poziomu transkryptów genomowego i niegenomowego szlaku sygnalizacji androgenów w płacie brzuszny prostaty szczurów

4.3.3.1.1. Zmiany poziomu transkrypcji mRNA p68 i Arip4 – przedstawicieli genomowego szlaku działania androgenów

Analizując zmiany ekspresji dla mRNA w brzusznej płacie prostaty u zwierząt niepoddanych zabiegowi indukcji hormonalnej, otrzymujących ekstrakt z zioła *Epilobium angustifolium* (grupa E) nastąpiło nieznamiennie podwyższenie poziomu mRNA czynnika p68 o 138% ($p=0,139$), natomiast poziom mRNA czynnika Arip4 uległ istotnemu podwyższeniu o 530% ($p=0,001$), w stosunku do szczurów kontrolnych (grupa K2) [Tab. 34]. U szczurów otrzymujących wyciąg z owoców *Serenoa repens* (grupa S) nastąpiła nieznamienna indukcja transkrypcji mRNA czynnika p68 o 132% ($p=0,111$), w odniesieniu do grupy kontrolnej (grupa K2). Z kolei ilość transkryptów Arip4 w tej grupie uległa istotnemu obniżeniu o 81% ($p=0,037$), względem szczurów K2. Indukcja transkrypcji mRNA p68 w grupie E była o 6,1% wyższa, aniżeli obserwowana w grupie S, natomiast różnica w poziomie transkryptów Arip4 pomiędzy grupami zwierząt E i S była znamienna i wyniosła 611%.

U szczurów T stwierdzono bardzo znaczne podwyższenie poziomu mRNA p68, tj. o 1378% względem szczurów K2 ($p<0,001$), podczas gdy ilość transkryptów Arip4 uległa jeszcze bardziej znacznemu, istotnemu podwyższeniu, bo o 35410% ($p=0,017$). U pozostałych szczurów indukowanych hormonalnie, otrzymujących wyciągi (tj. TE, TS) lub łącznie z finasterydem (TFE, TFS) oraz u szczurów TF nastąpiło znaczne podwyższenie poziomu badanych transkryptów (w szczególności Arip4), w odniesieniu do odpowiednich szczurów kontrolnych.

Przyjmując jako grupę odniesienia szczury T rozkład zmian poziomu transkryptów p68 i Arip4 w poszczególnych grupach zwierząt przedstawiał się w następujący sposób.

U szczurów TE nastąpiło obniżenie poziomu mRNA p68 o 31,4%, w stosunku do szczurów T ($p \leq 0,05$). Podobnie w grupie TS również doszło do znamiennej redukcji poziomu mRNA p68, tj. o

49,1%, względem grupy T ($p < 0,01$). Dla mRNA Arip4 u szczurów TE poziom tego transkryptu uległ nieznamienemu obniżeniu o 10%, a w grupie TS był niższy, choć nieistotnie statystycznie o 22,9%, w odniesieniu do szczurów T.

U zwierząt TF nastąpiło obniżenie poziomu mRNA p68 o 58,6%, względem szczurów T ($p = 0,002$). Natomiast dla tej samej grupy zwierząt poziom mRNA czynnika Arip4 uległ redukcji o 51,3%, w porównaniu do szczurów T ($p = 0,011$). Obecność wyciągu z *E. angustifolium* u szczurów w grupie TE spowodowała obniżenie ilości transkryptu p68 w stopniu o 17,7% mniejszym aniżeli obserwowane u zwierząt TS i o 27,2% słabiej niż w grupie TF. Dla czynnika Arip4 szczury TE wykazywały 12,9% słabsze działanie niż TS i 41,3% niż zwierzęta w grupie TF.

U zwierząt TFE nastąpiło statystycznie nieznamienne obniżenie ilości transkryptów p68 o 11,4%, względem szczurów T. Natomiast u szczurów TFS nastąpiło również obniżenie, aczkolwiek istotne statystycznie, ilości transkryptów p68 o 67,6% ($p = 0,002$). Obecność finasterydu u szczurów TFE spowodowała obniżenie ilości transkryptów p68 w stopniu o 20% mniejszym niż u zwierząt TE, choć różnica ta nie była znamienna. Z kolei obecność finasterydu w grupie TFS spowodowała obniżenie procesu transkrypcji mRNA czynnika p68 w stopniu o 18,5% większym niż u zwierząt TS, choć i w tym przypadku różnica otrzymanych średnich wartości nie osiągnęła znamienności statystycznej.

Analizując otrzymane dane dla zwierząt TFE zauważono, że nastąpiło obniżenie poziomu mRNA czynnika Arip4 o 45,6%, względem szczurów T, a w grupie TFS obniżenie ilości transkryptów sięgało wartości 18,8%, choć w obu przypadkach otrzymane różnice nie były znamienne. Obecność finasterydu w grupie TFE spowodowała obniżenie poziomu mRNA w stopniu o 35,6% bardziej znaczącym niż u zwierząt TE ($p \leq 0,05$). Z kolei obecność finasterydu u szczurów TFS w nieznacznym nieistotnym statystycznie stopniu spowodowała zmianę transkrypcji badanego mRNA, w porównaniu do zwierząt TS - nastąpiła redukcja poziomu mRNA w stopniu o 4,1% mniejszym niż u szczurów TS.

Tab. 34. Zestawienie zmian transkrypcji wybranych mRNA genomowego szlaku działania androgenów w płacie brzuszny szczurzych prostat.

Grupa	<i>p68</i> [%]	<i>p68</i> Średnia±SEM	P	<i>Arip4</i> [%]	<i>Arip4</i> Średnia±SEM	P
K1	100%	1,1±0,4		100%	1,1±0,3	
K2	100%	1,1±0,4		100%	1,0±0,3	
E/K2	↑ 138	2,7±0,9	0,139	↑ 530	6,4±1,0	0,001
S/K2	↑ 132	2,6±0,8	0,111	↓ 81	0,19±0,01	0,037
T/K2	↑ 1378	16,8±1,9	<0,001	↑ 35410	362±140	0,017
TE/K2	↑ 914	11,6±1,9	<0,001	↑ 31857	326±47	<0,001
TS/K2	↑ 653	8,6±1,6	0,001	↑ 27290	279±32	<0,001
TF/K1	↑ 518	6,9±1,5	0,002	↑ 16228	176±55	0,011
TFE/K2	↑ 12010	14,9±1,2	0,001	↑ 19211	197±16	<0,001
TFS/K2	↑ 379	5,4±1,0	0,002	↑ 28723	294±112	0,041
Porównanie w stosunku do grupy indukowanej testosteronem						
E/T	↓ 83,9%		↓ 98,2%			
S/T	↓ 84,3%		↓ 99,9%			
TE/T	↓ 31,4%		↓ 10,0%			
TS/T	↓ 49,1%		↓ 22,9%			
TF/T	↓ 58,6%		↓ 51,3%			
TFE/T	↓ 11,4%		↓ 45,6%			
TFS/T	↓ 67,6%		↓ 18,8%			

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt (poziom mRNA = 100%): K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; E – zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Epilobium angustifolium*; S – zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Serenoa repens*; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd; TFE - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium* i oraz finasteryd; TFS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens* oraz finasteryd.

Wartości $p \leq 0,05$ przyjęto jako statystycznie znamienne (pogrubione wartości).

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.3.1.2. Zmiany poziomu transkrypcji mRNA RafA, Mapk1, Mapk3 – przedstawicieli niegenomowego szlaku działania androgenów

Analiza profilu transkrypcji mRNA czynników RafA, Mapk1, Mapk3 w brzuszny płacie szczurzych prostat wskazuje na następujące zmiany ich poziomu w poszczególnych grupach [Tab. 35]. W grupie E nastąpiło znamienne statystycznie podwyższenie poziomu mRNA czynnika RafA o 114,6% ($p \leq 0,05$, natomiast poziom mRNA kinaz Mapk1 i Mapk3 uległ znacznemu podwyższeniu, kolejno o: 540% ($p=0,009$) i 464% ($p=0,017$), w stosunku do szczurów kontrolnych (grupa K2).

U szczurów S nastąpiła indukcja transkrypcji mRNA czynnika RafA oraz kinaz Mapk1 i Mapk3 kolejno o 153% ($p=0,016$), 574% ($p=0,001$) i 631% ($p=0,001$), względem grupy K2. Indukcja transkrypcji mRNA RafA w grupie E była o 38,5% niższa aniżeli obserwowana w grupie S. W

grupie E indukcja transkrypcji mRNA Mapk1 i Mapk3 była kolejno o 34% i 166% mniej znacząca w porównaniu do szczurów S. We wszystkich przypadkach otrzymane różnice między szczurami S i E nie osiągnęły znamienności statystycznej.

U szczurów T stwierdzono znaczące podwyższenie poziomu mRNA czynników RafA, Mapk1 i Mapk3, kolejno o 403% ($p<0,001$), 1404% ($p=0,007$) i 1851% ($p<0,001$), względem kontrolnych szczurów K2.

U pozostałych szczurów indukowanych hormonalnie, tj. w grupach TE, TS, TF, TFE, TFS nastąpiło znaczne znamienne podwyższenie poziomu badanych transkryptów (w szczególności Mapk1 i Mapk3) [Tab. 35].

Przyjmując jako grupę odniesienia szczury T rozkład zmian ilości transkryptów RafA, Mapk1 i Mapk3 w poszczególnych grupach zwierząt przedstawiał się w następujący sposób. U szczurów TE nastąpiło nieznamienne obniżenie poziomu mRNA czynnika RafA o 13,1%, w stosunku do szczurów T. Podobnie, w grupie TS doszło do nieistotnego statystycznie obniżenia ilości badanego transkryptu o 8,9%, względem szczurów T. U szczurów TE doszło do 4,2% silniejszej indukcji transkrypcji RafA niż w przypadku zwierząt TS, ale różnica ta nie była znamienna.

Odmienny profil transkrypcji w obu grupach zwierząt wystąpił w przypadku genów kodujących kinazy Mapk1 i Mapk3. U szczurów TE nastąpiło podwyższenie, choć nieznamienne, ilości transkryptów Mapk1 o 51,6%, względem szczurów T. Poziom mRNA Mapk1 w grupie TS również uległ nieznamiennemu podwyższeniu o 43,6%. Obecność ekstraktu z *E. angustifolium* u szczurów TE spowodowała indukcję mRNA Mapk1 o 8% wyższą niż obserwowana w grupie zwierząt TS, choć różnice te były nieznamienne. U szczurów TE i TS nastąpiło nieznamienne podwyższenie ilości transkryptów Mapk3, kolejno o 20% i 29,6%, w odniesieniu do szczurów T. Obecność ekstraktu z *E. angustifolium* (grupa TE) spowodowała indukcję mRNA Mapk3 o 9,6% niższą niż obserwowana w grupie TS.

U zwierząt TF poziom mRNA czynnika RafA praktycznie nie uległ zmianie – nastąpiło bardzo nieznaczące nieistotne statystycznie obniżenie ilości transkryptów (o 0,6%), względem szczurów T. Poziom mRNA kinazy Mapk1 w tej grupie zwierząt uległ z kolei znacznemu podwyższeniu - o 120%, w sposób znamienny statystycznie ($p<0,05$). Natomiast zawartość transkryptów Mapk3 uległa nieznamiennemu obniżeniu o 9,7%. W odniesieniu do szczurów T, u zwierząt TE nastąpiła o 12,5% silniejsza inhibicja transkrypcji RafA mRNA niż w przypadku zwierząt TF, choć nie były to różnice znamienne. W porównaniu do szczurów TF, u zwierząt TE wystąpiła o 68,4% mniejsza indukcja transkrypcji mRNA kinazy Mapk1. W przypadku transkryptów Mapk3 różnica w profilu transkrypcji między ww. grupami zwierząt wyniosła 57%. W obu tych ostatnich porównaniach różnice nie osiągnęły znamienności statystycznej.

Analizując wyniki łącznego podawania ekstraktów z finasterydem u zwierząt otrzymujących testosteron zauważono, że u szczurów TFE nastąpiło znamienne podwyższenie ilości transkryptów RafA o 70,1%, względem szczurów T ($p < 0,001$). Natomiast u szczurów TFS nastąpiło nieistotne statystycznie obniżenie ilości tego transkryptu o 22,1%. Obecność finasterydu u szczurów TFE spowodowała podwyższenie ilości transkryptów RafA o 92,2% bardziej znacząco i znamienne niż u zwierząt TFS ($p < 0,05$). Obecność finasterydu u szczurów TFE spowodowała istotne podwyższenie ilości transkryptów RafA o 57% bardziej znacząco niż w grupie TE ($p < 0,05$).

U szczurów TFE nastąpiło istotne podwyższenie ilości transkryptów Mapk1 i Mapk3, kolejno znamienne o 94,1% ($p = 0,005$) i nieznamienne o 71,3% ($p = 0,212$), względem szczurów T. U indukowanych szczurów TFS również nastąpiło nieznamienne obniżenie poziomu mRNA Mapk1 i podwyższenie Mapk3, kolejno o 32,8% i 12,7%. Obecność finasterydu u szczurów TFE spowodowała podwyższenie ilości transkryptów Mapk1 o 127% bardziej znacząco i znamienne niż u zwierząt TFS. Obecność finasterydu u szczurów TFE spowodowała podwyższenie ilości transkryptów Mapk3 o 58,3% w większym stopniu niż u zwierząt TFS, ale otrzymana różnica nie była znamienne. Ponadto, u szczurów TFE nastąpiła indukcja transkrypcji mRNA Mapk1 w stopniu o 37,5% silniejszym niż obserwowana w grupie TE. Indukcja transkrypcji mRNA Mapk3 u szczurów TFE wystąpiła na poziomie o 51,3% wyższym aniżeli obserwowana w grupie TE. W obu przypadkach jednak różnice nie osiągnęły znamienności statystycznej. U szczurów TFS poziom mRNA Mapk1 uległ obniżeniu o 53% aniżeli obserwowany w grupie TS ($p < 0,05$). W grupie TFS indukcja transkrypcji mRNA Mapk3 była w stopniu o 13% niższym niż u szczurów TS i nie różniła się znamienne.

Tab. 35. Zestawienie zmian transkrypcji wybranych mRNA szlaku niegenomowego działania androgenów w płacie brzusznej prostaty u szczurów

Grupa	<i>RafA</i> mRNA	Średnia± SEM	P	<i>Mapk1</i> mRNA	Średnia± SEM	P	<i>Mapk3</i> mRNA	Średnia± SEM	P
K1	100%	0,90±0,10		100%	1±0,15		100%	0,72±0,12	
K2	100%	1,03±0,32		100%	0,72±0,06		100%	0,50±0,12	
E/K2	↑ 114%	2,20±0,50	0,076	↑ 540%	4,61±1,30	0,009	↑ 466%	2,83±0,90	0,017
S/K2	↑ 152%	2,60±0,46	0,016	↑ 574%	4,85±1,10	0,001	↑ 634%	3,67±0,78	0,001
T/K2	↑ 403%	5,18±0,74	<0,001	↑ 1404%	10,83±3,02	0,007	↑ 1858%	9,79±2,28	0,001
TE/K2	↑ 337%	4,50±0,47	<0,001	↑ 2176%	16,39±3,51	<0,001	↑ 2252%	11,76±1,53	<0,001
TS/K2	↑ 358%	4,72±0,77	0,001	↑ 2062%	15,57±2,93	<0,001	↑ 2440%	12,7±1,76	<0,001
TF/K1	↑ 472%	5,15±0,56	<0,001	↑ 2285%	23,85±4,94	<0,001	↑ 1128%	8,84±1,04	<0,001
TFE/ K2	↑ 755%	8,81±0,42	<0,001	↑ 2822%	21,04±1,92	0,005	↑ 3256%	16,78±4,86	<0,001
TFS/ K2	↑ 302%	4,14±0,44	<0,001	↑ 912%	7,29±2,18	0,008	↑ 2108%	11,04±1,37	<0,001
Porównanie w stosunku do grupy indukowanej testosteronem									
E/T	↓ 57,5%			↓ 57,4%			↓ 71,1%		
S/T	↓ 49,8%			↓ 55,2%			↓ 62,5%		
TE/T	↓ 13,1%			↑ 51,3%			↑ 20,1%		
TS/T	↓ 9,0%			↑ 43,8%			↑ 29,7%		
TF/T	↓ 0,6%			↑ 120%			↓ 9,7%		
TFE/T	↑ 70,0%			↑ 94,3%			↑ 71,4%		
TFS/T	↓ 20,1%			↑ 32,7%			↑ 12,8%		

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt (poziom mRNA = 100%): K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup;; E – zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Epilobium angustifolium*; S – zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Serenoa repens*; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd; TFE - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium* i oraz finasteryd; TFS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens* oraz finasteryd.

Wartości $p \leq 0,05$ przyjęto jako statystycznie znamienne (pogrubione wartości).

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.3.2. Zmiany poziomu transkryptów genomowego i niegenomowego szlaku sygnalizacji androgenów w płacie grzbietowym szczurzych prostat

4.3.3.2.1. Zmiany poziomu transkrypcji mRNA p68 i Arip4 – przedstawicieli genomowego szlaku działania androgenów

Oceniając zmiany transkrypcji mRNA w grzbietowym płacie prostaty u zwierząt E nastąpiło nieznamiennie statystycznie podwyższenie poziomu mRNA czynnika p68 o 189% ($p=0,118$), z kolei poziom mRNA czynnika Arip4 uległ podwyższeniu w sposób statystycznie istotny o 67% ($p=0,001$), w stosunku do szczurów K2 [Tab. 36]. U szczurów grupy S nastąpiła nieznamienna

indukcja transkrypcji mRNA czynnika p68 o 220% ($p=0,090$). Ilość transkryptów Arip4 w tej grupie uległa nieznamniennemu obniżeniu o 42% ($p=0,308$), względem szczurów kontrolnych K2. Indukcja transkrypcji mRNA p68 w grupie E była o 39% niższa, aniżeli obserwowana u szczurów S. Różnica w poziomie transkryptów Arip4 pomiędzy grupami szczurów E i S wyniosła 109%.

U szczurów T stwierdzono znaczne podwyższenie poziomu mRNA p68, tj. o 2692% ($p<0,001$), względem szczurów K2. Ilość transkryptów Arip4 również uległa znacznemu znamniennemu podwyższeniu, tj. o 1399% ($p=0,017$). U pozostałych szczurów, tj. TE, TS, TF oraz TFE i TFS nastąpiło znaczne podwyższenie poziomu badanych transkryptów (w szczególności p68), względem szczurów K2. Przyjmując jako grupę odniesienia szczury T rozkład zmian poziomu transkryptów p68 i Arip4 w poszczególnych grupach zwierząt przedstawiał się w następujący sposób. U szczurów E i S ilość transkryptów p68 była na znacznie niższym poziomie, tj. niższym kolejno o 89,9% ($p<0,001$) i 88,5% ($p<0,001$). Podobnie, ilość transkryptów Arip4 w obu grupach była niższa kolejno o 88,9% ($p<0,05$) i 96,1% ($p<0,05$). U szczurów TE nastąpiło nieznamienne obniżenie poziomu mRNA p68 o 10,6% i tak samo w grupie TS poziom mRNA czynnika p68 praktycznie nie uległ zmianie – nastąpiło nieistotne statystycznie obniżenie poziomu mRNA o 2,3%, względem T. Dla czynnika Arip4 u szczurów TE i TS poziom mRNA uległ nieznamienne obniżeniu kolejno o 36,7% i 40,7%, w odniesieniu do szczurów T. W grupie zwierząt TE nastąpiła inhibicja transkrypcji mRNA p68 w stopniu o 8,3% większym niż w przypadku TS, choć różnica nie była znamniennie statystycznie. Z kolei u szczurów TE obniżenie poziomu mRNA Arip4 było o 4% mniejsze niż w przypadku szczurów TS, a różnice były również nieistotne.

U zwierząt TF nastąpiło istotne obniżenie poziomu mRNA czynnika p68 o 80% ($p=0,001$), a poziom mRNA czynnika Arip4 uległ podobnemu obniżeniu, tj. o 88% w porównaniu do grupy T ($p<0,05$). Obecność wyciągu z *E. angustifolium* u szczurów TE spowodowała obniżenie poziomu mRNA czynnika p68 w stopniu o 69,3% mniejszym aniżeli obserwowane u szczurów TF. Również u zwierząt TS doszło do mniej znaczącego obniżenia poziomu transkryptów p68 w stosunku do grupy TF. Różnica w tym przypadku pomiędzy obiema grupami wyniosła 77,6%. U szczurów TE doszło do 51,7% mniej znaczącej redukcji poziomu mRNA Arip4 w porównaniu do zwierząt TF. Różnica w poziomie mRNA Arip4 pomiędzy grupami TS i TF była zbliżona do wartości wspomnianej powyżej.

U szczurów TFE i TFS nastąpiło znamienne obniżenie ilości transkryptów p68, kolejno o 49% ($p<0,05$) i o 55% ($p<0,05$), względem szczurów T. Obecność finasterydu u szczurów TFE spowodowała obniżenie ilości transkryptów p68 w stopniu o 38,9% bardziej znaczącym niż u zwierząt TE. Z kolei obecność finasterydu u szczurów TFS spowodowała inhibicję transkrypcji mRNA czynnika p68 w stopniu o 52,9% większym niż u zwierząt TS.

U szczurów TFE i TFS nastąpiło nieznamiennie obniżenie poziomu mRNA czynnika Arip4, kolejno o 62,4% i 46%, względem szczurów T. Obecność finasterydu u szczurów TFE spowodowała obniżenie ilości transkryptów Arip4 w stopniu o 25,7% większym niż u zwierząt TE. Z kolei obecność finasteryd u szczurów TFS w nieznacznym stopniu spowodowała zmianę transkrypcji badanego mRNA w porównaniu do zwierząt TS - redukcja poziomu mRNA wyniosła 5,3%.

Tab. 36. Zestawienie zmian transkrypcji wybranych mRNA genomowego szlaku działania androgenów w płacie grzbietowym szczurzych prostat

Grupa	<i>p68</i> [%]	<i>p68</i> Średnia±SEM	P	<i>Arip4</i> [%]	<i>Arip4</i> Średnia±SEM	P
K1	100	0,9±0,2		100%	2,6±0,6	
K2	100	1,1±0,1		100%	5,1±1,6	
E/K2	↑ 181	3,1±1,1	0,118	↑ 67	8,5±4,1	0,001
S/K2	↑ 220	3,5±1,2	0,09	↓ 42	2,9±1,3	0,308
T/K2	↑ 2692	30,7±6,1	<0,001	↑ 1399	76,7±26,4	0,017
TE/K2	↑ 2397	27,5±6,9	0,002	↑ 849	48,6±14,2	0,009
TS/K2	↑ 2627	30,0±10,1	0,009	↑ 879	45,5±12,3	0,003
TF/K1	↑ 584	6,2±1,3	0,001	↑ 244	8,9±4,4	0,408
TFE/K2	↑ 1310	15,5±2,9	<0,001	↑ 464	28,9±4,7	<0,001
TFS/K2	↑ 1152	13,8±2,8	<0,001	↑ 718	41,8±11,1	<0,001
Porównanie w stosunku do grupy indukowanej testosteronem						
E/T		↓ 89,9%			↓ 88,9%	
S/T		↓ 88,5%			↓ 96,1%	
TE/T		↓ 10,6%			↓ 36,7%	
TS/T		↓ 2,3%			↓ 40,7%	
TF/T		↓ 79,9%			↓ 88,4%	
TFE/T		↓ 49,5%			↓ 62,4%	
TFS/T		↓ 55,2%			↓ 46,0%	

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt (poziom mRNA = 100%): K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup;; E – zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Epilobium angustifolium*; S – zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Serenoa repens*; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd; TFE - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium* i oraz finasteryd; TFS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens* oraz finasteryd.

Wartości $p \leq 0,05$ przyjęto jako statystycznie znamienne (pogrubione wartości)

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.3.3.2.2. Zmiany poziomu transkrypcji mRNA RafA, Mapk1, Mapk3 – przedstawicieli niegenomowego szlaku działania androgenów

Analizując zmiany poziomu transkrypcji mRNA RafA, Mapk1, Mapk3 jako przedstawicieli niegenomowego szlaku działania androgenów zauważono, że u zwierząt E nastąpiło znamienne podwyższenie poziomu mRNA czynnika RafA o 117% w odniesieniu do szczurów kontrolnych K2 ($p=0,001$) [Tab. 37]. Poziom mRNA kinazy Mapk3 uległ nieznacznemu podwyższeniu, tj. o 6% ($p=0,912$). Nastąpiła ponadto nieznamienna statystycznie inhibicja transkrypcji mRNA kinazy Mapk1 o 28% ($p=0,451$).

U szczurów S nastąpiła indukcja transkrypcji mRNA czynnika RafA o 154%, w odniesieniu do grupy K2 ($p=0,001$). Z kolei ilość transkryptów Mapk1 i Mapk3 w tej grupie uległa podwyższeniu, kolejno o 30% (nieznamiennie - $p=0,333$) i istotnie o 188% ($p=0,001$). Indukcja transkrypcji mRNA RafA u szczurów E była o 36% niższa niż u szczurów S, choć różnica nie była znamienne. Z kolei dla transkrypcji mRNA Mapk3 w grupie E stwierdzono mniej znaczącą tj. o 182% i słabo istotną statystycznie ($p<0,1$), indukcję transkrypcji, względem zwierząt S. Różnica w poziomie mRNA Mapk1 między grupami E i S również była znamienne ($p\leq 0,05$) i wyniosła 57%.

U szczurów T stwierdzono znaczące znamienne podwyższenie poziomu mRNA czynników RafA, Mapk1 i Mapk3, kolejno o 1133% ($p<0,001$), 1745% ($p<0,001$) i 6001% ($p<0,001$), względem szczurów K2.

U pozostałych zwierząt otrzymujących testosteron w kombinacji z wyciągami i / lub z finasterydem tj. TE, TF, TS, TFE i TFS nastąpiło znaczne podwyższenie poziomu badanych transkryptów (w szczególności Mapk1 i Mapk3), w odniesieniu do odpowiednich szczurów kontrolnych [Tab. 36.].

Przyjmując jako grupę odniesienia szczury T rozkład zmian ilości transkryptów RafA, Mapk1 i Mapk3 w poszczególnych grupach zwierząt przedstawiał się w następujący sposób. U szczurów TE nastąpiło niewielkie nieznamienne obniżenie poziomu mRNA czynnika RafA o 5%, w odniesieniu do szczurów T. Dla zwierząt TS doszło również do nieznamiennego, nieznacznego podwyższenia ilości badanego transkryptu, tj. o 6,6%, względem szczurów T. Reasumując zwierzęta TE różniły się wobec TS o 12% i 1,6% nieznamiennie poziomem transkrypcji mRNA RafA.

Nieco silniejsza inhibicja transkrypcji w obu grupach zwierząt wystąpiła w przypadku genów kodujących kinazy Mapk1 i Mapk3. U szczurów TE i TS nastąpiło nieznamienne obniżenie ilości transkryptów Mapk1, kolejno o 18,6% i 36%. Stąd obecność ekstraktu z *E. angustifolium* w grupie TE spowodowała inhibicję transkrypcji mRNA Mapk1 w stopniu o 17,4% słabszym niż u szczurów TS. U szczurów TE nastąpiło istotne obniżenie ilości transkryptów Mapk3 o 46% w odniesieniu do szczurów T ($p<0,001$). Zawartość ww. transkryptów w grupie TS praktycznie nie uległa zmianie – nastąpiło nieznamienne obniżenie poziomu mRNA Mapk3 o 0,5% a więc

obecność ekstraktu z *E. angustifolium* u szczurów TE spowodowała zahamowanie transkrypcji mRNA Mapk3 w stopniu o 45,5% bardziej znaczącym w porównaniu do zwierząt TS ($p < 0,001$).

Analizując działanie finasterydu u szczurów otrzymujących testosteron zauważono, że nastąpiło obniżenie poziomu mRNA czynnika RafA o 52,3%, względem grupy T ($p < 0,05$). Poziom mRNA kinazy Mapk1 w tej grupie zwierząt uległ znamienne obniżeniu o 59,3% ($p < 0,05$). Również zawartość transkryptów Mapk3 uległa obniżeniu, tj. o 62,3%, w sposób istotny statystycznie ($p < 0,05$).

W odniesieniu do szczurów T, u zwierząt TE nastąpiła o 47,3% mniej znacząca, ale istotna inhibicja transkrypcji RafA mRNA niż w przypadku szczurów TF ($p < 0,05$). Podobnie, w porównaniu do szczurów TF, u szczurów TE wystąpiła o 40,7% mniej znacząca i nieznamienne indukcja transkrypcji mRNA kinazy Mapk1. Natomiast w przypadku transkryptów Mapk3 różnica w profilu transkrypcji między ww. grupami zwierząt była nieznamienne najmniejsza i wyniosła 16,3%.

U zwierząt TFE nastąpiło znamienne obniżenie ilości transkryptów RafA o 49,3%, względem szczurów T ($p < 0,05$). Podobnie u szczurów TFS nastąpiło obniżenie ilości transkryptów o 43,4%, także w sposób znamienno statystycznie ($p < 0,05$). Obecność finasterydu u szczurów TFE spowodowała zmniejszenie ilości transkryptów RafA o 5,3% bardziej niż u zwierząt TFS, choć otrzymana różnica nie była znamienne statystycznie. Względem szczurów TE nastąpiło obniżenie poziomu mRNA czynnika RafA w stopniu o 44,3% mniej znaczącym niż u zwierząt TFE a różnica była znamienne statystycznie ($p \leq 0,05$).

