



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Gregor Jezernik

**Primerjava vpliva DNA polimorfizmov v genih za  
metabolizem lipidov na profile maščobnih kislin med  
bolniki z različnimi kompleksnimi boleznimi**

Diplomsko delo

Maribor, avgust 2014



Univerza v Mariboru

---

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

**Primerjava vpliva DNA polimorfizmov v genih za  
metabolizem lipidov na profile maščobnih kislin med  
bolniki z različnimi kompleksnimi boleznimi**

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa I. stopnje

Študent: Gregor Jezernik  
Študijski program: univerzitetni študijski program I. stopnje Kemijska tehnologija  
Predvideni strokovni naslov: diplomirani inženir kemijske tehnologije (UN)  
Mentor: red. prof. dr. Uroš Potočnik

Maribor, avgust 2014



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo  
in kemijsko tehnologijo

Številka: K1003574

Datum: 03.03.2014

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 46/2012)

izdajam

### SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

**Gregor Jezernik**, študent-ka univerzitetnega študijskega programa 1. stopnje KEMIJSKA TEHNOLOGIJA, lahko izdela diplomsko delo pri predmetu Biokemija in molekularna biologija.

Mentor-ica:izr. prof. dr. Uroš Potočnik

**Naslov diplomskega dela:**

PRIMERJAVA VPLIVA DNA POLIMORFIZMOV V GENIH ZA METABOLIZEM LIPIDOV NA PROFILE MAŠČOBNIH KISLIN MED BOLNIKI Z RAZLIČNIMI KOMPLEKSNI MI BOLEZNIMI

**Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:**

A COMPARISON OF THE INFLUENCE OF DNA POLYMORPHISMS IN THE GENES INVOLVED IN LIPID METABOLISM ON THE FATTY ACID PROFILES AMONG THE PATIENTS WITH DIFFERENT COMPLEX DISEASES

Diplomsko delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo diplomskega dela« in ga oddati v treh izvodih ter en izvod elektronske verzije do 30.09.2014 v referatu za študentske zadeve Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na senat članice v roku 3 delovnih dni.

Obvestiti:

- kandidata -ko,
- mentorja,
- somentorja,
- odložiti v arhiv



DEKAN:  
red. prof. dr. Željko Knez



FAKULTETA ZA KEMIJO  
IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

## IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal/a sam/a, prispevki drugih so posebej označeni.  
Pregledal/a sem literaturo s področja diplomskega dela po naslednjih geslih:

<b>Vir:</b> NCBI ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )	
<b>Gesla:</b>	<b>Število referenc</b>
asthma AND fatty acid profile	144
IBD AND fatty acid profile	13
uterine fibroid AND fatty acid profile	1
polyps AND fatty acid profile	9
arachidonic acid AND metabolism AND complex disease	197
LTB4 AND complex disease	54
PTGS2 AND complex disease	81
oleic acid AND metabolism AND complex disease	41

**Skupno število pregledanih člankov:** 540

**Skupno število pregledanih knjig:** 1

Maribor, Avgust 2014

Gregor Jezernik  
podpis

### Zahvala

Zahvaljujem se mentorju red. prof. dr. Urošu Potočniku za možnost opravljanja diplomskega dela na temi, ki me zelo zanima. Prav tako se zahvaljujem dr. Katji Repnik in asist. Staši Jurgec za vso pomoč pri laboratorijskem delu in oblikovanju diplomskega dela.

## **Primerjava vpliva DNA polimorfizmov v genih za metabolizem lipidov na profile maščobnih kislin med bolniki z različnimi kompleksnimi boleznimi**

### **Povzetek**

V diplomskem delu smo proučevali povezavo med polimorfizmi genov, ki sodelujejo pri presnovi maščobnih kislin, in profilom maščobnih kislin bolnikov s pogostimi kompleksnimi boleznimi. Namen dela je bilo ugotoviti povezavo med genotipom posameznega polimorfizma in masnimi deleži maščobnih kislin v eritrocitih, torej da prisotnost bolezenskega alela spremeni maščobno sestavo. Po preučevanju dosedanje literature smo izbrali primerne polimorfizme na genih, ki bi lahko vplivali na maščobni profil. Nato smo vzorce DNK genotipizirali z metodo RFLP ali s HRM. Genotipizirali smo slovenske bolnike z astmo (51), kronično vnetno črevesno boleznijo (103), polipi debelega črevesa (17), miomi maternice (52) in kontrolni skupini zdravih posameznikov (82) za SNP-ja v genih LTA4H, ki kodira encim levkotrien A4 hidrolazo, in PTGS2, ki kodira encim prostaglandin-endoperoksid sintazo 2. Funkcija encima LTA4H je hidrolizirati levkotrien A4 v levkotrien B4; encim PTGS2 pa metabolizira arahidonsko kislino v PGH<sub>2</sub>. Podatke pridobljene z genotipizacijo smo statistično obdelali.

Asociacijska študija je pokazala statistično signifikantno povezavo med bolezenskim alelom za SNP rs2540487 na genu LTA4H in patogenezo miomov maternice ( $p = 0,031$ ).

Rezultati kažejo več statistično signifikantnih povezav med profilom maščobnih kislin in genotipom polimorfizma rs2540487 v genu LTA4H; pri bolezenskih alelih zmanjšan delež adrenske in Osbondove kisline in povišan delež oleinske kisline. Adrenska in Osbondova kislina sta produkta arahidonske kisline pri podaljšanju omega-6 maščobnih kislin, kar bi lahko pomenilo, da se arahidonska kislina hitreje presnavlja po drugih metabolnih poteh. Razlog takšni spremembi v metabolizmu je povečano delovanje encima LTA4H, ki je povezano s SNP-jem rs2540487.

**Ključne besede:** profil maščobnih kislin, kompleksne bolezni, levkotrieni, arahidonska kislina, vnetni odziv

**UDK:** 575:543.635.3(043.2)

## **A comparison of the influence of DNA polymorphisms in the genes involved in lipid metabolism on the fatty acid profiles among the patients with different complex diseases**

### **Abstract**

We investigated the relationship between polymorphisms of genes involved in the metabolism of fatty acids and the fatty acid profile of patients with frequent complex diseases. The purpose of the work was to establish a statistically significant link between the genotype of the chosen polymorphism and weight percentages of fatty acids in erythrocytes, in other words, that the presence of the mutated allele alters the fatty composition. After examining existing literature, we selected suitable polymorphisms in genes that could affect the lipid profile. Then, the samples of DNA were tested with RFLP or by the HRM method. Slovenian patients with asthma (51), inflammatory bowel disease (103), colorectal polyps (17), uterine myomas (52) and a control group of healthy individuals (82) were genotyped for the SNP in genes LTA4H encoding the enzyme leukotriene A4 hydrolase and PTGS2 encoding the enzyme prostaglandin endoperoxide synthase 2. The LTA4H enzyme is hydrolyzed leukotriene A4 to leukotriene B4; PTGS2 enzyme metabolizes arachidonic acid to PGH<sub>2</sub>. The data obtained by genotyping were statistically analyzed.

The association study showed a statistically significant link between the disease allele of SNP rs2540487 in the LTA4H gene and the pathogenesis of uterine myomas ( $p = 0.031$ ).

The results show a number of statistically significant relationships between the fatty acid profile of patients and polymorphism rs2540487 genotype in the gene LTA4H; in disease alleles the level of adrenic and Osbond acid is reduced while the level of oleic acid is increased. Adrenic and Osbond acid are products of arachidonic acid in the omega-6 fatty acid elongation process, which could mean that arachidonic acid is metabolized through other pathways. The reason for such a change is an increase in LTA4H enzyme activity, which is linked to the SNP rs2540487.

**Key words:** profile of fatty acids, complex disease, leukotrienes, arachidonic acid, inflammatory response

**UDK:** 575:543.635.3(043.2)

## Kazalo

1	Uvod .....	1
2	Pogoste kompleksne bolezni in metabolizem lipidov .....	2
2.1	Kronična vnetna črevesna bolezen .....	2
2.2	Astma .....	3
2.3	Polipi debelega črevesa .....	4
2.4	Miomi maternice .....	4
2.5	Metabolizem izbranih lipidov .....	5
2.5.1	Elongacija in desaturacija .....	5
2.5.2	Metabolizem arahidonske kisline in njenih metabolitov .....	6
2.6	Genotipizacija .....	7
2.6.1	Verižna reakcija s polimerazo .....	7
2.6.2	Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov RFLP .....	9
2.6.3	Metoda HRM .....	10
3	Eksperimentalni del .....	11
3.1	Vzorci DNA .....	11
3.2	Materiali .....	11
3.2.1	Osnovne kemikalije .....	11
3.2.2	CEPH vzorci .....	12
3.2.3	Pufri in raztopine uporabljene v raziskavi .....	12
3.2.4	Laboratorijska oprema .....	13
3.3	Laboratorijske metode .....	13
3.3.1	Izolacija DNK .....	13
3.3.2	Merjenje koncentracij DNA .....	14
3.3.3	Verižna reakcija s polimerazo .....	15
3.3.4	Gelska elektroforeza .....	16
3.3.5	RFLP .....	16
3.3.6	HRM .....	16
3.4	Računalniški programi .....	17
3.4.1	Primer3 .....	17
3.4.2	IDT Oligo Analyzer .....	17
3.4.3	GeneRunner .....	17
3.4.4	Programsko orodje SPSS 22.0 .....	18
4	Rezultati in diskusija .....	19
4.1	Izbor polimorfizmov .....	19
4.1.1	FADS1 in FADS2 .....	19
4.1.2	PTGS2 .....	20
4.1.3	LTA4H .....	20
4.2	Optimizacija PCR in RFLP .....	21
4.3	Rezultati HRM .....	25
4.4	Rezultati statističnih analiz .....	26
4.4.1	Povezava med deleži oleinske in arahidonske kisline .....	30
5	Zaključek .....	32
6	Literatura .....	33
7	Priloge .....	1
7.1	Priloga 1 .....	1
7.2	Priloga 2 .....	2
7.3	Priloga 3 .....	2
7.4	Priloga 4 .....	3
7.5	Priloga 5 .....	4



7.6	Priloga 6 .....	5
7.7	Priloga 7 .....	6
7.8	Priloga 8 .....	7
7.9	Priloga 9 .....	8
7.10	Priloga 10 .....	9
7.11	Priloga 11 .....	10
7.12	Priloga 12 .....	11
7.13	Priloga 13 .....	12
7.14	Priloga 14 .....	13
7.15	Priloga 15 .....	14
8	Življenjepis .....	1

## Seznam tabel

Tabela 1 Seznam osnovnih kemikalij .....	11
Tabela 2 Začetni oligonukleotidi .....	12
Tabela 3 Seznam uporabljene laboratorijske opreme .....	13
Tabela 4 Protokol za PCR reakcijo (neoptimiziran) .....	15
Tabela 5 Termični program za reakcijo PCR .....	15
Tabela 6 Protokol za test RFLP .....	16
Tabela 7 Protokol za test HRM .....	16
Tabela 8 Rezultati optimizacije protokola za PCR .....	24
Tabela 9 Optimiran protokol za test RFLP .....	24
Tabela 10 Primerjava frekvenc genotipa oz. alela v primerjavi z evropsko populacijo .....	26
Tabela 11 Zbrani rezultati povezave genotipa LTA4H in maščobnega profila .....	28
Tabela 12 Zbrani rezultati povezave genotipa LTA4H in maščobnega profila (WT vs HE+HO) .....	28
Tabela 13 Zbrani rezultati povezave genotipa LTA4H in maščobnega profila (WT+HE vs. HO) .....	29
Tabela 14 Rezultati asociacijske analize genotipa LTA4H in PTGS2 bolnikov z KVČB in primerjava z kontrolnimi vzorci .....	1
Tabela 15 Rezultati asociacijske analize genotipa LTA4H bolnikov z polipi debelega črevesa in primerjava z kontrolnimi vzorci .....	2
Tabela 16 Rezultati asociacijske analize genotipa LTA4H bolnikov z miomi maternice in primerjava z kontrolnimi vzorci .....	2
Tabela 17 Rezultati asociacijske analize genotipa LTA4H bolnikov z astmo in primerjava z kontrolnimi vzorci .....	3

## Seznam slik

Slika 1 Metabolizem omega-3 in omega-6 maščobnih kislin (povzeto po [58]).....	5
Slika 2 Metabolizem arahidonske kisline (povzeto po [59]) .....	6
Slika 3 Primer termičnega cikla PCR reakcije in stanje DNA (povzeto po [61]).....	8
Slika 4 Primer rezultata rezanja PCR produkta v primeru različnih alelov[67] .....	9
Slika 5 Normaliziran in temperaturno spremenjen potek taljenja DNK .....	10
Slika 6 Normaliziran in temperaturno spremenjen diferencialni graf taljenja DNK .....	10
Slika 7 Prikaz vzorca na stopnji ločevanja v Lympholytu .....	13
Slika 8 Prikaz vzorca na stopnji ločevanja krvnih delcev .....	14
Slika 9 Prikaz uporabe spletne aplikacije Primer3 .....	17
Slika 10 Rezultati optimiziranja temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov za SNP rs2540487 v genu LTA4H .....	21
Slika 11 Rezultati optimiziranja koncentracije začetih nukleotidov za SNP rs2540487 v genu LTA4H .....	22
Slika 12 Optimiranje koncentracije magnezijevega klorida za začetne oligonukleotide za SNP rs za rs689466 v genu PTGS2 .....	23
Slika 13 Rezultati testa RFLP s CEPH vzorci .....	24
Slika 14 Rezultati HRM - normalizirane talilne krivulje .....	25
Slika 15 Rezultati HRM - normalizirane in obdelane talilne krivulje .....	25
Slika 16 Povezava med deleži oleinske in arahidonske kisline (vsi analizirani vzorci) .....	30
Slika 17 Povezava med deleži oleinske in arahidonske kisline (homozigoti in heterozigoti za SNP rs2540487).....	30
Slika 18 Povezava med deleži oleinske in arahidonske kisline (homozigoti za SNP rs2540487) .....	31

## Uporabljeni simboli in kratice

<i>c</i>	množinska koncentracija (M; mM)
<i>f</i>	število obratov (rpm; rcp)
<i>m</i>	masa (g)
<i>t</i>	čas (h; min; s)
<i>T</i>	temperatura (°C)
<i>V</i>	volumen (L; mL; µL)

## Kratice

A	adenin
bp	bazni pari
C	citozin
CB	Crohnova bolezen
CEPH	Center za študijo plimorfizmov v človeškem genomu
CI	interval zaupanja
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
G	gvanin
HRM	taljenje visoke ločljivosti
KVČB	kronična vnetna črevesna bolezen
n-3	omega-3 maščobne kisline
n-6	omega-6 maščobne kisline
NCBI	nacionalni center za biotehniške informacije
OR	razmerje obetov
<i>p</i>	<i>p</i> vrednost signifikance
PCR	verižna reakcija s polimerazo
RFLP	polimorfizem dolžin restikcijskih fragmentov
RNK	ribonukleinska kislina
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida
TRIS	2-amino 2-hidroksimetil-1,3-propandiol
UK	ulcerozni kolitis



## 1 Uvod

Patogeneza kompleksnih bolezni je povezana z večjim številom genetskih in okoljskih dejavnikov. Za genetiko teh bolezni je značilno, da povzročitelj ni en sam gen, ampak večje število genov. Tako imajo nekateri genetsko ozadje, ki ima večje tveganje za nastanek določene kompleksne bolezni, ta se lahko razvije ob prisotnosti okoljskih dejavnikov.

Raziskave so pokazale, da imajo bolniki s pogostimi kompleksnimi boleznimi spremenjen maščobni profil v eritrocitih, kar bi lahko pomenilo, da so del genetskih dejavnikov tudi geni, ki sodelujejo pri presnovi maščob. Med pomembnejšimi procesi, ki jih vodi metabolizem maščob, so vnetja. Metaboliti določenih večkrat nenasičenih maščobnih kislin delujejo vnetno ali protivnetno. Večini kompleksnih bolezni je skupen nepravilen vneti odziv, to se posebej kaže pri kronični vnetni črevesni bolezni (KVČB) in astmi. V obeh se bolniki odzovejo nepravilno ali preveč intenzivno na tujke ali alergene v obolenih tkivih. Vnetne procese v teh tkivih uravnavajo metaboliti arahidonske kisline, to so eikozanoidi. [98]

Iz tega razloga je smiselno preučiti metabolizem arahidonske kisline in gene, ki sodelujejo v njem. Arahidonska kislina se pojavlja v procesu elongacije in desaturacije omega-3 maščobnih kislin in kot začetni metabolit za sintezo širokega spektra lipidov. Pri elongaciji so ti geni FADS1, FADS2 in več genov, ki kodirajo desaturazne encime. Geni, ki sodelujejo pri presnovi arahidonske kisline v funkcijske lipide pa so CYP4, PTGS1, PTGS2, PGIS, PGES, PGFS, PGDS, ALOX5, LTA4H, LTC4S in drugi.

Namen dela je najti povezavo med maščobnim profilom bolnikov s pogostimi kompleksnimi boleznimi in genotipom polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP) v genih, ki sodelujejo pri vnetnih procesih.

## 2 Pogoste kompleksne bolezni in metabolizem lipidov

Za kompleksne bolezni je značilno, da sodeluje v patogenezi več genetskih, kot tudi okoljskih dejavnikov. Iz tega razloga je te bolezni težko raziskovat, saj njihov nastanek ni povezan le z enih samim genom. Med pogostejše kompleksne bolezni spadajo hipertenzija, sladkorna bolezen, več vrst raka, Alzheimerjeva bolezen, Parkinsonova bolezen, kronična vnetna črevesna bolezen, astma in mnoge druge.

### 2.1 Kronična vnetna črevesna bolezen

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je kronično vnetno obolenje črevesa. Nastane kot posledica nepravilnega imunskega odziva na črevesne mikrobove v genetsko pogojenem gostitelju. [1]

Glavni simptomi KVČB so driska, bolečine v predelu trebuha, krvavitve v prebavilih, težave s prebavo, izguba teže, kot tudi drugi simptomi, kot so artritis, bolečine v sklepih, ognjki in vnetje podkožnega maščobnega tkiva. Za bolnike s KVČB je značilno povečano tveganje za nastanek raka na debelem črevesju, ki se pojavi 8 do 10 let po diagnozi [1][7].

Med drugimi komplikacijami, ki lahko nastanejo zaradi simptomov KVČB, je zastrupitev ali razsežna infekcija črevesja, ki pogosto pomeni odstranitev obolelega dela.

KVČB se najpogosteje pojavi med 16. in 30. letom starosti [2]. Med epizodami hujših bolezenskih simptomov se pojavljajo daljša obdobja mirovanja oz. remisije bolezni, ta so lahko dolga tudi 10 ali več let.