U szczurów TFE nastąpiło znamienne obniżenie poziomu transkryptów Mapk1 i Mapk3, kolejno o 56,5% ($p < 0,05$) i 86,8% ($p < 0,05$), względem szczurów T. U zwierząt TFS również nastąpiło obniżenie poziomu mRNA Mapk1 i Mapk3, kolejno o 70,8% ($p < 0,05$) i 95,4% (nieznamienne- $p = 0,193$). Obecność finasterydu u szczurów TFE spowodowała obniżenie ilości transkryptów Mapk1 o 14,3% (różnica nieznamienne) mniej, a dla ilości transkryptów Mapk3 o 47,9% mniej znacząco niż u zwierząt TFS (różnica znamienne - $p < 0,001$).

U szczurów TFE nastąpiła redukcja poziomu mRNA Mapk1 w stopniu o 37,9% bardziej znaczącym niż u zwierząt TE, chociaż otrzymana różnica nie była znamienne statystycznie. Z kolei różnica wpływu sumarycznego działania finasterydu i wyciągu z *E. angustifolium* na poziom mRNA Mapk3 była bardzo niewielka (1,5%) w porównaniu do grupy TE.

W grupie TS poziom mRNA Mapk1 uległ redukcji w stopniu o 34,8% mniej znaczącym niż u zwierząt TFS, ale otrzymana różnica nie była znamienne statystycznie. Z kolei redukcja ilości transkryptów Mapk3 u szczurów TS była w stopniu o 94,9% mniej znaczącym niż u szczurów TFS, a otrzymana różnica działania była istotna statystycznie ($p < 0,001$).

Tab. 37. Zestawienie zmian transkrypcji wybranych mRNA szlaku niegenomowego działania androgenów w płacie grzbietowym prostaty u szczurów.

Grupa	<i>RafA</i> [%]	<i>RafA</i> Średnia± SEM	P	<i>Mapk1</i> [%]	<i>Mapk1</i> Średnia± SEM	P	<i>Mapk3</i> [%]	<i>Mapk3</i> Średnia± SEM	P
K1	100	1,3±0,2		100	0,8±0,1		100	1,4±0,5	
K2	100	0,6±0,1		100	1,0±0,3		100	0,8±0,4	
E/K2	↑ 117	1,3±0,1	0,001	↓ 28	0,7±0,2	0,451	↑ 6	0,9±0,8	0,912
S/K2	↑ 153	1,5±0,2	0,001	↑ 30	1,3±0,2	0,333	↑ 188	2,4±0,1	0,001
T/K2	↑ 1133	7,4±1,5	<0,001	↑ 1745	18,1±3,6	<0,001	↑ 6001	51,2±6,9	<0,001
TE/K2	↑ 1072	7,0±1,5	<0,001	↑ 1401	14,7±4,2	0,006	↑ 3200	27,7±2,8	<0,001
TS/K2	↑ 1215	7,9±1,7	<0,001	↑ 1082	11,6±4,2	0,007	↑ 5969	51,0±2,7	0,001
TF/K1	↑ 176	3,5±0,6	0,001	↑ 832	7,4±1,8	0,003	↑ 1282	19,3±12,5	0,062
TFE/K 2	↑ 525	3,7±0,5	<0,001	↑ 703	7,9±2,1	0,006	↑ 3105	26,9±5,0	<0,001
TFS/K 2	↑ 598	4,2±1,6	<0,001	↑ 439	5,3±2,7	0,113	↑ 271	2,4±0,4	0,014
Porównanie w stosunku do grupy indukowanej testosteronem (kontrolnej)									
E/T	↓ 82,4%			↓ 96,1%			↓ 98,3%		
S/T	↓ 79,5%			↓ 93,0%			↓ 95,3%		
TE/T	↓ 5,0%			↓ 18,6%			↓ 46,0%		
TS/T	↑ 6,6%			↓ 36,0%			↓ 0,50%		
TF/T	↓ 52,3%			↓ 59,3%			↓ 62,2%		
TFE/T	↓ 49,3%			↓ 59,5%			↓ 47,5%		
TFS/T	↓ 43,4%			↓ 70,8%			↓ 95,4%		

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt (poziom mRNA = 100%): K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup;; E – zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Epilobium angustifolium*; S – zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Serenoa repens*; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd; TFE - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium* i oraz finasteryd; TFS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens* oraz finasteryd.

Wartości $p \leq 0,05$ przyjęto jako statystycznie znamienne (pogrubione wartości)

“↑” – podwyższenie poziomu badanego mRNA; “↓” - obniżenie poziomu badanego mRNA.

4.4. Analiza zmian hormonalnych w surowicy zwierząt

4.4.1. Zmiany poziomu wolnego testosteronu pod wpływem badanych wyciągów roślinnych i finasterydu

Analizując wyniki wpływu stosowanych wyciągów roślinnych i finasterydu na zmiany poziomu wolnego testosteronu stwierdzono, że stężenia tego hormonu w surowicy zwierząt kontrolnych (grupy K1, K2) wynosiły odpowiednio 0,18 ng/ml i 0,62 ng/ml i stanowiły punkt odniesienia dla pozostałych grup zwierząt [Tab. 38]. W celu dokonania oceny stopnia zmian stężeń w grupach zwierząt indukowanych hormonalnie stężeniom wyjściowym zmierzonym u szczurów kontrolnych przypisano wartości 100% [Tab. 38]. U szczurów T stężenie hormonu wynosiło 17,9 ng/ml, co stanowiło 2800% wzrost w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p < 0,001$). Najwyższe stężenie wolnego testosteronu, wynoszące 48,4 ng/ml, stwierdzono w grupie zwierząt TE i stanowiło ono 7722% wzrost w stosunku do kontroli K2 ($p < 0,001$). Stężenie hormonu w tej grupie było o 4922% wyższe niż obserwowane u zwierząt T.

U zwierząt TS albo TF stężenia testosteronu wynosiły odpowiednio 15,8 ng/ml ($p < 0,001$) oraz 16,6 ng/ml ($p < 0,001$). W grupach tych nastąpiło podwyższenie poziomu hormonu odpowiednio o 2455% i 2586,5%, w odniesieniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych. W porównaniu do szczurów K2, u zwierząt TS podwyższenie poziomu wolnego testosteronu było o 5267% niższe niż u zwierząt TE. Z kolei w grupie TF wzrost stężenia był o 5136% mniej znaczący niż obserwowany u szczurów TE. Przyjmując jako grupę odniesienia szczury T zaobserwowano następujące zależności. U szczurów TE nastąpił wzrost stężenia o 170% ($p < 0,001$). U zwierząt TS albo TF kolejno o 11,9% i 7,35% względem grupy T. U szczurów TE zauważono podwyższenie poziomu testosteronu o 182% bardziej znacząco niż obserwowana zmiana jaka wystąpiła w grupie zwierząt TS. Obecność ekstraktu z *S. repens* spowodowała niewielkie obniżenie stężenia hormonu w sposób o 4,54%, w porównaniu do zwierząt TF.

Tab. 38. Zmiany poziomu wolnego testosteronu w surowicy u szczurów pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu.

Grupy:	Stężenia wolnego testosteronu (średnia ± SEM) [ng/ml]	Procentowa [%] zawartość wolnego testosteronu odpowiadająca stężeniom
K1	0,18±0,02	100
K2	0,62±0,09	100
T	17,94±0,05	2900
TE	48,40±3,76	7822
TS	15,81±0,89	2555
TF	16,62±0,89	2686
Porównanie grup badanych w stosunku do grup kontrolnych		
Stosunek grup	Zmiany stężenia wolnego testosteronu wyrażone w wartościach procentowych	
T/K2	↑ 2800	
TE/K2	↑ 7722	
TS/K2	↑ 2455	
TF/K1	↑ 2586	
Porównanie grup badanych w stosunku do grupy indukowanej testosteronem		
Stosunek grup	Zmiany stężenia wolnego testosteronu wyrażone w wartościach procentowych	
TE/T	↑ 170	
TS/T	↓ 11,9	
TF/T	↓ 7,4	

n=10 szczurów w każdej grupie

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup;; T – zwierzęta otrzymujące testosteron (s.c.); TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego hormonu; “↓” - obniżenie poziomu badanego hormonu.

4.4.2. Zmiany poziomu wolnego dihydrotestosteronu pod wpływem badanych wyciągów roślinnych i finasterydu

Oceniając zmiany poziomu wolnego dihydrotestosteronu (DHT) pod wpływem badanych wyciągów roślinnych i finasterydu zauważono, że w zastosowanym układzie doświadczalnym stężenia tego hormonu w surowicy zwierząt kontrolnych (grupy K1, K2) wynosiły odpowiednio 0,072 ng/ml (72 pg/ml) i 0,30 ng/ml (300 pg/ml) i stanowiły punkt odniesienia dla pozostałych grup zwierząt [Tab. 39]. U szczurów T stężenie DHT wynosiło 7,84 ng/ml, co stanowiło 2513% wzrost w stosunku do K2 ($p < 0,001$). Najwyższe stężenie DHT, wynoszące 42,3 ng/ml, stwierdzono w grupie TE i stanowiło ono 13993%, tj. w przybliżeniu blisko 140 - krotny wzrost w stosunku do K2 ($p \leq 0,05$) Jednocześnie stężenie analizowanego hormonu w tej grupie było o 11480% (prawie 115 – krotnie) wyższe niż obserwowane u zwierząt T.

U zwierząt TS albo TF stężenia DHT wynosiły odpowiednio 7,94 ng/ml (vs. K2, $p < 0,001$) oraz 7,20 ng/ml (vs. K1, $p < 0,001$). W grupach tych nastąpiło podwyższenie poziomu tego hormonu

odpowiednio o 2547% i 9900% w porównaniu do odpowiednich zwierząt kontrolnych. W porównaniu do nieindukowanych testosteronem szczurów kontrolnych, u zwierząt TS podwyższenie poziomu wolnego DHT było o 11446% (blisko 115 – krotnie) niższe niż u zwierząt TE. W grupie TF wzrost stężenia był o 4093% niższy niż obserwowany u szczurów TE.

Przyjmując jako grupę odniesienia szczury T zaobserwowano następujące zależności. U szczurów TE nastąpił wzrost stężenia o 439% ($p < 0,001$). Natomiast u zwierząt TS poziom wolnego DHT praktycznie nie uległ zmianie – stwierdzono niewielkie podwyższenie stężenia badanego hormonu o 1,3%, w odniesieniu do szczurów T. U zwierząt TF nastąpiło obniżenie poziomu DHT o 8,13% względem grupy T. Porównując działanie obu wyciągów stwierdzono, że obecność ekstraktu z *E. angustifolium* (grupa TE) spowodowała blisko 438% bardziej znaczące podwyższenie poziomu DHT niż u szczurów TS [Tab. 39.].

Tab. 39. Zmiany poziomu wolnego dihydrotestosteronu w surowicy u szczurów pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu.

Grupy:	Stężenia wolnego dihydrotestosteronu (średnia ± SEM) [ng/ml]	Procentowa [%] zawartość wolnego dihydrotestosteronu odpowiadająca stężeniom
K1	0,07±0,05	100
K2	0,30±0,04	100
T	7,84±1,07	2613
TE	42,28±6,05	14093
TS	7,94±0,84	2647
TF	7,20±0,77	10000
Porównanie grup badanych w stosunku do grup kontrolnych		
Stosunek grup	Zmiany stężenia wolnego dihydrotestosteronu wyrażone w wartościach procentowych	
T/K2	↑ 2513	
TE/K2	↑ 13993	
TS/K2	↑ 2547	
TF/K1	↑ 9900	
Porównanie grup badanych w stosunku do grupy indukowanej testosteronem		
Stosunek grup	Zmiany stężenia wolnego dihydrotestosteronu wyrażone w wartościach procentowych	
TE/T	↑ 439	
TS/T	↑ 1,3	
TF/T	↓ 8,1	

n=10 szczurów w każdej grupie

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup;; T – zwierzęta otrzymujące testosteron (s.c.); TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego hormonu; “↓” - obniżenie poziomu badanego hormonu.

4.4.3. Zmiany poziomu wolnego estradiolu pod wpływem badanych wyciągów roślinnych i finasterydu

Analizując zmiany poziomu wolnego estradiolu (E2) pod wpływem stosowanych wyciągów roślinnych i finasterydu stwierdzono, że stężenia tego hormonu w surowicy zwierząt kontrolnych (grupy K1, K2) wynosiły odpowiednio 41,06 pg/ml i 45,86 pg/ml i stanowiły punkt odniesienia dla pozostałych grup zwierząt [Tab. 40]. W celu dokonania oceny stopnia zmian stężeń w grupach zwierząt indukowanych hormonalnie, stężeniom wyjściowym zmierzonym u odpowiednich szczurów kontrolnych przypisano wartości 100%. U szczurów T stężenie E2 wynosiło 47,60 pg/ml co stanowiło nieznamienny 3,8% wzrost w stosunku do zwierząt kontrolnych K2 ($p=0,432$). Najwyższe stężenie E2, wynoszące 64,07 ng/ml, stwierdzono w grupie zwierząt TE, a obserwowana wartość uległa podwyższeniu o 39,7% w porównaniu do kontrolnych zwierząt K2 ($p<0,001$).

U zwierząt TS albo TF stężenia estradiolu wynosiły odpowiednio 48,62 ng/ml oraz 60,59 ng/ml. W grupie TS nastąpiło nieznamienne podwyższenie poziomu badanego hormonu o 6,01% w porównaniu do zwierząt kontrolnych K2. Z kolei u szczurów TF stwierdzono znaczny wzrost stężenia, bo o 47,6% w stosunku do K1 ($p<0,001$). Podwyższenie poziomu było o 7,9% wyższe niż obserwowane u zwierząt TE, a o 41,6% w stosunku do szczurów TS.

Przyjmując jako grupę odniesienia szczury T zaobserwowano następujące zależności. U szczurów TE nastąpił wzrost stężenia E2 o 34,6% ($p<0,001$). U zwierząt TS poziom badanego hormonu uległ nieznamiennemu podwyższeniu o 2,14%, w odniesieniu do szczurów T ($p=0,306$). Z kolei u zwierząt indukowanych, otrzymujących finasteryd (grupa TF) nastąpił wzrost poziomu estradiolu o 27,3%, względem grupy T ($p<0,001$). Podawanie ekstraktu z *E. angustifolium* (grupa TE) spowodowała bardziej znaczące podwyższenie poziomu estradiolu, tj. o 32,5% niż w grupie TS. W grupie TE stwierdzono także podwyższenie poziomu estradiolu w porównaniu do zwierząt TF. Różnica, choć nieznamienna, między tymi grupami wynosiła 7,3% na korzyść wyciągu z *E. angustifolium*.

Tab. 40. Zmiany poziomu wolnego estradiolu w surowicy u szczurów pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu.

Grupy:	Stężenia wolnego estradiolu (średnia ± SEM) [pg/ml]	Procentowa [%] zawartość wolnego estradiolu odpowiadająca stężeniom
K1	41,06±2,31	100
K2	45,86±1,83	100
T	47,60±1,23	104
TE	64,07±2,12	140
TS	48,62±1,82	106
TF	60,59±3,10	148
Porównanie grup badanych w stosunku do grup kontrolnych		
Stosunek grup	Zmiany stężenia wolnego estradiolu wyrażone w wartościach procentowych	
T/K2	↑ 3,8	
TE/K2	↑ 39,7	
TS/K2	↑ 6,0	
TF/K1	↑ 47,6	
Porównanie grup badanych w stosunku do grupy indukowanej testosteronem		
Stosunek grup	Zmiany stężenia wolnego estradiolu wyrażone w wartościach procentowych	
TE/T	↑ 34,6	
TS/T	↑ 2,14	
TF/T	↑ 27,3	

n=10 szczurów w każdej grupie

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd. Wartości $p \leq 0,05$ przyjęto jako statystycznie znamienne (jednoczynnikowa ANOVA).

“↑” – podwyższenie poziomu badanego hormonu; “↓” - obniżenie poziomu badanego hormonu.

Wartości średnie stężeń badanych hormonów steroidowych w poszczególnych grupach zwierząt wraz z poziomami istotności uzyskanych wyników podsumowano w tabeli poniżej [Tab. 41]. W kolejnej tabeli podsumowano zmiany stężeń badanych hormonów steroidowych w osoczu u szczurów pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt [Tab. 42.].

Tab. 41. Podsumowanie wyników pomiaru stężeń hormonów steroidowych w surowicy u szczurów względem grupy kontrolnej.

Hormony [stężenie]	Grupa	Średnia wartość stężenia ± SEM	Poziom istotności (P)
Testosteron [ng/ml]	K1	0,18±0,02	
	TF	16,62±0,89	<0,001
	K2	0,619±0,09	
	T	17,94±1,95	<0,001
	TS	15,81±0,89	<0,001
	TE	48,40±3,76	<0,001
Dihydrotestosteron [ng/ml]	K1	0,07±0,04	
	TF	7,20±0,77	<0,001
	K2	0,30±0,04	<0,001
	T	7,84±1,07	<0,001
	TS	7,94±0,84	<0,001
	TE	42,28±6,05	<0,001
Estradiol [pg/ml]	K1	41,06±2,31	<0,001
	TF	60,59±3,10	<0,001
	K2	45,86±1,83	<0,001
	T	47,60±1,23	0,432
	TS	48,62±1,82	0,306
	TE	64,07±2,12	<0,001

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup;; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd. Przedstawiono średnie stężeń dla poszczególnych grup z zaznaczonymi wartościami SEM. Czcionka pogrubioną wyszczególniono wartości $p < 0,05$ uznane za statystycznie istotne (pogrubione wartości).

Tab. 42. Podsumowanie zmian stężeń hormonów steroidowych w surowicy u szczurów pomiędzy poszczególnymi grupami zwierząt.

Hormony	Testosteron	Dihydrotestosteron	Estradiol
Porównanie grup badanych w stosunku do grup kontrolnych (nieindukowanych)			
Stosunek grup	Zmiany stężenia wolnego testosteronu wyrażone w wartościach procentowych	Zmiany stężenia wolnego dihydrotestosteronu wyrażone w wartościach procentowych	Zmiany stężenia wolnego estradiolu wyrażone w wartościach procentowych
T/K2	↑ 2800	↑ 2513	↑ 3,8
TE/K2	↑ 7722	↑ 13993	↑ 39,7
TS/K2	↑ 2455	↑ 2547	↑ 6,01
TF/K1	↑ 2586	↑ 9900	↑ 47,6
Porównanie grup badanych w stosunku do kontrolnej grupy indukowanej testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany stężenia wolnego testosteronu wyrażone w wartościach procentowych	Zmiany stężenia wolnego dihydrotestosteronu wyrażone w wartościach procentowych	Zmiany stężenia wolnego estradiolu wyrażone w wartościach procentowych
TE/T	↑ 170	↑ 439	↑ 34,6
TS/T	↓ 11,9	↑ 1,30	↑ 2,14
TF/T	↓ 7,35	↓ 8,13	↑ 27,3
Różnice pomiędzy grupami otrzymującymi wyciągi roślinne lub finasteryd w porównaniu do zwierząt kontrolnych, indukowanych testosteronem			
Stosunek grup	Zmiany stężenia wolnego testosteronu wyrażone w wartościach procentowych	Zmiany stężenia wolnego dihydrotestosteronu wyrażone w wartościach procentowych	Zmiany stężenia wolnego estradiolu wyrażone w wartościach procentowych
(TE/TS)/T	v 182	v 438	v 32,5
(TE/TF)/T	v 177	v 447	v 7,30
(TS/TF)/T	v 4,54	v 9,43	v 25,2

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Epilobium angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *Serenoa repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd.

“↑” – podwyższenie poziomu badanego hormonu; “↓” - obniżenie poziomu badanego hormonu

„v” – różnice w stężeniach hormonów pomiędzy określonymi grupami zwierząt wyrażone w wartościach procentowych

4.4. Wpływ badanych wyciągów roślinnych i finasterydu na masy prostat u szczurów

4.4.1. Zmiany mas płatów szczytowych prostat pod wpływem badanych ekstraktów roślinnych oraz finasterydu

Oceniając zmiany masy prostat (liczonych łącznie tj. masy prostaty części brzusznej oraz grzbietowej) u zwierząt nie poddanych indukcji hormonalnej, otrzymujących ekstrakt z ziela *Epilobium angustifolium* (grupa E) albo ekstrakt z owoców *Serenoa repens* (grupa S) nastąpiło obniżenie masy prostat kolejno o 18% (602 ± 40 mg) ($p=0,044$) i 33% (497 ± 52) ($p=0,004$), porównaniu do kontrolnych szczurów K2 (737 ± 50 mg) [Tab. 43]. Wynika stąd, że masa prostat u szczurów grupy E była o 15% większa aniżeli w grupie szczurów otrzymujących wyciąg z *S. repens*, w porównaniu do kontrolnych szczurów K2). W grupie T nastąpiło podwyższenie masy prostat o 109% (1539 ± 113 mg w porównaniu do szczurów K2. W porównaniu do szczurów T u zwierząt otrzymujących jedynie badane ekstrakty (grupa E i grupa S) masy prostat były mniejsze, kolejno o 60,9% ($p<0,001$) i 67,7% ($p<0,001$). Wynika stąd, że u zwierząt E zmniejszenie masy prostat było o 6,8% mniejsze niż redukcja masy jaka nastąpiła u zwierząt S.

U szczurów TE nastąpiło nieznaczne nieznamiennie obniżenie masy prostat – redukcja o 4,1% (1476 ± 88 mg) w porównaniu do szczurów T. U zwierząt TF nastąpiła redukcja masy prostat w stopniu zbliżonym do opisanego dla grupy TE, bowiem odnotowano w tym przypadku nieznamiennie obniżenie masy o 8% (1417 ± 97 mg). Z kolei u szczurów TS redukcja, istotna statystycznie, masy prostat wyniosła 20,3% (1227 ± 52 mg), w odniesieniu do szczurów T. Wynika stąd, że u szczurów TE redukcja masy prostat była w stopniu o 16,2% mniej znacząca niż w grupie TS.

U zwierząt indukowanych hormonalnie, otrzymujących jednocześnie badane ekstrakty wraz z finasterydem (odpowiednio grupy TFE i TFS) doszło do redukcji mas prostat w stopniu zbliżonym. Zauważono bowiem, że u szczurów TFE nastąpiło obniżenie mas prostat o 24,9% (1156 ± 77 mg), względem zwierząt T ($p \leq 0,05$).

Z kolei u szczurów TFS, w porównaniu do zwierząt T, nastąpiło zmniejszenie masy prostat o 29,4% (1074 ± 54 mg) ($p<0,05$). Wynikało stąd, że w grupie TFE zmniejszenie masy prostat było o 4,5% mniejsze niż w grupie TFS i o 8% bardziej wyraźne niż w przypadku zwierząt TF. U szczurów TFS redukcja mas prostat była o 21,4% wyraźna w porównaniu do zwierząt TF.

Tab. 43. Podsumowanie zmiany mas prostat u szczurów pod wpływem badanych wyciągów roślinnych i finasterydu.

Grupa	Masa prostat (średnia [mg]±SEM)	P	Masy prostat wyrażone w wartościach procentowych [%]
K1	567±52		100
K2	737±50		100
E	602±40	0,044	82
S	497±52	0,004	67
T	1539±113	<0,001	209
TE	1476±88	<0,001	200
TS	1227±52	<0,001	167
TF	1417±97	<0,001	250
TFE	1156±77	0,001	157
TFS/	1074±54	<0,001	148
Zmiany masy całych prostat w odniesieniu do odpowiedniej grupy kontrolnej wyrażone w wartościach procentowych [%]			
T/K2	↑ 106		
E/K2	↓ 19,5		
S/K2	↓ 33,6		
E/T	↓ 60,9		
S/T	↓ 67,7		
TE/T	↓ 4,1		
TS/T	↓ 20,3		
TF/T	↓ 8,0		
TFE/T	↓ 24,9		
TFS/T	↓ 29,4		

n=10 szczurów w każdej grupie

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; E - zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Epilobium angustifolium*; S - zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Serenoa repens*; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd; TFE - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium* i oraz finasteryd; TFS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens* oraz finasteryd.

“↑” – podwyższenie masy prostaty; “↓” - obniżenie masy prostaty

W tabeli umieszczono średnie wartości mas dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. Wartości $p \leq 0,05$ przyjęto jako statystycznie znamienne (pogrubione wartości).

Analiza zmian mas płata brzuszego i grzbietowego prostat u zwierząt eksperymentalnych wskazuje na zauważalny, zbliżony wpływ badanych ekstraktów roślinnych, zarówno u szczurów nieindukowanych hormonalnie, jak i u zwierząt poddanych indukcji testosteronem oraz finasterydu na ich masę. W odniesieniu do kontrolnych, nieindukowanych hormonalnie zwierząt (grupa K2, K1) masa płata brzuszego, jak i grzbietowego we wszystkich testowanych grupach zwierząt uległa zmianie, jednakże z większym stopniem nasilenia w przypadku płata brzuszego.

4.4.1.1. Zmiany masy płata brzusznego szczurzych prostat pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu

Ze względu na zastosowany układ doświadczalny postanowiono osobno zanalizować wpływ podawanych substancji i wyciągów na zmiany masy części brzusznej i grzbietowej wyodrębnionych prostat. Zauważono, że obecność ekstraktu z *Epilobium angustifolium* (grupa E) praktycznie nie wpłynęła na masę płata brzusznego – doszło do nieznamiennej redukcji masy tego płata o 1,1% (286 ± 18 mg), w porównaniu do szczurów kontrolnych K2 (288 ± 18 mg) [Tab. 43.]. U zwierząt otrzymujących ekstrakt z *Serenoa repens* (grupa S) nastąpiło obniżenie masy płata o 21,3% (227 ± 22 mg w porównaniu do grupy kontrolnej (K2) ($p=0,046$). Stwierdzono, że w grupie zwierząt E obniżenie masy płata było o 20,2% mniejsze niż w przypadku zwierząt S.

U szczurów T doszło do znacznego, bo o 229%, podwyższenia masy płata brzusznego (949 ± 80 mg), względem zwierząt kontrolnych K2 ($p < 0,001$).

W porównaniu do kontrolnych szczurów, niestymulowanych androgenem (grupa K2) w pozostałych grupach zwierząt, poddanych indukcji testosteronem, otrzymujących ekstrakty roślinne, z osobna lub łącznie z finasterydem doszło również do wzrostu masy płata brzusznego [Tab. 44.].

Niemniej jednak u zwierząt TE nastąpiło nieznamienne obniżenie masy płata o 4,6% (910 ± 61 mg), względem zwierząt stanowiących grupę odniesienia (grupa T). W grupie stymulowanej androgenem, otrzymującej ekstrakt z *S. repens* (grupa TS) nastąpiła redukcja masy płata o 20,3% ($756,6 \pm 32,4$ mg), względem szczurów T ($p < 0,05$). U szczurów TF nastąpiło obniżenie masy płata o 8,3% (871 ± 60 mg), w porównaniu do zwierząt T.

U szczurów TE redukcja masy płata była o 15,7% mniejsza niż u szczurów TS. U zwierząt TE i TF doszło do obniżenia masy płata w porównywalnym zakresie, aczkolwiek w pierwszej grupie (grupa TE) redukcja masy płata była o 3,7% mniejsza niż u zwierząt otrzymujących finasteryd (grupa TF).

U zwierząt TFE nastąpiło obniżenie masy płata brzusznego o 24,9% (713 ± 48 mg), względem szczurów T ($p < 0,05$). Podobnie, u szczurów TFS redukcja masy płata była porównywalna – doszło do jej obniżenia o 30,1% (664 ± 33 mg), w porównaniu do szczurów T ($p < 0,05$).

Zmniejszenia masy płata o szczurów TFE było o 5,2% mniejsze niż w przypadku zwierząt TFS. Obecność finasterydu u zwierząt stymulowanych hormonalnie, otrzymujących również ekstrakt z *E. angustifolium* (grupa TFE) spowodowała znamienne obniżenie masy płata w stopniu o 20,3% bardziej znaczącym niż obserwowana u szczurów TE ($p < 0,05$).

Zbliżony zakres redukcji masy płata zaobserwowano pomiędzy grupami zwierząt TFS i TS, bowiem obecność finasterydu u zwierząt TFS spowodowała obniżenie masy płata w stopniu o 9,8% bardziej niż obserwowana u szczurów TS, ale różnica nie osiągnęła znamienności statystycznej ($p=0,58$).

U szczurów TFE i TFS nastąpiło obniżenie masy płata w stopniu odpowiednio nieznamiennie o 16,6% i znamienne o 21,8% ($p < 0,05$) bardziej niż redukcja obserwowana u zwierząt TF.

4.4.1.2. Zmiany masy płata grzbietowego szczurzych prostat pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu

Analizując zmiany masy płata grzbietowego szczurzych prostat pod wpływem badanych wyciągów roślinnych oraz finasterydu zauważono, że w porównaniu do szczurów kontrolnych K2 (448 ± 34 mg) obecność ekstraktu z *Epilobium angustifolium* (grupa E) spowodowała obniżenie masy płata grzbietowego o 29,4% (316 ± 23 mg) ($p = 0,044$) [Tab. 44.]. U zwierząt S nastąpiło obniżenie masy płata o 21,3% (272 ± 30 mg), w porównaniu do grupy kontrolnej K2 ($p = 0,004$). Stwierdzono, że pod wpływem ekstraktu z *E. angustifolium* obniżenie masy płata było o 9,9% mniejsze niż w przypadku zwierząt otrzymujących drugi ekstrakt roślinny (grupa S).

U szczurów T doszło do podwyższenia masy płata grzbietowego (590 ± 45 mg) o 31,5%, względem zwierząt kontrolnych K2 ($p < 0,05$).

W porównaniu do kontrolnych szczurów, niestymulowanych androgenem (grupa K2) w pozostałych grupach zwierząt, poddanych indukcji testosteronem, otrzymujących badane ekstrakty roślinne, albo finasteryd doszło również do zwiększenia masy płata grzbietowego, podczas gdy u szczurów TFE i TFS doszło do nieznacznego zmniejszenia jego masy.

U zwierząt TE masa płata grzbietowego, praktycznie nie uległa zmianie w porównaniu do szczurów T. W pozostałych grupach zwierząt indukowanych testosteronem, tj. TS, TFS, TF wystąpiły zmiany masy płata grzbietowego na poziomie porównywalnym ze zmianami w przypadku płata brzuszego. Stwierdzono, że w grupie TS nastąpiła redukcja masy płata o 20,3% (470 ± 20 mg), względem szczurów T ($p < 0,05$).

Z kolei u szczurów TF nastąpiło nieznamiennie obniżenie masy płata o 8,3%. W grupie TS redukcja masy płata była o 20,5% znacząca niż u szczurów TE ($p < 0,05$). Podobnie, u zwierząt TE zmniejszenie masy płata była o 8,5% mniej znacząca i nieznamienna statystycznie niż w przypadku grupy TF.

Analizując wpływ podawania jednocześnie ekstraktu z *E. angustifolium* oraz finasterydu (grupa TFE) stwierdzono, że nastąpiło obniżenie masy płata grzbietowego o 25% (442 ± 30 mg), względem szczurów T ($p < 0,05$). Z kolei u szczurów TFS redukcja masy płata była porównywalna – doszło do jej obniżenia o 30,4% (411 ± 20 mg), w porównaniu do zwierząt T ($p < 0,001$). Zmniejszenie masy u szczurów TFE było o 5,4% mniejsze niż w przypadku zwierząt TFS. Obecność finasterydu u zwierząt otrzymujących również ekstrakt z *E. angustifolium* (grupa TFE) spowodowała obniżenie masy płata w stopniu o 20,3% bardziej znaczącym niż obserwowana w grupie TE. Zbliżony zakres redukcji masy płata zaobserwowano pomiędzy grupami zwierząt otrzymującymi ekstrakt z *S.*

repens łącznie lub bez finasterydu. Zauważono bowiem, że u zwierząt TFS nastąpiło większe (choć nieznamiennie) obniżenie masy płata o 9,8% niż u szczurów TS.

Ponadto, dla szczurów grup TFE i TFS nastąpiło obniżenie masy płata w stopniu odpowiednio o 16,6% ($p \leq 0.05$) i 21,8% ($p < 0,05$) bardziej znaczącym niż redukcja obserwowana u zwierząt TF.

Tab. 44. Zestawienie mas płatów brzusznych i grzbietowych prostat u poszczególnych grup szczurów.

Grupa zwierząt	Zmiany masy płatów prostat (brzuszno i grzbietowo) w poszczególnych grupach zwierząt					
	Masa płata brzuszno (średnia [mg] ±SEM)	Różnice mas wyrażone w wartościach procentowych względem grupy kontrolnej	P	Masa płata grzbietowo (średnia [mg]±SEM)	Różnice mas wyrażone w wartościach procentowych względem grupy kontrolnej	P
K1	224±68	100		342±60	100	
K2	288±18	100		448±34	100	
E	286±18	99	0,044	316±23	71	0,044
T	949±80	329	0,004	590±45	131	0,004
S	227±22	79	<0,001	272±30	61	<0,001
TE	910±61	316	<0,001	591±38	132	<0,001
TS	757±32	263	<0,001	470±20	105	<0,001
TF	871±60	388	<0,001	541±37	158	<0,001
TFE	713±48	248	0,001	442±30	99	0,001
TFS	664±33	230	<0,001	411±20	92	<0,001
Procentowe zmiany w masach poszczególnych płatów szczurzych prostat w grupach badanych w odniesieniu do grup kontrolnych (K2, K1 = 100%)						
Poszczególne grupy vs. grupa kontrolna (K2,K1)	Płat brzuszny		Płat grzbietowy			
E/K2	↓ 1,1		↓ 29,4			
T/K2	↑ 229		↑ 31,5			
S/K2	↓ 21,3		↓ 39,3			
TE/K2	↑ 216		↑ 31,8			
TS/K2	↑ 163		↑ 4,8			
TF/K1	↑ 288		↑ 57,8			
TFE/K2	↑ 148		↓ 1,3			
TFS/K2	↑ 130		↓ 8,4			
Procentowe różnice w masach poszczególnych płatów szczurzych prostat w grupach badanych w odniesieniu do kontrolnej grupy indukowanej testosteronem (T = 100%)						
Poszczególne grupy vs. grupa T	Płat brzuszny		Płat grzbietowy			
E/T	↓ 69,9		↓ 46,3			
S/T	↓ 76,1		↓ 53,9			
TE/T	↓ 4,6		↑ 0,2			
TS/T	↓ 20,3		↓ 20,3			
TF/T	↓ 8,3		↓ 8,3			
TFE/T	↓ 24,9		↓ 25,0			
TFS/T	↓ 30,1		↓ 30,4			

n=10 szczurów w każdej grupie

K1, K2 – kontrolne grupy zwierząt: K1 – grupa kontrolna dla zwierząt TF, K2 – grupa kontrolna dla pozostałych grup; E - zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Epilobium angustifolium*; S - zwierzęta otrzymujące wyciąg z *Serenoa repens*; T – zwierzęta otrzymujące testosteron; TE – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium*; TS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens*; TF – zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące finasteryd; TFE - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *E. angustifolium* i oraz finasteryd; TFS - zwierzęta indukowane testosteronem otrzymujące ekstrakt z *S. repens* oraz finasteryd.

“↑” – podwyższenie masy płata prostaty; “↓” - obniżenie masy płata prostaty

W tabeli umieszczono średnie wartości mas dla poszczególnych grup z zaznaczoną wartością SEM. Wartości $p \leq 0,05$ przyjęto jako statystycznie znamienne.

5. DYSKUSJA

Prowadzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej badania wpisują się w trend wzrostu zainteresowania poszukiwania nowych, alternatywnych do stosowanych w klasycznej farmakoterapii BPH / LUTS, terapeutyków pochodzenia roślinnego [Dreikorn, 2002; Madersbacher i wsp., 2005; Madersbacher i wsp., 2008]. Wzrastające zainteresowanie fitoterapią schorzeń prostaty widoczne jest szczególnie w rozwiniętych krajach Europy oraz w USA [Berges i wsp., 1999; Wilt i wsp., 2000; Dreikorn, 2002; Berges i wsp., 2003; Madersbacher i wsp., 2005; Madersbacher i wsp., 2008]. Niebagatelny wpływ na zainteresowanie fitoterapią schorzeń prostaty ma m.in. coraz większa świadomość samych pacjentów o korzyściach jakie mogą płynąć z racjonalnej fitochemoprewencji zmian rozrostowych prostaty. Szczególne znaczenie może mieć w tym przypadku wielokierunkowy mechanizm działania preparatów opartych na bazie surowców roślinnych. Wzrastający popyt i rosnąca moda na “roślinną profilaktykę” lub fitoterapię może być również konsekwencją swobodnego dostępu do surowców zielarskich, różnego rodzaju preparatów, rejestrowanych głównie jako suplementy diety, czy też powszechnego uznania bezpieczeństwa stosowanych ziół i fitopreparatów [Dadej i wsp., 2008; Hurkacz, 2010; Kim i wsp., 2012; Morán i wsp., 2013; Oelke i wsp., 2013].

5.1. Wpływ ekstraktu z *Epilobium angustifolium* na oddawanie moczu u szczurów

Jednym z celów prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej badań było ustalenie czy wyciąg wodny z ziela *Epilobium angustifolium* wpływa na proces swobodnego oddawania moczu u szczurów z indukowanym hormonalnie (testosteronem) rozrostem prostaty. Koncepcję pracy oparto na aktualnym stanie wiedzy dotyczącej patofizjologii BPH, w świetle której najbardziej powszechną kliniczną manifestacją procesu rozrostu prostaty (BPE) stanowią tzw. objawy dolegliwości dolnych dróg moczowych (ang. *lower urinary tract symptoms*; *LUTS*) [Lepor, 2004; Lepor, 2005], prowadzące do utrudnienia przepływu moczu przez sterczową część cewki moczowej [Dutkiewicz, 2009; Dutkiewicz, 2010].

W badaniach przeprowadzonych w ramach pracy doktorskiej wyciąg wodny z ziela *Epilobium angustifolium* po wielokrotnym podawaniu [100 mg/kg m.c./21 dni; p.o.] spowodował obniżenie objętości, a zwłaszcza znamienne częstotliwości oddawanego moczu u szczurów poddanych kastracji, nieindukowanych hormonalnie (grupa E), w stosunku do kontrolnych szczurów [Tab. 19]. W zastosowanym modelu podawanie zwierzętom kastrowanym testosteronu [40 mg/kg m.c. 3 razy co 7 dzień; s.c.] (grupa T) w niewielkim stopniu wpłynęło na mikcję. Natomiast u szczurów TE nastąpiło ok. 3-krotne zmniejszenie objętości i częstotliwości oddawanego moczu, w stosunku do

szczurów T. Efekt tego działania był zbliżony do obserwowanego u szczurów TF. Stąd uzyskane wyniki sugerują, iż badany wyciąg z ziela *Epilobium angustifolium* może prowadzić do poprawy upośledzonych w wyniku rozrostu gruczołu krokowego, parametrów mikcji, zarówno objętości jak i częstości oddawanego moczu u zwierząt doświadczalnych.

W dalszym etapie rozprawy doktorskiej prowadzono prace eksperymentalne w modelu *in vivo* mające na celu ustalenie czy badany wyciąg z ziela *E. angustifolium* może wykazywać właściwości przeciwzapalne. Ponadto podjęto próbę ustalenia molekularnego mechanizmu działania analizowanego ekstraktu z ziela *E. angustifolium* względem referencyjnego, lipido-sterolowego ekstraktu z owoców *Serenoa repens*.

5.2. Ocena obwodowego przeciwzapalnego działania ekstraktu z *Epilobium angustifolium*

U podłoża koncepcji oceny potencjalnego przeciwzapalnego działania badanego wyciągu z ziela *Epilobium angustifolium* leży hipoteza patogenezy BPH traktująca stan zapalny jako jeden z możliwych mechanizmów indukcji / progresji BPH [Briganti i wsp., 2009; Nicholson i wsp., 2011]. W ramach prowadzonych badań stwierdzono, iż badany wyciąg wodny z ziela *Epilobium angustifolium* [100 mg/kg; p.o.], zarówno po okresie 1,5 godziny jak i po 3 godzinach od indukcji karageniną obrzęku łap zwierząt doświadczalnych, spowodował znamienne zmniejszenie jego objętości, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych. Efekt działania ekstraktu zbliżony do działania referencyjnej indometacyny [10 mg/kg; s.c.] wystąpił po pierwszym pomiarze, tj. po 1,5 h [Tab. 18].

Przeprowadzona ocena potencjalnych właściwości przeciwzapalnych wodnego wyciągu z ziela *Epilobium angustifolium* wpisuje się w trend uprzednio prowadzonych w tym obszarze badań, zarówno w modelu *in vivo* [Hiermann i wsp., 1986; Hiermann i wsp., 1991, Hiermann i wsp., 1998], jak i analiz w warunkach *in vitro* [Steenkamp i wsp., 2006; Hevesi i wsp., 2009]. W niniejszych badaniach zastosowano procedurę wstrzyknięcia do podszwy lewej łapy niewykastrowanych szczurów 1% roztworu karageniny wg. Hiermann i wsp. [Hiermann i wsp., 1986; Hiermann i wsp., 1991, Hiermann i wsp., 1998] oraz Juan i wsp. [Juan i wsp., 1988]. Podsumowanie stanu wiedzy w zakresie wyników badań dotyczących właściwości przeciwzapalnych *Epilobium* sp. zebrano w rozdziale 1.9. Analiza literaturowa wskazuje, iż dotychczas w badaniach *in vivo* właściwości przeciwzapalne objawiające się zmniejszeniem obrzęku łapy szczura indukowanym karageniną badano dla wodnych i alkoholowych (metanolowych i etanolowych) ekstraktów *Epilobium parviflorum* oraz *E. angustifolium* [Hiermann i wsp., 1986; Juan i wsp., 1988; Hiermann i wsp., 1991]. Redukcję obrzęku o 49%, po upływie 4 godzin, zaobserwowano jedynie pod wpływem wodnego ekstraktu z *E. angustifolium* [3g/100 ml;

1ml; co odpowiadało 300 mg surowca/kg m.c.] oraz samego mirycetyno-3-O-glukuronidu [0,04; 0,2; 1,0 mg/kg; p.o.], podczas gdy wyciągi alkoholowe z *E. angustifolium* oraz wodne i alkoholowe z *E. parviflorum* nie wykazywały pożądanych właściwości [Juan i wsp., 1988; Hiermann i wsp., 1991; Hansel i wsp., 1993]. Obserwowane efekty działania przypisuje się frakcji o masie molowej nieprzekraczającej 1000 Da, flawonoidowej (mirycetyno-3-O-glukuronidu) i sterolowej [Hiermann i wsp., 1986; Juan i wsp., 1988; Hiermann i wsp., 1991; Hiermann i wsp., 1998]. Badane właściwości farmakologiczne wodnego ekstraktu z ziela *E. angustifolium* potwierdzono w toku realizacji niniejszej pracy doktorskiej. Na możliwy mechanizm działania badnego wyciągu wskazują nieliczne badania *in vitro* i *in vivo*. Wyniki badań *in vitro* przeprowadzone przez Steenkamp i wsp., wykazały blisko 10-krotne silniejsze właściwości przeciwzapalne mirycetyno-3-O-glukuronidu, w porównaniu do użytej w doświadczeniu syntetycznej indometacyny (7,14 µg/ml (20 µM) i 71,4 µg/ml (200 µM)) [Steenkamp i wsp., 2006].

W doświadczeniach tych badany ekstrakt wykazał hamowanie aktywności cyklooksygenazy w niskim zakresie stężeń [Steenkamp i wsp., 2006]. Poza tym, badania *in vitro* przeprowadzone przez Hevesi i wsp. wskazały na właściwości przeciwzapalne wodno-acetonowego ekstraktu z *E. parviflorum*, objawiające się zahamowaniem aktywności cyklooksygenazy i sekrecji prostaglandyny E2 [Hevesi i wsp., 2009]. Ponadto, jak nadmieniono w rozdziale 1.9.1., badania *in vitro* Schepetkin i wsp. [Schepetkin i wsp., 2009], Kiss i wsp. [Kiss i wsp., 2011] oraz Ramstead i wsp. [Ramstead i wsp., 2012] sugerują, iż za właściwości immunomodulujące ekstraktów *Epilobium* sp. odpowiedzialna może być również oenoteina B. Stwierdzono bowiem, że hamowanie *in vivo* indukowanego procesu zapalnego w modelu perfuzji ucha u królików prowadzące do obniżenia stężenia prostaglandyn I2, E2 i D2 zaobserwowano jedynie w przypadku wodnego ekstraktu z ziela *E. angustifolium* oraz samego mirycetyno-3-O-glukuronidu, podczas gdy efektu działania dla ekstraktu z ziela *E. parviflorum* oraz alkoholowych wyciągów z obu surowców roślinnych w badaniach tych nie potwierdzono [Juan i wsp., 1988; Hiermann i wsp., 1991].

Analiza wyników badań prowadzonych w toku realizacji pracy doktorskiej, jak również aktualnego stanu wiedzy dotyczącego oceny właściwości przeciwzapalnych i/lub immunomodulujących ekstraktów uzyskiwanych z poszczególnych przedstawicieli *Epilobium* sp. wskazywać może na istotny potencjał wodnego wyciągu z ziela *Epilobium angustifolium* i objawiający się hamowaniem procesu zapalnego. Wykazanie zasadności wykorzystania wyciągów *Epilobium* sp., ze szczególnym uwzględnieniem wodnego wyciągu z ziela *Epilobium angustifolium*, we wspomaganiu leczenia objawowego BPH pod kątem hamowania chronicznych, tkankowo-specyficznych procesów zapalnych mających miejsce w przebiegu patomechanizmu rozrostu stercza wymaga dalszych badań przedklinicznych.

5.3. Wpływ ekstraktów z *Epilobium angustifolium* i *Serenoa repens* na zmianę mas szczurzych prostat.

W prowadzonych badaniach stwierdzono obniżenie mas prostat u zwierząt pod wpływem wyciągów z *E. angustifolium* i *S. repens* nie poddanych indukcji hormonalnej (grupy E i S), jak i u zwierząt indukowanych testosteronem, otrzymujących jednocześnie badane ekstrakty roślinne (grupy TE i TS) [Tab. 42]. Redukcja mas prostat pod wpływem ekstraktów była bardziej znacząca u zwierząt nie poddanych stymulacji androgenem, niż u szczurów TE i TS. Zauważono bowiem, że u szczurów grupy E oraz S doszło do znamiennej redukcji mas prostat, kolejno o 19,5% i 33,6%, w porównaniu do kontrolnych szczurów. Efekty działania obu wyciągów były porównywalne, ponieważ różnice otrzymanych mas prostat u zwierząt traktowanych tymi ekstraktami nie były znamienne statystycznie.

W grupie T doszło do zgodnego z oczekiwaniami, znacznego znamienego podwyższenia masy prostat, tj. o 106% w porównaniu do zwierząt stanowiących kontrolę. U szczurów TE i TS doszło do zmniejszenia mas prostat, stopień redukcji w obu przypadkach był mniej znaczący niż w grupach E i S. Zauważono jednak, że w tym przypadku wyciąg z *S. repens* ma jednak silniejsze działanie niż wyciąg *E. angustifolium* - innymi słowy może on wykazywać działanie hamujące rozwój testosterono-zależnego wzrostu masy prostaty, podczas gdy wyciąg z wierzbownicy takich właściwości nie wykazywał.

Wykazano także, że zwierzęta TE działały na poziomie zbliżonym do grupy TF, a więc w tym przypadku aktywność finasterydu była porównywalna do wyciągu z wierzbownicy i nie wpływała silnie hamująco na testosterono-zależny wzrost prostaty. Natomiast podawanie łączne finasterydu i obu wyciągów wykazywało podobny efekt synergistyczny (choć nieco silniejszy w przypadku połączenia TFE), ponieważ zbliżony stopień redukcji mas prostat zaobserwowano ponadto u szczurów TFE i TFS, a zakres obserwowanych zmian mas wahał się pomiędzy grupami w przedziale 24,9% - 29,4%.

Porównywalny, podobny stopień redukcji mas i otrzymanych zależności dla poszczególnych płatów prostat zaobserwowano we wszystkich badanych grupach zwierząt otrzymujących wyciągi roślinne, zarówno u tych nie poddanych stymulacji testosteronem (grupy E i S), jak i indukowanych testosteronem (TE i TS), względem szczurów otrzymujących jedynie testosteron (grupa T). Silniejsze efekty indukcji wzrostu masy testosteronem użytkano w płacie brzuszny, a działanie hamujące samych ekstraktów było bardziej widoczne w płacie grzbietowym. Natomiast dla grup TE, TS oraz w połączeniach z finasterydem efekty były porównywalne [Tab. 43].

Uzyskane wyniki wpisują się we wzrastający trend badań oceniających wpływ ekstraktów roślinnych, ich metabolitów na zmiany masy prostat w eksperymentalnych modelach *in vivo* [Azimi i wsp., 2012] [Tab. 45.]. Oprócz oszacowania efektu ich działania czy leków syntetycznych na masę

prostat, oceniany był również ich wpływ na masę czy rozmiary poszczególnych płątów, w szczególności brzuszego, czy innych hormonozależnych organów, takich jak np. jąder, nasieniowodów, pęcherzyków nasiennych czy pęcherza moczowego. Szczególnie powszechny jest zastosowany, również w niniejszej pracy doktorskiej, model rozrostu indukowany obecnością egzogenego androgeny [Azimi i wsp., 2012].

Tab. 45. Zestawienie wybranych surowców roślinnych (ekstraktów) o potencjalnych właściwościach antyandrogennych. Opracowanie własne.

Surowiec / ekstrakt	Autor publikacji	Surowiec / ekstrakt	Autor publikacji
dokosanol (IK2 – składnik preparatu Tadenan (ekstrakt z <i>Pygeum africanum</i>))	Müntzing i wsp., 1979	lipido-sterolowy ekstrakt z owoców <i>Roystonea regia</i> (ang. Cuban royal palm; preparat D-004)	Noa i wsp., 2000; Arruzazabala i wsp., 2006
ekstrakt z <i>Pygeum africanum</i> (preparat Tadenan)	Solano i wsp., 2000	olej z nasion <i>Cucurbita pepo</i>	Tsai i wsp., 2006
1 i 5% ekstrakt z korzeni <i>Panax ginseng</i>	Fahim i wsp., 1982	wodne i wodno-alkoholowe ekstrakty z korzeni <i>Lepidium meyeri</i>	Gonzales i wsp., 2007
0,2% roztwór frakcji polifenolowej z <i>Camelia sinensis</i>	Gupta i wsp., 1999	metanolowy ekstrakt z <i>Melandrium firmum</i> ; wyizolowany α -Spinasterol	Lee i wsp., 2012; Lee i wsp., 2014
wodne wyciągi z liści <i>Hibiscus macranthus</i> oraz <i>Basella alba</i>	Moundipa i wsp., 1999	wodno-alkoholowy ekstrakt z korzeni <i>Boerhaavia diffusa</i>	Vyas i wsp., 2013
ekstrakt z <i>Eurycoma longifolia</i> Jack (nazwa zwyczajowa Tongkat Ali)	Ang i wsp., 2000	mieszanka ziołowa (<i>Tribulus terrestris</i> Linn, <i>Areca catechu</i> Willd, <i>Pedalium murex</i> Linn, <i>Caesalpinia bonducella</i> Fleming i <i>Asparagus racemosus</i> Willd.) - preparat Prostate	Mitra i wsp., 1999

Na chwilę obecną opublikowano kilka prac dotyczących wyników badań, przeprowadzonych w eksperymentalnych modelach zwierzęcych, podejmujących próbę ustalenia wpływu ekstraktów z *Epilobium* sp. m. in. na masę (rozmiary) prostaty.

W rozdziale 1.9.1. zwrócono uwagę na wyniki prac Hiermann i wsp., w toku których ocenie poddano ekstrakt heksanowy i wodny z ziela *Epilobium angustifolium* oraz frakcję powstałą na drodze ultrafiltracji wodnego ekstraktu badanego surowca zawierającą składniki o masie molowej nie przekraczającej 1000 Da (oznaczoną symbolem UF) u 30 - dniowych szczurów [Hiermann i wsp., 1997]. W badaniu tym zarówno model badawczy, czas trwania eksperymentu, jak również dawkowanie ekstraktów było odmienne od zastosowanego w pracy doktorskiej. Eksperyment

farmakologiczny wykonano na samcach szczurów kastrowanych, jak i również nie poddanych kastracji, a dawkowanie ekstraktów przedstawiało się w następujący sposób: 40 mg/kg m.c./dobę/14 dni; p.o. (dla szczurów poddanych kastracji) lub 20 dni (dla szczurów niekastrowanych). Dawka użytego do indukcji rozrostu prostaty testosteronu wynosiła 0,1 mg/zwierzę/14 dni (s.c.). Dokonano m. in. pomiarów zmian masy ich gruczołu krokowego, mięśnia dźwigacza odbytu i pęcherzyków nasiennych [Hiermann i wsp., 1997]. W odróżnieniu od wyników uzyskanych w badaniach będących przedmiotem niniejszej dysertacji, w badaniach Hiermann i wsp. stwierdzono odmienne działanie wodnego wyciągu z zieleń *Epilobium angustifolium* w obu grupach zwierząt, tzn. antyandrogenne działanie u zwierząt niekastrowanych i niewielkie proandrogenne u kastratów w stosunku do zwierząt kontrolnych stymulowanych testosteronem.

W badaniach będących przedmiotem pracy doktorskiej obserwowano podobne efekty, tj. silna indukcja rozrostu prostat objawiająca się znacznym podwyższeniem masy pod wpływem testosteronu. W odróżnieniu od uzyskanych wyników w niniejszej pracy, w eksperymencie Hiermann i wsp. stwierdzono nieznaczne podwyższenie masy prostat u kastrowanych szczurów, stymulowanych testosteronem, otrzymujących ekstrakt wodny z *E. angustifolium*.

Wysunięto wniosek, iż zidentyfikowane w badanym ekstrakcie kwasy tłuszczowe aplikowane zwierzętom w ww. ilościach nie wywołały oczekiwanej hamującej aktywności wobec enzymu 5 α -reduktazy steroidowej [Hiermann i wsp., 1997]. Odmienne działanie wodnego wyciągu z zieleń *Epilobium angustifolium*, tzn. antyandrogenne działanie u zwierząt niekastrowanych i niewielkie proandrogenne u kastratów w stosunku do zwierząt kontrolnych stymulowanych testosteronem, Hiermann i wsp. tłumaczą obecnością komponentów (o masie cząsteczkowej przewyższającej 1000 Da) we frakcji wodnej, wzmacniających biodostępność podawanego egzogennie testosteronu [Hiermann i wsp., 1997]. Niebagatelne znaczenie w aspekcie różnych wyników obu eksperymentów może mieć również odmienna zastosowana dawka ekstraktu oraz czas dawkowania, co w konsekwencji może wpływać na gospodarkę hormonów płciowych wewnątrz gruczołu, obwodowych, jak również na odpowiednie zmiany na poziomie molekularnym w komórkach gruczołu krokowego zwierząt.

Dotychczas nie opublikowano również dostatecznej liczby badań przedklinicznych *in vivo* oceniających m. in. wpływ ekstraktów czy gotowych preparatów opartych na bazie owoców *Serenoa repens* na masę (rozmiary) prostat u zwierząt eksperymentalnych. Ich wyniki nie są również jednoznaczne. Badania Rhodes i wsp. przeprowadzone na kastrowanych samcach szczurów stymulowanych testosteronem lub dihydrotestosteronem nie wykazały zdolności preparatu Permixon, w odróżnieniu do finasterydu, do redukcji mas gruczołów krokowych u zwierząt [Rhodes i wsp., 1993]. Mitropoulos i zespół wykazali, iż podawany ekstrakt LSESr dawkowany szczurom w ilości 50 lub 100 mg/kg m.c. co drugą dobę przez 90 dni znacznie zredukował

akumulację komórek tłuszczowych i doprowadził do atrofii nabłonka w środkowym obszarze prostaty brzusznej szczurów bez znacznego wpływu na całkowitą masę prostat [Mitropoulos i wsp., 2002]. Właściwości lipido-sterolowego ekstraktu (ang. *lipid-sterolic extract of Serenoa repens*; *LSES*) redukujące masę prostat nie zostały jednoznacznie potwierdzone także w badaniach na psach [Barsanti i wsp., 2000].

Kolejne badania wskazują na zdolności ekstraktów z *S. repens* do redukcji masy prostat [Paubert Braquet i wsp., 1996; Van Coppenolle i wsp., 2000; Talpur i wsp., 2003; Carbajal i wsp., 2005; Arruzazabala i wsp., 2006; Belostotskaia i wsp., 2006] oraz pęcherza moczowego [Oki i wsp., 2005] u zwierząt doświadczalnych. W badaniach tych nie zastosowano jednak schematu doświadczalnego zastosowanego w eksperymencie będącym przedmiotem pracy doktorskiej. Okres dawkowania ekstraktów obejmował zwykle 14, 17, 30 dni lub 3 miesiące przy zastosowaniu różnych dawek (w tym także 100 mg/kg m.c. [Belostotskaia i wsp., 2006], jak i również znacznie przekraczającej opisanej w niniejszej dysertacji, np. 200 – 400 mg/kg m.c. [Arruzazabala i wsp., 2006]). Nie można zatem bezpośrednio odnieść uzyskanych w toku realizacji pracy doktorskiej wyników, opisujących faktyczne obniżenie masy szczurzych prostat pod wpływem ekstraktów z *E. aangustifolium* oraz *S. repens*, do wyników danych literaturowych.

Podsumowując ten etap badań wydaje się, że oba wyciągi, gdy stosuje się je bez indukcji testosteronem wykazują działanie zapobiegawcze, a natomiast ekstrakt z *S. repens* wykazujący w niniejszych badaniach zdolność hamowania indukowanych testosteronem zmian masy prostat może wykazywać działanie lecznicze.

Wydaje się, że kluczowym etapem strategii zmierzającej do zrozumienia efektu działania ekstraktów roślinnych będących przedmiotem niniejszej dysertacji jest wyjaśnienie ich wpływu na gospodarkę hormonalną oraz próba wyjaśnienia ich molekularnego mechanizmu działania w komórkach rozrośniętego stercza.

5.4. Wpływ ekstraktów z *Epilobium angustifolium* i *Serenoa repens* na gospodarkę hormonalną

W świetle aktualnego stanu wiedzy u podłoża patofizjologii BPH leży zaburzona gospodarka hormonów płciowych, w szczególności dihydrotestosteronu, testosteronu oraz estradiolu [Bartsch i wsp., 2002; Roberts i wsp., 2004; Lepor, 2005; Ellem i wsp., 2010; Nicholson i wsp., 2011].