Obstajata dva glavna podtipa KVČB, tj. Crohnova bolezen (CB) in ulcerozni kolitis (UK).

Crohnova bolezen (CB) povzroča neenakomerno, transmuralno (tj. v celotni debelini stene črevesa) vnetje črevesa, ki se lahko pojavi po celotnem prebavnem traktu, najpogosteje na terminalnem ileumu ali v okolici danke. Za bolnike s CB je značilno, da se simptomi, ki niso direktno povezani s prebavnim sistemom, pojavljajo bolj pogosto. Značilne so tudi fistule in stenoze.

Za razliko od CB je UK omejen na vnetje sluznice debelega črevesa. Bolezen izvira iz rektuma, od koder se kontinuirano širi po kolonu. Pri pacientih z UK je najznačilnejši simptom krvava driska, ki se ne pojavlja pri CB v tolikšnem obsegu. Odstranitev obolelega dela debelega črevesa pri bolnikih z UK pogosto pomeni popolno izginotje bolezenskih simptomov, pri bolnikih z CB pa odstranitev nima nobenega dolgoročnega učinka.

Povezave med genetskimi dejavniki in pojavom KVČB so že dolgo znane. Z vse večjim številom raziskav je znano, da je KVČB kompleksna bolezen, kjer je patogeneza močno povezana z etničnim in regijskim izvorom pacienta [6].

V družinah z obolelimi za KVČB se pojavlja s 5-30% pojavnostjo [3], pri enojajčnih dvojčkih pa fenotipska konkordance znaša od 50% do 75% [4]. Vpliv družinskega ozadja je bolj izrazit pri pacientih s CB kot pa pri UK [3]. Večje neskladje pojavljanja CB pri dvojajčnih dvojčkih kot tudi nižja fenotipska konkordanca pri UK kažeta na prisotnost drugih dejavnikov, povezanih s patogenezo KVČB, posebej okoljskih [4][5].

Raziskave kažejo na sodelovanje več genov na patogenezo KVČB. Med njimi so NOD2, OCTN, IL-23R, IL-12B, STAT2, JAK3, CCR6, IRGM, ATG16L1, CARD9, RNF186, CUL2, MUC19, PTPN22, ATG16L1, PTGS2 idr. [99][103]

Med pomembnejšimi okoljskimi dejavniki so profil črevesnih mikrobov [10], kajenje in prehranske navade. Kajenje ima paradoksalno povezanost s KVČB, saj raziskave kažejo na povečanje tveganja za CB [8] in znižanje tveganja za UK [9].

Struktura diete ima vpliv na patogenezo in intenzivnost KVČB. Raziskave so našle povezavo z večjim vnosom ogljikovih hidratov [11][12] in omega-6 maščobnih kislin [13][14] pri pacientih s KVČB. Pozitiven učinek imajo omega-3 maščobne kisline [15][16], kot tudi hrana bogata z vlakninami in mineralnimi snovmi [17].

## 2.2 Astma

Astma je pogosta kronična kompleksna vnetna bolezen dihal [18], za katero trpi okrog 300 milijonov ljudi po svetu [19]. Za vse vrste astme je značilen premočen vnetni odziv na okoljske dejavnike, pogosto alergene. Zaradi takšnega odziva pride do prevelike aktivnosti dihalne sluznice, oteženega dihanja, ovir v dihalnih poteh, kašljanja, hropenja in do sprememb v strukturi dihalnega tkiva [20].

Kot ostale kompleksne bolezni tudi astma nastane kot posledica interakcij med več geni in okoljskimi dejavniki. Večina genov, ki sodeluje v patogenezi astme, so prisotni pri uravnavanju vnetnih oz. imunskih odzivov. Študije astme so pokazale, da med genetske dejavnike za patogenezo astme spadajo LTC4S, LTA4H, ORMDL3, CHI3L1, IL18R1, IL1RL1, GSDMB, HLA-DQ, IL33, SMAD3, IL2RB, PYHIN1, PDE4D idr. [101]-[103]

Pomembni okoljski dejavniki v patogenezi astme so alergeni in infekcije dihal, pomemben je tudi čas vnosa alergenov in okužbe dihal [21].

Glavni sindrom astme je prevelika občutljivost na okoljske dejavnike, ki pogosteje sproži močen vnetni odziv. Zaradi tega se bronhialne poti nenadoma zožijo, dihanje je oteženo, tako nastopijo sekundarni sindromi. Pogoste epizode močnih vnetnih odzivov povzročijo dolgoročne spremembe v aktivnosti sluznice in debeljenje bronhialnih sten, kar postopoma zmanjšuje dihalne kapacitete pacienta [22].

Blažje oblike astme so neposredno povezane s prisotnostjo alergenov oziroma drugih okoljskih dejavnikov, ki sprožijo astmatično epizodo. Tako je možno z izogibanjem sprožiteljem epizod (npr. alergeni, določene telesne aktivnosti) omejiti njihovo pogostost. V primeru napada so učinkoviti inhalirani steroidi. Pri hujših oblikah astme nastopijo napadi tudi takrat, kadar ni prisotnega alergena. Steroidi so zelo pogosto neučinkoviti za lajšanje simptomov hujše astme, zato se dandanes uporabljajo inhibitorji vnetnih odzivov [22].



### 2.3 Polipi debelega črevesa

Po definiciji je polip kakršnakoli tkivna masa, ki prodira iz notranjega prostora votlih oz. cevastih organov. Tako ločimo polipe na prebavnem traktu, na sečnih poteh in na dihalih. Načeloma nastopijo polipi iz sluznice teh organov in so ploski, obstajajo pa tudi takšni, ki prodrejo izpod sluznice in so stebelaste oblike.

Polipe debelega črevesa ločimo na neoplastične, hiperplastične, hamartómske in vnetne. Nevarni so predvsem neoplastični, saj se lahko razvijejo v adenome na debelem črevesju, ki so med pogostimi vzroki raka na debelem črevesju [23].

Vzrok za nastanek polipov debelega črevesa je več genetskih in okoljskih dejavnikov. Več genov sodeluje pri patogenezi polipov debelega črevesja [24], med njimi so geni povezani z metabolizmom, npr. prenašalci magnezija in kalcija (gen TRPM7) [25], encimi za presnovo proteinov in heterocikličnih aminov (skupina genov UGT in GST ter CYP) [26][27] in drugimi encimi, ki metabolizirajo kancerogene snovi (AhR, CYP1A2, CYP1B1, CYP2C9 in CYP2E1 ter NAT1, NAT2, EPHX1, SULT1A1, UGT1A7, GSTM1 in GSTT1) [28].

Druga skupina genov je povezana z malignostjo polipov, ti se delijo v tri skupine. Prva skupina sodeluje pri medceličnem signaliziranju, motnje te povzročijo abnormalne signale za celično rast; druga skupina so regulatorji tumorjev oz. njihove aktivnosti, tretja skupina pa so geni, ki sodelujejo pri DNA popravljanju, kot so MLH1, MSH2, MSH6, APC, DCC, K-RAS in MYC. Moteno delovanje teh genov poveča tveganje za nastanek malignih polipov in raka na debelem črevesju [23].

Med pomembnejšimi okoljskimi dejavniki za nastanek polipov debelega črevesa je kajenje [29], dieta z veliko količino mesa [30][31] in alfa-linolenske kisline [32] in nizko vsebnostjo kalcija [33][34]. Uporaba aspirina znižuje verjetnost polipov [35][36], prav tako dieta bogata z vlakni [37][38] in omega-3 maščobnimi kislinami [32].

### 2.4 Miomi maternice

Miomi maternice so najpogostejši benigni maternični tumorji s pojavnostjo med 20% in 40% pri ženskah v plodnih letih [41][42]. Nastanejo iz ene same mutirane celice gladkih mišic v maternici, ki se nenehno podvaja. Za zagotavljanje strukturne integritete te celice proizvajajo tudi precej fibronektina in kolagena [43].

Patogeneza miomov maternice še ni dobro razložena, vendar je znano da imajo estrogeni in progestogeni pomembno vlogo pri nastanku in rasti tumorjev [44][45], saj se le redko pojavijo pred prvo menstruacijo [46] in po menopavzi [47].

Pojavnost je odvisna predvsem od starost in etnične pripadnosti. V ZDA je večja pri črnski populaciji, kjer je pojavnost do 35. leta 60%, do 50. leta pa 80%; pri belski populaciji pa je pojavnost do 35. leta 40%, do 50. leta pa 70% [54].

Hipotetični faktorji za nastanek miomov maternice so zgodnja prva menstruacija, okužbe maternice, hormonalne motnje, spremembe v metabolizmu, vrsta diete in stres.

Zgodnja prva menstruacija je povezana z mnogimi hormonalnimi spremembami in boleznimi, kot je rak na dojkah in rak na materničnem vratu [48][49],

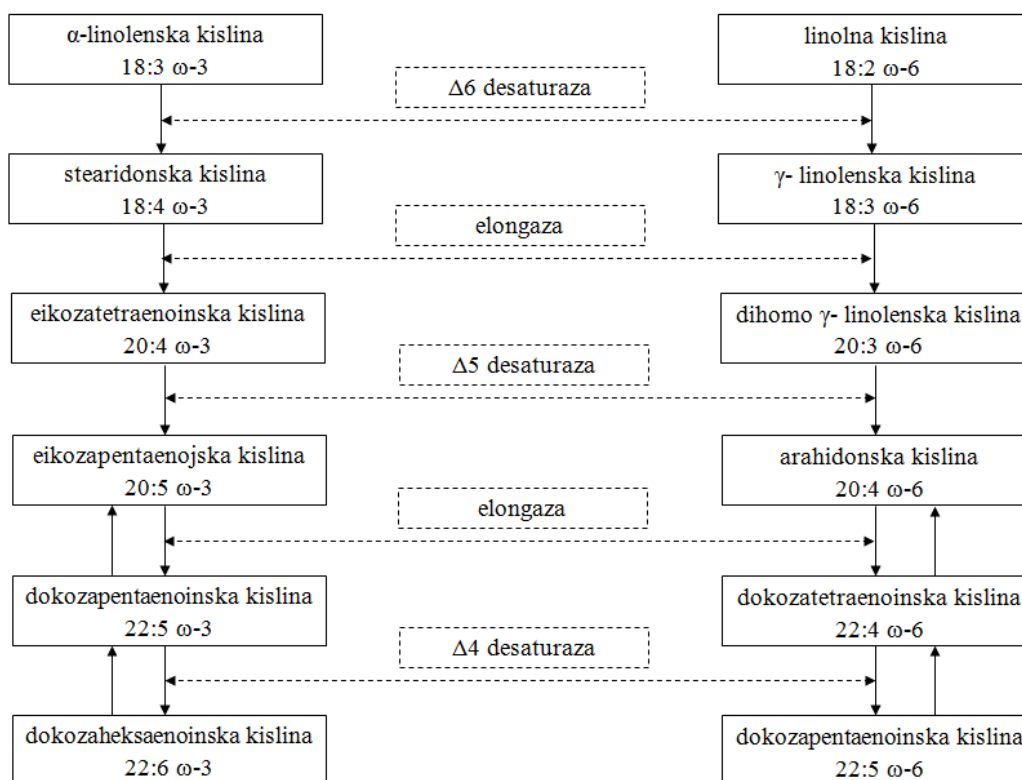
Maternica se na okužbe po različnih presnovnih poteh odzove, kar vodi v večje proizvodnje strukturnih proteinov (npr. kolagen in fibronektin), zmanjšano apoptozo celic, povečano rast tkiva in vgrajevanje tudi abnormalno popravljenih tkivnih struktur [41][50][51][52]. Vsi ti faktorji lahko vodijo do nastanka mioma, predvsem povečana ekspresija genov (npr. FN1) za proizvodnjo strukturnih proteinov, ki je značilna za miome [53].

## 2.5 Metabolizem izbranih lipidov

Pri kompleksnih boleznih, pri katerih je eden izmed faktorjev moteno delovanje vnetnih odzivov (npr. KVČB), so opazne spremembe metabolizma maščob oz. maščobnih kislin. V primerjavi s kontrolami so skupine pacientov z astmo, kronično vnetno črevesno boleznijo, miomi maternice in polipi debelega črevesja imeli povišane vrednosti arahidonske in alfa-linolenske kisline ter nižje razmerje med omega-3 in omega-6 maščobnimi kislinami (to pomeni večjo stopnjo omega-6 mašč. kislin) [55].

### 2.5.1 Elongacija in desaturacija

V človeškem organizmu se omega-3 in omega-6 maščobne kisline metabolizirajo z zaporednimi desaturacijami in elongacijami, kot prikazuje slike (Slika 1).



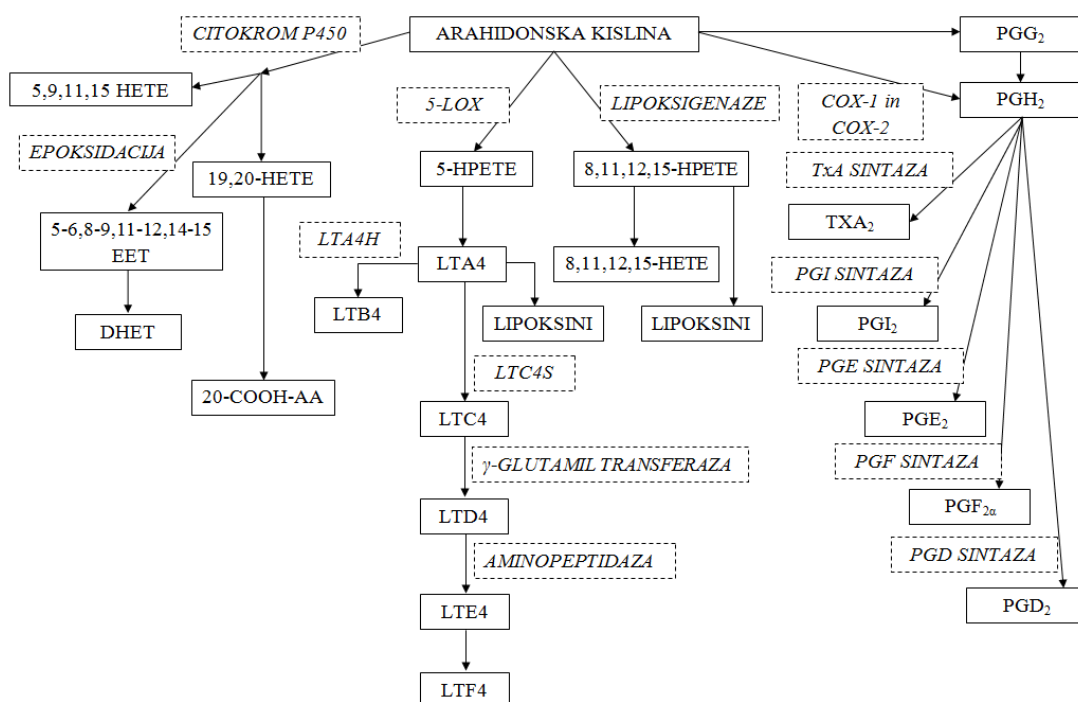
Slika 1 Metabolizem omega-3 in omega-6 maščobnih kislin (povzeto po [58])

Za vnetne in protivnetne procese so pomembni eikozanoidi, to so skupina fiziološko aktivnih derivatov arahidonske kisline in drugih polinenasičenih maščobnih kislin z dvajsetimi ogljikovimi atomi. Mednje sodijo levkotrieni, prostaglandini, prostaciklini in tromboksani. [60]

Skoraj vsi eikozanoidi, ki delujejo vnetno, so derivati arahidonske kisline, protivnetno pa delujejo derivati EPA (eikozapentaenojske kisline) in dihomo  $\gamma$ -linolenske kisline.

## 2.5.2 Metabolizem arahidonske kisline in njenih metabolitov

Arahidonska kislina je omega-6 maščobna kislina. V prosti obliki se metabolizira v več produktov, kot prikazuje slika (Slika 2).



Slika 2 Metabolizem arahidonske kisline (povzeto po [59])

Prva presnovna pot se začne s pretvarjanjem proste arahidonske kisline v HETE skupino eikozanoidov s pomočjo lipoksigenaz. Vseprisotne celične peroksidaze HETE eikozanoide nato pretvorijo v levkotrieni. Najpomembnejša presnovna pot je preko 5-LOX encima, ki ga kodira ALOX5 gen. Produkt tega je 5-HETE, ki se metabolizira v LTA4. LTA4 je predhodnik dveh pomembnih levkotrienov, to sta LTB4 in LTC4.

LTB4 sodeluje v vnetnih procesih in nastane s pomočjo LTA4H encima, ki hidrolizira LTA4. LTC4S katalizira encimsko reakcijo med GHS in LTA4, da nastane LTC4, ki lahko naprej reagira do LTD4 in LTE4; ti levkotrieni imajo več funkcij, v glavnem povzročajo krčenje dihalnih poti, žil in gladkih mišic. [56]

Pri drugi presnovni poti se arahidonska kislina preko prostaglandin-endoperoksid sintaze 2 pretvori v prostaglandin H<sub>2</sub>, ki je predhodnik štirih metabolitov. Ti so prostaciklin (širi žili in združuje trombocite), tromboksan A<sub>2</sub> (krči žile pri vnetjih), prostaglandin D<sub>2</sub> (več funkcij; močni krči bronhialne poti) in prostaglandin E<sub>2</sub> (več funkcij; poveča telesno temperaturo). [57]

Arahidonska kislina se lahko metabolizira v druge produkte preko citokroma P450. Med temi produkti so najpomembnejši EET (epoksieikozatrienoinske kisline), ki uravnavajo vnetne procese in zmanjšujejo aktivnost ciklooksigenaz.

## 2.6 Genotipizacija

Genotipizacija je postopek določanja genotipa posameznika. Genotip je celotni genom ali samo določen del genetske sestave organizma ali celice [65]. Pogosto se izraz 'genotip' navezuje na en sam gen ali SNP. V primeru genotipa SNP obstajajo tri vrste:

- "wild-type", tj. homozigot za normalen alel
- homozigot za mutiran alel
- heterozigot, ki vsebuje oba alela

### 2.6.1 Verižna reakcija s polimerazo

PCR oziroma verižna reakcija s polimerazo je encimska reakcija sinteze tarčne sekvence DNK s pomočjo termično obstojne polimeraze in termičnega programa. V osnovi reakcija posnema pomnoževanje DNK *in vivo*, le da funkcijo proteinov opravljajo termični cikli; ti zaporedoma vršijo DNK denaturacijo, vezanje začetnih oligonukleotidov in DNK sintezo s polimerazo. [62][64]

Metoda je sprva uporabljala velike količine DNK polimeraz, saj so morali nadomestiti izgube encima med segrevanjem do temperatur, ko se začne DNK denaturacija. Moderno obliko PCR je omogočilo odkritje termično stabilne polimeraze, ki jo uporablja ekstremno-termofilna bakterija *Thermus aquaticus*. [63]

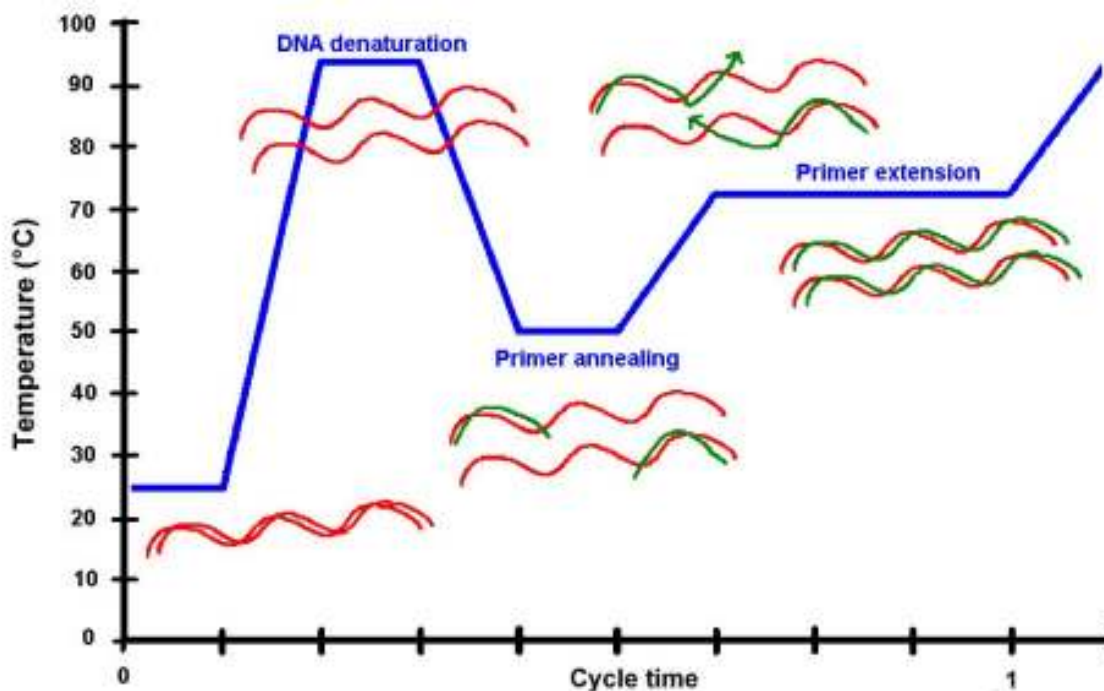
Za uspešno delovanje PCR je potrebno zagotoviti optimalno delovanje polimeraze, zadostno količino gradnikov DNK, dobro oblikovane začetne oligonukleotide in primeren temperaturni program. Sestavine verižne reakcije s polimerazo so sledeče:

- Dvoverižna DNK, ki vsebuje tarčno zaporedje
- Načrtovani začetni oligonukleotidi, dolgi med 15 in 30 bp, ki so komplementarni znanemu delu osnovne DNK
- Termično stabilna polimeraza (*Taq* DNK polimeraza) ali kombinacija *Taq* in *Pfu* polimeraz
- Deoksinukleozid trifosfati oz. dNTP-ji, osnovni reagenti za sintezo nove DNK
- Divalentni kationi, za *Taq* polimerazo se uporabi primerna količina Mg<sup>2+</sup> ionov (velika koncentracija lahko vodi do sinteze nezaželenih DNK produktov)
- Pufer, ki vzdržuje pH raztopine na 8.0 do 8.3
- Avtoklavirana, ultrafiltrirana voda

Ciklični termostati omogočajo hitro in natančno segrevanje ali ohlajanje, zato v njih potekajo PCR reakcije. Običajni termični programi za uspešno reakcijo so sestavljeni iz naslednjih korakov:

- Denaturacija DNK, ki poteka pri  $T = 95^{\circ}\text{C}$ , za  $t = 15\text{-}30\text{ s}$
- Pripenjanje; temperatura se hitro zniža na optimalno temperaturo pripenjanja uporabljenih začetnih oligonukleotidov, ki je nekje  $T = 53\text{-}60^{\circ}\text{C}$  za  $t = 15\text{-}30\text{ s}$
- Podaljševanje, kjer se reakcijska zmes segreje na  $T = 72^{\circ}\text{C}$ , za  $t = 15\text{-}30\text{ s}$ , pri tem koraku se polimeraza veže na kompleks DNK-primer začne sintezo nove DNK s vključevanjem dNTP-jev

Slika (Slika 3) prikazuje primer takšnega cikla.



Slika 3 Primer termičnega cikla PCR reakcije in stanje DNA (povzeto po [61])

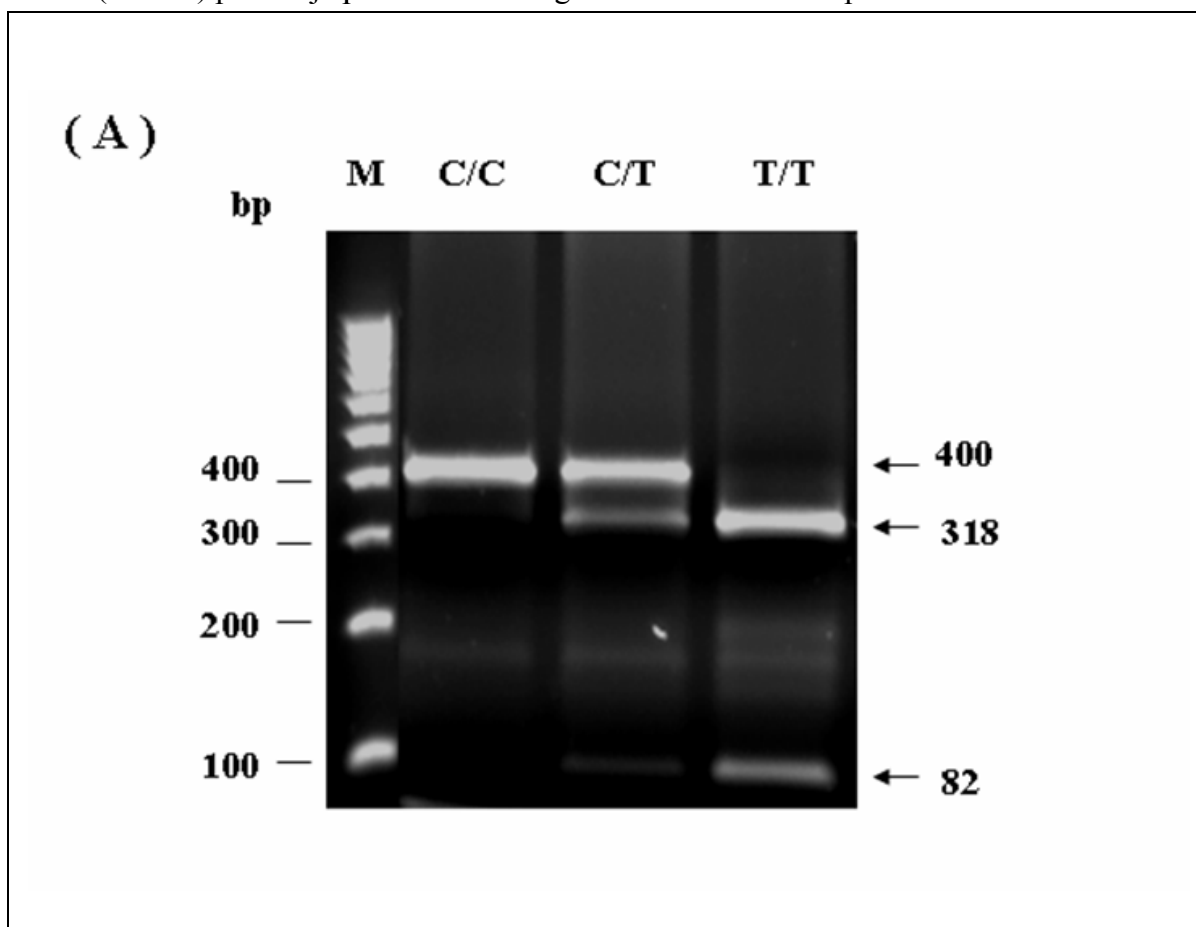
Verižna reakcija s polimerazo ima običajno 20-40 takšnih termičnih ciklov pri izbranih časovnih parametrih in temperaturi pripenjanja. Koncentracija DNK produkta tako eksponentno raste s številom ciklov, vendar reakcija ne doseže 100% učinkovitosti zaradi linearnega pomnoževanja začetne sekvence PCR.

### 2.6.2 Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov RFLP

Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov je razlika v homolognem zaporedju DNK, ki jo je možno zaznati po prisotnosti fragmentov različnih dolžin po razkroju vzorcev DNK s posebnimi restrikcijskimi endonukleazami, to so encimi, ki režejo DNK molekule na specifičnih mestih. [66]

RFLP se danes uporablja v kombinaciji s PCR tehniko in gelsko elektroforezo. Oblikujejo se začetni oligonukleotidi za DNK produkt, ki bo vseboval mesto SNP-ja, nato se izbere encim, ki bo rezal produkt v primeru enega alela na dva različno dolga fragmenta. V prvi fazi se DNK produkt pomnoži z uporabo PCR tehnike, nato se z izbranim encimom reže na fragmente in analizira z gelsko elektroforezo. Tako lahko določimo genotip vzorca DNK.

Slika (Slika 4) prikazuje primer rezultata gelske elektroforeze v primeru različnih alelov.



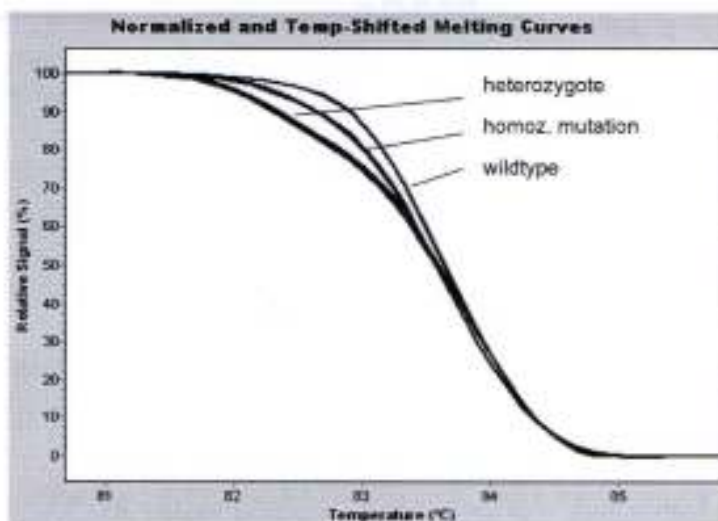
Slika 4 Primer rezultata rezanja PCR produkta v primeru različnih alelov[67]

### 2.6.3 Metoda HRM

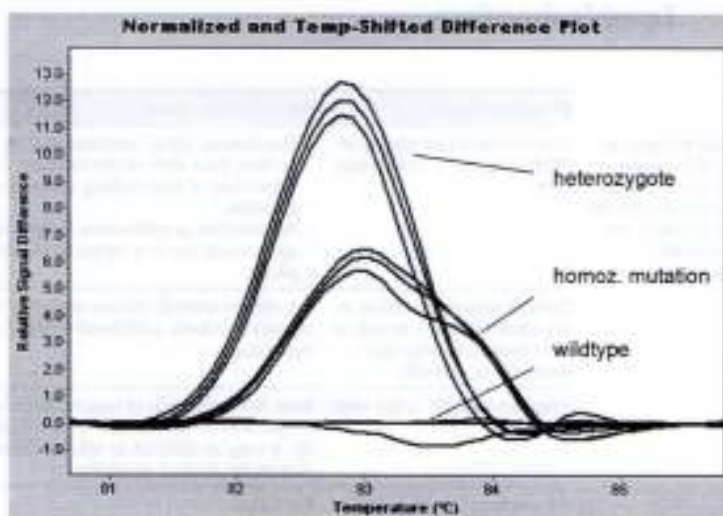
Taljenje z visoko ločljivostjo oz. High Resolution Melt (HRM) je metoda, pri kateri se določa genotip SNP-ja na podlagi razlik v talilnih krivuljah kratkih DNK sekvenc, ki vsebujejo SNP mesto. DNK z mutiranimi aleli ima lahko namreč zaradi različnega deleža AT oz. CG nukleotidov drugačno temperaturo denaturacije in se zato obnaša drugače pri taljenju kot 'wild-type'.

Potek taljenja se spremlja z merjenjem fluorescence, ki jo oddaja posebno barvilo. To deluje fluorescentno le, ko je vezano na dvoverižno DNK. Najpogosteje uporabljeno barvilo za te namene je SYRB Green I. [68]

HRM tehnika se pogosto uporablja v kombinaciji s PCR, najpogosteje s PCR reakcijo v realnem času (Real-Time PCR), kjer lahko nastajanje PCR produkta spremljamo z meritvami fluorescence na koncu vsakega termičnega cikla. Sliki (Slika 5 in Slika 6) prikazujeta primer rezultata HRM testa v programskem orodju za Light Cycler LC480.



Slika 5 Normaliziran in temperaturno spremenjen potek taljenja DNK



Slika 6 Normaliziran in temperaturno spremenjen diferencialni graf taljenja DNK

### 3 Eksperimentalni del

#### 3.1 Vzorci DNA

Vzorci DNK, uporabljeni pri laboratorijskem delu, so bili predhodno izolirani iz krvnih limfocitov. Masni deleži so bili določeni v okviru doktorskega dela Zdenke Cencič Kodbe (Zdenka Cencič Kodba, Določevanje sestave maščobnih kislin in njihovih profilov v membranah rdečih krvnih celic bolnikov z različnimi boleznimi z metodo plinske kromatografije, Maribor, Junij 2011).

#### 3.2 Materiali

##### 3.2.1 Osnovne kemikalije

Za izolacijo, PCR, RFLP in HRM so bile uporabljene sledeče osnovne kemikalije. V tabeli (Tabela 1) so podani podatki o uporabljenih kemikalijah.

Tabela 1 Seznam osnovnih kemikalij

Kemikalija	Proizvajalec
Kloroform	Sigma Aldrich
Izopropanol	Sigma Aldrich
Etanol absolut	Merck
TRIS baza	Calbiochem
EDTA	Sigma Aldrich
TRI reagent	Sigma Aldrich
Ficoll-Paque Plus™	GE Healthcare
Agaroz	SeaKem
Začetni nukleotidi	Sigma Aldrich
PCR pufer	Sigma Aldrich
PBS pufer	Sigma Aldrich
TAQ polimeraza	Sigma Aldrich
Restriksijski encimi	Fermentas
Pufri za restriksijske encime	Fermentas
dNPT-ji	Sigma Aldrich
Etidijev bromid	Sigma Aldrich
Ksilen cianol	Sigma Aldrich
Magnezijev klorid (PCR)	Fermentas
Light Cycler Master Mix	Roche
Magnezijev klorid (HRM)	Roche

V tabeli (Tabela 2) so zapisani začetni oligonukleotidi uporabljeni za genotipizacijo vzorcev. Začetni oligonukleotidi so bili ročno oblikovani s pomočjo spletne aplikacije Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), nato so bili preverjeni v spletni aplikaciji IDT Oligo Analyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).



Tabela 2 Začetni oligonukleotidi

Gen	SNP ID	Oznaka	Zaporedje 5'-3'
PTGS2	rs689466	PTGS2_rs689466 (1)	CCCTGAGCACTACCCATGA
		PTGS2_rs689466 (2)	CTGGGCTTATTGGGGCTAA
LTA4H	rs2540487	LTA4H_rs2540487 (1)	GAGGAACCGCACGAAAGA
		LTA4H_rs2540487 (2)	CTGTGGTGGCAAACGTAAGA

### 3.2.2 CEPH vzorci

Kot referenčne vzorce smo pri delu uporabili CEPH vzorce. CEPH (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain oz. Center za študijo človeških polimorfizmov) vzdržuje podatkovno bazo za genetske markerje, ki so bili genotipizirani na CEPH referenčnih družinah. Fundacija je iz celic posameznikov in rakastih celic razvila linije nesmrtnih celičnih linij, ki so vir DNA za genetske študije po vsem svetu. [69]

### 3.2.3 Pufri in raztopine uporabljene v raziskavi

Za pripravo pufrov in drugih raztopin se je uporabljala posebno čista destilirana voda. Vodo je destilirala naprava TKA Pacific UP-UPW water purification system.

#### 3.2.3.1 TBE pufer

TBE pufer se je pripravil kot založna raztopina z 10x koncentracijo. Sestava 10x TBE pufra je: 445 mM TRIS, 445 mM borove kisline in 5 mM EDTA.

Za 1 L pufra je potrebno zatehtati  $m = 108$  g TRIS baze,  $m = 55$  g borove kisline in  $m = 3,72$  g EDTA in raztopiti v  $V = 1$  L destilirane vode. 1x TBE pufer se nato pripravi iz  $V = 100$  mL 10x pufra in  $V = 900$  mL destilirane vode.

#### 3.2.3.2 PBS pufer

Uporabili smo PBS v tabletah. Tako se za pripravo PBS pufra raztopi 1 tableta v  $V = 200$  mL destilirane vode. Raztopina se pred uporabo sterilizira v avtoklavu s programom za sterilizacijo raztopin.

#### 3.2.3.3 Nanašalni pufer za gelsko elektroforezo

Nanašalni pufer za nanašanje na gelsko elektroforezo je bil pripravljen iz  $m = 0,25$  g ksilen cianola in  $m = 40$  g saharoze v  $V = 100$  mL 1x TBE pufra.

### 3.2.4 Laboratorijska oprema

V raziskavi smo uporabili laboratorijsko opremo, prikazano v tabeli (Tabela 3).

Tabela 3 Seznam uporabljene laboratorijske opreme

Oprema	Proizvajalec
Ciklični termostat	Biometra T1 Thermocycler
	Biometra Professional basic gradient
Centrifuge	Biosan CMC-3000
	Eppendorf centrifuge 5415R
UV transiluminator	Gel imaging system GBOX
Mikrovalovna pečica	Gorenje
Mikropipete	Finnpipette 10 $\mu$ L, 100 $\mu$ L, 1000 $\mu$ L
Spektrofotometer	BioTek Synergy2 Plate Reader
HRM	Light Cycler LC480

### 3.3 Laboratorijske metode

#### 3.3.1 Izolacija DNK

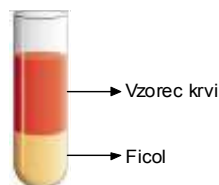
Deleži mašč. kislin so bili predhodno analizirani.