O ile zmiany stężeń tych hormonów na poziomie tkankowym w obrębie rozrastającego się stercza skorelowane są zwykle ze zmianami jego objętości i masy [Bartsch i wsp., 2002; Lepor, 2005; Ho i wsp., 2011; Azzouni i wsp., 2012], to jednoznaczne ustalenie stopnia współzależności pomiędzy zmianami stężeń biodostępnego testosteronu, estradiolu w surowicy / osoczu oraz w

homogenatach tkanek gruczołu krokowego, białkowego markera PSA w surowicy pacjentów, intensywności występowania określonych dolegliwości LUTS i tempa wzrostu masy i objętości gruczołu krokowego w określonych grupach wiekowych pacjentów ze zdiagnozowanym BPH nadal pozostaje kwestią dyskusyjną [Lepor, 2005; Nicholson i wsp., 2011; Azzouni i wsp., 2012]. Udział wspomnianych hormonów płciowych w patomechanizmie BPH pozostaje raczej bezsporny. Coraz częściej postulowany jest ich charakter permissywny, tj. predysponujący, niejako ułatwiający, czy też przyspieszający progresję schorzenia, ale go nie indukujący [Wright i wsp., 1999; Huggins i wsp., 2002; Cunha i wsp., 2004; Ho i wsp., 2011]. Formowane jest przekonanie, iż rozwój schorzenia wymagać może obecności androgenów syntetyzowanych w jądrach już w toku rozwoju, dojrzewania, a nie tylko w okresie starzenia się mężczyzn [Cunha i wsp., 2004].

W toku oceny właściwości antyproliferacyjnych ekstraktów z *E. angustifolium* oraz *S. repens* we wszystkich grupach zwierząt otrzymujących testosteron sam lub wraz z ww. wyciągami i finasterydem odnotowano wzrost stężenia wolnego T i DHT względem kontrolnych zwierząt [Tab. 37-41]. Za wzrost stężenia wolnego T i DHT w osoczu zwierząt odpowiedzialna może być m. in. zastosowana w eksperymencie dawka testosteronu i okres jego dawkowania [40 mg/kg m.c. 3 razy co 7 dzień [wg. Kosowicz i wsp., 2004]. U zwierząt stymulowanych hormonalnie, otrzymujących ekstrakt z *E. angustifolium* zauważono znaczne podwyższenie stężenia wolnego T i DHT, kolejno o 170% i 439%, jak i estradiolu o 36 % względem szczurów poddanych działaniu samego testosteronu. Efekt ten dla stężenia estradiolu był podobny do działania finasterydu u zwierząt TF [Tab. 40, 41]. Z kolei odmienny efekt działania dostrzegalny jest w przypadku wyciągu z *S. repens*. W tej grupie szczurów nastąpiło nieznaczne obniżenie wolnego T (o 12%), podczas gdy stężenie DHT praktycznie nie uległo zmianie (podwyższenie stężenia o 1,3%) [Tab. 40, 41].

W toku analizy zmian profilu stężeń badanych hormonów oraz zmian mas szczurzych prostat (ich płatów) można dostrzec pewien zakres korelacji pomiędzy redukcją masy prostat (płatów) u szczurów TS (redukcja o 20,3%) [Tab. 43.] a obniżeniem stężenia wolnego T w ich osoczu (o 12%), [Tab. 37]. Taka korelacja nie występuje w przypadku zwierząt otrzymujących ekstrakt z *E. angustifolium*. W grupie TE doszło bowiem do nieznacznego obniżenia masy prostat (redukcja o 4,1%) (w zbliżony sposób również dla masy płata brzuszego) [Tab. 42, 43] pomimo znacznego podwyższenia stężenia wszystkich badanych hormonów [Tab. 40, 41].

Z powodu brakującej liczby doniesień literaturowych dotyczących badań z wykorzystaniem modelu eksperymentalnego podobnego do zastosowanego w niniejszej dysertacji nie możliwa jest bezpośrednia konfrontacja uzyskanych wyników. W badaniach Koziorowski i wsp. stwierdzono tendencję do zahamowania wzrostu stężenia obwodowego T i E2 pod wpływem ekstraktu z *E. angustifolium* u zwierząt stymulowanych hormonalnie, ale doświadczenie te przeprowadzono na knurkach świniodzika przy zastosowaniu odrębnego schematu dawkowania, bowiem iniekcję T w

ilości 100 mg/ml na osobnika przeprowadzono w 1, 6 i 12 dniu eksperymentu, a dawka wyciągu wodnego z *E. angustifolium* wynosiła 800 mg/dobę (2 x 400 mg)/14 dni [Koziorowski i wsp., 2006]. Nie jest wykluczone, iż na podwyższone stężenia wolnego T, DHT, E2 obserwowane w niniejszej pracy pod wpływem wodnego ekstraktu z *E. angustifolium* mogły mieć wpływ bioaktywne metabolity w nim zawarte, w szczególności te o potencjalnym lub udowodnionym antyandrogennym potencjale (oenotena A i B, flawonoidy, wolne kwasy tłuszczowe), powodujące uwalnianie się hormonów z frakcji obwodowych białek SHBG transportujących hormony płciowe lub też komórek tucznych obwodowej tkanki tłuszczowej lub w okolicy nerek u zwierząt eksperymentalnych. W konsekwencji mogło to doprowadzić do zwiększenia ich puli możliwej do detekcji przy pomocy metody ELISA. Hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia eksperymentalnego.

Brakuje również danych eksperymentalnych w ww. aspekcie dla ekstraktu z *S. repens*, które potwierdzałyby jednoznacznie jego postulowany antyandrogenny charakter, a w niniejszej pracy nie zaobserwowano takiego wyraźnego efektu jeśli chodzi stężenia T, DHT czy E2. Pośrednie dowody tłumaczące efekt działania ekstraktu z *S. repens* dostarczają liczne badania kliniczne, szerzej omówione w rozdziale 1.8.

5.5. Wpływ ekstraktów z *Epilobium angustifolium* i *Serenoa repens* na profil ekspresji genów biorących udział w patogenezie BPH

5.5.1. Wykorzystanie analiz ekspresji genów w ocenie patomechanizmu BPH

Prostata jest jednym z niewielu organów wewnętrznych, które ulega powiększaniu w wieku dorosłym [Schauer i wsp., 2011]. Jak wspomniano w rozdziale 1.1.2. istotną składową stercza jest tkanka gruczołowa obejmująca komórki nabłonka o charakterze wydzielniczym zebrane w postaci gron w obrębie podścieliska włóknisto-mięśniowego.

Pomimo znacznego postępu w obszarze badań nad patofizjologią gruczołu krokowego dokładne mechanizmy regulujące proces rozrostu stercza w ontogenezie mężczyzn, a także wpływające na zmiany chorobowe prowadzące do fenotypu BPH nie zostały w pełni poznane [Briganti i wsp., 2009; Schauer i wsp., 2011; Roosen i wsp., 2013]. Cechą wspólną łączącą liczne teorie tłumaczącą etiologię BPH jest proces fizjologicznego starzenia się organizmu mężczyzny jako centralny mechanizm inicjacji i rozwoju choroby, zaburzenie regulacji oddziaływania nabłonka wydzielniczego i komórek zrębu, głównie w strefie przejściowej, lokalne procesy naprawcze i zapalne, a w szczególności wybitnie androgeno- i estrogeno-zależny charakter poszczególnych stref gruczołu krokowego [McNeal, 1990; Cunha i wsp., 2003; Briganti i wsp., 2009; Schauer i wsp., 2011].

Obecnie powszechną strategią funkcjonalnej charakterystyki genów i molekularnych ścieżek sygnalizacyjnych w komórkach prostaty, kluczowych na różnych etapach organogenezy gruczołu krokowego i jego patofizjologii, są techniki profilowania ich ekspresji [Pritchard i wsp., 2008]. Analiza funkcjonalna genów, jak i ich produktów, dostarcza cennych informacji dotyczących molekularnych aspektów rozwoju i różnicowania poszczególnych rejonów stercza w okresie ontogenezy [Pritchard i wsp., 2008; Prins i wsp., 2008; Timms i wsp., 2011; Powers i wsp., 2013]. Profilowanie ekspresji genów w komórkach prostaty, w szczególności pochodzących z każdej ze stref, przyczynia się do ujawnienia specyficznych różnic pomiędzy obwodowym (postać nowotworowa) i strefy przejściowej (BPH) typem zmian produktów genowych modulujących aktywność komórek zrebłu i banlonka, wpływając w ten sposób na zakres ich interakcji, co może sugerować, iż schorzenie te może mieć również silny strefowo-specyficzny charakter [van der Heul-Nieuwenhuijsen i wsp., 2006; Schauer i wsp., 2011].

Analiza funkcjonalna i opisowa (m. in. analiza morfometryczna, histopatologiczna) wykonana w szeregu eksperymentach wykazała przede wszystkim istotną rolę oddziaływania androgenów / estrogenów na funkcjonowanie genów w komórkach prostaty, w szczególności w obrębie podścieliska oraz ich wpływ na skalę i zakres interakcji w obrębie nabłonka i / lub mezenchymy w procesie różnicowania się poszczególnych rejonów gruczołu krokowego [Cunha i wsp., 2003; Pritchard i wsp., 2008; Schauer i wsp., 2011; Powers i wsp., 2013].

Kluczowym dla zrozumienia wpływu licznych genów i ich produktów białkowych na funkcjonowanie komórek poszczególnych stref prostaty są wyniki badań, oprócz najliczniejszych przeprowadzonych na hodowlach komórkowych [Zhao i wsp., 2007], również z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych, głównie myszy i szczurów [Dadras i wsp., 2001; Abate-Shen i wsp., 2002; Abbott i wsp., 2003; Pritchard i wsp., 2008; Nicholson i wsp., 2013; Prajapati i wsp., 2014], a także analizy materiału tkankowego, pobranego najczęściej od pacjentów poddanych radykalnej prostatektomii [van der Heul-Nieuwenhuijsen i wsp., 2006; Powers i wsp., 2013; Khvostova i wsp., 2014; Velaeti i wsp., 2014; Paziewska i wsp., 2014]. Między innymi w badaniach van der Heul-Nieuwenhuijsen i wsp. uwidoczono odmienny profilu ekspresji genów w poszczególnych rejonach rozrośniętej prostaty, w których potwierdzono nadekspresję 199 genów w strefie obwodowej, podczas gdy w strefie przejściowej indukcję odnotowano w przypadku 147 genów [van der Heul-Nieuwenhuijsen i wsp., 2006].

5.5.2. Analiza zmian ekspresji genów metabolizmu androgenów w poszczególnych płatach szczyrczych prostat

5.5.2.1. Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na transkrypcję mRNA reduktaz steroidowych

Jak opisano w rozdziale 1.4.2.1. głównym enzymem przekształcającym T w DHT jest enzym 5 α -reduktaza steroidowa (*SRd5ar*) [EC 1.3.99.5] występująca przeważnie w postaci dwóch izoform (typu 1 i 2) [Zhu i wsp., 2009; Sánchez i wsp., 2013] o odmiennej lokalizacji chromosomalnej genu kodującego, dystrybucji w organizmie człowieka, parametrach kinetycznych, czy też optimum aktywności w zależności od pH [Tab. 1.] [Jenkins i wsp., 1992; Thigpen i wsp., 1993; Russell i wsp., 1994].

W komórkach ludzkiej prostaty [Thigpen i wsp., 1993; Bruchovsky i wsp., 1988; Eicheler i wsp., 1994; Levine i wsp., 1996; Negri-Cesi i wsp., 1998; Negri-Cesi i wsp., 1999; Febbo i wsp., 1999; Zhu i wsp., 2003; Thomas i wsp., 2003; Thomas i wsp., 2005; Thomas i wsp., 2008; Thomas i wsp., 2009; Zhao i wsp., 2007; Zhu i wsp., 2009], jak również u zwierząt doświadczalnych [Span i wsp., 2000; Mahendroo i wsp., 2001; Torres i wsp., 2003; Assinder i wsp., 2004] wykazano obecność, podwyższenie aktywności i / lub ekspresji (na poziomie transkryptu lub białka) obu izoform 5 α -reduktazy steroidowej. SRd5ar2 ulega ekspresji głównie w komórkach zrębu i podstawnych nabłonka [Silver i wsp., 1994], podczas gdy SRd5ar1 występuje głównie w komórkach nabłonkowych [Levine i wsp., 1996; Torres i wsp., 2003; Zhu i wsp., 2009]. Przewagę ekspresji izoformy typu 1 w części bazalnej komórek nabłonkowych prostat, a izoformy typu 2 w obrębie zrębu potwierdzono m. in. u szczurów [Assinder i wsp., 2004].

Izoformie typu 2 przypisuje się główny udział w patogenezie BPH [Zhu i wsp., 2009; Sanchez i wsp., 2013]. Nie bez znaczenia pozostaje również izoforma typu 1 [Iehle i wsp., 1999; Mahendroo i wsp., 2001; Torres i wsp., 2003].

Analiza wycinków tkanek prostat pochodzących od pacjentów z rozrośniętym gruczołem krokowym również potwierdza obecność, wzmożoną aktywność oraz ekspresję obu izoform 5 α -reduktazy steroidowej [Eicheler i wsp., 1994; Levine i wsp., 1996], z przewagą izoenzymu typu 2 [Silver i wsp., 1994], na różnym stadium progresji rozrostu stercza, zarówno postaci łagodnej [Eicheler i wsp., 1994; Thomas i wsp., 2003; Thomas i wsp., 2005; Thomas i wsp., 2008; Powers i wsp., 2013], jak i nowotworowej [Thomas i wsp., 2003; Thomas i wsp., 2005; Thomas i wsp., 2008; Thomas i wsp., 2009; Zhu i wsp., 2009; Li i wsp., 2009; Li i wsp., 2011; Niu i wsp., 2011].

Wykazano m. in., iż aktywność SRd5ar u pacjentów z BPH może być dwukrotnie do trzykrotnie wyższa niż u osób zdrowych [Bruchovsky i wsp., 1988]. Istnieje także podwyższone ryzyko wystąpienia formy nowotworowej u pacjentów ze zwiększoną aktywnością reduktaz [Febbo i wsp., 1999] oraz ich poziomem, w szczególności SRd5ar1 [Thomas i wsp., 2009; Sanchez i wsp.,

2013]. Wyniki szeregu prac wskazują na kilkukrotnie (trzykrotnie do czterokrotnie) wyższą aktywność SRd5ar w skrawkach tkanek złośliwej postaci nowotworowej prostat, w porównaniu do próbek BPH [Iehle i wsp., 1999; Thomas i wsp., 2005; Thomas i wsp., 2008; Sanchez i wsp., 2013].

W prowadzonych w ramach pracy doktorskiej badaniach stwierdzono znaczną indukcję transkrypcji mRNA obu reduktaz w płacie brzuszny i grzbietowy u szczurów poddanych kastracji, poddanych stymulacji T. W części brzusznej odnotowano transkrypcję SRd5ar1 i SRd5ar2 na poziomie o 723 i 703% wyższym niż w przypadku zwierząt kontrolnych, natomiast w części grzbietowej stwierdzono znacznie wyższy poziom mRNA obu izoform, odpowiednio o 2362% i 1263%. Uzyskane wyniki odzwierciedlają wyniki przytoczonych powyżej badań, w których stwierdzano podwyższony poziom obu reduktaz, zwłaszcza izoformy typu 2 w proliferujących komórkach stercza lub w tkankach rozrośniętej prostaty [Tab. 32.].

Wzmoczona transkrypcja mRNA obu izoform 5 α -reduktazy steroidowej w poszczególnych płatach szczurzych prostat pod wpływem testosteronu może być konsekwencją zwiększonej jej aktywności prowadzącej do podwyższonego stężenia DHT w komórkach zrębu, w szczególności płata brzuszno prostat u szczurów poddanych kastracji, co wykazano w pracach m. in. Wright i wsp. [Wright i wsp., 1996; Wright i wsp., 1999]. Również w doświadczeniu na szczurach kastrowanych i nie poddanych kastracji przeprowadzonym przez Avilla i wsp. wykazano pośrednio androgeno-zależną aktywację SRd5ar pod wpływem T i DHT. Stwierdzono bowiem indukcję pod wpływem transkrypcji szeregu, odmiennych genów będących pod kontrolą T lub DHT, użytych w doświadczeniu, co może być konsekwencją odmiennego powinowactwa obu hormonów do miejsc aktywnych AR [Avila i wsp., 1998]. W badaniach Torres i wsp. wykazano wzrost transkrypcji mRNA obu izoform 5 α -reduktazy steroidowej w szczurzych prostatkach a obecnością egzogenego testosteronu [Torres i wsp., 2003], co potwierdza silny androgeno-zależne podłoże ich aktywności, jak i maszynerii transkrypcyjnej regulującej proces transkrypcji genów je kodujące. Badania Sanchez i wsp. również potwierdzają znaczną indukcję transkrypcji mRNA w brzuszny płacie szczurzych prostat pod wpływem T [Sánchez i wsp., 2013].

Dotychczas nie opublikowano wyników badań podejmujących próbę wyjaśnienia molekularnego mechanizmu działania wyciągów *E. angustifolium* oraz *S. repens* u szczurów z indukowanym testosteronem rozrostem prostaty. Stąd też niemożliwe jest bezpośrednie odniesienie do danych literaturowych uzyskanych wyników [Tab. 32, 33].

W badaniach będących przedmiotem pracy doktorskiej stwierdzono, iż oba ekstrakty roślinne znacznie indukowały transkrypcje mRNA obu reduktaz w obu płatach u zwierząt TE i TS, w odniesieniu do szczurów kontrolnych. Natomiast w odniesieniu do szczurów indukowanych T badane ekstrakty roślinne w zbliżonym stopniu obniżyły poziom mRNA izoform 5 α -reduktazy steroidowej [Tab. 32]. Zauważono bowiem, że poziom mRNA izoformy typu 1 uległ bardziej

znaczącemu obniżeniu u szczurów TE i TS, w szczególności w płacie grzbietowym, w którym stwierdzono obniżenie ilości transkryptów SRd5ar1, kolejno o 87% i 82,1%, względem szczurów T. Podobne efekty w tym płacie osiągnięto dla finasterydu podawanego łącznie z testosteronem, stąd można domniemywać o podobnym mechanizmie działania obu wyciągów na ekspresję SRd5ar1. Jednak w stosunku do drugiej izoformy takiej zależności nie stwierdzono, ponieważ efekt wykazywany przez zwierzęta TF w stosunku do ekspresji SRd5ar2 był znacznie silniejszy niż wykazywały to zwierzęta TE i TS.

Nieco odmienny efekt działania wyciągów zauważono w płacie brzusznym. Obecność ekstraktu z *E. angustifolium* u szczurów TE spowodowała obniżenie poziomu mRNA SRd5ar1 i SRd5ar2 kolejno o 47% i 11%, podczas gdy obecność ekstraktu z *S. repens* praktycznie nie wpłynęła na transkrypcje mRNA izoformy typu 2 (obniżenie poziomu o 0,4%). Trudno w tym przypadku odnosić efekty wyciągów do działania finasterydu, ponieważ w płacie brzusznym zauważono 125% wzrost aktywności o zwierząt TF.

Zaprezentowane wyniki, opisujące wpływ ekstraktów z *E. angustifolium* i *S. repens* na poziom wyżej wymienionych mRNA są pierwszymi tego typu przedstawionymi w modelu *in vivo*.

Przedstawione różnice na poziomie transkrypcji izoform SRd5ar mogą być konsekwencją różnicy w masach poszczególnych płatów u szczurów indukowanych testosteronem, a więc i potencjalnej odmiennej biodostępności bio-aktywnych metabolitów obu ekstraktów roślinnych, podwyższonego stężenia samego T użytego w doświadczeniu, jak również i odmiennego ich profilu fitochemicznego.

Opublikowano wyniki szeregu prac eksperymentalnych, w przeważającej liczbie przeprowadzonych w warunkach hodowli *in vitro* komórek prostaty, wskazujących na hamowanie przez ekstrakty z owoców *Serenoa repens* aktywności 5 α - reduktazy steroidowej [Rhodes i wsp., 1993; Delos i wsp., 1994; Hill i wsp., 2004], głównie w sposób niekompetycyjny [Delos i wsp., 1994; Iehle i wsp., 1995; Bayne i wsp., 1999; Hill i wsp., 2004]. Postacią ekstraktu lipido-sterolowego jaki podano analizom był również preparat Permixon [Bayne i wsp., 1999; Hill i wsp., 2004; Habib i wsp., 2005] lub suplement diety „PC-SPES“ [Hsieh i wsp., 2002]. Brak jest jednak dostatecznej liczby opublikowanych danych oceniających ich zdolność do zmiany profilu ekspresji większej liczby androgeno- i estrogeno-zależnych genów w komórkach wchodzących w skład gruczołu krokowego.

W latach 80. w eksperymencie na linii komórkowej ludzkich fibroblastów wykazano, że lipido-sterolowy ekstrakt z owoców *S. repens* wykazywał zdolność do hamowania syntezy DHT i aktywność enzymu reduktazy-3-ketosteroidowej metabolizującej przekształcanie DHT w 5 α -androstan-3- α -17- β -diol [Sultan i wsp., 1984]. W badaniach Delos i wsp. podjęto próbę porównania

potencjału inhibicyjnego dwóch azasteroidów, w tym finasterydu oraz heksanowego ekstraktu LSESr na zdolność hamowania aktywności 5 α -reduktazy typu 1, obecnej w linii ludzkich komórek raka prostaty DU-145 o niskiej wrażliwości androgenowej, w kulturze komórek insekta transfekowanych bakulowirusem [Delos i wsp., 1994]. Wykazano w komórkach DU-145 m. in. blisko 3 – krotnie bardziej znaczącą, niekompetycyjną inhibicję aktywności badanej izoformy enzymu pod wpływem ekstraktu, w porównaniu do finasterydu [IC₅₀ = 264 \pm 55 nM], co, zdaniem autorów, mogło znacząco wpłynąć na ilość tej izoformy w komórkach. Ten pośredni wpływ na liczbę kopii analizowanej izoformy reduktazy steroidowej autorzy tłumaczą wpływem LSESr na integralność i charakter lipidowy błony komórkowej, której to obecność wymagana jest do zachowania natywnej konformacji przez enzym.

W badaniach Hill i wsp., mających na celu ustalenie wpływu preparatu Permixon [10 i 100 μ g/ml] na zahamowanie proliferacji nowotworowych komórek prostaty: androgenozależnych PC-3 i androgeniezależnych LNCaP oraz komórkach raka piersi MCF-7, stwierdzono nieznaczną zdolność ekstraktu do inhibicji aktywności 5 α -reduktazy typu 2 [Hill i wsp., 2004]. W kolejnym badaniu, przeprowadzonym przez Iehle i wsp., lipidowo-sterolowy ekstrakt *S. repens* wykazał niekompetycyjną inhibicję aktywności obu izozymów reduktazy steroidowej. W tym przypadku również postulowano jego zdolność do modulowania środowiska błony komórkowej, kluczowej dla funkcjonowania 5 α -reduktazy [Iehle i wsp., 1995]. Również w badaniach na kulturach ludzkich komórek nabłonkowych i fibroblastów prostaty, przeprowadzonych przez Bayne i wsp., zaobserwowano ww. właściwości, a także zahamowanie aktywności dehydrogenazy 17- β -hydroksysteroidową (17 β -HSD) (enzymu odpowiadający za przekształcanie androstendionu w testosteron) [Bayne i wsp., 1999]. Analiza mikroskopowa wykazała istotne zmiany morfologiczne i cytologiczne komórek nabłonkowych i fibroblastów prostaty, włącznie z degradacją frakcji śródkomórkowych błon (głównie błon mitochondrialnych i jądra komórkowego). Ponadto analizowany preparat Permixon nie wpływał znacząco na sekrecję markera PSA, co zdaniem autorów, mogło sugerować, iż nie miał on wpływu na inne procesy komórkowe, będące pod kontrolą funkcjonalną androgenów, a w tym na zdolność do wiązania się ligandów z AR.

Badania Habib i wsp. oraz Hsieh i wsp., obejmujące ocenę wpływu preparatu Permixon na aktywność androgenów w androgenozależnych komórkach raka prostaty LNCaP, nie wykazały bezsprzecznie czy LSES może wpływać na sekrecję markera PSA [Hsieh i wsp., 2002; Habib i wsp., 2005]

Badania właściwości antyproliferacyjnych z wykorzystaniem ekstraktów *Epilobium* sp., przeprowadzone głównie w modelu hodowli komórkowych dostarczają pośrednich dowodów świadczących ich właściwościach wpływających na gospodarkę hormonalną [Hiermann i wsp.,

1997; Vitalone i wsp., 2001; Vitalone i wsp., 2006; Kiss i wsp., 2004; Kiss i wsp., 2006; Stolarczyk i wsp., 2013]. Ponadto wyniki badań przeprowadzone przez Lesuisse i wsp. [Lesuisse i wsp., 1996] oraz Ducrey i wsp. [Ducrey i wsp., 1997] wskazały na możliwość oddziaływania kluczowych metabolitów wtórnych zawartych w poszczególnych frakcjach ekstraktów z *Epilobium* sp. na aktywność SRd5ar. Jednakże żadne z tych badań nie podejmowało oceny zmian na poziomie transkrypcji obu izoform reduktazy steroidowej.

5.5.2.2. Ocena wpływu ekstraktów roślinnych na transkrypcję mRNA AR oraz wybranych genów genomowego oraz niegenomowego szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej zależnej od androgenów

Jak opisano w rozdziale 1.4.2.1. kluczową rolę w patogenezie BPH przypisuje się również receptorowi androgenowemu, z uwagi na fakt, iż T i DHT, w komórkach prostaty wiążą się do AR, jednakże powinowactwo DHT do receptora jest znacznie większe [Andriole i wsp., 2004]. Po przyłączeniu się liganda do odpowiednich kieszeni AR indukuje kaskadę zmian prowadzących transkrypcję szeregu genów promujących proliferację komórek stercza i zwiększanie ich objętości [Wilson i wsp., 1980; Wilson, 1980; Thigpen, 1992; Briganti i wsp., 2009; Yadav i wsp., 2012; Izumi i wsp., 2013].

Wykazano nieznaczny, odmienny wpływ ekstraktów z *E. angustifolium* oraz *S. repens* na transkrypcję mRNA receptora androgenowego w obu płatach szczurów indukowanych hormonalnie. W płacie brzuszny u zwierząt TE poziom mRNA AR uległ podwyższeniu zaledwie o 5,15%, względem grupy T. Obecność ekstraktu z *Serenoa repens* (grupa TS) spowodowała obniżenie ilości transkryptów kolejno o 7,73% (nieznamiennie). W płacie grzbietowym zmiana profilu transkrypcji AR pod wpływem obu ekstraktów była na poziomie zbliżonym, chociaż przeciwnym [Tab. 32.].

W świetle aktualnego stanu wiedzy trudno jest w bezpośredni sposób odnieść wyniki badań do danych literaturowych. Nie opublikowano bowiem badań oceniających zmiany poziomu mRNA AR u szczurów z indukowanym testosteronem rozrostem stercza pod wpływem badanych ekstraktów roślinnych.

W szeregu pracach eksperymentalnych, przeprowadzonych głównie w warunkach hodowli *in vitro*, oceniano molekularne podłoże zmian aktywności i ilościowych AR w procesie patologicznej proliferacji komórek prostaty, także pod wpływem różnych ksenobiotyków [Powers i wsp., 2013]. Wzrasta też liczba badań podejmujących próbę oszacowania zmian ekspresji i aktywności AR poszczególnych rejonach prostat z wykorzystaniem zwierząt doświadczalnych [Scolnik i wsp., 1994; Powers i wsp., 2013].

Stwierdzono m. in. obniżenie poziomu mRNA AR w części grzbietowo-bocznej prostaty u szczurów otrzymujących metimazol, co było skorelowane z obniżeniem poziomu białka, zarówno w tej części, jak i brzusznej [Aruldas i wsp., 2010].

W badaniach Prajapati i wsp. w indukowanym obecnością kadmu rozrostu prostaty u szczurów również stwierdzono zróżnicowany stopień indukcji ekspresji AR i ER α w zależności od lokalizacji w narządzie [Prajapati i wsp., 2014]. Wykazano także obniżenie poziomu ekspresji AR i ER α w brzusznej części prostaty u szczurów poddanych ekspozycji polichlorowanych bifenyli [2 mg/kg/dobę; i.p.] skorelowane z podwyższeniem m. in. testosteronu, estradiolu w surowicy [Selvakumar i wsp., 2011].

Zmiana aktywności AR pod wpływem γ - tokoferolu została również wykazana w u szczurów z dysplazją nabłonkową brzusznych prostat wywołaną obecnością N-metylo-N-nitrozomoczniku [Sanchez i wsp., 2013].

Ponadto zaobserwowano skorelowane z redukcją ekspresji AR obniżenie masy szeregu androgeno-zależnych organów (m. in. prostaty brzusznej, najądrzy, pęcherzyków nasiennych, dźwigacza odbytu, gruczołów Cowpera) u samców szczurów pokolenia F1 pod wpływem di (n-butylu) – ftalanu [250, 500, 700 mg/kg/dobę] lub flutamidu [1, 12.5, or 25 mg/kg/dobę] podawanego samicom *in utero* w 10 – 19 – tym dniu ciąży [Kim i wsp., 2010].

Na skomplikowany charakter molekularnych zależności pomiędzy zmianami ekspresji AR oraz szeregu czynników komórkowych wskazują m. in. badania Kumar i wsp. [Kumar i wsp., 2012]. W badaniach *in vitro* eksplantantu tkanki prostaty pobranej od pacjentów cierpiących na BPH wykazano obniżenie ekspresji mRNA i białka AR, ER- α , a także czynników wzrostu: EGF-R i IGF-1, podczas gdy poziom ER β , TGF β 1 oraz kinaz szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej (Fas and FasL) uległ obniżeniu pod wpływem wybranych SERM [Kumar i wsp., 2012].

Przykładem prac eksperymentalnych nad farmakoterpią schorzeń prostaty z wykorzystaniem indukcji testosteronowej u szczurów są m. in. badania Rick i wsp. [Rick i wsp., 2011]. W badaniach tych nie zaobserwowano jednak znaczących zmian w poziomie ekspresji mRNA i białka AR w prostatkach u szczurów (do indukcji wykorzystano komercyjne silikonowe implanty zawierające T). Efekt redukcji masy prostat wywołany obecnością cetroreliksu, odwracalnego antagonisty LHRH [0,625 mg/kg/dobę; p.o.], korelował z obniżeniem poziomu ekspresji AR oraz szeregu cytokin prozapalnych (IFN- γ , IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-13, IL-15, IL-17) i czynników wzrostu (EGF, FGF-2, FGF-7, FGF-8, FGF-14, TGF- β 1, VEGF-A) [Rick i wsp., 2011].

Jedną z przyczyn odmiennego efektu działania badanych wyciągów może być skomplikowana budowa samego receptora androgenowego, a także jego fizjologiczne, komórkowe, molekularne podłoże działania i regulacja aktywności [Briganti i wsp., 2009; Benett i wsp., 2010;

Yadav i wsp., 2012; Green i wsp., 2012; Izumi i wsp., 2013; Nicholson i wsp., 2013; Schrecengost i wsp., 2013]. Zagadnienie te szerzej omówiono w rozdziale 1.4.2.1.

Jak uprzednio wspomniano, oprócz bezpośredniego wpływu oddziaływania z białkami komórkowej maszynery transkrypcyjnej na aktywność molekularną AR kluczową rolę w tym procesie odgrywają tzw. białka korelatorowe: korelatorowe i korepresory genowego i niegenomowego szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej [Lee i wsp., 2000; Wang i wsp., 2005; Gao, 2010; Culig i wsp., 2012; van de Wijngaart i wsp., 2012; Izumi i wsp., 2013] [Ryc. 5.].

W toku badań będących przedmiotem pracy doktorskiej oba ekstrakty przeważnie w sposób znaczący indukowały transkrypcję mRNA białek regulatorowych, tj. p68, Arip4 oraz RafA, Mapk1 i Mapk3, w odniesieniu do zwierząt kontrolnych. W odniesieniu do zwierząt T obecność ekstraktów prowadziła do obniżenia mRNA p68 i Arip4 choć w stopniu słabszym niż stwierdzono to dla działania finasterydu w obu płatach prostaty. Dla mRNA RafA w obu płatach efekty działania wyciągów były na zbliżonym poziomie i nie wykazały statystycznie istotnego wpływu na transkrypcję wywołaną podawaniem testosteronu. Natomiast łączna obecność wyciągów i testosteronu powodowała hamowanie transkrypcji dla mRNA Mapk1 i Mapk3 w płacie grzbietowym, podczas gdy w płacie brzuszny przeważnie efekt ich działania był odwrotny, w stosunku do działania samego T [Tab. 35, 37.]. Wydaje się, że oba wyciągi, pomimo odmiennego profilu chemicznego, w zbliżony sposób wpływały na ekspresję analizowanych genów genomowego i niegenomowego szlaku zależnego od androgenów na poziomie mRNA. Jednakże w proponowanym modelu wykazano androgenowe, w tym przypadku zależne od testosteronu, podłoże regulacji ich transkrypcji.

Podobnie jak w przypadku AR trudno jest w bezpośrednio odnieść wyniki badań dla genów genomowego i niegenomowego szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej do danych literaturowych. Nie opublikowano bowiem wyników prac oceniających zmiany ich transkrypcji u szczurów z indukowanym testosteronem rozrostem stercza pod wpływem badanych ekstraktów roślinnych. Zaprezentowane wyniki, opisujące wpływ ekstraktów z *E. angustifolium* i *S. repens* na poziom wyżej wymienionych mRNA są pierwszymi tego typu przedstawionymi w modelu *in vivo*.

5.5.3. Analiza zmian ekspresji genów metabolizmu estrogenów w poszczególnych płatach szczurzych prostat

W toku badań stwierdzono, iż oba wyciągi słabo oddziaływały na transkrypcję mRNA dla CYP19 w zastosowanym modelu eksperymentalnym [Tab. 30, 31]. Ponadto u zwierząt stymulowanych testosteronem oba ekstrakty indukowały transkrypcję mRNA ER α i ER β w płacie grzbietowym oraz ER α w płacie brzuszny. W płacie grzbietowym wzrost poziomu mRNA ER α i ER β w przypadku wyciągu z *E. angustifolium* był zbliżony i wynosił odpowiednio 14,3% i 14,2%,

a obecność ekstraktu z *S. repens* u zwierząt TS spowodowała bardziej znaczącą indukcję, kolejno o 130% i 36%. W płacie brzuszny, w odniesieniu do zwierząt T, efekt ich działania na transkrypcję mRNA obu receptorów estrogenowych różnił się. Wyciąg z *S. repens* wykazał tendencję do silniejszego pobudzenia ER α i redukcji ilości transkryptów ER β [Tab. 22 – 25, 32.].

Podobnie jak w rozdziale powyżej różny efekt działania ekstraktów z *E. angustifolium* i *S. repens* w płacie brzuszny i grzbietowy szczurzych prostat może również wynikać ze skomplikowanej budowy receptorów ER α i ER β , czy też regulacji ich aktywności [Ellem i wsp., 2009; Ho i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2013]. Uważa się, że estrogeny mogą stymulować proliferację komórek nabłonka przewodów gruczołowych w obrębie płatów stercza, jak i komórek zrębu [Coffey i wsp., 1990; Prins i wsp., 2006; Prins i wsp., 2008; Briganti i wsp., 2009; Ellem i wsp., 2009; Ho i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2011]. Podkreśla się przy tym dualistyczny charakter udziału estrogenów za pośrednictwem ER oraz aromatazy (CYP19) w patomechanizmie BPH [Ho i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2013]. Ponadto udowodniono, iż ER α ulega ekspresji głównie w zrębie prostaty, a ER β jest zlokalizowany przede wszystkim, ale nie wyłącznie, w komórkach nabłonka [Weihua i wsp., 2002; Bosland, 2005; Ho i wsp., 2011; Nicholson i wsp., 2013]. Izoformie α przypisuje się głównie funkcję stymulującą proliferację komórek [Bosland, 2005; Bonkhoff i wsp., 2003; Bonkhoff i wsp., 2009; Kawashima i wsp., 2012]. Stąd też odmienny mechanizm działania badanych wyciągów u szczurów indukowanych testosteronem może być pośrednio konsekwencją zróżnicowanej budowy histologicznej obu rozróżnionych płatów, różnego udziału frakcji komórek nabłonka w stosunku do komórek zrębu, w szczególności w płacie brzuszny, zróżnicowanej reprezentacji obu izoform ER w płatach, co mogło się przełożyć na odmienny charakter dostępności biologicznej metabolitów wtórnych obu ekstraktów roślinnych. Potwierdzenie lub zaprzeczenie przytoczonych założeń wymaga jednak dalszych prac eksperymentalnych w tym zakresie.

W świetle przedstawionych wyników badań zachodzi zatem potrzeba przeprowadzenia dalszych kompleksowych badań nad obydwoma wyciągami roślinnymi w uwzględnieniu ich długotrwałego podawania zwierzętom, być może z użyciem różnych dawek, a także sprawdzenia efektywności działania przy łącznym podawaniu obu wyciągów. Być może, w takim schemacie eksperymentalnym, efekt ich działania może przybrać bardziej znamieny, synergistyczny, względnie addytywny charakter.

6. WNIOSKI

1. Wyciąg wodny z zieleń *Epilobium angustifolium* prowadzi do poprawy upośledzonych w wyniku rozrostu gruczołu krokowego, parametrów miki, zarówno objętości jak i częstotliwości oddawanego moczu u zwierząt doświadczalnych.
2. Wyciąg z zieleń *Epilobium angustifolium* wykazuje cechy preparatu o obwodowym działaniu przeciwzapalnym.
3. Wyciąg z zieleń *Epilobium angustifolium* oraz wyciąg z *Serenoa repens* hamują wzrost masy prostaty i wykazują działanie zapobiegawcze, chociaż w warunkach indukowanego rozrostu prostaty efekt silniejszy wykazuje ekstrakt z *Serenoa repens*.
4. Wyciąg z zieleń *Epilobium angustifolium* powoduje wzrost stężenia testosteronu, dihydrotestosteronu i estradiolu w surowicy zwierząt indukowanych testosteronem wykazując tym samym odmienny wpływ niż wyciąg z *Serenoa repens*.
5. U szczurów indukowanych testosteronem wykazano wyraźny hamujący charakter ekstraktów z *E. angustifolium* i *S. repens* poprzez wpływ na ekspresję mRNA obu izoform reduktazy steroidowej w szczególności w płacie grzbietowym prostaty szczurów.
6. U szczurów indukowanych testosteronem nie wykazano wpływu wyciągów na ekspresję mRNA dla receptora androgenowego.
7. Wyciąg z *S. repens* wykazał pobudzenie ekspresji mRNA receptora ER α zwłaszcza w płacie grzbietowym szczurów z indukowanym testosteronem przerostem prostaty.
8. Oba wyciągi słabo oddziałują na ekspresję mRNA dla CYP19 aromatazy w zastosowanym modelu przerostu prostaty u szczurów.
9. Oba ekstrakty indukują transkrypcję mRNA białek regulatorowych, tj. p68, Arip4 oraz RafA, Mapk1 i Mapk3.
10. Oba wyciągi działają hamująco na wywołaną testosteronem indukcję mRNA dla p68 i Arip4.
11. Kierunek działania wyciągów w połączeniu z testosteronem na transkrypcję mRNA białek Mapk1 i Mapk3 jest różny w zależności części analizowanej prostaty.

7. STRESZCZENIE

„Wpływ wyciągów z *Epilobium angustifolium* i *Serenoa repens* na ekspresję genów związanych z patogenezą łagodnego przerostu gruczołu krokowego“.

Celem pracy było zbadanie *in vivo* obwodowego działania przeciwzapalnego (w modelu indukcji obrzęku łapy karageniną) i właściwości hamujących diurezę suchego ekstraktu wodnego z ziela wierzbownicy wąskolistnej (*Epilobium angustifolium*) oraz ocena antyproliferacyjnego (poprzez pomiar zmian mas prostat (brzuszných i grzbietowych)) i molekularnego mechanizmu działania ekstraktu z *E. angustifolium* i lipidowo-sterolowego ekstraktu z owoców boczni piłkowanej (*Serenoa repens*) w modelu rozrostu prostaty u kastrowanych samców szczurów indukowanych testosteronem.

Molekularny mechanizm działania ekstraktów badano dokonując pomiaru: 1) transkrypcji mRNA genów kandydujących do rozwoju rozrostu gruczołu krokowego, tj. 5 α -reduktazy steroidowej typu 1 i typu 2 (SRd5ar1, SRd5ar2), aromatazy (CYP19), receptora androgenowego (AR), receptora estrogenowego α i β (ER α , ER β), oraz genów genomowego (kodujących białka p68 i Arip4) i niegenomowego (kodujących kinazy RafA, Mapk1, Mapk3) szlaków sygnalizacji białek wewnątrzkomórkowych zależnych od androgenów; 2) poziomu hormonów steroidowych (testosteronu, dihydrotestosteronu i β -estradiolu) w surowicy zwierząt.

Suchy wyciąg wodny z ziela *Epilobium angustifolium* [100 mg/kg; p.o.] wykazał obwodowo właściwości przeciwzapalne. Spowodował również poprawę upośledzonych w wyniku rozrostu gruczołu krokowego, parametrów mikcji, zwłaszcza częstości oddawanego moczu u szczurów. Ekstrakty z *E. angustifolium* i *S. repens* [100 mg/kg; p.o./21 dni] znamienne obniżyły masę prostat u szczurów nie poddanych indukcji hormonalnej, kolejno o 60,9% i 67,7%, chociaż w warunkach indukowanego testosteronem [40 mg/kg m.c. 3 razy co 7 dzień; s.c.] rozrostu prostaty silniejszy efekt wykazał ekstrakt z *Serenoa repens* (redukcja o 20,3%). W poszczególnych płatach prostaty efekty działania wyciągów na zmiany masy tychże były porównywalne.

Oba wyciągi w odmienny sposób wpłynęły na stężenia obwodowego testosteronu i dihydrotestosteronu w surowicy zwierząt indukowanych testosteronem. Wyciąg z ziela *E. angustifolium* spowodował znaczne podwyższenie stężenia obu tych hormonów oraz estradiolu, wykazując tym samym odmienny wpływ niż wyciąg z *Serenoa repens*. Efekt działania ekstraktu z *E. angustifolium* zbliżony do finasterydu stwierdzono dla stężenia estradiolu.

U szczurów indukowanych hormonalnie hamujący charakter ekstraktów z *E. angustifolium* i *S. repens* był szczególnie widoczny w przypadku transkryptów obu izoform reduktazy steroidowej, w szczególności w płacie grzbietowym. W części grzbietowej ekstrakt z *E. angustifolium* wykazał nieco silniejsze działanie hamujące transkrypcję SRd5ar1 w porównaniu do wyciągu z *S. repens* –

nastąpiło obniżenie poziomu kolejno 87% i 82,4%. Oba ekstrakty w zbliżony sposób, chociaż nieznaczny, hamowały transkrypcję SRd5ar2. Nie wykazano istotnego wpływu wyciągów na poziom mRNA receptora androgenowego i CYP19 w obu płatach.

Jednoznaczna silną indukcję mRNA ER α spowodował ekstrakt z *S. repens*. Ponadto oba wyciągi obniżyły poziom mRNA genomowego (p68 i Arip4) szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowych w obu płatach u zwierząt poddanych indukcji hormonalnej. Tendencję do silniejszego hamowania transkrypcji zauważono w przypadku ekstraktu z *S. repens*.

Podsumowując, w stosowanym modelu wykazano hamujące działanie obu ekstraktów na indukowany testosteronem rozrost prostaty u szczurów, o mechanizmie zależnym najprawdopodobniej od hamowania aktywności obu 5 α -reduktaz steroidowych, choć w przypadku wyciągu z *S. repens* udział innych badanych mechanizmów może być także postulowany.

8. SUMMARY

“Influence of *Epilobium angustifolium* of *Serenoa repens* extracts on the expression of genes involved in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia”.

The aim of this dissertation was to investigate in vivo peripheral anti-inflammatory (in the model carrageenan-induced paw edema) and diuresis-inhibiting properties of a dried aqueous extract from the herb of willow-herb (*Epilobium angustifolium*) and to assess of an anti-proliferative effect (by measuring changes in mass prostate (ventral and dorsal lobes)) and the molecular mechanism of action of *E. angustifolium* extract and lipid-sterolic extract from fruits of saw palmetto (*Serenoa repens*) in a model of prostate hyperplasia in testosterone induced castrated male rats.

The molecular mechanism of action of the extracts was evaluated by measuring: 1) changes in the mRNA transcription profile of candidate genes involved in the development of prostate hyperplasia: 5 α -steroid reductase type 1 and 2 (SRD5AR1 and 2), aromatase (CYP19), androgen receptor (AR), estrogen receptor α and β (ER α and ER β) and mRNAs of genes belonging to the genomic (genes encoding the p68 and Arip4 proteins) and nongenomic (genes encoding RafA, Mapk1, Mapk3 kinases) androgen-dependent, intracellular signaling pathways; 2) steroid hormones (testosterone, dihydrotestosterone and β -estradiol) levels in the serum of animals.

Dried aqueous extract from herb of *Epilobium angustifolium* [100 mg/kg; p.o.] revealed peripherally anti-inflammatory properties. Also resulted in the improvement of impaired, as a result of prostatic hyperplasia, voiding parameters, particularly frequency of urination in rats.

E. angustifolium and *S. repens* extracts [100 mg/kg; p.o./21 days] significantly reduced the prostate weight in rats not stimulated by testosterone injection, respectively by 60.9% and 67.7%, although in the conditions of testosterone induced prostatic hyperplasia [40 mg/kg/3 times every 7th day; s.c.] a stronger effect showed an extract from *S. repens* (reduction by 20.3%). In the particular prostate lobes effects of these extracts on weight changes were comparable.

Both extracts in different ways contributed to the peripheral concentrations of testosterone and dihydrotestosterone in serum of testosterone induced animals. Extract from herb of *E. angustifolium* caused a significant increase of both hormones and estradiol concentrations, thus demonstrating a different effect than the extract of *Serenoa repens*. The effect of *E. angustifolium* extract similar to finasteride was found for estradiol concentration.

In testosterone induced rats the inhibitory nature of *E. angustifolium* and *S. repens* extracts was particularly evident in the case of transcripts of both steroid 5 α -reductase isoforms, especially in the dorsal lobe. In the dorsal prostate extract from *E. angustifolium* slightly showed more potent

inhibition of SRd5ar1 mRNA transcription, compared to an extract from *S. repens* - a reduction of both mRNA levels, respectively by 87% and 82.4%, was observed. Both extracts in a similar way, although slightly, inhibited SRd5ar2 transcription. No significant effect of extracts on mRNA levels of androgen receptor and CYP19 in both lobes was revealed.

Uniquely a strong induction of ER α mRNA level caused the extract from *S. repens*. In addition, both extracts decreased mRNA levels of genomic (p68 and Arip4) intracellular signaling pathway in both prostate lobes in testosterone induced animals. The tendency towards a stronger inhibition of transcription was observed with a *S. repens* extract.

In summary, in the applied model the inhibitory effect of both extracts on the testosterone induced prostate hyperplasia in rats has been shown, probably dependent on the mechanism relying on inhibition of both 5 α -steroid reductase activities, although in the case of extract from *S. repens* the contribution of other studied mechanisms may be also postulated.

9. LITERATURA

- Abate-Shen C., Shen MM. Mouse models of prostate carcinogenesis. *Trends Genet.* 2002;18:1-5.
- Abbott DE., Pritchard C., Clegg NJ., Ferguson C., Dumpit R., Sikes RA., Nelson PS. Expressed sequence tag profiling identifies developmental and anatomic partitioning of gene expression in the mouse prostate. *Genome Biol.* 2003;4:79.
- Abdollah F., Briganti A., Suardi N., Castiglione F., Gallina A., Capitanio U., Montorsi F. Metabolic syndrome and benign prostatic hyperplasia: evidence of a potential relationship, hypothesized etiology, and prevention. *Korean J Urol.* 2011;52(8):507-16.
- Abrams P., Cardozo L., Fall M., Griffiths D., Rosier P., Ulmsten U., van Kerrebroeck P., Victor A., Wein A. The standardization of terminology of lower urinary tract function: report from the Standardisation Sub-committee of the International Continence Society. *Am J Obstet Gynec.* 2002;187:116-126.
- Agoulnik IU., Vaid A., Nakka M., Alvarado M., Bingman WE 3rd., Erdem H., Frolov A., Smith CL., Ayala GE., Ittmann MM., Weigel NL. Androgens modulate expression of transcription intermediary factor 2, an androgen receptor coactivator whose expression level correlates with early biochemical recurrence in prostate cancer. *Cancer Res.* 2006;66(21):10594-602.
- Ahmed A., Ali S., Sarkar FH. Advances in androgen receptor targeted therapy for prostate cancer. *J Cell Physiol.* 2014;229(3):271-6.
- Al-Shukri SH., Deschaseaux P., Kuzmin IV., Amdiy RR. Early urodynamic effects of the lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon(R)) in patients with lower urinary tract symptoms due to benign prostatic hyperplasia. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2000;3(3):195-199.
- Albrecht M., Gillen S., Wilhelm B., Doroszewicz J., Aumüller G. Expression, localization and activity of neutral endopeptidase in cultured cells of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *J Urol.* 2002;168(1):336-42.
- Alken CE. Konservative Behandlung des Prostata Adenom und Stadien Einteilung. *Urologe.* 1973;13:95-8.
- and tolerability of Permixon in benign prostatic hyperplasia after the exclusion of placebo
- Andriole G., Bruchovsky N., Chung LW., Matsumoto AM., Rittmaster R., Roehrborn C., Russell D., Tindall D. Dihydrotestosterone and the prostate: the scientific rationale for 5alpha-reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 2004;172(4 Pt 1):1399-403.
- Ang HH., Cheang HS., Yusof AP. Effects of *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali) on the initiation of sexual performance of inexperienced castrated male rats. *Exp Anim.* 2000;49(1):35-8.
- Arnold JT. DHEA metabolism in prostate: For better or worse? *Mol Cell Endocrinol.* 2009;301:83-88.

Arredondo MF., Blasina F., Echeverry C., Morquio A., Ferreira M., Abin-Carriquiry JA., Lafon L., Dajas F. Cytoprotection by *Achyrocline satureioides* (Lam) D.C. and some of its main flavonoids against oxidative stress. *J Ethnopharmacol.* 2004;91(1):13-20.

Arruzazabala ML., Más R., Molina V., Noa M., Carbajal D., Mendoza N. Effect of D-004, a lipid extract from the Cuban royal palm fruit, on atypical prostate hyperplasia induced by phenylephrine in rats. *Drugs R D.* 2006;7(4):233-41.

Aruldhas MM., Ramalingam N., Jaganathan A., John Sashi AM., Stanley JA., Nagappan AS., Vasavan J., Kannan A., Seshadri VN. Gestational and neonatal-onset hypothyroidism alters androgen receptor status in rat prostate glands at adulthood. *Prostate.* 2010;70(7):689-700.

Assinder SJ., Johnson C., King K., Nicholson HD. Regulation of 5 α -reductase isoforms by oxytocin in the rat ventral prostate. *Endocrinology.* 2004;145(12):5767-73.

Audy MC., Vacher P., Duly B. 17 beta-estradiol stimulates a rapid Ca²⁺ influx in LNCaP human prostate cancer cells. *Eur J Endocrinol.* 1996;135:367-373.

Avila DM., Fuqua SA., George FW., McPhaul MJ. Identification of genes expressed in the rat prostate that are modulated differently by castration and Finasteride treatment. *J Endocrinol.* 1998;159(3):403-11.

Avins AL., Bent S., Staccone S., Badua E., Padula A., Goldberg H., Neuhaus J., Hudes E., Shinohara K., Kane C. A detailed safety assessment of a saw palmetto extract. *Complement Ther Med.* 2008;16(3):147-54.

Azimi H., Khakshur AA., Aghdasi I., Fallah-Tafti M., Abdollahi M. A review of animal and human studies for management of benign prostatic hyperplasia with natural products: perspective of new pharmacological agents. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2012;11(3):207-21.

Azzouni F., Mohler J. Role of 5 α -reductase inhibitors in prostate cancer prevention and treatment. *Urology.* 2012;79(6):1197-205.

Bales GT., Christiano AP., Kirsh EJ. Gerber GS. Phytotherapeutic agents in the treatment of lower urinary tract symptoms: a demographic analysis of awareness and use at the University of Chicago. *Urology.* 1999;54:86.

Barakat HH., Hussein SAM., Marzouk MS., Merfort I., Linscheid M., Nawwar MAM. Polyphenolic metabolites of *Epilobium hirsutum*. *Phytochemistry.* 1997;46(5):935-941.

Barkin J. Benign prostatic hyperplasia and lower urinary tract symptoms: evidence and approaches for best case management. *Can J Urol.* 2011;18(Suppl.1.):14-19.

Barkin J., Folia C. Emerging therapies: what's new is old and what's old is new. *Can J Urol.* 2012;19(Suppl 1):49-53.

Barnard RJ., Aronson WJ. Benign prostatic hyperplasia: does lifestyle play a role?. *Phys Sports Med* 2009;37(4):141-146.

Barsanti JA., Finco DR., Mahaffey MM., Fayer-Hosken RA., Crowell WA., Thompson FN Jr., Shotts EB. Effects of an extract of *Serenoa repens* on dogs with hyperplasia of the prostate gland. *Am J Vet Res.* 2000;61(8):880-5.

Bartfay WJ., Bartfay E., Green-Johnson J. Gram-Negative and Gram-Positive Antibacterial Properties of the Whole Plant Extract of Willow Herb (*Epilobium angustifolium*). *Biol Res Nurs.* 2012;14(1):85-9.

Bartsch G., Rittmaster RS., Klocker H. Dihydrotestosterone and the role of 5 alpha-reductase inhibitors in benign prostatic hyperplasia. *Urologe A.* 2002;41(5):412-24.

Bates TS., Reynard JM., Peters TJ., Gingell JC. Determination of prostatic volume with transrectal ultrasound: A study of intra-observer and interobserver variation. *J Urol.* 1996;155(4):1299-300.

Bauer HW., Casarosa C., Cosci M., Fratta M., Blessmann G. Saw palmetto fruit extract for treatment of benign prostatic hyperplasia. Results of a placebo-controlled double-blind study. *MMW Fortschr Med.* 1999;141:127-32.

Baulieu EE., Robel P. Non-genomic mechanisms of action of steroid hormones. *Ciba Found Symp.* 1995;191:24-37.

Bayne CW., Donnelly F., Ross M., Habib FK. *Serenoa repens* (Permixon): a 5alpha-reductase types I and II inhibitor-new evidence in a coculture model of BPH. *Prostate.* 1999;40(4):232-41.

Begley LA., Kasina S., MacDonald J., Macoska JA. The inflammatory microenvironment of the aging prostate facilitates cellular proliferation and hypertrophy. *Cytokine.* 2008;43(2):194-9.

Belostotskaia LI., Nikitchenko IuV., Gomon ON., Chaika LA., Bondar VV., Dziuba VN. Effect of biologically active substances of animal and plant origin on prooxidant-antioxidant balance in rats with experimental prostatic hyperplasia. *Eksp Klin Farmakol.* 2006;69(4):66-8.

Benett NC., Gardiner RA., Hooper JD., Johnson DW., Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010;42(6):813-27.

Bent S., Kane C., Shinohara K., Neuhaus J., Hudes ES., Goldberg H., Avins AL. Saw palmetto for benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med.* 2006;354(6):557-66.

Benten WP., Lieberherr M., Giese G., Wunderlich F. Estradiol binding to cell surface raises cytosolic free calcium in T cells. *FEBS Lett.* 1998;422:349-353.

Benten WP., Lieberherr M., Stamm O., Wrehlke C., Guo Z., Wunderlich F. Testosterone signaling through internalizable surface receptors in androgen receptor-free macrophages. *Mol Biol Cell.* 1999;10:3113-3123.

Berges R., Dreikorn K., Hofner K. Leitlinien der Deutschen Urologen zur Therapie des benignen Prostatasyndroms (BPS) *Urologe A.* 2003;42:722-738.

Berges RR., Pientka L. Management of the BPH syndrome in Germany: who is treated and how? *Eur Urol.* 1999;36(Suppl. 3):21-27.

Berry SJ., Coffey DS., Walsh PC., Ewing LL. The development of human benign prostatic hyperplasia with age. *J Urol.* 1984;132:474–9.

Bierhoff E., Vogel J., Benz M., Giefer T., Wernert N., Pfeifer U. Stromal nodules in benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol.* 1996;29:345-54.

Blanco JC., Minucci S., Lu J., Yang XJ., Walker KK., Chen H., Evans RM., Nakatani Y., Ozato K. The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* 1998;12(11):1638-51.

Blok LJ., de Ruiter PE., Brinkmann AO. Forskolin-induced dephosphorylation of the androgen receptor impairs ligand binding. *Biochemistry.* 1998;37(11):3850-57.

Blumenthal M., Goldberg A., Brinkmann J., editors. *Herbal Medicine: Expanded Commission E Monographs.* Boston (MA): Integrative Medicine Communications; 2000.

Bochenek A., Reicher M. *Anatomia człowieka. T. 2. Państwowe Zakłady Wydawnictw Lekarskich PZWL, Warszawa 2010:300-304.*

Bonkhoff H., Berges R. The evolving role of oestrogens and their receptors in the development and progression of prostate cancer. *Eur Urol.* 2009;55(3):533-42.

Bonkhoff H., Motherby H., Fixemer T. New insights into the role of estrogens and their receptors in prostate cancer. *Urologe A.* 2003;42(12):1594-601.

Borkowski A. Rola farmakoterapii skojarzonej w leczeniu BPH i męskich LUTS. *Przegl Urol.* 2011;3(67):8-13.

Borówka A. Łagodny rozrost stercza. Skala problemu. *Przegl Urol.* 2002;4(suppl.):7-8.

Bosland MC. The role of estrogens in prostate carcinogenesis: a rationale for chemoprevention. *Rev. Urol.* 2005;7(Suppl 3):4-10.

Bostwick DG., de la Roza G., Dundore P., Corica FA., Iczkowski KA. Intraepithelial and stromal lymphocytes in the normal human prostate. *Prostate* 2003;55:187-93.

Bourke JB., Griffin JP. Diabetes mellitus and prostatic hyperplasia. *Br Med J.* 1968;4(5634):832–833.

Braeckman J. A double-blind, placebo-controlled study of the plant extract *Serenoa repens* in the treatment of benign hyperplasia of the prostate. *European Journal of Clinical Research.* 1997;9:247–59.

Braeckman J., Denis L., de Lavel J. A double-blind, placebo-controlled study of the plant extract *Serenoa repens* in the treatment of benign hyperplasia of the prostate. *Eur J Clin Res.* 1997;

Briganti A., Capitiano U., Nazareno S., Andrea G., Andrea S., Bianchi M., Tutolo M., Di Girolamo V., Guazzoni G., Rigatti P., Montorsi F. Benign Prostatic Hyperplasia and Its Aetiologies. *Eur Ass Urol.* 2009;Suppl. 8:865-871

British Pharmacopoeia. British Pharmacopoeia Commission. 2008. Volume III. London (GB): The Stationary Office on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA). 2009.

Bruchovsky N., Rennie PS., Batzold FH., Goldenberg S.L, Fletcher T., McLoughlin MG. Kinetic parameters of 5 alpha-reductase activity in stroma and epithelium of normal, hyperplastic, and carcinomatous human prostates. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988;67:806–816.