DNK smo izolirali iz krvi bolnikov in zdravih posameznikov.

##### 3.3.1.1 Izolacija limfocitov

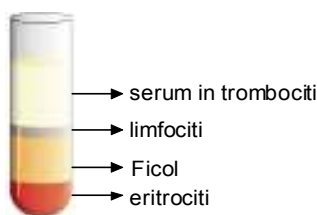
Kri je bila izolirana po naslednjem protokolu:

Kri je odvzeta v epruveto z EDTA, nato je prenesena v sterilno  $V = 50$  mL centrifugirko, v katero se doda enaka količina PBS pufra (v primeru  $V = 12$  mL krvi dodamo  $V = 12$  mL pufra). Po mešanju se prenese v novo sterilno centrifugirko, v katero smo predhodno nalili Lympholyte-M (Cedarlane Labs) (enake količine kot vzorec krvi, npr. za  $V = 12$  mL se nalije  $V = 12$  mL medija).



Slika 7 Prikaz vzorca na stopnji ločevanja v Lympholytu

Centrifugirko centrifugiramo pri  $f = 2500$  rpm,  $t = 20$  min, na  $T = 18^{\circ}\text{C}$ . Plazmo prenesemo v sterilno  $V = 50$  mL centrifugirko, na tej stopnji jo lahko shranimo na  $T = -20^{\circ}\text{C}$ . Drugo fazo z limfociti prenesemo s pipeto v novo  $V = 50$  mL sterilno centrifugirko.



Slika 8 Prikaz vzorca na stopnji ločevanja krvnih delcev

K limfocitom dodamo 3 volumne pufru PBS. Vzorec centrifugiramo  $t = 10$  minut pri  $f = 2800$  rpm. Supernatant odsesamo, nato dodamo  $V = 10$  mL PBS-a in previdno vorteksiramo. Ponovno centrifugiramo  $t = 10$  minut pri  $f = 2800$  rpm. Supernatant v celoti odsesamo, pomagamo si s pipeto. Vzorce shranimo na  $T = -70^{\circ}\text{C}$  do nadaljnje uporabe.

Nad plastjo eritrocitov odstranimo Lympholyte in le-te shranimo na  $T = -20^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.1.2 Izolacija DNK

Pri sobni temperaturi odmrzujemo limfocite, katrim dodamo  $V = 1500$   $\mu\text{L}$  TRI reagenta, celice s pipeto razbijejo dokler ni vidnih večjih kosov. Zmes prenesemo v 2 mL epice ter inkubiramo  $t = 5$  minut. V epice dodamo  $V = 300$   $\mu\text{L}$  kloroforma in vorteksiramo  $t = 15$  s, da postane raztopina motno bela. Vzorce inkubiramo na sobni temperaturi do  $t = 15$  minut, dokler ne nastaneta dve vidni fazi. Mešanico nato centrifugiramo  $t = 15$  minut pri  $f = 12000$  rcf pri  $T = 4^{\circ}\text{C}$ , da se loči v tri faze: spodnja rdeča faza so proteini, vmesna bela je DNK, zgornja prozorna je vodna raztopina RNK.

V naslednji delu izolacije ločimo faze po vrsti. RNK prenesemo v svežo epico, preostanek se uporabi za izolacijo DNK in proteinov.

Da iz tega preostanka ločimo DNK, dodamo  $V = 450$   $\mu\text{L}$  100% etanola. Po ročnem mešanju s preobračanjem epice inkubiramo za  $t = 3$  minute na sobni temperaturi. Vzorec nato centrifugiramo  $t = 5$  minut pri  $f = 5000$  rcf pri  $T = 4^{\circ}\text{C}$ . Supernatant odlijemo in ga uporabimo za izolacijo proteinov.

Pelet DNK speremo v  $V = 1500$   $\mu\text{L}$ ,  $c = 0.1$  M natrijevem citratu / 10% etanolu in premešamo s preobračanjem, nato pustimo stati  $t = 30$  minut. Nato centrifugiramo  $t = 5$  minut pri  $f = 5000$  rcf pri  $T = 4^{\circ}\text{C}$ . Korak spiranja DNK enkrat ponovimo. DNA pelet nato resuspendiramo v  $V = 1$  mL 75% etanola ter pustimo stati  $t = 10-20$  minut na sobni temperaturi. Na tej stopnji lahko vzorce shranimo na  $T = -20^{\circ}\text{C}$ .

DNK nato ponovno centrifugiramo  $t = 5$  minut pri  $f = 5000$  rcf pri  $T = 4^{\circ}\text{C}$ , supernatant zavržemo. Pelet nato sušimo v eksikatorju. Posušeni pelet raztopimo v  $V = 400$   $\mu\text{L}$  sterilizirane vode in shranimo v hladilniku na  $T = 4^{\circ}\text{C}$ .

### 3.3.2 Merjenje koncentracij DNA

Za izenačenje koncentracij DNK za HRM smo izmerili koncentracije vzorcev DNK s spektrofotometrom BioTek Synergy2 Plate Reader in nato razredčili, da smo dobili koncentracijo  $c_{\text{DNK}} = 15$  ng/ $\mu\text{L}$ .

### 3.3.3 Verižna reakcija s polimerazo

Verižno reakcijo s polimerazo (PCR) smo uporabili za pomnoževanje DNK, ki vsebuje tarčno mesto, tj. mesto SNP-ja. Ta DNK se je v naslednji fazi uporabila za analizo polimorfizma dolžin restrikcijskih fragmentov (RFLP). Reakcije so bile izvedene po protokolu v tabeli (Tabela 4).

Tabela 4 Protokol za PCR reakcijo (neoptimiziran)

Reagent	Volumen za 1 vzorec [ $\mu$ L]
DNK	2
dH <sub>2</sub> O	x
PCR pufer	1
MgCl <sub>2</sub>	y
dNTP-ji	0,2
Primer 1	w
Primer 2	w
<i>Taq</i> polimeraza	0,05

Parametri x, y, w so odvisni od posameznega polimorfizma. Vrednosti y in w sta določeni po optimizaciji PCR reakcije, x pa je naknadno izračunana.

Reakcijsko mešanico smo pripravili posebej z vorteksiranimi in odcentrifugiranimi reagenti, nato se je mešanica nanese v ploščice ali stripe, kjer smo predhodno nanese DNK vzorce. Ploščico smo nato vstavili v ciklični termostat, kjer smo izbrali protokol z zahtevano temperaturo pripenjanja. Tabela (Tabela 5) prikazuje najpogosteje izbran protokol.

Tabela 5 Termični program za reakcijo PCR

Začetna denaturacija	$T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}, t = 5\text{ min}$
Denaturacija	$T = 94\text{ }^{\circ}\text{C}, t = 30\text{ s}$
Pripenjanje začetnih oligonukleotidov	$T = Z\text{ }^{\circ}\text{C}, t = 20\text{ s}$
Sinteza nove DNK (podaljševanje)	$T = 72\text{ }^{\circ}\text{C}, t = 30\text{ s}$
Število ciklov	40 ciklov
Končno podaljševanje	$T = 72\text{ }^{\circ}\text{C}, t = 7\text{ min}$

Parameter Z je določen z optimizacijo.

### 3.3.4 Gelska elektroforeza

Gelska elektroforeza je v osnovi kromatografska metoda, ki uporablja 2% agarozni gel (v TBE pufru) kot medij za ločevanje DNA produktov različnih dolžin ali kot test uspešnosti PCR. Ker je DNK molekula negativno nabita, se pomika po gelu zaradi električne napetosti. Krajši fragmenti DNK potujejo po gelu hitreje, kot daljši, kar nam omogoča ločevanje DNK po dolžini.

Gel je sestavljen iz agaroze, TBE pufra in etidijevga bromida. Pripravili smo 2% agarozni gel, pri čemer smo agarozo raztopili v 1xTBE pufru. Zmes se segreva do vrenja, nato ohladimo in dodamo etidijev bromid ter prelijemo v model, v katerem je glavniček, naloga katerega je narediti žepke v gel. Ko se gel strdi se z modelom da v banjico, v kateri bo potekala elektroforeza.

V žepke se nanese DNA produkt z dodanim barvilo, ki vsebuje ksilen cianol. Na gel damo tudi velikostni marker, tj. mešanica več DNA produktov znanih dolžin, ki služijo kot standard. Banjico priklopimo na zeleno napetost. Po času, določenem s protokolom, se napetost izključi, gel se nato slika v UV spektru po programu za etidijev bromid.

### 3.3.5 RFLP

PCR produktu se doda  $V = 20 \mu\text{L}$  reakcijske mešanice, pripravljene za RFLP.

Sestavljena je po protokolu v tabeli (Tabela 6):

Tabela 6 Protokol za test RFLP

Sestavina	Količina za 1 vzorec ( $\mu\text{L}$ )
Restriksijski encim ( $c=10\text{U}/\mu\text{L}$ )	0,5
10x pufer za restriksijski encim	2
dH <sub>2</sub> O	18

Pripravljena reakcijska mešanica za RFLP se inkubira na  $T = 37^\circ\text{C}$  za  $t = 2\text{-}16$  h.

### 3.3.6 HRM

Za PCR v realnem času in HRM se podobno kot pri PCR pripravi reakcijska mešanica, ki se doda pripravljenim vzorcem DNK. HRM reakcijske mešanice smo delali po protokolu v tabeli (Tabela 7):

Tabela 7 Protokol za test HRM

Reagent	Volumen za 1 vzorec [ $\mu\text{L}$ ]
DNK	2
PCR-grade H <sub>2</sub> O	x
HRM Master Mix	5
MgCl <sub>2</sub>	y
Prednji začetni oligonukleotid	w
Zadnji začetni oligonukleotid	w

Vrednosti w in y so določeno po optimizaciji PCR. Parameter x je izračunan naknadno. Reakcije so bile izvede v Light Cycler LC480 po protokolu za Real-Time PCR in Melting Step za določanje genotipa SNP-ja.

### 3.4 Računalniški programi

#### 3.4.1 Primer3

Primer3 je spletno programsko orodje za načrtovanje začetnih oligonukleotidov, dostopno na spletnem naslovu <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>. Za načrtovanje se vnese FASTA sekvenca okrog polimorfizma in dodatni kriteriji za boljše rezultate, kot so npr. dolžina produkta, delež GC baz in razlika med temperaturo vezanja.

Slika (Slika 9) prikazuje primer rezultata Primer3 orodja.

#### Primer3 Output

---

```
PRIMER PICKING RESULTS FOR gnl|dbSNP|rs689466|allelePos=501|totalLen=1001|taxid=9606|  
  
No mispriming library specified  
Using 1-based sequence positions  
WARNING: Unrecognized base in input sequence  
  
OLIGO          start  len  tm   gc%  any  3'  seq  
LEFT PRIMER    449   20  59.95 55.00 4.00 3.00 CCCTGAGCACTACCCATGAT  
RIGHT PRIMER   587   19  60.04 52.63 3.00 2.00 CTGGGCTTATTGGGGCTAA  
SEQUENCE SIZE: 1001  
INCLUDED REGION SIZE: 1001  
  
PRODUCT SIZE: 139, PAIR ANY COMPL: 4.00, PAIR 3' COMPL: 1.00  
TARGETS (start, len)*: 501,1
```

Slika 9 Prikaz uporabe spletne aplikacije Primer3

#### 3.4.2 IDT Oligo Analyzer

IDT Oligo Analyzer je spletno orodje (dostopno na <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>), s katerim preverimo, ali načrtovani začetni oligonukleotidi ustrezajo zastavljenih kriterijem. Preveril sem, ali ustrezajo vsi parametri ki jih je dalo orodje Primer3, če tvorita sekundarne strukture nad 35°C ter če sta komplementarna med seboj.

#### 3.4.3 GeneRunner

Programsko orodje GeneRunner je namenjeno iskanju restrikcijskih encimov, ki režejo določeno sekvenco DNA za razvoj testov RFLP. Najprej v program vnesemo FASTA sekvenco okrog SNP-ja, nato poiščemo lege naših začetnih oligonukleotidov in z vgrajeno podatkovno bazo poiščemo ustrezen encim za selektivno rezanje DNK produkta v primeru določenega alela.

#### **3.4.4 Programsko orodje SPSS 22.0**

Za statistično obdelavo podatkov smo uporabili programsko orodje SPSS. Z njim lahko naredimo različne vrste standardnih statističnih analiz oz. testov, s katerimi ovrednotimo pridobljene podatke. S programskim paketom SPSS smo primerjali asociacijo med prisotnostjo določenega alela in prisotnostjo bolezni ali deležem maščobnih kislin v eritrocitih. Za primerjavo kontrol in DNK bolnikov smo uporabili Fischerjev natančni test oz. chi-kvadrat test; tako smo za vsak SNP dobili naslednje parametre: P-vrednost, interval zaupanja in razmerje obov. Zaradi značilnosti Fisherjevega testa (ki lahko obdela le 2x2 podatke) se analiza naredi v dveh oblikah, pri eni se heterozigoti štejejo k wild-typom, drugič pa k homozigotom.

Za testiranje asociacije med deleži maščobnih kislin v eritrocitih in genotipom vzorca se najprej naredi test vnesenih parametrov, če so le ti nenormalno porazdeljeni. V primeru, da so, se naredi Kruskal-Wallis neparametrični test, ki omogoča 3x3 obdelavo podatkov (torej ni potrebe po AA+AGvsGG in AAvsAG+GG). Test nam poda P-vrednost.

## 4 Rezultati in diskusija

### 4.1 Izbor polimorfizmov

Pri izboru polimorfizmov posameznega nukleotida (SNP-jev), ki bi lahko bili pomembni pri bolnikih s kroničnimi boleznimi in povezani s profilom maščobnih kislin, sem primerjal rezultate krvnih analiz, literaturo na to temo in kaj je skupno vsem boleznim. Za vse izbrane bolezni je do neke mere značilen nenormalni vnetni odgovor, ki vodi do sprememb metabolizma in do simptomov, kot so tumorske tvorbe, zmanjšanje telesnih funkcij (npr. zmanjšanje pljučne kapacitete pri astmatikih) in moten imunski odziv.

Najbolj zanimivi parametri so bili deleži arahidonske kisline in razmerje med omega-3 in omega-6 maščobnimi kislinami. Iz tega razloga sem poglobljeje pogledal metabolizem osnovnih omega-3 in omega-6 maščobnih kislin in arahidonske kisline, katere derivati so povezani z vnetno funkcijo. V prvem procesu so zanimivi geni povezani s podaljševanjem maščobnih kislin, v drugem primeru pa geni povezani s presnovo arahidonske kisline.

#### 4.1.1 FADS1 in FADS2

Med gene, ki sodelujejo pri metabolizmu arahidonske kisline, spadajo tudi geni, ki kodirajo desaturaze in elongaze. Te uravnavajo razmerje med daljšimi in krajšimi prostimi maščobnimi kislinami, ki se naprej presnavljajo v razne produkte. Za kronične bolezni so najpomembnejši tisti, ki sodelujejo pri vnetnih procesih.

FADS1 in FADS2 gena kodirata encima, ki hkrati delujeta pri desaturazi n-3 in n-6 maščobnih kislin. Morebitni SNP-ji teh genov bi lahko razložili spremenjen krvni profil bolnikov s pogostimi kroničnimi boleznimi, le-ti imajo povečano stopnjo n-6 maščobnih kislin in večjo količino proste arahidonske kisline.

SNP-ji v teh genih bi teoretično lahko imeli več učinkov. V primeru zmanjšanja ali povečanja aktivnosti encima bi se določene maščobne kisline začele akumulirati ali pa jih bi bilo premalo, kar bi spremenilo maščobni profil. SNP-ji bi lahko spremenili afiniteto ali selektivnost določenega gena, tako bi lahko na primer normalno potekala presnova n-6 maščobnih kislin, za n-3 pa bi bila upočasnjena.

V literaturi sem iskal podatke za več SNP-jev v genih FADS1 in FADS2, vendar nisem našel raziskane povezave med njimi in patogenezo kroničnih bolezni, ki jih preiskujem. Večina povezav, ki so jih vzpostavili v raziskavah, so na vzorcih bolnikov s kroničnimi boleznimi srca in ožilja.

Tako so povezani s koronarno boleznijo srca [70], sladkorno boleznijo in odpornostjo na inzulin [71], z dislipidemijo [72], atopičnim dermatitisom [73] in bipolarno motnjo [74].



#### 4.1.2 PTGS2

PTGS2 je gen, ki kodira prostaglandin-endoperoksid sintazo 2. Ta encim je eden izmed treh, ki metabolizirajo arahidonsko kislino. Polimorfizmi tega gena so povezani s patogenezo kompleksnih bolezni kot so črevesne neoplazme [104], pljučne neoplazme [105], adenomi [106] in koronarna bolezen srca [107].

Morebitni SNP-ji v genu PTGS2 lahko spremenijo aktivnost tega encima. V primeru, da SNP zmanjša aktivnost tega encima, nastane manj produktov na tej presnovni poti in več na drugih dveh presnovnih poteh za arahidonsko kislino, torej tistih, ki se začeta z LO-5 in s citokrom P450. To bi pomenilo večjo koncentracijo levkotrienov v organizmu, kar poveča moč vnetnih odzivov v telesu, ki pa so stalni spremljevalci vnetnih kroničnih bolezni.

V nasprotnem primeru se aktivnost poveča, kar zmanjša količino snovi, ki pospešujejo vnetne odzive in več takšnih, ki imajo protivnetne vloge. Tak primer bi lahko bil SNP rs20417, ki bi lahko imel zaščitno vlogo pri patogenezi KVČB [75].

Najizrazitejši učinek spremenjene aktivnosti encima PTGS2 je pri KVČB [76][77]. Nevarnost za obolenostjo za KVČB je 1.25 krat večja pri heterozigotih in 1.47 krat večja pri homozigotih za SNP rs689466; to je pokazala študija na Danski in Škotski populaciji [76]. V tem primeru je izrazito spremenjena aktivnost PTGS2 encima.

Povezave med SNP-ji v genu PTGS2 in patogenezo drugih kroničnih bolezni so tudi verjetne. Aspirin je ireverzibilni inhibitor PTGS2 gena in ima zaščitni učinek pri nekaterih kroničnih boleznih, npr. polipih debelega črevesa [78][79], ali pa deluje kot sprožitelj bolezenskih simptomov, npr. pri nekaterih vrstah astme [80][81].

Iz tega razloga sem se odločil, da bom na danih vzorcih genotipiziral SNP rs689466.