Buck AC. Is there a scientific basis for the therapeutic effects of *serenoa repens* in benign prostatic hyperplasia? Mechanisms of action. *J Urol.* 2004;172(5 Pt 1):1792-9.

Bushman W. Etiology, epidemiology and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 2009;36(4):403-15.

Cao N., Haynes JM., Ventura S. Saw palmetto is an indirectly acting sympathomimetic in the rat-isolated prostate gland. *Prostate.* 2006;66(2):115-23.

Cao X., Qin J., Xie Y., Khan O., Dowd F., Scofield M., Lin MF., Tu Y. Regulator of G-protein signaling 2 (RGS2) inhibits androgen-independent activation of androgen receptor in prostate cancer cells. *Oncogene.* 2006;25(26):3719-34.

Carbajal D., Molina V., Mas R., Arruzazabala ML. Therapeutic effect of D-004, a lipid extract from *Roystonea regia* fruits, on prostate hyperplasia induced in rats. *Drugs Exp Clin Res.* 2005;31(5-6):193-7.

Carilla E., Briley M., Fauran F., Sultan C., Duvilliers C. Binding of Permixon, a new treatment for prostatic benign hyperplasia, to the cytosolic androgen receptor in the rat prostate. *J Steroid Biochem.* 1984;20(1):521-3.

Carraro JC., Raynaud JP., Koch G., Chisholm GD., Di Silverio F., Teillac P., Da Silva FC., Cauquil J., Chopin DK., Hamdy FC., Hanus M., Hauri D., Kalinteris A., Marencak J., Perier A., Perrin P. Comparison of phytotherapy (Permixon) with finasteride in the treatment of benign prostate hyperplasia: a randomized international study of 1,098 patients. *Prostate.* 1996;29(4):231-40.

Castoria G., Barone MV., Di Domenico M., Bilancio A., Ametrano D., Migliaccio A., Auricchio F. Non-transcriptional action of oestradiol and progestin triggers DNA synthesis. *Embo J.* 1999;18:2500-2510.

Chamberlain NL., Whitacre DC., Miesfeld, RL. Delineation of two distinct type 1 activation functions in the androgen receptor amino-terminal domain. *J. Biol. Chem.* 1996;271:26772-26778.

Chang C., Norris JD., Gron H., Paige LA., Hamilton PT., Kenan DJ., Fowlkes D., McDonnell DP. Dissection of the LXXLL nuclear receptor-coactivator interaction motif using combinatorial peptide libraries: Discovery of peptide antagonists of estrogen receptors alpha and beta. *Mol Cell Biol* 1999;19(12):8226–8239.

Chang CY., McDonnell DP. Androgen receptor–cofactor interactions as targets for new drug

discovery. *Trends Pharmacol. Sci.* 2005;26:225–228.

Chatterjee B. The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Mol Cell Biochem.* 2003;253(1-2):89-101.

Chen H., Lin RJ., Schiltz RL., Chakravarti D., Nash A., Nagy L., Privalsky ML., Nakatani Y., Evans RM. Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell.* 1997;90:569–580.

Chmelar R., Buchanan G., Need EF., Tilley W., Greenberg NM. Androgen receptor coregulators and their involvement in the development and progression of prostate cancer. *Int J Cancer.* 2007;120(4):719-33.

Choudhary MI., Azizuddin, Jalil S., Atta-ur-Rahman. Bioactive phenolic compounds from a medicinal lichen, *Usnea longissima*. *Phytochemistry.* 2005;66(19):2346-50.

Christensen MM., Bruskewitz RC. Clinical manifestations of benign prostatic hyperplasia and indications for therapeutic intervention. *Urol Clin North Am.* 1990;17(3):509-16.

Chughtai B., Lee R., Te A., Kaplan S. Role of inflammation in benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol.* 2011;13(3):147-50.

Chughtai B., Te A. BPH in 2012: novel agents in treatment of BPH. *Nat Rev Urol.* 2013;10(2):72-3.

Chute CG., Panser LA., Girman CJ., Oesterling JE., Guess HA., Jacobsen SJ., Lieber MM. The prevalence of prostatism: a population-based survey of urinary symptoms. *J Urol.* 1993;150(1):85-89.

Cochran RC., Ewing LL., Niswender GD. Serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone, prolactin, testosterone, 5 alpha-dihydrotestosterone, 5 alpha-androstane-3 alpha, 17 beta-diol, 5 alpha-androstane-3 beta, 17 beta-diol, and 17 beta-estradiol from male beagles with spontaneous or induced benign prostatic hyperplasia. *Invest Urol.* 1981;19(3):142-7.

Coffey DS., Walsh PC. Clinical and experimental studies of benign prostatic hyperplasia. *Urol Clin North Am.* 1990;17:461-75.

Corona G., Vignozzi L., Rastrelli G., Lotti F., Cipriani S., Maggi M. Benign prostatic hyperplasia: a new metabolic disease of the aging male and its correlation with sexual dysfunctions. *Int J Endocrinol.* 2014;2014:329456.

Coulson S., Rao A., Beck SL., Steels E., Gramotnev H., Vitetta L. A phase II randomised double-blind placebo-controlled clinical trial investigating the efficacy and safety of ProstateEZE Max: a herbal medicine preparation for the management of symptoms of benign prostatic hypertrophy. *Complement Ther Med.* 2013;21(3):172-9.

Cristoni A., Di Pierro F., Bombardelli E. Botanical derivatives for the prostate. *Fitoterapia.* 2000;71(Suppl 1):21-8.

Cukier J., Ducassou J., Le Guillou M., Leriche A., Lobel B., Toubol J. Permixon versus placebo; resultats d'une 'etude multicentrique. *Comptes Rend Therapeut Pharmacol Clin.* 1985;4:15-21.

Culig Z. Androgen receptor cross-talk with cell signalling pathways. *Growth Factors.* 2004;22(3):179-84.

Culig Z., Comuzzi B., Steiner H., Bartsch G., Hobisch A. Expression and function of androgen receptor coactivators in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;92(4):265-71.

Culig Z., Santer FR. Androgen receptor co-activators in the regulation of cellular events in prostate cancer. *World J Urol.* 2012;30(3):297-302.

Cunha GR., Hayward SW., Wang YZ., Ricke WA. Role of the stromal microenvironment in carcinogenesis of the prostate. *Int J Cancer.* 2003;107:1–10.

Cunha GR., Lung B. The possible influence of temporal factors in androgenic responsiveness of urogenital tissue recombinants from wild-type and androgen- insensitive (Tfm) mice. *J Exp Zool.* 1978; 205:181–193.

Cunha GR., Ricke W., Thomson A., Marker PC., Risbridger G., Hayward SW., Wang YZ., Donjacour AA., Kurita T. Hormonal, cellular, and molecular regulation of normal and neoplastic prostatic development. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004; 92:221–236.

Cunha GR., Ricke WA. A historical perspective on the role of stroma in the pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 2011;82(4-5):168-72.

Czap K. *Alternative Medicine Review Monographs.* Thome Research Inc., 2002:384-87.

Dadej R., Dadej-Jedrzejczak A. Farmakoterapia łagodnego rozrostu stercza – leki oryginalne i odtwórcze. *Geriatrics.* 2008;2:349-357.

Dadras SS., Cai X., Abasolo I., Wang Z. Inhibition of 5alpha-reductase in rat prostate reveals differential regulation of androgen-response geneexpression by testosterone and dihydrotestosterone. *Gene Expr.* 2001;9(4-5):183-94.

de la Rosette JJ., Alivizatos G., Madersbacher S., Perachino M., Thomas D., Desgrandchamps F., de Wildt M. *Benign Prostatic Hyperplasia. EAU Guidelines 2009.*

de la Rosette JJ., Alivizatos G., Madersbacher, Rioja Sanz C, Nordling J, Emberton M, Gravas S, Michel MC, Oelke M, EAU guidelines on benign prostatic hyperplasia (BPH). *Eur Urol.* 2001;40(3):256-263.

Debruyne F., Boyle P., Calais Da Silva FC., Gillenwater JG., Hamdy FC. Comparison of phytotherapeutic agent (Permixon) with an alpha-blocker (Tamsulosin) in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a 1-year international study. *Eur Urol.* 2002;41:497-506.

Debruyne F., Boyle P., Calais Da Silva FC., Gillenwater JG., Hamdy FC., Perrin P. Evaluation of the clinical benefit of permixon and tamsulosin in severe BPH patients-PERMAL study subset analysis. *Eur Urol.* 2004;45:773-9.

Dedhar S., Rennie PS., Shago M., Hagesteijn CY., Yang H., Filmus J., Hawley RG., Bruchovsky N., Cheng H., Matusik RJ., Gigue`re V. Inhibition of nuclear hormone receptor activity by calreticulin. *Nature*. 1994;367(6462):480–483.

Dedhia RC., McVary KT. Phytotherapy for lower urinary tract symptoms secondary to benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 2008;179(6):2119-25.

Delos S., Iehle C., Martin PM., Raynaud JP. Inhibition of the activity of 'basic' 5 alpha-reductase (type 1) detected in DU 145 cells and expressed in insect cells. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1994;48(4):347-52.

Denford KE. Flavonol glycosides and seed coat structure in certain species of *Epilobium* - A correlation. *Experientia*. 1980;36:299-300.

Denford KE., Karas I. Some observations on the seed coat structure within the genus *Epilobium*. *Experientia*. 1974;30(10):1144-7.

Descotes JL., Rambeaud JJ., Deschaseaux P., Faure G. Placebo-controlled evaluation of the efficacy

Detera-Wadleigh SD., Fanning TG. Phylogeny of the steroid receptor superfamily. *Mol Phylogenet Evol* 1994;3(3):192–205.

Di Silverio F, Monti S, Sciarra A, Varasano PA, Martini C, Lanzara S, D'Eramo G, Di Nicola S, Toscano V. Effects of long-term treatment with *Serenoa repens* (Permixon) on the concentrations and regional distribution of androgens and epidermal growth factor in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 1998;37(2):77-83.

Di Silverio F, D'Eramo G., Lubrano C., Flammia GP., Sciarra A., Palma E., Caponera M., Sciarra F. Evidence that *Serenoa repens* extract displays an antiestrogenic activity in prostatic tissue of benign prostatic hypertrophy patients. *Eur Urol*. 1992;21(4):309-14.

Di Silverio F, Flammia GP., Sciarra A., Caponera M., Mauro M., Buscarini M., Tavani M., D'Eramo G. Plant extracts in BPH. *Minerva Urol Nefrol*. 1993;45(4):143-9.

Dittmar KD., Banach M., Galigniana MD., Pratt WB. The role of DNAj-like proteins in glucocorticoid receptor hsp90 heterocomplex assembly by the reconstituted hsp90.p60.hsp70 foldosome complex. *J Biol Chem* 1998;273:7358–66.

Djavan B., Fong YK., Chaudry A., Reissigl A., Anagnostou T., Bagheri F. Progression delay in men with mild symptoms of bladder outlet obstruction: a comparative study of phytotherapy and watchful waiting. *World J Urol*. 2005;23:253-6.

Dreikorn K. The role of phytotherapy in treating lower urinary tract symptoms and benign prostatic hyperplasia. *World J Urol*. 2002;19:426-435.

Dreikorn K., Richter R., Schönhöfer PS. Drugs in the treatment of benign prostatic hypertrophy. Reply. *Urologe A*. 1990;29(3):166-7.

Ducrey B., Marston A., Gohring S., Hartmann RW., Hostettmann K. Inhibition of 5 α -Reductase and Aromatase by the Ellagitannins Oenothein A and Oenothein B from *Epilobium* Species. *Planta Medica*. 1997;63:111-14.

Duke JA. *Handbook of Medicinal Herbs*. Boca Raton, FL: CRC Press. 1985:443.

Dutkiewicz S. Aktualne zasady postępowania i leczenia łagodnego rozrostu stercza. *Przeg Lek*. 2008;4:62-70.

Dutkiewicz S. Choroby stercza (gruczołu krokowego). *Termedia Wydawnictwa Medyczne*. Poznań. 2010:155-86.

Dutkiewicz S. Zmiana standardów diagnostyczno-leczniczych w postępowaniu z chorymi na łagodny rozrost gruczołu krokowego. *Przeg Urol*. 2009;10(3):24-32.

Eicheler W., Tuohimaa P., Vilja P., Adermann K., Forssmann WG., Aumüller G. Immunocytochemical localization of human 5 alpha-reductase 2 with polyclonal antibodies in androgen target and non-target human tissues. *J Histochem Cytochem*. 1994;42(5):667-75.

Ellem SJ., Risbridger GP. Aromatase and regulating the estrogen:androgen ratio in the prostate gland. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2010;118(4-5):246-51.

Ellem SJ., Risbridger GP. The dual, opposing roles of estrogen in the prostate. *Ann NY Acad Sci*. 2009;1155:174-86.

Elterman DS., Barkin J., Kaplan SA. Optimizing the management of benign prostatic hyperplasia. *Ther Adv Urol*. 2012;4(2):77-83.

Ernst E., Weihmayr T. *Phytotherapy. 7: Applications in the urogenital tract*. *Fortschr Med*. 1998 Sep;116(25):40-1.

Eure GR. Management of Patients with Benign Prostatic Hyperplasia. In: *Benign Prostatic Hyperplasia. Disease Management Guide*. Thompson PD, NJ, USA. 2005.

European Pharmacopoeia 8.0. Directorate for the Quality of Medicines & healthcare of the Council of Europe (EDQM), Council of Europe, 67075 Strasbourg Cedex, France. 2014, vol.1.

European Scientific Cooperative On Phytotherapy [ESCOP], 2nd ed., New York, USA. 2003.

Fahim MS, Fahim Z., Harman JM., Clevenger TE., Mullins W., Hafez ES. Effect of *Panax ginseng* on testosterone level and prostate in male rats. *Arch Androl*. 1982;8(4):261-3.

Farmakopea Polska. Wyd. IX, Tom. 1. *Polskie Toarzystwo Farmaceutyczne*, Warszawa, 2011.

Farnsworth WE. Estrogen in the etiopathogenesis of BPH. *Prostate*. 1999;41(4):263-74.

Febbo PG., Kantoff PW., Platz EA., Casey D., Batter S., Giovannucci E., Hennekens CH., Stampfer MJ. The V89L polymorphism in the 5alpha-reductase type 2 gene and risk of prostate cancer. *Cancer Res*. 1999;59:5878-5881.

Filson CP., Wei JT., Hollingsworth JM. Trends in medical management of men with lower urinary tract symptoms suggestive of benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2013;82(6):1386-93.

Fong YK., Milani S., Djavan B. Role of phytotherapy in men with lower urinary tract symptoms. *Curr Opin Urol.* 2005;15(1):45-8.

Foradori CD., Weiser MJ, Handa RJ. Non-genomic actions of androgens. *Front Neuroendocrinol* 2008;29(2):169–81.

Foradori CD., Werner SB, Sandau US, Clapp TR, Handa RJ. Activation of the androgen receptor alters the intracellular calcium response to glutamate in primary hippocampal neurons and modulates sarco/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 transcription. *Neuroscience.* 2007;149:155–164.

Foster S., Duke JA. Peterson Field Guide to Medicinal Plants & Herbs of Eastern & Ce. 2000:164.

Gann PH., Hennekens CH., Longcope C., Verhoek-Oftedahl W., Grodstein F., Stampfer MJ. A prospective study of plasma hormone levels, nonhormonal factors, and development of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 1995;26(1):40-9.

Gao W. Androgen receptor as a therapeutic target. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(13):1277-84.

Garraway WM., Alexander FE. Prostate disease: epidemiology, natural history and demographic shifts. *Br J Urol.* 1997;79(2):3-8.

Geavlete P., Multescu R., Geavlete B. Serenoa repens extract in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Ther Adv Urol.* Aug 2011;3(4):193-198.

Gerber GS. Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. *Curr Urol Rep.* 2002;3(4):285-91

Gerber GS., Kuznetsov D., Johnson BC., Burstein JD. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of saw palmetto in men with lower urinary tract symptoms. *Urology.* 2001;58:960-4.

Gerber GS., Zagaja GP., Bales GT., Chodak GW., Contreras BA. Saw palmetto (*Serenoa repens*) in men with lower urinary tract symptoms: effects on urodynamic parameters and voiding symptoms. *Urology.* 1998;51(6):1003-7.

Giannakopoulos X., Baltogiannis D., Giannakis D., Tasos A., Sofikitis N., Charalabopoulos K., Evangelou A. The lipidosterolic extract of *Serenoa repens* in the treatment of benign prostatic hyperplasia: a comparison of two dosage regimens. *Adv Ther.* 2002;19(6):285-96.

Gioeli D., Ficarro SB., Kwiek JJ., Aaronson D., Hancock M., Catling AD., White FM., Christian RE., Settlage RE., Shabanowitz J., Hunt DF., Weber MJ. Androgen receptor phosphorylation. Regulation and identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem.* 2002;277(32):29304-14.

Giri D, Ittmann M. Interleukin-8 is a paracrine inducer of fibroblast growth factor 2, a stromal and epithelial growth factor in benign prostatic hyperplasia. *Am J Pathol.* 2001;159:139-47.

Głowacka A., Mianowany M., Trojanowska D., Budak A. Ocena aktywności przeciwgrzybiczej wyciągu wodnego z wierzbownicy drobnokwiatowej (*Epilobium parviflorum* Schreb.) wobec dermatofitów z gatunku *Trichophyton mentagrophytes*. *Postepy Fitoterapii.* 2013;3:163-166.

Godoy A., Kawinski E., Li Y., Oka D., Alexiev B., Azzouni F. 5 α -reductase type 3 expression in

human benign and malignant tissues: a comparative analysis during prostate cancer progression. *Prostate* 2011;71:1033-46.

Goepel M., Hecker U., Krege S., Rübber H., Michel MC. Saw palmetto extracts potently and noncompetitively inhibit human alpha1-adrenoceptors in vitro. *Prostate*. 1999;38(3):208-215.

Gonzales GF., Vasquez V., Rodriguez D., Maldonado C., Mormontoy .J, Portella J., Pajuelo M., Villegas .L, Gasco M. Effect of two different extracts of red maca in male rats with testosterone-induced prostatic hyperplasia. *Asian J Androl*. 2007;9(2):245-51.

Gorbachinsky I., Akpınar H., Assimos DG. Metabolic syndrome and urologic diseases. *Rev Urol*. 2010;12:e157-80.

Gormley GJ., Stoner E., Bruskewitz RC., Imperato-McGinley J., Walsh PC., McConnell JD., Andriole GL., Geller J., Bracken BR., Tenover JS. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. The Finasteride Study Group. *N Engl J Med*. 1992;327(17):1185-91.

Gormley GJ., Stoner E., Bruskewitz RC., Imperato-McGinley J., Walsh PC., McConnell JD., Andriole GL., Geller J., Bracken BR., Tenover JS., Vaughan ED., Pappas F., Taylor A., Binkowitz B., Ng J. Finasteride Study Group. The effect of finasteride in men with benign prostatic hyperplasia. 1992. *J Urol*. 2002;167(2 Pt 2):1102-7.

Gottlicher M., Heck C., Herrlich P. Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med*. 1998;76:480–489.

Granica S., Bazylko A., Kiss AK. Determination of macrocyclic ellagitannin oenothien B in plant materials by HPLC-DAD-MS: method development and validation. *Phytochem Anal*. 2012;23(6):582-7.

Gravas S., Oelke M. Current status of 5alpha-reductase inhibitors in the management of lower urinary tract symptoms and BPH. *World J Urol*. 2010;28(1):9-15.

Greco KA., McVary KT. The role of combination medical therapy in benign prostatic hyperplasia. *Int J Impot Res*. 2008;20(Suppl 3):33-43.

Green SM., Mostaghel EA., Nelson PS. Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;360(1-2):3-13.

Griffiths K. Estrogens and prostatic disease. International Prostate Health Council Study Group. *Prostate*. 2000;45:87-100.

Gryszczyńska A., Opala B. Palma sabalowa (Sabal palmetto Lodd., Saw palmetto) w łagodnym rozroście gruczołu krokowego. *Post Fitoter*. 2011;1:18-27.

Gupta S., Ahmad N., Mohan RR., Husain MM., Mukhtar H. Prostate cancer chemoprevention by green tea: in vitro and in vivo inhibition of testosterone-mediated induction of ornithine decarboxylase. *Cancer Res*. 1999;59(9):2115-20.

Habib FK. *Serenoa repens*: the Scientific Basis for the treatment of Benign Prostatic Hyperplasia.

- Eur Urol Suppl. 2009;8:887-93.
- Habib FK., Ross M., Ho CK., Lyons V., Chapman K. Serenoa repens (Permixon) inhibits the 5 α -reductase activity of human prostate cancer cell lines without interfering with PSA expression. *Int J Cancer*. 2005;114(2):190-4.
- Halkidou K., Gnanapragasam VJ., Mehta PB., Logan IR., Brady ME., Cook S., Leung HY., Neal DE., Robson CN. Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene*. 2003;22(16):2466-77.
- Hamilton RJ., Andriole GI., Freedland SJ. 5 α -Reductase Inhibitors: Preventing the Treatable. *Europ Assoc Urol*. 2012;62:242-45.
- Hammarsten J., Högstedt B. Hyperinsulinaemia as a risk factor for developing benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol*. 2001;39:151-8.
- Handisurya A., Steiner GE., Stix U., Ecker RC., Pfaffeneder-Mantai S., Langer D., Kramer G., Memaran-Dadgar N., Marberger M. Differential expression of interleukin-15, a pro-inflammatory cytokine and T-cell growth factor, and its receptor in human prostate. *Prostate*. 2001;49(4):251-62.
- Hanecki R. Łagodny rozrost gruczołu krokowego. *Medycyna Rodzinna*. 2003;6:1-8.
- Hansel R., Keller K., Rimpler H., Schneider G (Hrsg.). *Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis 5., vollständig neubearbeitete Auflage. Drogen E – O*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 1993:57-64.
- He B., Kempainen JA., Wilson EM. FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH₂-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J Biol Chem*. 2000;275(30):22986–22994.
- Heemers HV., Regan KM., Dehm SM. Androgen induction of the androgen receptor coactivator four and a half LIM domain protein-2: evidence for a role of serum response factor in prostate cancer. *Cancer Res*. 2007;67:10592-10599
- Heemers HV., Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr. Rev*. 2007;28:778-808.
- Heemers HV., Tindall DJ. Androgen receptor (AR) coregulators: a diversity of functions converging on and regulating the AR transcriptional complex. *Endocr Rev*. 2007;28(7):778-808.
- Heinlein CA., Chang C. Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev*. 2002;23(2):175–200.
- Hennenberg M., Stief CG., Gratzke C. Pharmacology of the lower urinary tract. *Indian J Urol*. 2014;30(2):181-8.
- Hevesi BT, Houghton PJ., Habtemariam S., Kéry A. Antioxidant and antiinflammatory effect of *Epilobium parviflorum* Schreb. *Phytother Res*. 2009;23(5):719-24.
- Hevesi BT., Kéry A. *Epilobium parviflorum*--in vitro study of biological action. *Acta Pharm Hung*.

2009;79(1):3-9.

Hiermann A. Die phytochemische Charakterisierung von *Epilobium angustifolium* L. und dessen Abgrenzung zu anderen *Epilobium*-species mittels DC und HPLC. *Sci. Pharm.* 1995;63:135-144.

Hiermann A., Bucar F. Studies of *Epilobium angustifolium* extracts on growth of accessory sexual organs in rats. *J Ethnopharmacol.* 1997;55(3):179-83.

Hiermann A., Juan H., Sametz W. Influence of *Epilobium* extracts on prostaglandin biosynthesis and carrageenin induced oedema of the rat paw. *J Ethnopharmacol.* 1986;17(2):161-9.

Hiermann A., Reidlinger M., Juan H., Sametz, W. Isolierung des antiphlogistischen Wirkprinzips von *Epilobium angustifolium*. *Planta Med.* 1991;57:357–360.

Hiermann A., Schramm HW., Laufer S. Anti-inflammatory activity of myricetin-3-O-beta-d-glucuronide and related compounds. *Inflamm. Res.* 1998;47:421-427.

Hill B., Kyprianou N. Effect of permixon on human prostate cell growth: lack of apoptotic action. *Prostate.* 2004;61(1):73-80.

Ho CK., Habib FK. Estrogen and androgen signaling in the pathogenesis of BPH. *Nat. Rev. Urol.* 2011;8:29–41.

Hofman K., Swinnen JV., Verhoeven G, Heyns W. E2F activity is biphasically regulated by androgens in LNCaP cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001;283:97–101.

Hostettmann K., Hamburger M. *Schweiz Zschr Ganzheits Medizin.* 1990;3:120-121

Hsieh TC., Wu JM. Mechanism of action of herbal supplement PC-SPES: elucidation of effects of individual herbs of PC-SPES on proliferation and prostate specific gene expression in androgen-dependent LNCaP cells. *Int J Oncol.* 2002;20(3):583-8.

Huang PL. A comprehensive definition for metabolic syndrome. *Dis Model Mech.* 2009;2:231-7.

Huggins C., Hodges CV. Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. 1941. *J Urol.* 2002; 168:9–12.

Hulka BS., Hammond JE., DiFerdinando G., Mickey DD., Fried FA., Checkoway H., Stumpf WE., Beckman WC Jr., Clark TD. Serum hormone levels among patients with prostatic carcinoma or benign prostatic hyperplasia and clinic controls. *Prostate.* 1987;11(2):171-82.

Hurkacz M. Czy stosowanie fitoterapii w leczeniu łagodnego rozrostu gruczołu krokowego jest skuteczne i bezpieczne? *Przegl Urol.* 2010;4(62):38-39.

Husiatyński W., Pypno W., Zbrzeźniak M., Borówka A. Możliwości leczenia farmakologicznego łagodnego rozrostu stercza (BPH) – aspekt kliniczny i ekonomiczny. *Nowa Med.* 1999;3:30-35.

Hutchison A., Farmer R., Verhamme K., Berges R., Navarrete RV. The efficacy of drugs for the treatment of LUTS/BPH, a study in 6 European countries. *Eur Urol.* 2007;51(1):207-15.

Huttunen S., Riihinen K., Kauhanen J., Tikkanen-Kaukanen C. Antimicrobial activity of different

Finnish monofloral honeys against human pathogenic bacteria. *APMIS*. 2013;121(9):827-34.

hypertrophy. *Br J Urol*. 1986;58:36-40.

Iehle C., Delos S., Guirou O., Tate R., Raynaud JP., Martin PM. Human prostatic steroid 5 alpha-reductase isoforms--a comparative study of selective inhibitors. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;54(5-6):273-9.

Iehle C., Radvanyi F., Gil Diez de Medina S., Ouafik LH., Gerard H., Chopin D., Raynaud JP., Martin PM. Differences in steroid 5 α -reductase isoenzymes expression between normal and pathological human prostate tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1999;68:189-195.

Ikonen T., Palvimo JJ., Kallio PJ., Reinikainen P., Janne OA. Stimulation of androgen-regulated transactivation by modulators of protein phosphorylation. *Endocrinology*. 1994;135:1359-1366.

Imamov O., Morani A., Shim GJ., Omoto Y., Thulin-Andersson C., Warner M., Gustafsson JA. Estrogen receptor beta regulates epithelial cellular differentiation in the mouse ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(25):9375-80.

Isaacs J., Coffey DS. Etiology and disease process of benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 1987;2(suppl):33-50.

Ivancheva S., Manolova .N, Serkedjieva J., Dimov V., Ivanovska N. Polyphenols from Bulgarian medicinal plants with anti-infectious activity. *Basic Life Sci*. 1992;59:717-28.

Izumi K., Mizokami A., Lin WJ., Lai KP., Chang C. Androgen receptor roles in the development of benign prostate hyperplasia. *Am J Pathol*. 2013;182(6):1942-9.

Jenkins EP., Andersson S., McGinley JL., Wilson JD., Russel DW. Genetic and pharmacological evidence for more than one of human steroid 5 α -reductase. *J Clin Invest*. 1992;89:293-300.

Jenster G., Trapman J., Brinkmann AO. Nuclear import of the human androgen receptor. *Biochem. J*. 1993;293(Pt 3):761-768.

Jenster G., van der Korput HA., Trapman J., Brinkmann AO. Identification of two transcription activation units in the N-terminal domain of the human androgen receptor. *J. Biol. Chem*. 1995;270, 7341-7346.

Jeong BC., Hong CY., Chattopadhyay S., Park JH., Gong EY., Kim HJ., Chun SY., Lee K. Androgen receptor corepressor-19 kDa (ARR19), a leucine-rich protein that represses the transcriptional activity of androgen receptor through recruitment of histone deacetylase. *Mol Endocrinol*. 2004;18(1):13-25.

Jepsen JV., Bruskewitz RC. Clinical manifestation and indications for treatment. In: Lepor H, ed. *Prostatic Diseases*. Philadelphia, PA: WB Saunders Co. 2000:123-142.

Juan H., Sametz W., Hiermann A. Anti-inflammatory effects of a substance extracted from *Epilobium angustifolium*. *Agents Actions*. 1988;23(1-2):106-7.

Juniewicz PE., Lemp BM., Barbolt TA., LaBrie TK., Batzold FH., Reel JR. Dose-dependent

hormonal induction of benign prostatic hyperplasia (BPH) in castrated dogs. *Prostate*. 1989;14(4):341-52.

Kampa M., Papakonstanti EA., Hatzoglou A., Stathopoulos EN., Stournaras C., Castanas E. The human prostate cancer cell line LNCaP bears functional membrane testosterone receptors that increase PSA secretion and modify actin cytoskeleton. *Faseb J*. 2002;16:1429-1431.

Kang DI., Chung JI. Current status of 5 α -reductase inhibitors in prostate disease management. *Korean J Urol*. 2013;54(4):213-9.

Kaplan SA. AUA Guidelines and Their Impact on the Management of BPH: An Update. *Treatment of LUTS and BPH. Rev Urol*. 2004;6(suppl 9):46-52.

Kaplan SA. Medical therapy for benign prostatic hyperplasia: new terminology, new concepts, better choices. *Rev Urol*. 2006;8:14-22.

Kaplan SA. Update on the American Urological Association guidelines for the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol*. 2006;8(Suppl. 4):10-17.

Kaplan SA., McConnell JD., Roehrborn CG., Meehan AG., Lee MW., Noble WR., Kusek JW., Nyberg LM Jr. Medical Therapy of Prostatic Symptoms (MTOPS) Research Group. Combination therapy with doxazosin and finasteride for benign prostatic hyperplasia in patients with lower urinary tract symptoms and a baseline total prostate volume of 25 ml or greater. *J Urol*. 2006;175(1):217-20.

Katz AE. Flavonoid and botanical approaches to prostate health. *J Altern Complement Med*. 2002;8(6):813-21.

Kawashima H., Nakatani T. Involvement of estrogen receptors in prostatic diseases. *Int J Urol*. 2012;19(6):512-22.

Kędzia B., Bobkiewicz-Kozłowska T., Furmanowa M., Mikołajczak P., Hołderna-Kędzia E., Khvostova EP., Otpuschennikov AA., Pustylnyak VO., Gulyaeva LF.. Gene Expression of Androgen Metabolising Enzymes in Benign and Malignant Prostatic Tissues. *Horm Metab Res*. 2014. [Publikacja elektroniczna przed drukiem].

Kim TH., Lim HJ., Kim MS., Lee MS. Dietary supplements for benign prostatic hyperplasia: an overview of systematic reviews. *Maturitas*. 2012;73(3):180-5.

Kim TS., Jung KK., Kim SS., Kang IH., Baek JH., Nam HS., Hong SK., Lee BM., Hong JT., Oh KW., Kim HS., Han SY., Kang TS. Effects of in utero exposure to DI(n-Butyl) phthalate on development of male reproductive tracts in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Health A*. 2010;73(21-22):1544-59.

King KJ., Nicholson HD., Assinder SJ. Effect of increasing ratio of estrogen:androgen on proliferation of normal human prostate stromal and epithelial cells, and the malignant cell line LNCaP. *Prostate* 2006;66:105-14.

Kinyamu HK., Archer TK. Modifying chromatin to permit steroid hormone receptor-dependent transcription. *Biochim. Biophys. Acta.* 2004;1677:30–45.

Kirby RS., McConnel JD. Benign Prostatic Hyperplasia. Fast facts. Health Press. Oxford. 2005;5:7-37.

Kirby RS., Roehrborn C., Boyle P., Bartsch G., Jardin A., Cary MM., Sweeney M., Grossman EB. Prospective European Doxazosin and Combination Therapy Study Investigators. Efficacy and tolerability of doxazosin and finasteride, alone or in combination, in treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia: the Prospective European Doxazosin and Combination Therapy (PREDICT) trial. *Urology.* 2003;61(1):119-26.

Kiss A., Kowalski J., Melzig MF. Compounds from *Epilobium angustifolium* inhibit the specific metallopeptidases ACE, NEP and APN. *Planta Med.* 2004;70(10):919-23.

Kiss A., Kowalski J., Melzig MF. Effect of *Epilobium angustifolium* L. extracts and polyphenols on cell proliferation and neutral endopeptidase activity in selected cell lines. *Pharmazie.* 2006;61(1):66-9.

Kiss A., Kowalski J., Melzig MF. Induction of neutral endopeptidase activity in PC-3 cells by an aqueous extract of *Epilobium angustifolium* L. and oenothien B. *Phytomedicine.* 2006;13(4):284-9.

Kiss AK., Bazylko A., Filipek A., Granica S., Jaszewska E., Kiarszys U., Kośmider A., Piwowarski J. Oenothien B's contribution to the anti-inflammatory and antioxidant activity of *Epilobium* sp. *Phytomedicine.* 2011;18(7):557-60.

Kohnen PW., Drach GW. Patterns of inflammation in prostatic hyperplasia: a histologic and bacteriologic study. *J Urol* 1979;121:755–60.

Kosalec I., Kopjar N., Kremer D. Antimicrobial activity of Willowherb (*Epilobium angustifolium* L.) leaves and flowers. *Curr Drug Targets.* 2013;14(9):986-91.

Kosano H., Stensgard B., Charlesworth MC., McMahon N., Toft D. The assembly of progesterone receptor-hsp90 complexes using purified proteins. *J Biol Chem* 1998;273:32973–9.

Kosowicz J., Miskowiak B., Konwerska A., Belloni AS., Nussdorfer GG., Malendowicz LK. Pneumadin in the rat ventral prostate and its hormonal regulation. *Hormon. Metab. Res.* 2004;36:78-81.

Kousteni S., Bellido T., Plotkin LI., O'Brien CA., Bodenner DL., Han L., Han K., DiGregorio GB., Katzenellenbogen JA., Katzenellenbogen BS., Roberson PK., Weinstein RS., Jilka RL., Manolagas SC. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. *Cell.* 2001;104:719-730.

Kramer G., Marberger M. Could inflammation be a key component in the progression of benign prostatic hyperplasia? *Curr Opin Urol.* 2006;16:25-9.

Kramer G., Mitteregger D., Marberger M. Is benign prostatic hyperplasia (BPH) an immune inflammatory disease? *Eur Urol.* 2007;51:1202-16.

Kramer G., Steiner GE., Handisurya A., Stix U., Haitel A., Knerer B., Gessl A., Lee C., Marberger M. Increased expression of lymphocyte-derived cytokines in benign hyperplastic prostate tissue, identification of the producing cell types, and effect of differentially expressed cytokines on stromal cell proliferation. *Prostate.* 2002;52(1):43-58.

Kujawski R., Mrozikiewicz PM., Bogacz A., Cichocka J., Mikołajczak PŁ., Czerny B., Bobkiewicz-Kozłowska T., Grześkowiak E. Influence of standardized extract of *Epilobium angustifolium* on estrogen receptor alpha and beta expression in *in vivo* model. *Ginekol Pol.* 2010;81(8):600-5.

Kujawski R., Mrozikiewicz PM., Mikołajczak PŁ., Kuzio G., Bogacz A., Bartkowiak-Wieczorek J., Grzeskowiak E., Bobkiewicz-Kozłowska T., Czerny B. Influence of *Epilobium angustifolium* and *Serenoa repens* extracts on cytochrome 2D2 and 3A1 expression level in rats. *Herba Pol.* 2010;56(4):39-51.

Kumar R., Verma V., Sarswat A., Maikhuri JP., Jain A., Jain RK., Sharma VL., Dalela D., Gupta G. Selective estrogen receptor modulators regulate stromal proliferation in human benign prostatic hyperplasia by multiple beneficial mechanisms--action of two new agents. *Invest New Drugs.* 2012;30(2):582-93.

Kumar VL., Wahane VD. Current status of 5 α -reductase inhibitors in the treatment of benign prostatic hyperplasia of prostate. *Indian J Med. Sci.* 2008;62(4):167-75.

Kwias Z., Borówka A. Łagodny rozrost stercza – podstawowe wiadomości dla lekarza rodzinnego. *Przew Lek.* 2001;10 (34):116-26.

Kwiaz Z. Rozpoznawanie i leczenie łagodnego rozrostu stercza. *Przew Lek.* 2001;15-23.

Kyprianou N., Isaacs JT. Expression of transforming growth factor-beta in the rat ventral prostate during castration induced programmed cell death. *Mol Endocrinol.* 1989;3:1515-1522.

Langley E., Zhou ZX., Wilson EM. Evidence for an anti-parallel orientation of the ligand-activated human androgen receptor dimer. *J Biol Chem* 1995;270(50):29983–29990.

Lee DK., Duan HO., Chang C. From androgen receptor to the general transcription factor TFIID. Identification of cdk activating kinase (CAK) as an androgen receptor NH(2)-terminal associated coactivator. *J. Biol. Chem.* 2000;275, 9308-9313.

Lee DK., Li M., Chang C. The second largest subunit of RNA polymerase II interacts with and enhances transactivation of androgen receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003;302:162-169.

Lee MY., Shin IS., Kyoung H., Seo CS., Son JK., Shin HK. α -Spinasterol from *Melandrium firmum* attenuates benign prostatic hyperplasia in a rat model. *Mol Med Rep.* 2014;9(6):2362-

- Lee MY., Shin IS., Seo CS., Lee NH., Ha HK., Son JK., Shin HK. Effects of *Melandrium firmum* methanolic extract on testosterone-induced benign prostatic hyperplasia in Wistar rats. *Asian J Androl.* 2012;14(2):320-4.
- Lee TI., Young, RA. Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu. Rev. Genet.* 2000;34:77-137.
- Lepor H. Comparison of single-agent androgen suppression for advanced prostate cancer. *Rev Urol.* 2005;7(Suppl 5):3-12.
- Lepor H. Medical therapy for benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 1993;42:483-501.
- Lepor H. Medical Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. *Rev Urol.* 2011;13(1):20-33.
- Lepor H. Pathophysiology, epidemiology, and natural history of benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol.* 2004;6(Suppl 9):3-10.
- Lepor H., Williford WO., Barry MJ., Brawer MK., Dixon CM., Gormley G., Haakenson C., Machi M., Narayan P., Padley RJ. The efficacy of terazosin, finasteride, or both in benign prostatic hyperplasia. Veterans Affairs Cooperative Studies Benign Prostatic Hyperplasia Study Group. *N Engl J Med.* 1996;335(8):533-9.
- Lesuisse D., Berjonneau J., Ciot C., Devaux P., Doucet B., Gourvest JF., Khemis B., Lang C., Legrand R., Lowinski M., Maquin P., Parent A., Schoot B., Teutsch G. Determination of Oenothien B as the Active 5- α -Reductase-Inhibiting Principle of the Folk Medicine *Epilobium parviflorum*. *J Nat Prod* 1996;59:490-2.
- Leveille H. Iconographie du genre *Epilobium*, Le Mans. 1910.
- Levin RM., Das AK. A scientific basis for the therapeutic effects of *Pygeum africanum* and *Serenoa repens*. *Urol Res.* 2000;28(3):201-9.
- Levine AC., Wang JP., Ren M., Eliashvili E., Russell DW., Kirschenbaum A. Immunohistochemical localization of steroid 5 alpha-reductase 2 in the human male fetal reproductive tract and adult prostate. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996;81(1):384-9.
- Lewis BA., Reinberg D. The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. *J Cell Sci.* 2003;116:3667-3675.
- Li J., Al-Azawi F. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas.* 2009;63:142-148.
- Li J., Ding Z., Wang Z., Lu JF., Maity SN., Navone NM., Logothetis CJ., Mills GB., Kim J. Androgen regulation of 5 α -reductase isoenzymes in prostate cancer: implications for prostate cancer prevention. *PLoS One.* 2011;6(12):e28840.
- Lieberherr M., Grosse B., Kachkache M., Balsan S. Cell signaling and estrogens in female rat osteoblasts: a possible involvement of unconventional nonnuclear receptors. *J Bone Miner Res.* 1993;8:1365-1376.
- Lin HK., Yeh S., Kang HY., Chang C. Akt suppresses androgen induced apoptosis by

phosphorylating and inhibiting androgen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98(13):7200–7205.

Linja MJ., Porkka KP., Kang Z., Savinainen KJ., Janne OA., Tamela TL., vessella RL., Palvimo JJ., Visakorpi T. Expression of androgen receptor coregulators in prostate cancer. *Clin Cancer Res*. 2004;10(3):1032-40.

Liu L., Zhao Y., Wang Y., Li Q., Wang Z., Wang L., Qiao Z. Testosterone induced Ca²⁺ influx in bone marrow-derived macrophages via surface binding sites. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*. 2005;27:623-628.

Lopatkin N., Sivkov A., Walther C., Schläfke S., Medvedev A., Avdeichuk J., Golubev G., Melnik K., Elenberger N., Engelmann U. Long-term efficacy and safety of a combination of sabal and urtica extract for lower urinary tract symptoms--a placebo-controlled, double-blind, multicenter trial. *World J Urol*. 2005;23(2):139-46.

Lopatkin NA., Sivkov AV., Medvedev AA., Walter K., Schlefke S., Avdeičuk IuI., Golubev GV., Mel'nik KP., Elenberger NA., Engelman U. Combined extract of Sabal palm and nettle in the treatment of patients with lower urinary tract symptoms in double blind, placebo-controlled trial]. *Urologiia*. 2006;(2):12:14-9.

Lowe FC. Phytotherapy in the management of benign prostatic hyperplasia. *Urology*. 2001;58(6 Suppl 1):71-6.

Lowe FC. The Role of *Serenoa repens* in the Clinical Management of Lower Urinary Tract Symptoms Due to Benign Prostatic Hyperplasia. *Eur Urol Suppl*. 2009;8:894-7.

Lowe FC. The Role of *Serenoa repens* in the Clinical management of Lower urinary tract Symptoms Due To Benign Prostatic Hyperplasia. *Eur Urol Suppl*. 2009;8:894-97.

Lowe FC., Fagelman E. Phytotherapy in the treatment of benign prostatic hyperplasia: an update. *Urology*. 1999;53(4):671-8.

Macdonald R., Tacklind JW., Rutks I., Wilt TJ. *Serenoa repens* monotherapy for benign prostatic hyperplasia (BPH): an updated Cochrane systematic review. *BJU Int*. 2012;109(12):1756-61.

Madersbacher S., Berger I., Ponholzer A., Marszalek M. Plant extracts: sense or nonsense? *Curr Opin Urol*. 2008;18(1):16-20.

Madersbacher S., Schatzl G., Brössner C., Dreikorn K. Phytotherapy for BPS. Which products can still be prescribed?. *Urologe A*. 2005;44(5):513-20.

Magdy El-Sheikh M., Dakkak MR., Saddique A. The effect of Permixon on androgen receptors. *Acta Obstet Gynecol Scand* 1988;67:397-399.

Mahendroo MS., Cala KM., Hess DV., Rusell DW. Unexpected virilization in male mice lacking steroid 5 α -reductase enzymes. *Endocrinology*. 2001;142:4652–4662.

Manin M., Baron S., Goossens K., Beaudoin C., Jean C., Veysiere G., Verhoeven G., Morel L. Androgen receptor expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway in normal and tumoral epithelial cells. *Biochem J.* 2002;366(Pt 3):729-36.

Marwick C. Growing use of medicinal botanicals forces assessment by drug regulators. *JAMA.* 1995;273(8):607-9.

Mazaris E., Tsiotras A. Molecular pathways in prostate cancer. *Nephrourol Mon.* 2013;5(3):792-800.

McConnell JD. Prostatic growth: new insights into hormonal regulation. *Br J Urol.* 1995;76(Suppl 1):5-10.

McConnell JD. The pathophysiology of benign prostatic hyperplasia. *J Androl.* 1991;12(6):353-63.

McConnell JD. The pathophysiology of benign prostatic hyperplasia. *J Androl.* 1991;12(6):356-63.

McConnell JD., Roehrborn CG., Bautista OM., Andriole GL Jr., Dixon CM., Kusek JW., Lepor H., McVary KT., Nyberg LM Jr., Clarke HS., Crawford ED., Diokno A., Foley JP., Foster HE., Jacobs SC., Kaplan SA., Kreder KJ., Lieber MM., Lucia MS., Miller GJ., Menon M., Milam DF., Ramsdell JW., Schenkman NS., Slawin KM., Smith JA.; Medical Therapy of Prostatic Symptoms (MTOPS) Research Group. The long-term effect of doxazosin, finasteride, and combination therapy on the clinical progression of benign prostatic hyperplasia. *N Engl J Med.* 2003;349(25):2387-98.

McDowell ME., Occhipinti S, Gardiner RA., Baade PD., Steginga SK. A review of prostate-specific antigen screening prevalence and risk perceptions for first-degree relatives of men with prostate cancer. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2009;18:545-555.

McGuire E. Detrusor response to obstruction. NIH Publication. 1987;221:87-2881.

McNeal J. Pathology of benign prostatic hyperplasia. Insight into etiology. *Urol Clin North Am.* 1990;17(3):477-486.

McNeal JE. Origin and evolution of benign prostatic enlargement. *Invest Urol.* 1978;15:340-345.

McVary KT., Roehrborn CG. American Urological Association Guideline: Management of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). American Urological Association. Education and Research, Inc. 2010.

McVary KT., Roehrborn CG., Avins AL., Barry MJ., Bruskewitz RC., Donnell RF., Foster HE Jr., Gonzalez CM., Kaplan SA., Penson DF., Ulchaker JC., Wei JT. American Urological Association (AUA) Guideline: Management of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). Chapter 1: Guideline on Management of Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). 2010:2-12.

McVary KT., Roehrborn CG., Avins AL., Barry MJ., Bruskewitz RC., Donnell RF., Foster HE Jr., Gonzalez CM., Kaplan SA., Penson DF., Ulchaker JC., Wei JT. American Urological Association (AUA): Guideline on Management of Benign Prostatic Hyperplasia. Chapter 1: Diagnosis and treatment Recommendation. *J Urol.* 2003;170(2):530-547.

McVary KT., Roehrborn CG., Avins AL., Barry MJ., Bruskewitz RC., Donnell RF., Foster HE Jr.,

Gonzalez CM., Kaplan SA., Penson DF., Ulchaker JC., Wei JT. Update on AUA guideline on the management of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 2011;185(5):1793-1803.

Mędraś M., Bablok L. *Andropauza.* 2004. Wydawnictwo Lekarskie PWL; s. 69.

Michels G., Hoppe UC. Rapid actions of androgens. *Front Neuroendocrinol.* 2008;29(2):182-98.

Migliaccio A., Castoria G., Di Domenico M., de Falco A., Bilancio A., Lombardi M., Barone MV., Ametrano D., Zannini MS., Abbondanza C., Auricchio F. Steroid-induced androgen receptor-estradiol receptor beta-*Src* complex triggers prostate cancer cell proliferation. *Embo J.* 2000;19:5406-5417.

Migliaccio A., Di Domenico M., Castoria G., de Falco A., Bontempo P., Nola E., Auricchio F. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J.* 1996;15:1292-1300.

Migliaccio A., Piccolo D., Castoria G., Di Domenico M., Bilancio A., Lombardi M., Gong W., Beato M., Auricchio F. Activation of the *Src*/p21ras/*Erk* pathway by progesterone receptor via cross-talk with estrogen receptor. *Embo J.* 1998; 17:2008–2018.

Mirek Z., Piękoś-Mirkowa H., Zajac A., Zajac M. Flowering plants and pteridophytes of Poland. A checklist. *Krytyczna lista roślin kwiatowych i paprotników Polski.* W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences, 2002:279-292.

Mishra VC., Allen DJ., Nicolaou C., Sharif H., Hudd C., Karim OM., Motiwala HG., Laniado ME. Does intraprostatic inflammation have a role in the pathogenesis and progression of benign prostatic hyperplasia?. *BJU Int.* 2007;100:327-331.

Mitra SK., Sundaram R., Mohan AR., Gopumadhavan S., Venkataranganna MV., Venkatesha U., Seshadri SJ., Anturlikar SD. Protective effect of Prostate in experimental prostatic hyperplasia in rats. *Asian J Androl.* 1999;1(4):175-9.

Mitropoulos D., Kyroudi A., Zervas A., Papadoukakis S., Giannopoulos A., Kittas C., Karayannacos P. *In vivo* effect of the lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on mast cell accumulation and glandular epithelium trophism in the rat prostate. *World J Urol.* 2002;19(6):457-61.

Montgomery BT., Young CY., Bilhartz DL., Andrews PE., Prescott JL., Thompson NF., Tindall DJ. Hormonal regulation of prostate-specific antigen (PSA) glycoprotein in the human prostatic adenocarcinoma cell line, LNCaP. *Prostate.* 1992;21:63-73.

Montgomery JS., Price DK., Figg WD. The androgen receptor gene and its influence on the development and progression of prostate cancer. *J Pathol.* 2001;195(2):138–46.

Moran E., Budia A., Broseta E., Boronat F. Phytotherapy in urology. Current scientific evidence of its application in benign prostatic hyperplasia and prostate adenocarcinoma. *Actas Urol Esp.* 2013;37(2):114-19.

Moundipa FP., Kamtchouing P., Koueta N., Tantchou J., Foyang NP., Mbiapo FT. Effects of aqueous extracts of *Hibiscus macranthus* and *Basella alba* in mature rat testis function. *J Ethnopharmacol.* 1999;65(2):133-9.

Mrozikiewicz PM., Buchwald W., Mścisz A., Otta H., Łuczowska T., Wojciechowska S. Contents of pharmacological active substances of *Epilobium angustifolium* L herb during the vegetation. *Herba Pol.* 2005;51(1):103-4.

Müntzing J., Eneroth P., Gustafsson JA., Liljekvist J. Direct and indirect effects of docosanol (IK.2), the active principle in Tadenan, on the rat prostate. *Invest Urol.* 1979;17(3):176-80.

Murray MT., Pizzorno J. *Encyclopedia of Natural Medicine.* John Bastyr University Publishing: Seattle, WA. 1994.

Naber KG., Weidner W. Chronic prostatitis-an infectious disease? *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:157–161.

Nawrot J. Surowce roślinne stosowane w łagodnym przerzucie gruczołu krokowego. *Herba Pol.* 2009;4(55):214-23.

Nazareth LV., Weigel NL. Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J Biol Chem.* 1996;271:19900-19907.

Negri-Cesi P., Colciago A., Poletti A., Motta M. 5alpha-reductase isozymes and aromatase are differentially expressed and active in the androgen-independent human prostate cancer cell lines DU145 and PC3. *Prostate.* 1999;41(4):224-32.

Negri-Cesi P., Poletti A., Colciago A., Magni P., Martini P., Motta M. Presence of 5alpha-reductase isozymes and aromatase in human prostate cancer cells and in benign prostate hyperplastic tissue. *Prostate.* 1998;34(4):283-91.

Nicholson TM., Ricke WA. Androgens and estrogens in benign prostatic hyperplasia: past, present and future. *Differentiation.* 2011;82(4-5):84-99.

Nicholson TM., Sehgal PD., Drew SA., Huang W., Ricke WA. Sex steroid receptor expression and localization in benign prostatic hyperplasia varies with tissue compartment. *Differentiation.* 2013;85(4-5):140-9.

Nickel JC., Roehrborn CG., O’Leary MP., Bostwick DG., Somerville MC., Rittmaster RS. Examination of the relationship between symptoms of prostatitis and histological inflammation: baseline data from the REDUCE chemoprevention trial. *J Urol* 2007;178:896-900.

Nickel JC., Roehrborn CG., O’Leary MP., Bostwick DG., Somerville MC., Rittmaster RS. The relationship between prostate inflammation and lower urinary tract symptoms: examination of baseline data from the REDUCE trial. *Eur Urol.* 2008;54:1379-84.

Noa M., Arruzazabala ML., Carbajal D., Más R., Molina V. Effect of D-004, a lipid extract from Cuban royal palm fruit, on histological changes of prostate hyperplasia induced with testosterone in

rats. *Int J Tissue React.* 2005;27(4):203-11.

Noble RL. The development of prostatic adenocarcinoma in Nb rats following prolonged sex hormone administration. *Cancer Res.* 1977;37:1929-33.

Nowak R., Krzaczek T. Sterols in the herb of *Epilobium angustifolium* L. *Herba Pol.* 1998;4:297-9.

O'Malley KJ., Dhir R., Nelson JB., Bost J., Lin Y., Wang Z. The expression of androgen-responsive genes is up-regulated in the epithelia of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 2009;69:1716-23.

Oelke M., Baarda J., Wijkstra H., de la Rosette JJ., Jonas U., Hoefner K. Age and bladder obstruction are independently associated with detrusor overactivity in patients with benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol.* 2008;54: 419-426.

Oelke M., Bachmann A., Descazeaud A., Emberton M., Gravas S., Michel MC., N'dow J., Nordling J., de la Rosette JJ. EAU guidelines on the treatment and follow-up of non-neurogenic male lower urinary tract symptoms including benign prostatic obstruction. *Eur Urol.* 2013;64(1):118-40.

Oki T., Suzuki M., Nishioka Y., Yasuda A., Umegaki K., Yamada S. Effects of saw palmetto extract on micturition reflex of rats and its autonomic receptor binding activity. *J Urol.* 2005;173(4):1395-9.

Okulicz-Kozaryn I., Załuska A., Kamińska E., Mikołajczak P., Szulc M., Bobkiewicz-Kozłowska T. Changes in nociceptive sensitivity induced by carrageenan inflammation evaluated using automated von Frey method, XVth International Congress of the Polish Pharmacological Society, Poznań, September 12-14, 2004, *Pol. J. Pharmacol.* 2004; 56(Suppl):174.

Oliveira AG., Coelho PH., Guedes FD., Mahecha GA., Hess RA., Oliveira CA. 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol (3beta-diol), an estrogenic metabolite of 5alpha-dihydrotestosterone, is a potent modulator of estrogen receptor ERbeta expression in the ventral prostate of adult rats. *Steroids.* 2007; 72:914–922.

Papandreou CN., Usmani B., Geng Y., Bogenrieder T., Freeman R., Wilk S., Finstad CL., Reuter VE., Powell CT., Scheinberg D., Magill C., Scher HI., Albino AP., Nanus DM. Neutral endopeptidase 24.11 loss in metastatic human prostate cancer contributes to androgen-independent progression. *Nat Med.* 1998;4(1):50-57.

Parsons JK., Carter HB., Partin AW., Windham BG., Metter EJ., Ferrucci L., Landis P., Platz EA. Metabolic factors associated with benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(7):2562-8.

Partin AW., Oesterling JE., Epstein JI., Horton R., Walsh PC. Influence of age and endocrine factors on the volume of benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 1991;145(2):405-9.

Paubert-Braquet M., Richardson FO., Servent-Saez N., Gordon WC., Monge MC., Bazan NG., Authie D., Braquet P. Effect of *Serenoa repens* extract (Permixon) on estradiol/testosterone-induced

experimental prostate enlargement in the rat. *Pharmacol Res.* 1996;34(3-4):171-9.

Paziewska A., Dabrowska M., Goryca K., Antoniewicz A., Dobruch J., Mikula M., Jarosz D., Zapala L., Borowka A., Ostrowski J. DNA methylation status is more reliable than gene expression at detecting cancer in prostate biopsy. *Br J Cancer.* 2014. [Publikacja elektroniczna przed drukiem]

Pecoraro S., Anacchiarico A., Gambardella MC., Sepe G. Efficacy of pretreatment with *Serenoa repens* on bleeding associated with transurethral resection of prostate. *Minerva Urol Nefrol.* 2004;56(1):73-8.

Pedram A., Razandi M., Sainson RC., Kim JK., Hughes CC., Levin ER. A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007;282(31):22278-88.

Pelc M., Kosakowska O., Weglarz Z., Przybył J., Geszprych A. Sterols and fatty acids in the seeds of evening primrose (*Oenothera* sp) and willow herb (*Epilobium* sp). *Herba Pol.* 2005;51(3/4):20-24.

Penna G., Fibbi B., Amuchastegui S., Cossetti .C, Aquilano F., Laverny G., Gacci M., Crescioli C., Maggi M., Adorini L. Human benign prostatic hyperplasia stromal cells as inducers and targets of chronic immuno-mediated inflammation. *J Immunol.* 2009;182(7):4056-64.

Physician's Desc Reference [PDR] for Herbal Medicines, 4th ed., USA. 2007:903-4.

Pizzorno J., Murray M. *Textbook of Natural Medicine*, 4th Edition. Churchill Livingstone, UK, 2012:735-36.

Platz EA., Kawachi I., Rimm EB., Longcope C., Stampfer MJ., Willett WC., Giovannucci E. Plasma steroid hormones, surgery for benign prostatic hyperplasia, and severe lower urinary tract symptoms. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 1999;2(5/6):285-289.

Platz EA., Rimm EB., Kawachi I., Colditz GA., Stampfer MJ., Willett WC., Giovannucci E. Alcohol consumption, cigarette smoking, and risk of benign prostatic hyperplasia. *Am J Epidemiol.* 1999;149(2):106-15.

Plosker GL., Brogden RN. *Serenoa repens* (Permixon). A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in benign prostatic hyperplasia. *Drug Aging.* 1996;9:379-395.

Pourmorad F., Ebrahimzadeh MA., Mahmoudi M., Yasini S. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Epilobium hirsutum*. *Pak J Biol Sci.* 2007;10(16):2764-7.

Powell SM., Christiaens V., Voulgaraki D., Waxman J., Claessens F., Bevan CL. Mechanisms of androgen receptor signalling via steroid receptor coactivator-1 in prostate. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(1):117-30.

Powers GL., Marker PC. Recent advances in prostate development and links to prostatic diseases. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2013;5(2):243-56.

Prajapati A., Rao A., Patel J., Gupta S., Gupta S. A single low dose of cadmium exposure induces benign prostate hyperplasia like condition in rat: A novel benign prostate hyperplasia rodent model. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2014;239(7):829-841.

Pratt WB., Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 1997;18:306-60.

Prescott J., Coetzee GA. Molecular chaperones throughout the life cycle of the androgen receptor. *Cancer Lett* 2006;231:12–19.

Priest R., Garzotto M., Kaufman J. Benign prostatic hyperplasia: a brief overview of pathogenesis, diagnosis, and therapy. *Tech Vasc Interv Radiol*. 2012;15(4):261-4.