#### 4.1.3 LTA4H

LTA4H je gen, ki kodira levkotrien A4 hidrolazo, ki hidrolizira levkotrien A4 do levkotrien B4 oblike. Levkotrien B4 ima vlogo aktivacije levkocitov in sproži njihovo migracijo do tkiva, v katerem se bo začel vnetni odziv. S tem je eden ključnih aktivatorjev vnetnih odzivov v večini celic [56]. Polimorfizmi tega gena so povezani s astmo [108] in koronarno boleznijo srca [109].

Polimorfizmi SNP v tem genu lahko spremenijo aktivnost encima, če so v kodirajočem območju. V primeru znižanja aktivnosti bi lahko prišlo do hitrejšega širjenja okužb, saj bi moral organizem kompenzirati z drugimi vnetnimi odzivi, predvsem tistimi, ki se začnejo s tromboksani. V nasprotnem primeru, torej zvišanje aktivnosti encima, bi pri povprečnem vnetnem odzivu nastalo več LTB4 in bi vnetni odzivi bili močnejši in dlje trajajoči, torej bi po nepotrebnem že pri manjši okužbi nastalo večje vnetje.

Najbolj izraziti učinki nenormalnih količin LTB4 so opazni v dihalnih poteh, kjer se sproži močno krčenje dihalnih poti, kar pomeni hitro znižanje dihalnih kapacitet. Ta mehanizem je posebej izrazit pri alergijah na zračne alergeni, še bolj pa pri astmi. [82]

Več raziskav je povezalo LTB4 tudi pri procesih, ki vodijo do nastanka novega, abnormalnega ali celo rakastega tkiva; npr. celice v melanomu proizvedejo večje količine LTB4 in LTC4 kot zdrave [83], blokiranje LTB4 sinteze omogoča zaustavitev širjenja črevesnega raka [84].

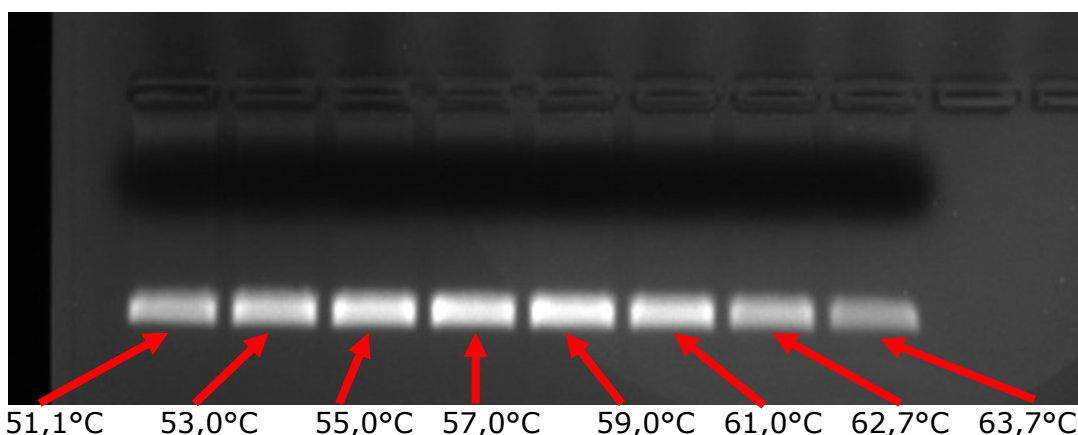
Ker je LTB4 vpleten v patogenezo kroničnih bolezni z motenimi vnetnimi refleksi, sem se odločil za genotipizacijo polimorfizma SNP v genu LTA4H, ki je povezan z višjo aktivnostjo LTA4H encima, tj SNP rs2540487.

## 4.2 Optimizacija PCR in RFLP

Za genotipizacijo s tehniko RFLP in HRM smo za izbrane polimorfizme oblikovali začetne oligonukleotide s pomočjo programskih orodij (Primer3, IDT Oligo Analyzer). Za polimorfizem v genu PTGS2 smo s programom GeneRunner poiskali primeren restrikcijski encim, tj. Pvu II.

PCR reakcijo je potrebno optimizirati, natančneje je treba poiskati najboljšo temperaturo za pripenjanje primerjev, koncentracijo primerjev in koncentracijo dodanega  $MgCl_2$  (v primeru nastanka nespecifičnih produktov).

Temperatura smo optimizirali z gradientnim programom na cikličnem termostatu, tako da smo reakcijo izvedli pri različni temperaturah. Slika (Slika 10) prikazuje rezultate optimiranja temperature pripenjanja začetnih nukleotidov za PCR reakcijo.

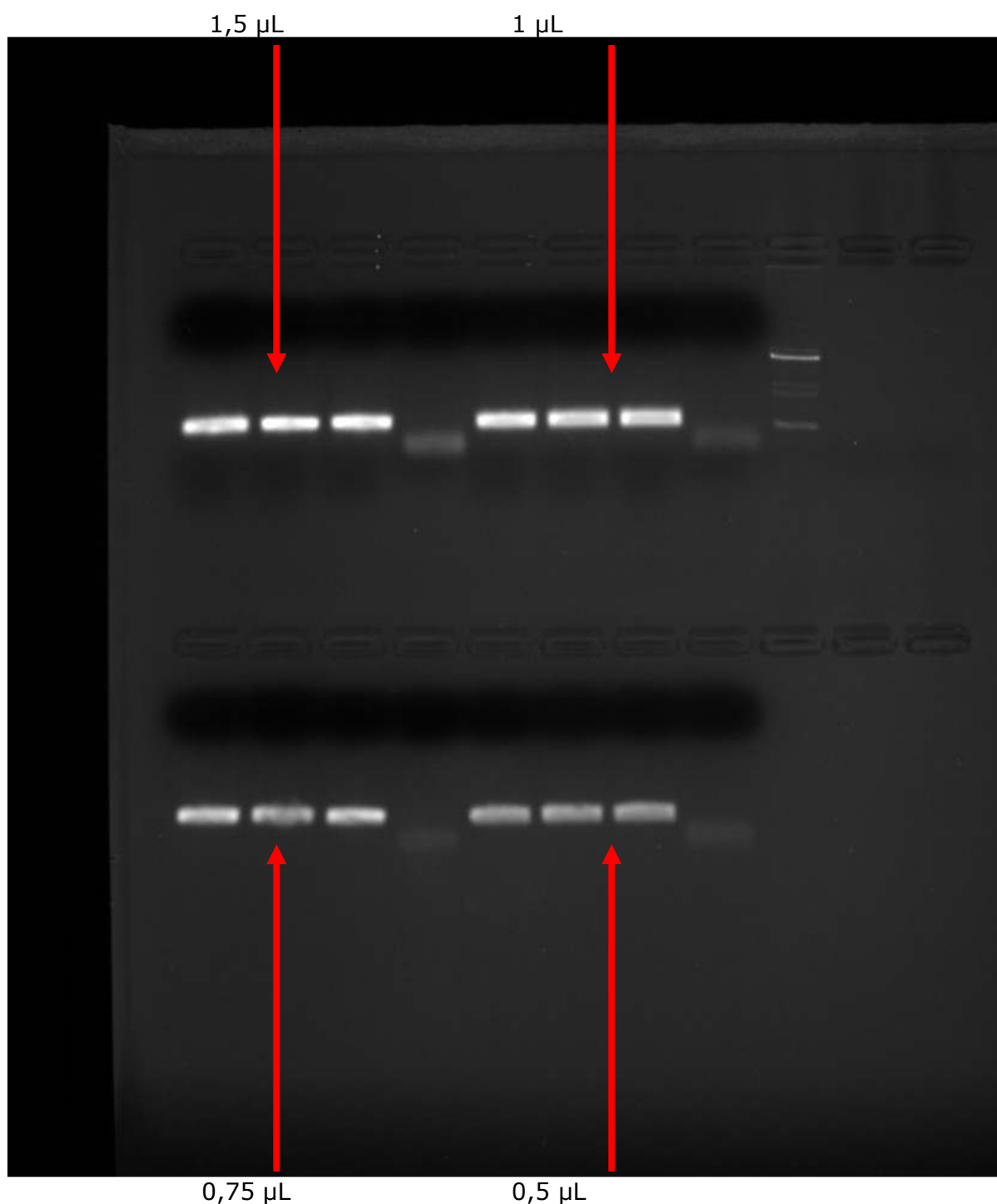


Slika 10 Rezultati optimiranja temperature pripenjanja začetnih oligonukleotidov za SNP rs2540487 v genu LTA4H

Začetni oligonukleotid dobro deluje pri vseh temperaturah, zato smo izbrali srednjo vrednost,  $T = 57^{\circ}C$ , kot optimalno temperaturo pripenjanja. Za polimorfizen SNP rs689466 v genu PTGS2 smo kot optimalno temperaturo pripenjanja začetnih oligonukleotidov določili pri  $T = 59^{\circ}C$ .

V naslednjem koraku smo optimizirali koncentracije začetnih oligonukleotidov. Za to se pripravijo štiri različne reakcijske mešanice z različnimi koncentracijami začetnih oligonukleotidov. V prvi je  $c = 375$  nM (1,5  $\mu$ L) vsakega primerja, v drugi  $c = 250$  nM (1  $\mu$ L), v tretji  $c = 187,5$  nM (0,75  $\mu$ L), v zadnji pa  $c = 125$  nM (0,5  $\mu$ L).

Slika (Slika 11) prikazuje rezultate optimiranja koncentracije začetnih nukleotidov za PCR reakcijo.



Slika 11 Rezultati optimiziranja koncentracije začetih nukleotidov za SNP rs2540487 v genu LTA4H

Začetni oligonukleotid dobro deluje pri vseh koncentracijah, zato smo izbrali najmanjšo, torej  $V = 0,5 \mu\text{L}$ . Začetni oligonukleotidi niso tvorili nobenih nespecifičnih produktov, zato ni bilo potrebe po optimizaciji količine  $\text{MgCl}_2$ , vendar so nezaželene produkte tvorili začetni oligonukleotidi za SNP rs689466 v genu PTGS2.

Za optimizacijo  $MgCl_2$  smo naredili pet PCR reakcij, štiri z DNA in eno z vodo. Slika (Slika 12) prikazuje rezultate po zmanjšanju dodanega  $MgCl_2$  z  $c = 2 \text{ mM}$  ( $V = 0,8 \mu\text{L}$ ) na  $c = 1,5 \text{ mM}$  ( $V = 0,6 \mu\text{L}$ ).



Slika 12 Optimiranje koncentracije magnezijevega klorida za začetne oligonukleotide za SNP rs za rs689466 v genu PTGS2

Kljub temu da še je nastalo nekaj nespecifičnega produkta (vidno kot dve šibkejši črti pod zgornjo, močnejšo), je bilo tega bistveno manj in pri RFLP ni onemogočal določanje genotipa, saj je bil relativno neobstoje in slabo viden na gelih.

V spodnji tabeli (Tabela 8) so zbrani rezultati optimizacije PCR reakcije oz. protokoli:

Tabela 8 Rezultati optimizacije protokola za PCR

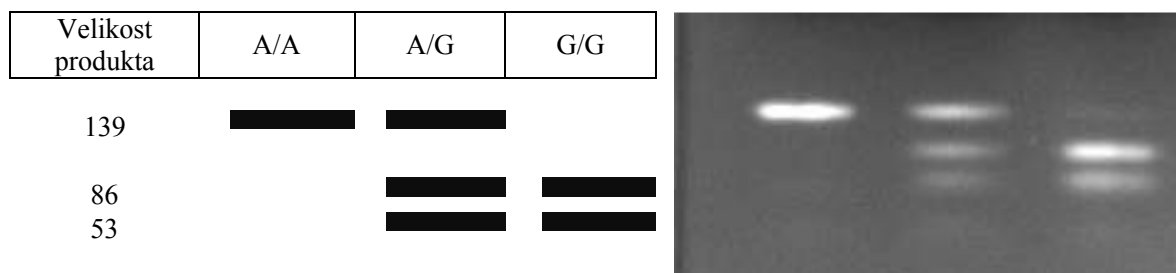
Začetni oligonukleotid	LTA4H (rs2540487)	PTGS2 (rs689466)
Temperatura pripenjanja	57°C	59°C
DNK	2 µL	2 µL
dH <sub>2</sub> O	4,95 µL	5,15 µL
PCR pufer	1 µL	1 µL
MgCl <sub>2</sub>	0,8 µL	0,6 µL
dNTP-ji	0,2 µL	0,2 µL
Primer 1	0,5 µL	0,5 µL
Primer 2	0,5 µL	0,5 µL
Taq polimeraza	0,05 µL	0,05 µL

Po testu uspešnosti PCR na gelu se je izvedel RFLP po protokolu v tabeli (Tabela 9):

Tabela 9 Optimiran protokol za test RFLP

Sestavina	Količina za 1 vzorec (µL)
Restriksijski encim (c = 10 U/µl)	0,5
10x pufer za restriksijski encim	2
dH <sub>2</sub> O	18

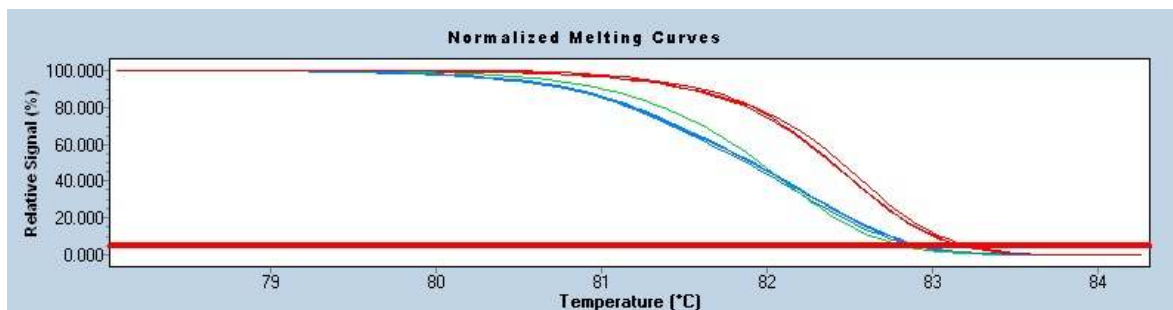
Po  $t = 2$  h smo vzorce nanesti na 2% agarozni gel. Gelska elektroforeza je trajala  $t = 20$  min pri napetosti  $U = 150V$ . Na sliki (Slika 13) so prikazani rezultati RFLP testa rs689466 s CEPH referenčnimi vzorci.



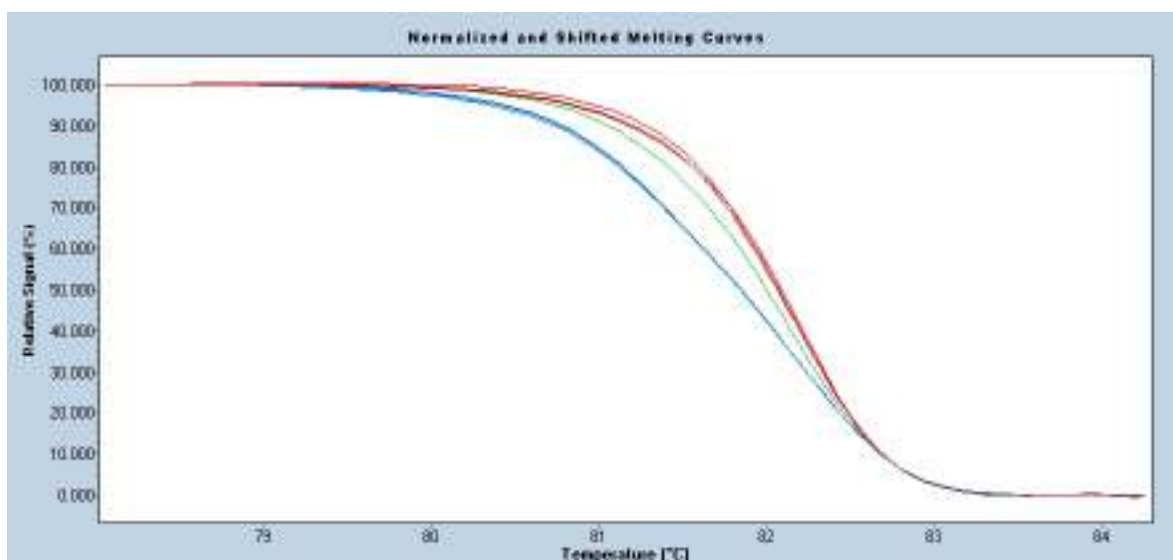
Slika 13 Rezultati testa RFLP s CEPH vzorci

### 4.3 Rezultati HRM

Sliki (Slika 14 in Slika 15) prikazujeta rezultate testa HRM začetnih oligonukleotidov za SNP rs2540487 v genu LTA4H. Zelena krivulja prikazuje homozigot, modre wild-type, rdeče krivulje pa heterozigotne DNK.



Slika 14 Rezultati HRM - normalizirane talilne krivulje



Slika 15 Rezultati HRM - normalizirane in obdelane talilne krivulje

Zaradi jasnega ločevanje med genotipi dodatna optimizacija HRM testa ni bila potrebna.

#### 4.4 Rezultati statističnih analiz

Primerjal sem frekvenco pogostosti genotipa posameznega SNP-ja in frekvenco alelov. V tabeli (Tabela 10) sem zbral rezultate analize.

Tabela 10 Primerjava frekvenc genotipa oz. alela v primerjavi z evropsko populacijo

	PTGS2 (rs689466)		LTA4H (rs2540487)	
	Izmerjeno (N=202)	HapMap	Izmerjeno (N=305)	HapMap
Frekvence genotipov	TT: 0,785 CT: 0,186 CC: 0,029	TT: 0,717 CT: 0,230 CC: 0,053	CC:0,642 CT:0,169 TT:0,189	CC: 0,482 CT: 0,438 TT: 0,080
Frekvence alelov	T: 0,878 C: 0,122	T: 0,832 C: 0,168	C:0,723 T:0,277	C: 0,701 T: 0,299

Frekvence alelov so primerljive, frekvence genotipov pa nekoliko odstopajo od tiste v projektu HapMap. Najbolj razvidno je odstopanje od evropske populacije pri rs2540487 v genu LTA4H, kar lahko pripišemo manjšemu vzorcu ali pa drugačni populaciji (SLO vzorci proti evropskim CEU; podatki sneti s HapMap [85][86]).

Asociacijska študija je pokazala statistično signifikantno povezavo med bolezenskim alelom za SNP rs2540487 na genu LTA4H in patogenezo miomov maternice ( $p = 0,031$ ). Nagnjenje k patogenezi KVČB pri bolnikih z obema bolezenskima aleloma je skoraj statistično signifikantno ( $p = 0,055$ ). Drugih povezav med bolezenskimi aleli za SNP rs689466 na genu PTGS2 in boleznimi nismo našli. Razlog temu bi lahko bila drugačna populacija, kar nam nakazuje spremenjena frekvenca alelov, prikazana v tabeli zgoraj (Tabela 9).

Pri analizi povezave med genotipom in deležem maščobnih kislin smo našli več statistično signifikantnih povezav. Tabele (Tabela 10, Tabela 11, Tabela 12) prikazujejo zbrane podatke statistične signifikance ( $p$  vrednost  $<0,05$ ) in povprečne vrednosti deležev maščobnih kislin.

Statistična analiza vseh bolezenskih vzorcev je pokazala statistično signifikantno povezavo med genotipom SNP-ja rs2540487 in deležem oleinske kisline ( $p = 0,0170$ ;  $p = 0,0050$  za WT+HE vs. HO in  $p = 0,0800$  za WT vs. HE+HO). Pri mutiranih alelih je delež te maščobne kisline povišan. Te povezave nismo pričakovali, saj oleinska kislina nima direktne in jasne vloge pri vnetnih procesih. Po dodatnem iskanju po literaturi smo našli raziskave, ki kažejo na inverzno korelacijo z deležem arahidonske kisline v krvi [87][88]. Po grobi primerjavi deležev arahidonske kisline z deleži oleinske kisline smo ugotovili, da ta korelacija velja za povprečja deležev kislin za skupino vseh bolezenskih vzorcev. Ker je takšno razmerje pri bolnikih z bolezenskim alelom, lahko predpostavimo, da rs2540487 na LTA4H poveča aktivnost encima LTA4H ali ekspresijo tega gena, kar je v skladu z našo predpostavko. Pri povečanem delovanju bi delež arahidonske kisline upadel, po še neznanih mehanizmih pa bi delež oleinske kisline narastel.

Oleinska kislina lahko deluje v telesu protivnetno [89], vendar v visokih koncentracijah poškoduje tkiva, raziskave so našle povezave med visoko stopnjo oleinske kisline in poškodbami očesnega[90] in pljučnega[91] tkiva. Njena vloga pri poškodbah drugih tkiv pri višjih deležih je verjetna.

Za skupino vseh bolezenskih vzorcev sta signifikantni tudi povezavi med bolezenskimi aleli in nižjimi deleži adrenske (C22:4 (7,10,13,16)c) in Osbondove kisline (C22:5 n-6). Adrenska kislina je produkt arahidonske kisline v procesu elongacije omega-6 maščobnih kislin, Osbondova pa je produkt adrenske. Nižji delež obeh bi pomenil, da se teh kislin manj proizvede iz osnovne arahidonske kisline, torej da se arahidonska kislina presnavlja po drugih metabolnih poteh. To sovпада s prejšnjimi ugotovitvami v zvezi z oleinsko kislino. Dodaten razlog za takšno razlago je zmožnost adrenske in oleinske kisline, da se po sekundarnih metabolnih poteh presnujeta nazaj v arahidonsko kislino, če je to potrebno. Pri znižanem deležu arahidonske kisline je to zelo verjetno. Tako bi se pri bolnikih z mutiranimi aleli tudi s hrano vnešena Osbondova kislina porabila za metabolite arahidonske kisline.

Glede na rezultate asociacijske študije patogeneze miomov maternice v povezavi z genotipom SNP-ja rs2540487, ki je pokazala statistično signifikantno povezavo, ni presentljivo, da je največ statistično signifikantnih povezav z maščobnim profilom ravno pri tej bolezni.

Povzetek rezultatov kaže na povišan delež nasičenih, enkrat nenasičenih in trans maščobnih kislin ter znižanim deležem večkrat nenasičenih maščobnih kislin. To sovпада z raziskavami, ki so proučevale vpliv maščobnih kislin na razne kompleksne bolezni. [92]-[97]

Druge signifikantne povezane so sledeče:

- Bolezenski aleli SNP-ja rs689466 na genu PTGS2 na vzorcih KVČB in zmanjšana količina behenske kisline. Vloga behenske kisline ni dobro razložena, njen vpliv na patogenezo ali bolezenske simptome se še ni proučeval. V literaturi je le nekaj raziskav na temo behenske kisline, nobena ni v povezavi s KVČB ali kakšno drugo avtoimuno boleznijo.
- Nagnjenje blizu statistične signifikance ( $p = 0,063$  za test WT vs. HE+HO) je opaženo pri astmatikih za linolno kislino (C18:2 (9,12)c) v povezavi z bolezenskim alelom SNP-ja rs2540487 na genu LTA4H. Ta povezava verjetno nima teže, saj ni bistvene razlike med povprečnima vrednostima v WT in pri mutacijah oz. pri HE in HO.
- Povezava med bolezenskim alelom SNP-ja rs2540487 in deleži enkrat nenasičenih maščobnih kislin pri analizi vseh vzorcev je signifikantna. V primeru bolezenskega alela je delež enkrat nenasičenih maščobnih kislin nekoliko višji, vendar razlika ni bistvena.

Signifikantne povezave med bolezenskimi aleli SNP-ja rs689466 in maščobnim profilom bolnikov nismo našli. Razlog temu je lahko drugačna populacija, kar je razvidno že iz razlik frekvenc alelov. Med drugimi razlogi so lahko še premajhno število vzorcev in funkcija PTGS2 gena. Njegova ekspresija bi lahko bila omejena s končnimi produkti te metabolne poti, tako da spremenjena aktivnost ne bi vplivala na spremembo deležev lipidov.



Tabela 11 Zbrani rezultati povezave genotipa LTA4H in maščobnega profila

Bolezen	Kislina	<i>p</i> vrednost	Povp. delež (WT) [%]	Povp. delež (HE) [%]	Povp. delež (HO) [%]
KVČB	Behenska C22:0	0,0460	0,1461	0,1229	0,1230
Miomi maternice	Miristinska C14:0	0,0320	0,4143	0,4274	0,6469
Miomi maternice	Pentadekanska C15:0	0,0230	0,2615	0,2768	0,3747
Miomi maternice	Margarinska C17:0	0,0300	0,4826	0,5345	0,6462
Miomi maternice	Vsota vseh (18:1)t	0,0140	0,5032	0,5835	0,8568
Miomi maternice	Oleinska C18:1 (9c)	0,0510	16,0405	16,7956	20,1366
Miomi maternice	Gondoinska C20:1 (11c)	0,0400	0,2881	0,2947	0,4257
Miomi maternice	Stearidonska C18:4	0,0410	0,1781	0,2064	0,6520
Miomi maternice	Behenska C22:0	0,0390	0,1221	0,1497	0,2010
Miomi maternice	Lignocerinska C24:0	0,0160	0,1403	0,1713	0,3549
Miomi maternice	Osbondova C22:5n-6	0,0030	0,6202	0,2834	0,1077
Miomi maternice	Enkrat nenasičene	0,0460	19,0399	19,9296	23,8376
Miomi maternice	Trans mašč. kisline	0,0160	0,5633	0,6512	0,9186
Bolezni vzorci	Oleinska C18:1 (9c)	0,0170	17,3814	17,1881	18,8605
Bolezni vzorci	Enkrat nenasičena	0,0210	20,6617	20,2625	22,3426
Bolezni vzorci	Razmerje med enkrat in večkrat nenasičenimi	0,0440	0,8333	0,8167	1,0492

Tabela 12 Zbrani rezultati povezave genotipa LTA4H in maščobnega profila (WT vs HE+HO)

Bolezen	Kislina	<i>p</i> vrednost	Povp. delež (WT) [%]	Povp. delež (HE+HO) [%]
KVČB	Behenska C22:0	0,0190	0,1461	0,1230
Astma	Linolna C18:2 (9,12)c	0,0630	10,1212	10,4942
Bolezni vzorci	Oleinska C18:1 (9c)	0,0800	17,3814	18,1438
Bolezni vzorci	Osbondova C22:5n-6	0,0730	0,5088	0,4241
Vsi vzorci	Osbondova C22:5n-6	0,036	0,5261	0,4350

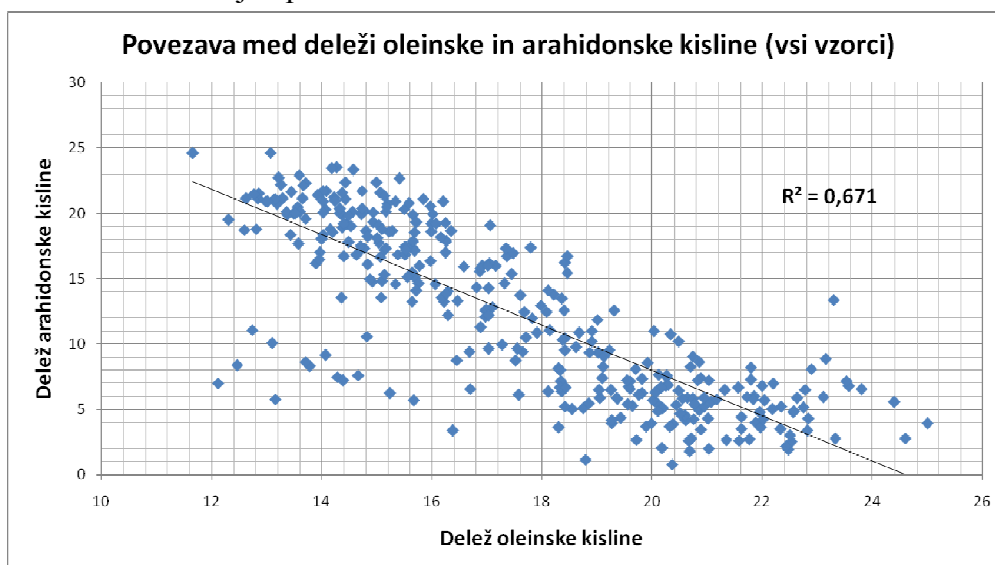
Tabela 13 Zbrani rezultati povezave genotipa LTA4H in maščobnega profila (WT+HE vs. HO)

Bolezen	Kislina	<i>p</i> vrednost	Povp. delež (WT+HE) [%]	Povp. delež (HO) [%]
Miomi maternice	Miristinska C14:0	0,0100	0,4243	0,6469
Miomi maternice	Pentadekanska C15:0	0,0090	0,2680	0,3747
Miomi maternice	Margarinska C17:0	0,0230	0,4955	0,6462
Miomi maternice	Vsota vseh (18:1)t	0,0110	0,5315	0,8568
Miomi maternice	Oleinska C18:1 (9c)	0,0180	16,3575	20,1366
Miomi maternice	Gondoinska C20:1 (11c)	0,0110	0,2895	0,4257
Miomi maternice	Stearidonska C18:4	0,0130	0,1939	0,6520
Miomi maternice	Behenska C22:0	0,0140	0,1256	0,2010
Miomi maternice	Arahidonska C20:4 (5,8,11,14)c	0,0310	12,2275	5,5851
Miomi maternice	Lignocerinska C24:0	0,0060	0,1488	0,3549
Miomi maternice	Osbondova C22:5n-6	0,0240	0,5405	0,1077
Miomi maternice	DPA C22:5 (7,10,13,16,19)c	0,0430	1,2936	0,5210
Miomi maternice	DHA C22:6 (4,7,10,13,16,19)c	0,0310	2,5407	0,9937
Miomi maternice	Nasičene	0,0430	48,1509	58,6316
Miomi maternice	Enkrat nenasičene	0,0180	19,4025	23,8376
Miomi maternice	Večkrat nenasičene	0,0350	32,4467	17,5308
Miomi maternice	Trans mašč. kisline	0,0110	0,5926	0,9186
Miomi maternice	Razmerje med enkrat in večkrat nenasičenimi	0,0350	0,7368	1,3853
Miomi maternice	Omega-6	0,0310	27,8140	14,7780
Bolezni vzorci	Oleinska C18:1 (9c)	0,0050	17,3456	18,8605
Bolezni vzorci	Adrenska C22:4 (7,10,13,16)c	0,0820	3,0349	2,4859
Bolezni vzorci	Osbondova C22:5n-6	0,0630	0,5006	0,3938
Bolezni vzorci	Enkrat nenasičene	0,0060	20,5878	22,3426
Bolezni vzorci	Razmerje med enkrat in večkrat nenasičenimi	0,0150	0,8302	1,0492
Vsi vzorci	Oleinska C18:1 (9c)	0,0260	17,0803	18,1090
Vsi vzorci	Enkrat nenasičene	0,0290	20,2732	21,4744
Vsi vzorci	Razmerje med enkrat in večkrat nenasičenimi	0,033	0,7831	0,9374

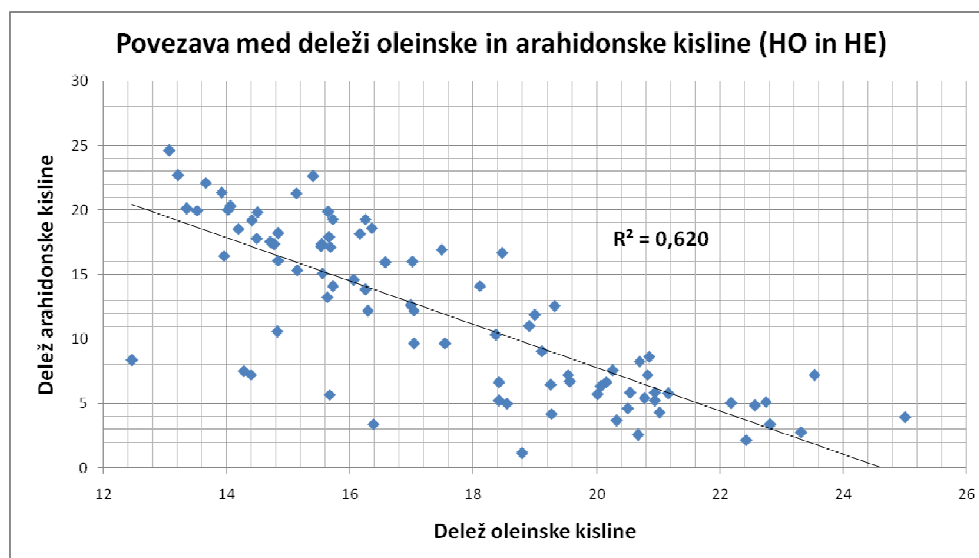
#### 4.4.1 Povezava med deleži oleinske in arahidonske kisline

Raziskave so pokazale inverzno korelacijo med deležem oleinske in arahidonske kisline v krvi [87][88]. Povezava med genotipom SNP-ja rs2540487 v genu LTA4H in deležem oleinske kisline je statistično signifikantna ( $p = 0,0050$  za vse bolezenske vzorce in  $p = 0,0260$  za vse analizirane vzorce). Pri bolezenskem alelu je namreč povečan delež oleinske kisline. Iz tega razloga smo preverili, ali velja inverzna korelacija med deleži oleinske in arahidonske kisline pri vseh vzorci oz. v prisotnosti bolezenskega alela.

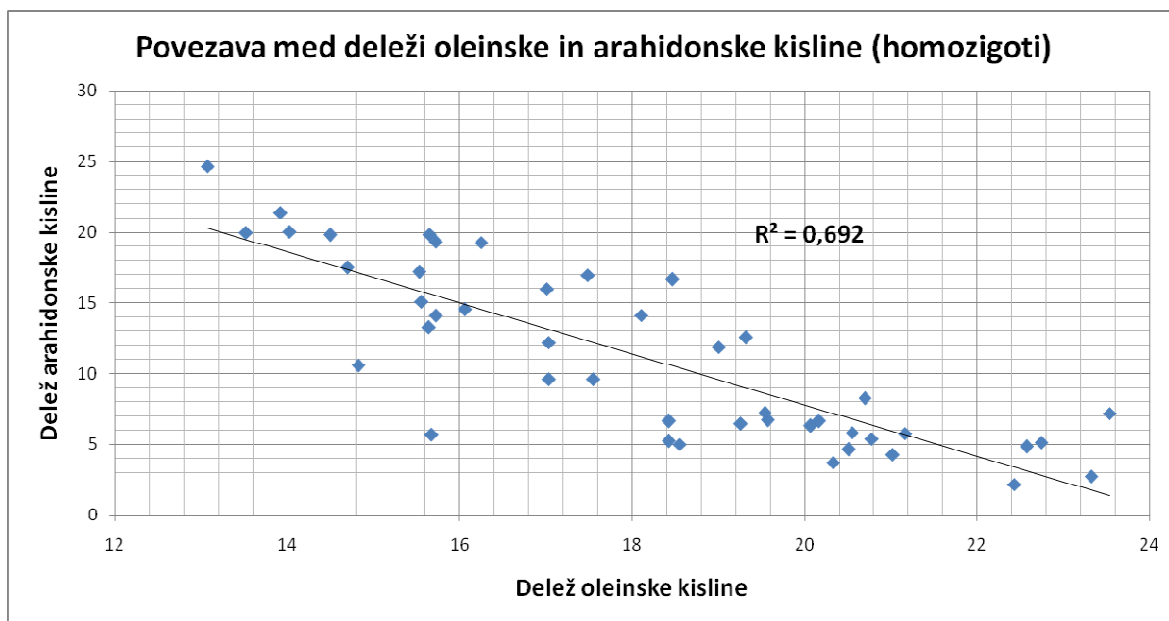
Slike (Slika 16, Slika 17 in Slika 18) grafično prikazujejo povezavo med deleži oleinske in arahidonske kisline. Na x-osi so deleži oleinske kisline kot neodvisna spremenljivka, na y-osi pa deleži arahidonske kisline kot odvisna spremenljivka. Na grafih so tudi linearne aproksimacije in  $R^2$  vrednosti. Kljub temu, da funkcije slabše aproksimirajo korelacijo, je trend inverzne korelacije opazen.



Slika 16 Povezava med deleži oleinske in arahidonske kisline (vsi analizirani vzorci)



Slika 17 Povezava med deleži oleinske in arahidonske kisline (homozigoti in heterozigoti za SNP rs2540487)



Slika 18 Povezava med deleži oleinske in arahidonske kisline (homozigoti za SNP rs2540487)

## 5 Zaključek

V naši raziskavi smo potrdili vpliv SNP-ja rs2540487 v genu LTA4H z miomi maternice in maščobnim profilom bolnikov s pogostimi kompleksnimi boleznimi. Glede na rezultate lahko sklepamo, da rs2540487 spremeni aktivnost encima ali ekspresijo gena, kar vodi v večjo porabo arahidonske kisline, katere delež je znižan pri bolnikih. To predpostavko nam indirektno potrjujejo signifikantne povezave z znižano stopnjo adrenske in Osbondove kisline (obe nastaneta iz arahidonske kisline pri metabolizmu omega-6 maščobnih kislin) ter višja raven oleinske kisline, ki je po raziskavah v inverzni korelaciji z deležem arahidonske kisline v krvi (višja raven oleinske pomeni nižjo raven arahidonske).