Prins GS., Huang L., Birch L., Pu Y. The role of estrogens in normal and abnormal development of the prostate gland. *Ann.N.Y.Acad.Sci*. 2006;1089:1-13.

Prins GS., Korach KS. The role of estrogens and estrogen receptors in normal prostate growth and disease. *Steroids*. 2008;73:233-44.

Prins GS., Putz O. Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*. 2008;76(6):641-59.

Pritchard CC., Nelson PS. Gene expression profiling in the developing prostate. *Differentiation*. 2008;76(6):624-40.

Pytel YA., Vinarov A., Lopatkin N., Sivkov A., Gorilovsky L., Raynaud JP. Long-term clinical and biologic effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* in patients with symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Adv Ther*. 2002;19(6):297-306.

Ramstead AG., Schepetkin IA., Quinn MT., Jutila MA. Oenothien B, a cyclic dimeric ellagitannin isolated from *Epilobium angustifolium*, enhances IFN γ production by lymphocytes. *PLoS One*. 2012;7(11):e50546.

Rannikko S., Adlercreutz H. Plasma estradiol, free testosterone, sex hormone binding globulin binding capacity, and prolactin in benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer. *Prostate*. 1983;4(3):223-9.

Rauha JP., Remes S., Heinonen M., Hopia A., Kähkönen M., Kujala T., Pihlaja K., Vuorela H., Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol*. 2000;56(1):3-12.

Ravish IR., Nerli RB., Amarkhed SS. Finasteride to evaluate of the efficacy of dutasteride in the management of patients with lower urinary tract symptoms and enlarged prostate. *Arch Androl*. 2007;3:17-20.

Raynaud JP., Cousse H., Martin PM. Evidence that *Serenoa repens* extract displays an antiestrogenic activity in prostatic tissue of benign prostatic hypertrophy patients. *Eur Urol*. 1992;21(4):309-14.

Reece Smith H., Memon A., Smart CJ., Dewbury K. The value of Permixon in benign prostatic responders. *Clin Drug Invest.* 1995;5:291-297.

Rhodes L., Primka RL., Berman C., Vergult G., Gabriel M., Pierre-Malice M., Gibelin B. Comparison of finasteride (Proscar), a 5 alpha reductase inhibitor, and various commercial plant extracts in *in vitro* and *in vivo* 5 alpha reductase inhibition. *Prostate.* 1993;22(1):43-51.

Rhodes T., Girman CJ., Jacobson SJ. Longitudinal measures of prostate volume in a community-based sample: 3.5 year follow-up in the Olmsted county study of health status and urinary symptoms among men. *J Urol* 1995;153(Suppl):Abstr 291.

Rhodes T., Jacobson DJ., McGree ME., St Sauver JL., Girman CJ., Lieber MM., Klee GG., Demissie K., Jacobsen SJ. Longitudinal changes of benign prostate-specific antigen and [-2] proprostate-specific antigen in seven years in a community-based sample of men. *Urology.* 2012;79(3):655-61.

Rick FG., Schally AV., Block NL., Halmos G., Perez R., Fernandez JB., Vidaurre I., Szalontay L. LHRH antagonist Cetrorelix reduces prostate size and gene expression of proinflammatory cytokines and growth factors in a rat model of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 2011;71(7):736-47.

Ricke WA., Macoska JA., Cunha GR. Developmental, cellular and molecular biology of benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 2011;82(4-5):165-7.

Robert G., Descazeaud A., Nicolaiew N., Terry S., Sirab N., Vacherot F., Maillé .P, Allory Y., de la Taille A. Inflammation in benign prostatic hyperplasia: a 282 patients' immunohistochemical analysis. *Prostate.* 2009;69(16):1774-80.

Roberts RO., Jacobson DJ., Rhodes T., Klee GG., Leiber MM., Jacobsen SJ. Serum sex hormones and measures of benign prostatic hyperplasia. *Prostate.* 2004;61(2):124-31.

Roehrborn CG: Pathology of benign prostatic hyperplasia. *Int J Impot Res.* 2008;20(Suppl 3):11-18.

Roehrborn CG. Male lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH). *Med Clin N Am.* 2011;95:87-100.

Roehrborn CG. Reducing the risk of benign prostatic hyperplasia. *Rev Urol.* 2002;4(Suppl. 2):29-38.

Roehrborn CG., Barkin J, Tubaro A, Emberton M, Wilson TH, Brotherton BJ, Castro R. The influence of baseline parameters on changes in International Prostate Symptom Score (IPSS) after combined therapy with dutasteride plus tamsulosin or either monotherapy in men with benign prostatic hyperplasia (BPH) and lower urinary tract symptoms (LUTS): 4-year results CombAT study. *BJU Int.* 2013. doi: 10.1111/bju.12500

Roehrborn CG., Boyle P., Gould AL. Serum-prostate specific antigen as a predictor of prostate volume in men with benign prostatic hyperplasia. *Urology.* 1999;53:581-589.

Roehrborn CG., McConnell J., Bonilla J. Serum prostate antigen is a strong predictor of future prostate growth in men with benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 2000;163:13-20.

Roehrborn CG., Siami P., Barkin J. et al. The influence of baseline parameters on changes in international prostate symptom score with dutasteride, tamsulosin and combination therapy on lower urinary tract symptoms in men with benign prostatic hyperplasia and enlargement: 2-year results from the CombAT study. *J Urol.* 2008;179:616-621.

Roehrborn CG., Siami P., Barkin J. The effect of dutasteride, tamsulosin and combination therapy of lower urinary tract symptoms in men with benign prostatic hyperplasia and prostatic enlargement: 2-year results from the CombAT study. *Eur Urol.* 2010;57(1):123-131.

Roosen A., Gratzke C., Herrlemann A., Magistro G., Strittmatter F., Weinhold P., Tritschler S., Stief CG. Etiology and pathophysiology of benign prostate hyperplasia. *Urologe A.* 2013;52(2):186-92.

Roveda S., Colombo P. Sperimentazione clinica controllata sulla bioequivalenza terapeutica e sulla tollerabilità dei prodotti a base di *Serenoa repens* in capsule da 160 mg o capsule rettali da 640 mg. *Arch Med Interna.* 1994;44(2):61-75.

Rowan BG., Garrison N., Weigel NL, O'Malley BW. 8-Bromo-cyclic AMP induces phosphorylation of two sites in SRC-1 that facilitate ligand-independent activation of the chicken progesterone receptor and are critical for functional cooperation between SRC-1 and CREB binding protein. *Mol Cell Biol.* 2000;20:8720-8730.

Royuela M., de Miguel MP., Ruiz A., Fraile B., Arenas MI., Romo E., Paniagua R. Interferon-gamma and its functional receptors overexpression in benign prostatic hyperplasia and prostatic carcinoma: parallelism with c-myc and p53 expression. *Eur Cytokine Netw.* 2000;11(1):119-27.

Russell DW., Wilson JD. Steroid 5 alpha-reductase: Two genes / two enzymes. *Ann Rev Biochem.* 1994;63:25-61.

Ruszová E., Cheel J., Pávek S., Moravcová M., Hermannová M., Matějková I., Spilková J., Velebný V, Kubala L. *Epilobium angustifolium* extract demonstrates multiple effects on dermal fibroblasts *in vitro* and skin photo-protection *in vivo*. *Gen Physiol Biophys.* 2013;32(3):347-59.

Rządowska-Bodalska H., Żuk J., Olechnowicz-Stępień W. Badanie zieleń wierzbowicy drobnokwiatowej *Epilobium parviflorum* Schreb. *Herba pol.* 1987;33(3):179-184.

Sadar MD. Androgen-independent induction of prostate-specific antigen gene expression via crosstalk between the androgen receptor and protein kinase A signal transduction pathways. *J Biol Chem.* 1999;274:7777-7783.

Sanches LD., Santos SA., Carvalho JR., Jeronimo GD., Favaro WJ., Reis MD., Felisbino SL., Justulin LA Jr. Protective effect of γ -tocopherol-enriched diet on N-methyl-N-nitrosourea-induced epithelial dysplasia in rat ventral prostate. *Int J Exp Pathol.* 2013;94(6):362-72.

Sánchez P., Castro B., Torres JM., Olmo A., del Moral RG., Ortega E. Bisphenol A modifies the regulation exerted by testosterone on 5 α -reductase isozymes in ventral prostate of adult rats. *Biomed Res Int.* 2013;2013:629235.

Sánchez P., Torres JM., Castro B., Olmo A., del Moral RG., Ortega E. Expression of steroid 5 α -reductase isozymes in prostate of adult rats after environmental stress. *FEBS J.* 2013;280(1):93-101.

Schaffner W. Rośliny lecznicze chemizm, działanie, zastosowanie. MULTICO Oficyna Wydawnicza, Warszawa 1996:108-109.

Schauer IG., Rowley DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 2011;82(4-5):200-10.

Schauer IG., Rowley DR. The functional role of reactive stroma in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation.* 2011;82(4-5):200-10.

Scheid MP., Woodgett JR. PKB/AKT: functional insights from genetic models. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2(10):760-8.

Schepetkin IA., Kirpotina LN., Jakiw L., Khlebnikov AI., Blaskovich CL., Jutila MA., Quinn MT. Immunomodulatory activity of oenothain B isolated from *Epilobium angustifolium*. *J Immunol.* 2009;183(10):6754-66.

Schmidt LJ., Tindall DJ. Steroid 5 α -reductase inhibitors targeting BPH and prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2011;125(1-2):32-8.

Schrecengost R., Knudsen KE. Molecular pathogenesis and progression of prostate cancer. *Semin Oncol.* 2013;40(3):244-58.

Scolnik MD., Servadio C., Abramovici A. Comparative study of experimentally induced benign and atypical hyperplasia in the ventral prostate of different rat strains. *J Androl.* 1994;15(4):287-97.

Selvakumar K., Sheerin Banu L., Krishnamoorthy G., Venkataraman P., Elumalai P., Arunakaran J. Differential expression of androgen and estrogen receptors in PCB (Aroclor 1254)-exposed rat ventral prostate: impact of alpha-tocopherol. *Exp Toxicol Pathol.* 2011;63(1-2):105-12.

Shi R., Xie Q., Gang X., Lun J., Cheng L., Pantuck A. Effect of saw palmetto soft gel capsule on lower urinary tract symptoms associated with benign prostatic hyperplasia: a randomized trial in Shanghai. *Chin J Urol.* 2008;179:610-5.

Shikov AN., Poltanov EA., Dorman HJ., Makarov VG., Tikhonov VP., Hiltunen R. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of commercial water-soluble willow herb (*Epilobium angustifolium* L.) extracts. *J Agric Food Chem.* 2006;54(10):3617-24.

Shimada H., Tyler VE., McLaughlin JL. Biologically active acylglycerides from the berries of saw-palmetto (*Serenoa repens*). *J Nat Prod.* 1997;60(4):417-8.

Silver RI., Wiley EL., Davis DL., Thigpen AE., Russell DW., McConnell JD. Expression and regulation of steroid 5 alpha-reductase 2 in prostate disease. *J Urol.* 1994;152(2 Pt 1):433-7.

Simental JA., Sar M., Lane MV., French F.S., Wilson E.M. Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 1991;266: 510-518.

Slacanin I., Marston A., Hostettmann K., Delabays N., Darbellay C. Isolation and determination of flavonol glycosides from *Epilobium* species. *J Chromatogr.* 1991;557:391-398.

Smirnova G., Samoilova Z., Muzyka N., Oktyabrsky O. Influence of plant polyphenols and medicinal plant extracts on antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol.* 2012;113(1):192-9.

Smith P., Rhodes NP., Ke Y., Foster CS. Upregulation of estrogen and androgen receptors modulate expression of FGF-2 and FGF-7 in human, cultured, prostatic stromal cells exposed to high concentrations of estradiol. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2002;5:105-10.

Solano RM., García-Fernández MO., Clemente C., Querol M., Bellamy F., Sanchez-Chapado M., Prieto JC., Carmena MJ. Effects of *Pygeum africanum* extract (Tadenan) on vasoactive intestinal peptide receptors, G proteins, and adenylyl cyclase in rat ventral prostate. *Prostate.* 2000;45(3):245-52.

Span PN., van Bokhoven A., Smals AG., Sweep CG., Schalken JA. Partial sequencing and tissue distribution of the canine isoforms of steroid 5alpha-reductase type I and type II. *Prostate.* 2000;44(3):233-9.

Spencer TE., Jenster G., Burcin MM., Allis CD., Zhou J., Mizzen CA., McKenna NJ., Onate SA., Tsai SY., Tsai MJ., O'Malley BW. Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature.* 1997;389:194-198.

Stajner D., Popović BM., Boza P. Evaluation of willow herb's (*Epilobium angustifolium* L.) antioxidant and radical scavenging capacities. *Phytother Res.* 2007;21(12):1242-5.

Steenkamp V. Phytotherapies for the prostate. *Fitoterapia.* 2003;74:545-552.

Steenkamp V., Gouws MC., Gulumian M., Elgorashi EE., van Staden J. Studies on antibacterial, anti-inflammatory and antioxidant activity of herbal remedies used in the treatment of benign prostatic hyperplasia and prostatitis. *J Ethnopharmacol.* 2006;103(1):71-5.

Steiner G., Gessl A., Kramer G., Schollhammer A., Forster O., Marberger M. Phenotype and function of peripheral and prostatic lymphocytes in patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 1994;151:480-4.

Steiner GE., Stix U., Handisurya A., Willheim M., Haitel A., Reithmayr F., Paikl D., Ecker RC., Hrachowitz K., Kramer G., Lee C., Marberger M. Cytokine expression pattern in benign prostatic hyperplasia infiltrating T cells and impact of lymphocytic infiltration on cytokine mRNA profile in prostatic tissue. *Lab Invest.* 2003;83(8):1131-46.

Steinsapir J., Socci R., Reinach P. Effects of androgen on intracellular calcium of LNCaP cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991;179:90-96.

Stettner M., Kaulfuss S., Burfeind P. The relevance of estrogen receptor-beta expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Mol Cancer Ther.* 2007;6:2626-33.

Stolarczyk M., Naruszewicz M., Kiss AK. Extracts from *Epilobium* sp. herbs induce apoptosis in human hormone-dependent prostate cancer cells by activating the mitochondrial pathway. *J Pharm Pharmacol.* 2013;65(7):1044-54.

Stolarczyk M., Piwowarski JP., Granica S., Stefańska J., Naruszewicz M., Kiss AK. Extracts from *Epilobium* sp. Herbs, Their Components and Gut Microbiota Metabolites of Epilobium Ellagitannins, Urolithins, Inhibit Hormone-Dependent Prostate Cancer Cells-(LNCaP) Proliferation and PSA Secretion. *Phytother Res.* 2013;;27(12):1842-8.

Sultan C., Terraza A., Devillier C., Carilla E., Briley M., Loire C., Descomps B. Inhibition of androgen metabolism and binding by a liposterolic extract of "Serenoa repens B" in human foreskin fibroblasts. *J Steroid Biochem.* 1984;20(1):515-9.

Szopiński T., Dobruch J., Chłosta PL., Borówka A. Leczenie farmakologiczne łagodnego rozrostu stercza (BPH). *Post N Med.* 2012;4:362-370.

Tacklind J., Macdonald R., Rutks I., Stanke JU., Wilt TJ. Serenoa repens for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2012;12:CD001423.

Tacklind J., MacDonald R., Rutks I., Wilt TJ. Serenoa repens for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009;(2):CD001423.

Talpur N., Echard B., Bagchi D., Bagchi M., Preuss HG. Comparison of Saw Palmetto (extract and whole berry) and Cernitin on prostate growth in rats. *Mol Cell Biochem.* 2003;250(1-2):21-6.

Tan JA., Hall SH., Petrusz P., French FS. Thyroid receptor activator molecule, TRAM-1, is an androgen receptor coactivator. *Endocrinology.* 2000;141:3440-3450.

Theyer G., Kramer G., Assmann I. Phenotypic characterization of infiltrating leukocytes in benign prostatic hyperplasia. *Lab Invest.* 1992;66:96-107.

Thigpen AE., Silver RI., Guileyardo JM., Casey ML., McConnell JD., Russell DW. Tissue distribution and ontogeny of steroid 5 alpha-reductase isozyme expression. *J Clin Invest.* 1993;92(2):903-10.

Thomas JA., Keenan EJ. Effects of estrogens on the prostate. *J Androl.* 1994;15:97-9.

Thomas LN., Douglas RC., Lazier CB., Too CK., Rittmaster RS., Tindall DJ. Type 1 and type 2 5alpha-reductase expression in the development and progression of prostate cancer. *Eur Urol.* 2008;53(2):244-52.

Thomas LN., Douglas RC., Rittmaster RS., Too CK. Overexpression of 5alpha-reductase type 1 increases sensitivity of prostate cancer cells to low concentrations of testosterone. *Prostate.* 2009;1:595-602.

Thomas LN., Douglas RC., Vessey JP., Gupta R., Fontaine D., Norman RW., Thompson IM., Troyer DA., Rittmaster RS., Lazier CB. 5alpha-reductase type 1 immunostaining is enhanced in some prostate cancers compared with benign prostatic hyperplasia epithelium. *J Urol*. 2003;170(5):2019-25.

Thomas LN., Lazier CB., Gupta R., Norman RW., Troyer DA., O'Brien SP., Rittmaster RS. Differential alterations in 5alpha-reductase type 1 and type 2 levels during development and progression of prostate cancer. *Prostate*. 2005;63(3):231-239.

Timms BG., Hofkamp LE. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*. 2011;82(4-5):173-83.

Timms BG., Hofkamp LE. Prostate development and growth in benign prostatic hyperplasia. *Differentiation*. 2011;82(4-5):173-83.

Tita B., Abdel-Haq H., Vitalone A., Mazzanti G., Saso L. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *Farmaco*. 2001;56(5-7):341-3.

Torres JM., Ruiz E., Ortega E. Development of a quantitative RT-PCR method to study 5a-reductase mRNA isozymes in rat prostate in different androgen status. *Prostate*. 2003;5:674-679.

Tsai YS., Tong YC., Cheng JT., Lee CH., Yang FS., Lee HY. Pumpkin seed oil and phytosterol-F can block testosterone/prazosin-induced prostate growth in rats. *Urol Int*. 2006;77(3):269-74.

Unni E., Sun S., Nan B., McPhaul MJ., Cheskis B., Mancini MA., Marcelli M. Changes in androgen receptor nongenotropic signaling correlate with transition of LNCaP cells to androgen independence. *Cancer Res*. 2004;64:7156-7168.

Untergasser G, Madersbacher S, Berger P. Benign prostatic hyperplasia: age-related tissue-remodeling. *Exp Gerontol*. 2005;40:121-8.

Vacherot F., Azzouz M., Gil-Diez-De-Medina S., Colombel M., De La Taille A., Lefrère Belda MA., Abbou CC., Raynaud JP., Chopin DK. Induction of apoptosis and inhibition of cell proliferation by the lipido-sterolic extract of *Serenoa repens* (LSESr, Permixon) in benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 2000;45(3):259-66.

Van Coppenolle F., Le Bourhis X., Carpentier F., Delaby G., Cousse H., Raynaud JP., Dupouy JP., Prevarskaya N. Pharmacological effects of the lipidosterolic extract of *Serenoa repens* (Permixon) on rat prostate hyperplasia induced by hyperprolactinemia: comparison with finasteride. *Prostate*. 2000;43(1):49-58.

van de Wijngaart DJ., Dubbink HJ., van Royen ME., Trapman J., Jenster G. Androgen receptor coregulators: recruitment via the coactivator binding groove. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;352(1-2):57-69.

van der Heul-Nieuwenhuijsen L., Hendriksen PJ., van der Kwast TH., Jenster G. Gene expression profiling of the human prostate zones. *BJU Int*. 2006;98(4):886-97.

- Van-Hellemont J. Compedium de Phytotherapie. Association Pharmaceutique, Brussels 1986.
- Vela-Navarrete R., Escribano-Burgos M., Farré AL., García-Cardoso J., Manzarbeitia F., Carrasco C. *Serenoa repens* treatment modifies bax/bcl-2 index expression and caspase-3 activity in prostatic tissue from patients with benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 2005;173(2):507-10.
- Velaeti S., Dimitriadis E., Kontogianni-Katsarou K., Savvani A., Sdrolia E., Pantazi G., Stefanakis S., Trangas T., Pandis N., Petraki K. Detection of TMPRSS2-ERG fusion gene in benign prostatic hyperplasia. *Tumour Biol*. 2014. [Publikacja elektroniczna przed drukiem].
- Veltri R., Rodriguez R. Molecular biology, endocrinology, and physiology of the prostate and seminal vesicles. In: Wein, AJ., editor. *Campbell-Walsh Urology*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier; 2007:2677-2726.
- Verleye M., Akwa Y., Liere P., Ladurelle N., Pianos A., Eychenne B., Schumacher M., Gillardin JN. The anxiolytic etifoxine activates the peripheral benzodiazepine receptor and increases the neurosteroid levels in rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav*. 2005;82:712-720.
- Vermeulen A., Kaufman JM., Goemaere S., van Pottelberg I. Estradiol in elderly men. *Aging Male*. 2002;5:98-102.
- Vermeulen A., Rubens R., Verdonck L. Testosterone secretion and metabolism in male senescence. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 1972;34:730-735.
- Verrijdt G., Haelens A., Claessens F. Selective DNA recognition by the androgen receptor as a mechanism for hormone-specific regulation of gene expression. *Mol. Genet. Metab*. 2003;78:175-185.
- Vitali F., Fonte G., Saija A., Tita B. Inhibition of intestinal motility and secretion by extracts of *Epilobium* spp. in mice. *J Ethnopharmacol*. 2006;107(3):342-8.
- Vitalone A., Bordi F., Baldazzi C., Mazzanti G., Saso L., Tita B. Anti-proliferative effect on a prostatic epithelial cell line (PZ-HPV-7) by *Epilobium angustifolium* L. *Farmaco*. 2001;56(5-7):483-9.
- Vitalone A., Guizzetti M., Costa LG., Tita B. Extracts of various species of *Epilobium* inhibit proliferation of human prostate cells. *J Pharm Pharmacol*. 2003;55(5):683-90.
- Volak J., Stodola J. *Rośliny lecznicze Polska Oficyna Wydawnicza BGW, Warszawa, 1992:148.*
- von Schoultz B., Carlström K. On the regulation of sex-hormone-binding globulin - a challenge of an old dogma and outlines of an alternative mechanism. *J Steroid Biochem*. 1989;32(2):327-34.
- Voynova E., Dimitrova S., Naydenova E., Karadjov P. Inhibitory action of extracts of *Maclura aurantiaca* and *Epilobium hirsutum* on tumour models in mice. *Acta Physiol Pharmacol Bulg*. 1991;17(4):50-2.
- Vyas BA., Desai NY., Patel PK., Joshi SV., Shah DR. Effect of *Boerhaavia diffusa* in experimental prostatic hyperplasia in rats. *Indian J Pharmacol*. 2013;45(3):264-9.

- Wang L., Hsu CL., Chang C. Androgen receptor corepressors: an overview. *Prostate*. 2005;63(2):117-30.
- Wang Q., Carroll JS., Brown M. Spatial and temporal recruitment of androgen receptor and its coactivators involves chromosomal looping and polymerase tracking. *Mol. Cell*. 2005b;19: 631–642.
- Wang W., Bergh A., Damber JE. Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium. *Prostate*. 2004;61:60-72.
- Wang X., Yang Y., Guo X., Sampson ER., Hsu CL., Tsai MY., Yeh S., Wu G., Guo Y., Chang C. Suppression of androgen receptor transactivation by Pyk2 via interaction and phosphorylation of the ARA55 coregulator. *J Biol Chem*. 2002;277:15426-15431.
- Wehling M., Schultz A., Losel R. Nongenomic actions of estrogens: exciting opportunities for pharmacology. *Maturitas*. 2006;54:321-326.
- Wehrberger C., Dreikorn K., Schmitz-Dräger BJ., Oelke M., Madersbacher S. Phytotherapy of benign prostate syndrome and prostate cancer: better than placebo. *Urologe A*. 2012;51(12):1674-82.
- Weihua Z., Lathe R., Warner M., Gustafsson JA. An endocrine pathway in the prostate, ERbeta, AR, 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol, and CYP7B1, regulates prostate growth. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002; 99:13589–13594.
- Weihua Z., Makela S., Andersson LC., Salmi S., Saji S., Webster JJ., Jensen EV., Nilsson S., Warner M., Gustafsson JA. A role for estrogen receptor beta in the regulation of growth of the ventral prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(11):6330-5.
- Weihua Z., Warner M., Gustafsson JA. Estrogen receptor beta in the prostate. *Mol. Cell. Endocrinol*. 2002;193:1–5.
- Weisser H., Tunn S., Behnke B., Krieg M. Sabal serulata extract IDS 89 and its subfractions on 5 α -reductase activity in human benign prostatic hyperplasia. *Prostate* 1996;28:300-6.
- Weisser B., Behnke B., Helpap B., Bach D., Krieg M. Enzyme activities in tissue of human benign prostatic hyperplasia after three months treatment with the Sabal serrulata extract IDS 89 (Strogen) or placebo. *Eur Urol*. 1997;31:97-101.
- Weisser H., Tunn S., Behnke B., Krieg M. Effects of the sabal serrulata extract IDS 89 and its subfractions on 5 alpha-reductase activity in human benign prostatic hyperplasia. *Prostate*. 1996;28(5):300-6.
- Wichtl M. *Herbal Drug and Phytopharmaceuticals*, 3th ed. Stuttgart; Medpharm GmbH. 2004.
- Wilson JD. The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Am J Med*. 1980;68(5):745-56.

Wilson MJ., Davis AT, Ahmed K. Effects of antiandrogens (cyproterone acetate and flutamide) on the activity of nuclear protein phosphokinases and phosphatases of rat ventral prostate. *Mol Pharmacol.* 1980;17(2):212-7.

Wilt T., Ishani A., MacDonald R. *Serenoa repens* for benign prostatic hyperplasia. *Cochrane Database Syst Rev.* 2002;(3):CD001423.

Wilt T., Ishani A., MacDonald R. *Serenoa repens* for benign prostatic hyperplasia. Review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007;(3):CD001423.

Wilt TJ., Ishani A., Rutks I., MacDonald R. Phytotherapy for benign prostatic hyperplasia. *Public Health Nutr.* 2000;3(4A):459-72.

Winter ML., Bosland MC., Wade DR., Falvo RE., Nagamani M., Liehr JG. Induction of benign prostatic hyperplasia in intact dogs by near-physiological levels of 5 alpha-dihydrotestosterone and 17 beta-estradiol. *Prostate.* 1995;26(6):325-33.

Winter ML., Liehr JG. Possible mechanism of induction of benign prostatic hyperplasia by estradiol and dihydrotestosterone in dogs. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1996;136(2):211-9.

Woo H. The effects of dutasteride or tamsulosin alone and in combination on storage and voiding symptoms in men with lower urinary tract symptoms (LUTS) and benign prostatic hyperplasia (BPH): 4-year data from the combination of avodart and tamsulosin (CombAT) study. *BJU Int.* 2011;107(9):1431.

Woo HH., Chin PT., McNicholas TA., Gill HS., Plante MK., Bruskewitz RC., Roehrborn CG. Safety and feasibility of the prostatic urethral lift: a novel, minimally invasive treatment for lower urinary tract symptoms (LUTS) secondary to benign prostatic hyperplasia (BPH). *BJU Int.* 2011;108(1):82-8.

Wright AS., Douglas RC., Thomas LN., Lazier CB., Rittmaster RS. Androgen-induced regrowth in the castrated rat ventral prostate: role of 5alpha-reductase. *Endocrinology.* 1999;140(10):4509-15.

Wright AS., Thomas LN., Douglas RC., Lazier CB., Rittmaster RS. Relative potency of testosterone and dihydrotestosterone in preventing atrophy and apoptosis in the prostate of the castrated rat. *J Clin Invest.* 1996;98(11):2558-63.

Xu M., Mizoguchi I., Morishima N., Chiba Y., Mizuguchi J., Yoshimoto T. Regulation of antitumor immune responses by the IL-12 family cytokines, IL-12, IL-23, and IL-27. *Clin Dev Immunol.* 2010;2010. pii: 832454.

Yadav N., Heemers HV. Androgen action in the prostate gland. *Minerva Urol Nefrol.* 2012;64(1):35-49.

Yeh S., Lin HK., Kang HY., Thin TH., Lin MF., Chang C. From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 1999;96(10):5458-63.

Zhang Y., Yang Y., Chang C. ARA67 functions as a repressor to suppress androgen receptor transactivation. *Mol Cell Biol.* 2004;24(3):1044–1057

Zhang Z., Duan L., Du X., Ma H., Park I., Lee C. The proliferative effect of estradiol on human prostate stromal cells is mediated through activation of ERK. *Prostate* 2008;68:508–16.

Zhao H., Ramos CF., Brooks JD., Peehl DM. Distinctive gene expression of prostatic stromal cells cultured from diseased versus normal tissues. *J Cell Physiol.* 2007;210(1):111-21.

Zhu YS., Cai LQ., You X., Cordero JJ., Huang Y., Imperato-McGinley J. Androgen-induced prostate-specific antigen gene expression is mediated via dihydrotestosterone in LNCaP cells. *J Androl.* 2003;24(5):681-7.

Zhu YS., Imperato-McGinley JL. 5alpha-reductase isozymes and androgen actions in the prostate. *Ann N Y Acad Sci.* 2009;1155:43-56.

Zumoff B., Levin J., Strain GW., Rosenfeld RS., O'Connor J., Freed SZ., Kream J., Whitmore WS., Fukushima DK., Hellman L. Abnormal levels of plasma hormones in men with prostate cancer: Evidence toward a “two-disease” theory. *Prostate.*1982;3:579-588.