Takšno moteno delovanje LTA4H gena pomeni hitrejšo ali intenzivnejšo presnovo levkotriena A4 v levkotrien B4, ki sproži v velikem številu tkiv vnetni proces. Levkociti pričnejo migrirati, spremeni se tudi celokupni metabolizem in obnašanje celic v tkivu. V primeru miomov maternice to pomeni buren odziv na okužbo, ki po različnih metabolnih poteh vodi do proizvodnje večjih količin zunajceličnih strukturnih proteinov, zmanjšano apoptozo celic in povečano rast tkiva; to so faktorji, ki lahko vodijo do nastanka maligne celice, iz katere po nenehnem podvajanju nastane maternični miom. V že oblikovanem miomu bi mutacija v genu LTA4H pomenila višjo raven levkotriena B4, kar bi le poslabšalo bolezensko stanje.

Več raziskav je pokazalo povezavo med spremenjenim metabolizmom maščob in patogenezo kompleksnih bolezni. Bolnikov, ki trpijo za temi boleznimi je iz leta v leto več. Razlog temu je verjetno moderni stil življenja (vnos omega-6 maščobnih kislin, večje količine kalorij, manj mineralnih snov itd.), ki pri posameznikih z genetsko pogojenim ozadjem vse pogosteje izzove patogenezo kompleksnih bolezni. Z nadaljevanjem študij na tem področju bi lahko dodatno ozavestili javnost za spremembo stila življenja, da bi se zmerno pogojeni posamezniki lahko izognili bolezni ali omilili njej obseg.

Z identifikacijo SNP-jev, ki so povezani s kompleksnimi boleznimi in metabolizmom maščobnih kislin bi lahko že pred samo patogenezo ozavestili posameznike o njihovem genetskem ozadju, kar bi delovalo kot učinkovita preventiva. Pravtako dodatne identifikacije SNP-jev prispevajo k možnosti hitrejše diagnoze kompleksne bolezni s testom večih statistično signifikantnih polimorfizmov.

## 6 Literatura

- [1] Rubin DC, Shaker A, Levin MS.; Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer; Maj 2012; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3347037/>); dostopno April 2014
- [2] Küster W1, Pascoe L, Purrmann J, Funk S, Majewski F.; The genetics of Crohn disease: complex segregation analysis of a family study with 265 patients with Crohn disease and 5,387 relatives; Januar 1989; (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2705471/>); dostopno April 2014
- [3] Duerr RH.; The genetics of inflammatory bowel disease.; Marec 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12122744>; dostopano April 2014
- [4] Tysk C, Lindberg E, Järnerot G, Flodérus-Myrhed B.; Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking; Julij 1988; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1433769/>; dostopano April 2014
- [5] Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO.; Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study.; Oktober 2000; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099061>; dostopano April 2014
- [6] Abraham C, Cho JH.; Inflammatory bowel disease; November 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19923578>; dostopano April 2014
- [7] Itzkowitz SH, Yio X.; Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation.; Julij 2004; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194558>; dostopano April 2014
- [8] Calkins BM.; A meta-analysis of the role of smoking in inflammatory bowel disease.; December 1989; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2598752>; dostopano April 2014
- [9] A D Harries, A Baird, and J Rhodes; Non-smoking: a feature of ulcerative colitis; Marec 1982; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2598752>; dostopano April 2014
- [10] Lidar M, Langevitz P, Shoenfeld Y.; The role of infection in inflammatory bowel disease: initiation, exacerbation and protection.; September 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19960852>; dostopano April 2014
- [11] S Reif, I Klein, F Lubin, M Farbstein, A Hallak, and T Gilat; Pre-illness dietary factors in inflammatory bowel disease.; Junij 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1027200/>; dostopano April 2014
- [12] Mayberry JF, Rhodes J, Newcombe RG.; Increased sugar consumption in Crohn's disease.; 1980; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7390057>; dostopano April 2014
- [13] Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, Stockbrügger RW.; Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors.; Marec 1998; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9585029>; dostopano April 2014
- [14] Persson PG, Ahlbom A, Hellers G.; Diet and inflammatory bowel disease: a case-control study.; Januar 1992; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1313310>; dostopano April 2014
- [15] Geerling BJ, Dagnelie PC, Badart-Smook A, Russel MG, Stockbrügger RW, Brummer RJ.; Diet as a risk factor for the development of ulcerative colitis.; April 2000; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10763951>; dostopano April 2014; dostopano April 2014
- [16] Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, Stockbrügger RW.; Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors.; Marec 1998; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9585029>; dostopano April 2014
- [17] Russel MG, Engels LG, Muris JW, Limonard CB, Volovics A, Brummer RJ, Stockbrügger RW.; Modern life' in the epidemiology of inflammatory bowel disease: a case-control study with special emphasis on nutritional factors.; Marec 1998; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9585029>; dostopano April 2014
- [18] Barnes PJ.; Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease.; Marec 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18274560>; dostopano April 2014

- [19] Holgate ST, Polosa R.; Treatment strategies for allergy and asthma.; Marec 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18274559>; dostopano April 2014
- [20] Anil B. Mukherjee and Zhongjian Zhang; Allergic Asthma: Influence of Genetic and Environmental Factors; September 2011; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3190897/>; dostopano April 2014
- [21] Nelson HS.; The importance of allergens in the development of asthma and the persistence of symptoms.; Januar 2001; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11182682>; dostopano April 2014
- [22] Jenna R. Murdoch and Clare M. Lloyd; Chronic inflammation and asthma; August 2010; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2923754/>; dostopano April 2014
- [23] Noam Shussman and Steven D. Wexner; Colorectal polyps and polyposis syndromes; Februar 2014; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3920990/>; dostopano April 2014
- [24] Ben Zhang, Martha J. Shrubsole, [...], and Wei Zheng; Association of genetic variants for colorectal cancer differs by subtypes of polyps in the colorectum; December 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3510743/>; dostopano April 2014
- [25] Dai Q, Shrubsole MJ, Ness RM, Schlundt D, Cai Q, Smalley WE, Li M, Shyr Y, Zheng W.; The relation of magnesium and calcium intakes and a genetic polymorphism in the magnesium transporter to colorectal neoplasia risk.; September 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17823441>; dostopano April 2014
- [26] Shin A, Shrubsole MJ, Rice JM, Cai Q, Doll MA, Long J, Smalley WE, Shyr Y, Sinha R, Ness RM, Hein DW, Zheng W.; Meat intake, heterocyclic amine exposure, and metabolizing enzyme polymorphisms in relation to colorectal polyp risk.; Februar 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18268115>; dostopano April 2014
- [27] Fu Z, Shrubsole MJ, Li G, Smalley WE, Hein DW, Chen Z, Shyr Y, Cai Q, Ness RM, Zheng W.; Using gene-environment interaction analyses to clarify the role of well-done meat and heterocyclic amine exposure in the etiology of colorectal polyps.; November 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23015320>; dostopano April 2014
- [28] Fu Z, Shrubsole MJ, Li G, Smalley WE, Hein DW, Cai Q, Ness RM, Zheng W.; Interaction of cigarette smoking and carcinogen-metabolizing polymorphisms in the risk of colorectal polyps.; April 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23299405>; dostopano April 2014
- [29] Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB.; Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis.; Februar 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242207>; dostopano April 2014
- [30] Wei Zheng, M.D., Ph.D. and Sang-Ah Lee, Ph.D.; Well-done Meat Intake, Heterocyclic Amine Exposure, and Cancer Risk; 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769029/>; dostopano April 2014
- [31] Botteri E, Iodice S, Raimondi S, Maisonneuve P, Lowenfels AB.; Cigarette smoking and adenomatous polyps: a meta-analysis.; Februar 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18242207>; dostopano April 2014
- [32] Harvey J Murff, Martha J Shrubsole, [...], and Wei Zheng; Dietary intake of PUFAs and colorectal polyp risk; Marec 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3278245/>; dostopano April 2014
- [33] Oh K, Willett WC, Wu K, Fuchs CS, Giovannucci EL.; Calcium and vitamin D intakes in relation to risk of distal colorectal adenoma in women.; Maj 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17379616>; dostopano April 2014
- [34] Cho E, Smith-Warner SA, Spiegelman D, Beeson WL, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, Fraser GE, Freudenheim JL, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Miller AB, Pietinen P, Potter JD, Rohan TE, Terry P, Toniolo P, Virtanen MJ, Willett WC, Wolk A, Wu K, Yaun SS, Zeleniuch-Jacquotte A, Hunter DJ.; Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies.; Julij 2004; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15240785>; dostopano April 2014
- [35] Flossmann E, Rothwell PM; British Doctors Aspirin Trial and the UK-TIA Aspirin Trial.; Effect of aspirin on long-term risk of colorectal cancer: consistent evidence from randomised and observational studies.; Maj 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17499602>; dostopano April 2014

- [36] Cole BF, Logan RF, Halabi S, Benamouzig R, Sandler RS, Grainge MJ, Chaussade S, Baron JA.; Aspirin for the chemoprevention of colorectal adenomas: meta-analysis of the randomized trials.; Februar 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19211452>; dostopano April 2014
- [37] Park Y, Hunter DJ, Spiegelman D, Bergkvist L, Berrino F, van den Brandt PA, Buring JE, Colditz GA, Freudenheim JL, Fuchs CS, Giovannucci E, Goldbohm RA, Graham S, Harnack L, Hartman AM, Jacobs DR Jr, Kato I, Krogh V, Leitzmann MF, McCullough ML, Miller AB, Pietinen P, Rohan TE, Schatzkin A, Willett WC, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, Zhang SM, Smith-Warner SA.; Dietary fiber intake and risk of colorectal cancer: a pooled analysis of prospective cohort studies.; December 2005; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16352792>; dostopano April 2014
- [38] Jacobs ET, Lanza E, Alberts DS, Hsu CH, Jiang R, Schatzkin A, Thompson PA, Martínez ME.; Fiber, sex, and colorectal adenoma: results of a pooled analysis.; Februar 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16469993>; dostopano April 2014
- [39] Zhenming Fu, Martha J. Shrubsole, [...], and Wei Zheng; Lifestyle Factors and Their Combined Impact on the Risk of Colorectal Polyps; November 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3571253>; dostopano April 2014
- [40] E. Linda R. Sheldrick, Kamila Derecka, [...], and Anthony P. F. Flint; Peroxisome-proliferator-activated receptors and the control of levels of prostaglandin-endoperoxide synthase 2 by arachidonic acid in the bovine uterus; August 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1948980/>; dostopano April 2014
- [41] Aamir T Khan, Manjeet Shehmar, and Janesh K Gupta; Uterine fibroids: current perspectives; 2014; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3914832>; dostopano April 2014
- [42] Wallach EE, Vlahos NF.; Uterine myomas: an overview of development, clinical features, and management.; 2004; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15292018>; dostopano April 2014
- [43] Parker WH.; Etiology, symptomatology, and diagnosis of uterine myomas.; April 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17430732>; dostopano April 2014
- [44] Rein MS, Barbieri RL, Friedman AJ.; Progesterone: a critical role in the pathogenesis of uterine myomas.; Januar 1995; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7847524>; dostopano April 2014
- [45] Andersen J.; Growth factors and cytokines in uterine leiomyomas.; August 1996; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8885057>; dostopano April 2014
- [46] Fields KR, Neinstein LS.; Uterine myomas in adolescents: case reports and a review of the literature.; November 1996; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957774>; dostopano April 2014
- [47] Cramer SF, Patel A.; The frequency of uterine leiomyomas.; Oktober 1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2220671>; dostopano April 2014
- [48] Purdie DM, Green AC.; Epidemiology of endometrial cancer.; Junij 2001; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11476557>; dostopano April 2014
- [49] Colditz GA.; Epidemiology of breast cancer. Findings from the nurses' health study.; Februar 1993; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8431884>; dostopano April 2014
- [50] Leppert PC, Catherino WH, Segars JH.; A new hypothesis about the origin of uterine fibroids based on gene expression profiling with microarrays.; August 2006; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16635466>; dostopano April 2014
- [51] Stewart EA, Nowak RA.; New concepts in the treatment of uterine leiomyomas.; Oktober 1998; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9764641>; dostopano April 2014
- [52] Cramer SF, Mann L, Calianese E, Daley J, Williamson K.; Association of seedling myomas with myometrial hyperplasia.; Februar 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18799191>; dostopano April 2014
- [53] Catherino W, Salama A, Potlog-Nahari C, Leppert P, Tsibris J, Segars J.; Gene expression studies in leiomyomata: new directions for research.; Maj 2004; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15164303>; dostopano April 2014
- [54] Baird DD, Dunson DB, Hill MC, Cousins D, Schectman JM.; High cumulative incidence of uterine leiomyoma in black and white women: ultrasound evidence.; Januar 2003; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12548202>; dostopano April 2014
- [55] Zdenka Cencič Kodba, Določevanje sestave maščobnih kislin in njihovih profilov v membranah rdečih krvnih celic bolnikov z različnimi boleznimi z metodo plinske kromatografije, Maribor, Junij 2011



- [56] Olof Radmark, Takao Shimizuss, Hans Jornvall, and Bengt Samuelsson; Leukotriene A4 Hydrolase in Human Leukocytes; THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, Vol. 259. No. 20, Issue of October 25, pp. 12339-12345, 1984; <http://www.jbc.org/content/259/20/12339.long>; dostopano Maj 2014
- [57] Chenyu Huang and Rei Ogawa; Roles of lipid metabolism in keloid development; 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3653711/>; dostopano Maj 2014
- [58] [http://en.wikipedia.org/wiki/File:EFA\\_to\\_Eicosanoids.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:EFA_to_Eicosanoids.svg); dostopano Maj 2014
- [59] Bjarne Østerud, Eirik Bjørklid; Biosynthesis of prostanoids, thromboxane, leukotrienes, lipoxins, and HETE; Oktober 2003; [shttp://physrev.physiology.org/content/83/4/1069/F3](http://physrev.physiology.org/content/83/4/1069/F3); dostopano Maj 2014
- [60] <http://lsm1.amebis.si/lsmeds/novPogoj.aspx?pPogoj=eikozanoid>; dostopano Maj 2014
- [61] [http://www.biosistemika.com/uploads/PCR\\_sketch\\_4.jpg](http://www.biosistemika.com/uploads/PCR_sketch_4.jpg); dostopano Maj 2014
- [62] W Rychlik, W J Spencer, and R E Rhoads; Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro.; November 1990; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332522/>; dostopano Julij 2014
- [63] A Chien, D B Edgar, and J M Trela; Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*.; September 1976; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC232952/>; dostopano Junij 2014
- [64] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechPCR.shtml>; dostopano Junij 2014
- [65] <http://lsm1.amebis.si/>; dostopano Junij 2014
- [66] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/probe/doc/TechRFLP.shtml>; dostopano Junij 2014
- [67] Ming-Yii Huang, Wei-Yu Fang, Su-Chen Lee, Tian-Lu Cheng, Jaw-Yuan Wang and Shiu-Ru Lin; ERCC2 2251A>C genetic polymorphism was highly correlated with early relapse in high-risk stage II and stage III colorectal cancer patients: A preliminary study; Februar 2008; <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/8/50> ; dostopano Maj 2014
- [68] Reed GH1, Kent JO, Wittwer CT.; High-resolution DNA melting analysis for simple and efficient molecular diagnostics.; Junij 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17559349>; dostopano Junij 2014
- [69] <http://www.cephb.fr/en/>; dostopano Maj 2014
- [70] Martinelli N, Girelli D, Malerba G, Guarini P, Illig T, Trabetti E, Sandri M, Friso S, Pizzolo F, Schaeffer L, Heinrich J, Pignatti PF, Corrocher R, Olivieri O.; FADS genotypes and desaturase activity estimated by the ratio of arachidonic acid to linoleic acid are associated with inflammation and coronary artery disease.; Oktober 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18842780>; dostopano April 2014
- [71] Oh Yoen Kim, Hyo Hee Lim, [...], and Jong Ho Lee; Fatty acid desaturase (FADS) gene polymorphisms and insulin resistance in association with serum phospholipid polyunsaturated fatty acid composition in healthy Korean men: cross-sectional study; 2011; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3111337/>; dostopano April 2014
- [72] Sekar Kathiresan, Cristen J Willer, [...], and L Adrienne Cupples; Common variants at 30 loci contribute to polygenic dyslipidemia; Januar 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2881676/>; dostopano April 2014
- [73] Aida Maribel Chisaguano, Rosa Montes, [...], and M. Carmen López-Sabater; Gene Expression of Desaturase (FADS1 and FADS2) and Elongase (ELOVL5) Enzymes in Peripheral Blood: Association with Polyunsaturated Fatty Acid Levels and Atopic Eczema in 4-Year-Old Children; 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3805510/>; dostopano April 2014
- [74] Simon J. Evans, Masoud Kamali, [...], and Charles F. Burant; Association of Plasma Omega-3 and Omega-6 Lipids with Burden of Disease Measures in Bipolar Subjects; November 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3495133/>; dostopano April 2014
- [75] de Vries HS, te Morsche RH, van Oijen MG, Nagtegaal ID, Peters WH, de Jong DJ.; The functional -765G→C polymorphism of the COX-2 gene may reduce the risk of developing crohn's disease.; November 2010; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21124790>; dostopano April 2014
- [76] Andersen V, Nimmo E, Krarup HB, Drummond H, Christensen J, Ho GT, Ostergaard M, Ernst A, Lees C, Jacobsen BA, Satsangi J, Vogel U.; Cyclooxygenase-2 (COX-2) polymorphisms and risk of

- inflammatory bowel disease in a Scottish and Danish case-control study.; April 2011; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20803508>; dostopano April 2014
- [77] Nina Habermann, Cornelia M. Ulrich, [...], and Martha L. Slattery; PTGS1, PTGS2, ALOX5, ALOX12, ALOX15, and FLAP SNPs: interaction with fatty acids in colon cancer and rectal cancer; Januar 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3534991/>; dostopano April 2014
- [78] Andrew T. Chan, Nadir Arber, [...], and John A. Baron; Aspirin in the Chemoprevention of Colorectal Neoplasia: An Overview; Februar 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3273592/>; dostopano April 2014
- [79] Maria V. Grau, Robert S. Sandler, [...], and John A. Baron; Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use After 3 Years of Aspirin Use and Colorectal Adenoma Risk: Observational Follow-up of a Randomized Study; Februar 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2644329/>; dostopano April 2014
- [80] Mathew Varghese and Richard F Lockey; Aspirin-Exacerbated Asthma; 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2868885/>; dostopano April 2014
- [81] Tanya M. Laidlaw, MD and Joshua A. Boyce, MD; Pathogenesis of Aspirin-Exacerbated Respiratory Disease and Reactions; Maj 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3781366/>; dostopano April 2014
- [82] Haig Tcheurekdjian, M.D., Marc Via, Ph.D., [...], and Esteban González Burchard, M.D., M.P.H.; ALOX5AP and LTA4H polymorphisms modify augmentation of bronchodilator responsiveness by leukotriene modifiers in Latinos; Oktober 2010; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2950217/>; dostopano April 2014
- [83] Okano-Mitani H, Ikai K, Imamura S.; Human melanoma cells generate leukotrienes B4 and C4 from leukotriene A4.; Maj 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9209681>; dostopano Maj 2014
- [84] Ihara A, Wada K, Yoneda M, Fujisawa N, Takahashi H, Nakajima A.; Blockade of leukotriene B4 signaling pathway induces apoptosis and suppresses cell proliferation in colon cancer.; Januar 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220595>; dostopano Maj 2014
- [85] <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>; dostopano Maj 2014
- [86] <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>; dostopano Maj 2014
- [87] Arne Torbjørn Høstmark and Anna Haug; Percentage oleic acid is inversely related to percentage arachidonic acid in total lipids of rat serum; 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3622620/>; dostopano Maj 2014
- [88] Arne Torbjørn Høstmark and Anna Haug; Percentages of oleic acid and arachidonic acid are inversely related in phospholipids of human sera; 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3722056/>; dostopano Maj 2014
- [89] Evros K Vassiliou, Andres Gonzalez, [...], and Jeffrey H Toney; Oleic acid and peanut oil high in oleic acid reverse the inhibitory effect of insulin production of the inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  both *in vitro* and *in vivo* systems; 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2706835/>; dostopano Julij 2014
- [90] Zhenhua Liu, Yunbei Xiao, [...], and Xiaofeng Wang; Effects of oleic acid on cell proliferation through an integrin-linked kinase signaling pathway in 786-O renal cell carcinoma cells; April 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3629253/>; dostopano Julij 2014
- [91] Muiris T Kennedy, Brendan D Higgins, [...], and John G Laffey; Hypertonic saline reduces inflammation and enhances the resolution of oleic acid induced acute lung injury; 2008; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2467400/>; dostopano Julij 2014
- [92] C Mermer and J Mercola; Omega-3s and childhood asthma; Marec 2002; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1746277/>; dostopano Avgust 2014
- [93] Jonathan P Arm, Joshua A Boyce, [...], and Floyd H Chilton; Impact of botanical oils on polyunsaturated fatty acid metabolism and leukotriene generation in mild asthmatics; 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3851449/>; dostopano Avgust 2014
- [94] SC Mills, AC Windsor, and SC Knight; The potential interactions between polyunsaturated fatty acids and colonic inflammatory processes; November 2005; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1809520/>; dostopano Avgust 2014

- [95] Korosh Khanaki, Mohammad Nouri, [...], and Ali Rahimpour; Evaluation of the Relationship between Endometriosis and Omega-3 and Omega-6 Polyunsaturated Fatty Acids; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3614254/>; dostopano Avgust 2014
- [96] Darla R. Shores, MD, David G. Binion, MD, [...], and Paul R.S. Baker, PhD; New Insights into the Role of Fatty Acids in the Pathogenesis and Resolution of Inflammatory Bowel Disease; Oktober 2011; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4100336/>; dostopano Avgust 2014
- [97] S Bühner, E Nagel, J Körber, H Vogelsang, T Linn, and R Pichlmayr; Ileal and colonic fatty acid profiles in patients with active Crohn's disease.; Oktober 1994; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1375018/>; dostopano Avgust 2014
- [98] James P. Hardwick, Katie Eckman, [...], and Byoung-Joon Song; Eicosanoids in Metabolic Syndrome; 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3675900/>; dostopano Avgust 2014
- [99] Thaddeus S. Stappenbeck, John D. Rioux, [...], and Ramnik J. Xavier; Crohn disease, A current perspective on genetics, autophagy and immunity; April 2011; dostopano Avgust 2011
- [100] John D. Rioux, Ramnik J. Xavier, [...], and Steven R. Brant; Genome-wide association study identifies five novel susceptibility loci for Crohn's disease and implicates a role for autophagy in disease pathogenesis; Maj 2007; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2757939/>; dostopano Avgust 2014
- [101] Emmanuelle Bouzigon, Paola Forabosco, [...], and Cathryn M Lewis; Meta-analysis of 20 genome-wide linkage studies evidenced new regions linked to asthma and atopy; Junij 2010; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2987334/>; dostopano Avgust 2014
- [102] Blanca E. Himes, Gary M. Hunninghake, [...], and Scott T. Weiss; Genome-wide Association Analysis Identifies PDE4D as an Asthma-Susceptibility Gene; Maj 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2681010/>; dostopano Avgust 2014
- [103] Adaikalavan Ramasamy, Mikko Kuokkanen, [...], and Joel N. Hirschhorn; Genome-Wide Association Studies of Asthma in Population-Based Cohorts Confirm Known and Suggested Loci and Identify an Additional Association near HLA; 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3461045/>; dostopano Avgust 2014
- [104] Jun Wang, Xufeng Guo, [...], and Weiguo Dong; Cyclooxygenase-2 Polymorphisms and Susceptibility to Colorectal Cancer: A Meta-Analysis; November 2013; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3809860/>; dostopano Avgust 2014
- [105] V. Shane Pankratz, Ph.D., Zhifu Sun, M.D., [...], and Ping Yang, M.D., Ph.D.; Systematic evaluation of genetic variants in three biological pathways on patient survival in low stage non-small cell lung cancer; September 2011; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3158278/>; dostopano Avgust 2014
- [106] Elizabeth L. Barry, Leah B. Sansbury, [...], and John A. Baron; Cyclooxygenase-2 Polymorphisms, Aspirin Treatment, and Risk of Colorectal Adenoma Recurrence – Data from a Randomized Clinical Trial; Oktober 2009; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2769932/>; dostopano Avgust 2014
- [107] C.-L. Xuan, W. Yan, L. Xuan in R.-H. Xu; PTGS2 gene polymorphism -765G>C is associated with coronary artery disease: a meta-analysis; Januar 2014; <http://www.geneticsmr.com/articles/2752/>; dostopano Avgust 2014
- [108] Asif S Tulah, Bianca Beghé, [...], and Ian Sayers; Leukotriene B4 receptor locus gene characterisation and association studies in asthma; 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3607986/>; dostopano Avgust 2014
- [109] Jaana Hartiala, Dalin Li, [...], and Hooman Allayee; Genetic contribution of the leukotriene pathway to coronary artery disease; Junij 2012; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3092945/>; dostopano Avgust 2014

## 7 Priloge

Priloge 5-15 so zbrani rezultati statističnih analiz maščobnih kislin in genotipa.

### 7.1 Priloga 1

Tabela 14 Rezultati asociacijske analize genotipa LTA4H in PTGS2 bolnikov z KVČB in primerjava z kontrolnimi vzorci

Gen	db SNP ID	Frekvence genotipov - kontrolni vzorci	Frekvence genotipov - KVČB	Kontrolni vzorci vs. KVČB genotipi 11	Kontrolni vzorci vs. KVČB genotipi 22	Alelni frekvenci kontrolni vzorci	Alelni frekvenci KVČB	Kontrolna skupina vs. KVČB - aleli
PTGS2	rs689466	n = 62 TT: 75,8% CT: 20,98% CC: 3,22%	n = 79 TT: 77,21% CT: 19,0% CC: 3,79%	TT in CT vs. CC $p = 0,855$ OR = 0,844 95% CI = 0,137 - 5,217	TT vs. CT in CC $p = 0,845$ OR = 1,082 95% CI = 0,494 - 2,368	T: 86,29% C: 13,71%	T: 87,71% C: 13,29%	$p = 0,919$ OR = 1,036 95% CI = 0,521 - 2,062
LTA4H	rs2540487	n = 60 CC: 61,67% CT: 23,33% TT: 15%	n = 80 CC: 57,5% CT: 13,75% TT: 28,75%	CC in CT vs. TT $p = \mathbf{0,055}$ OR = 2,287 95% CI = 0,969 - 5,394	CC vs. CT in TT $p = 0,619$ OR = 1,198 95% CI = 0,600 - 2,356	C: 73,34% T: 26,66%	C: 64,38% T: 35,62%	$p = 0,111$ OR = 1,522 95% CI = 0,907 - 2,555

## 7.2 Priloga 2

Tabela 15 Rezultati asociacijske analize genotipa LTA4H bolnikov z polipi debelega črevesa in primerjava z kontrolnimi vzorci

Gen	db SNP ID	Frekvence genotipov - kontrolni vzorci	Frekvence genotipov - POL	Kontrolni vzorci vs. POL genotipi 11	Kontrolni vzorci vs. POL genotipi 22	Alelni frekvenci kontrolni vzorci	Alelni frekvenci POL	Kontrolna skupina vs. POL - aleli
LTA4H	rs2540487	n = 60 CC: 61,67% CT: 23,33% TT: 15%	n = 17 CC: 58,82% CT: 29,42% TT: 11,76%	CC in CT vs. TT $p = 0,174$ OR = 2,361 95% CI = 0,669 - 8,334	CC vs. CT in TT $p = 0,832$ OR = 1,126 95% CI = 0,376 - 3,373	C: 73,34% T: 26,66%	C: 73,53% T: 26,47%	$p = 0,326$ OR = 1,500 95% CI = 0,666 - 3,377

## 7.3 Priloga 3

Tabela 16 Rezultati asociacijske analize genotipa LTA4H bolnikov z miomi maternice in primerjava z kontrolnimi vzorci

Gen	db SNP ID	Frekvence genotipov - kontrolni vzorci	Frekvence genotipov - GIN	Kontrolni vzorci vs. GIN genotipi 11	Kontrolni vzorci vs. GIN genotipi 22	Alelni frekvenci kontrolni vzorci	Alelni frekvenci GIN	Kontrolna skupina vs. GIN - aleli
LTA4H	rs2540487	n = 60 CC: 61,67% CT: 23,33% TT: 15%	n = 48 CC: 77,08% CT: 16,67% TT: 6,25%	CC in CT vs. TT $p = 0,150$ OR = 0,378 95% CI = 0,096 - 1,482	CC vs. CT in TT $p = 0,087$ OR = 0,478 95% CI = 0,204 - 1,112	C: 73,34% T: 26,66%	C: 85,42% T: 14,58%	$p = \mathbf{0,031}$ OR = 0,470 95% CI = 0,234 - 0,942

**7.4 Priloga 4**

Tabela 17 Rezultati asociacijske analize genotipa LTA4H bolnikov z astmo in primerjava z kontrolnimi vzorci

Gen	db SNP ID	Frekvence genotipov - kontrolni vzorci	Frekvence genotipov - AST	Kontrolni vzorci vs. AST genotipi 11	Kontrolni vzorci vs. AST genotipi 22	Alelni frekvenci kontrolni vzorci	Alelni frekvenci AST	Kontrolna skupina vs. AST - aleli
LTA4H	rs2540487	n = 60 CC: 61,67% CT: 23,33% TT: 15%	n = 37 CC: 70,27% CT: 16,22% TT: 13,51%	CC in CT vs. TT $p = 0,840$ OR = 0,885 95% CI = 0,272 - 2,879	CC vs. CT in TT $p = 0,388$ OR = 0,681 95% CI = 0,283 - 1,035	C: 73,34% T: 26,66%	C: 78,38% T: 21,62%	$p = 0,429$ OR = 0,759 95% CI = 0,382 - 1,506

## 7.5 Priloga 5

	P-vrednost: LTA4H in AST	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in AST (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in AST (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,8870	0,4012	0,4186	0,3755	0,6570	0,4045	0,3755	0,6660	0,4012	0,3990
C15:0	0,7530	0,2588	0,2778	0,2510	0,5640	0,2623	0,2510	0,9730	0,2588	0,2656
C16:0	0,9280	23,6586	23,1035	23,6057	0,9650	23,5545	23,6057	0,7400	23,6586	23,3318
NN1	0,3740	2,6185	2,1185	2,5475	0,7560	2,5248	2,5475	0,3700	2,6185	2,3135
C16:1	0,5460	0,3454	0,3544	0,3841	0,2860	0,3471	0,3841	0,3880	0,3454	0,3679
C17:0	0,7120	0,4722	0,4611	0,4378	0,4770	0,4701	0,4378	0,4450	0,4722	0,4505
C18:0	0,9850	21,4269	21,2908	21,2705	0,8940	21,4014	21,2705	0,8680	21,4269	21,2816
NN2	0,5420	4,4002	3,7073	4,1687	0,9290	4,2703	4,1687	0,3520	4,4002	3,9170
C18:1 (6+9+11)t	0,2300	0,6087	0,4363	0,5954	1,0000	0,5764	0,5954	0,1730	0,6087	0,5086
C18:1 (9c)	0,7680	17,3786	16,8766	17,9208	0,5640	17,2844	17,9208	1,0000	17,3786	17,3512
C18:1 (11c)	0,8690	1,2982	1,3074	1,3784	0,6250	1,2999	1,3784	0,8940	1,2982	1,3397
C18:2 (9,12)c	0,1330	10,1212	10,3151	10,7091	0,5940	10,1576	10,7091	0,0630	10,1212	10,4942
C20:0	0,5440	0,1793	0,1829	0,1637	0,3510	0,1800	0,1637	0,9210	0,1793	0,1742
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,4490	0,0973	0,0862	0,1201	0,4770	0,0952	0,1201	0,6900	0,0973	0,1016
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,3000	0,0433	0,0318	0,0573	0,2030	0,0412	0,0573	0,9460	0,0433	0,0434
C20:1 (11c)	0,5790	0,3399	0,3494	0,3657	0,3070	0,3417	0,3657	0,4250	0,3399	0,3568
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,9960	0,1572	0,1608	0,1619	0,9650	0,1578	0,1619	0,9730	0,1572	0,1613
C18:4	0,8140	0,1213	0,1317	0,0974	0,9640	0,1232	0,0974	0,5920	0,1213	0,1161
C20:2(11,14)c	0,6380	0,3396	0,3601	0,3441	0,8940	0,3434	0,3441	0,5060	0,3396	0,3528
C22:0	0,7520	0,1400	0,1369	0,1463	0,4500	0,1394	0,1463	0,6420	0,1400	0,1412
C20:3(8,11,14)c	0,7840	1,4565	1,6028	1,6401	0,6570	1,4839	1,6401	0,4850	1,4565	1,6197
C22:1(13c)	0,8990	0,0544	0,0583	0,0548	1,0000	0,0551	0,0548	0,7140	0,0544	0,0567
C20:4 (5,8,11,14)c	0,9390	12,8176	13,3309	12,0660	0,7220	12,9139	12,0660	0,8420	12,8176	12,7559
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,7060	0,2701	0,3021	0,2257	0,4240	0,2761	0,2257	0,7650	0,2701	0,2674
C24:0	0,2710	0,1571	0,1238	0,1667	0,3740	0,1509	0,1667	0,5950	0,1571	0,1433
C24:1 (15c)	0,4910	0,0883	0,0741	0,0961	0,3070	0,0856	0,0961	0,8940	0,0883	0,0841
C22:4 (7,10,13,16)c	0,9650	3,5279	3,6304	3,3989	0,7900	3,5471	3,3989	0,8680	3,5279	3,5252
C22:5n-6	0,9110	0,5502	0,5821	0,5869	0,7900	0,5562	0,5869	0,6660	0,5502	0,5843
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,9780	1,1826	1,1627	1,1697	1,0000	1,1789	1,1697	0,8680	1,1826	1,1659
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,6050	2,0828	2,6018	1,8357	0,6250	2,1801	1,8357	0,6900	2,0828	2,2536
sat	0,9730	46,6940	45,9955	46,4173	0,8940	46,5631	46,4173	0,8160	46,6940	46,1872
mono-unsat	0,8080	20,5384	19,7809	21,1699	0,6890	20,3963	21,1699	0,8680	20,5384	20,4123
poly-unsat	0,9270	32,7676	34,2984	32,4128	0,8590	33,0546	32,4128	0,8680	32,7676	33,4413
TRANS	0,1530	0,7060	0,5225	0,7155	0,7220	0,6716	0,7155	0,1950	0,7060	0,6102
m/s	0,6200	0,4420	0,4328	0,4631	0,6890	0,4403	0,4631	0,6420	0,4420	0,4466
m/p	0,8620	0,7242	0,7225	0,7391	0,7560	0,7239	0,7391	0,8680	0,7242	0,7301
n3	0,6660	3,8141	4,3591	3,4903	0,5640	3,9163	3,4903	0,8420	3,8141	3,9642
n6	0,8580	28,8563	29,8532	28,8024	0,9650	29,0432	28,8024	0,6420	28,8563	29,3755
n3/n6	0,2780	0,1245	0,1439	0,1098	0,3510	0,1282	0,1098	0,6420	0,1245	0,1284

## 7.6 Priloga 6

	P-vrednost: LTA4H in CON	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in CON (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in CON (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,3080	0,3931	0,4651	0,4014	0,6860	0,4014	0,4129	0,1420	0,3931	0,4402
C15:0	0,5650	0,2337	0,2598	0,2262	0,8600	0,2262	0,2409	0,4250	0,2337	0,2467
C16:0	0,5720	22,0838	25,3590	23,5412	0,5980	23,5412	22,9829	0,2910	22,0838	24,6477
NN1	0,6370	2,1889	1,9548	1,8455	0,4140	1,8455	2,1246	0,3990	2,1889	1,9121
C16:1	0,5690	0,3777	0,4405	0,3923	0,6860	0,3923	0,3949	0,5380	0,3777	0,4216
C17:0	0,2810	0,4300	0,4925	0,4195	0,7800	0,4195	0,4472	0,2390	0,4300	0,4639
C18:0	0,8520	19,6230	19,0451	18,8289	0,9590	18,8289	19,4643	0,6540	19,6230	18,9605
NN2	0,8140	3,5742	3,3170	3,0611	0,5280	3,0611	3,5036	0,6650	3,5742	3,2169
C18:1 (6+9+11)t	0,8090	0,5557	0,5189	0,5167	0,5690	0,5167	0,5456	0,5690	0,5557	0,5180
C18:1 (9c)	0,6610	16,2013	16,5984	15,1030	0,5010	15,1030	16,3103	0,8730	16,2013	16,0133
C18:1 (11c)	0,5640	1,2680	1,3880	1,2730	0,8770	1,2730	1,3009	0,4160	1,2680	1,3430
C18:2 (9,12)c	0,0710	10,2146	11,1305	12,1445	0,0390	12,1445	10,4661	0,0490	10,2146	11,5273
C20:0	0,8080	0,1665	0,1614	0,1571	0,5140	0,1571	0,1651	0,7210	0,1665	0,1597
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,5440	0,0819	0,0589	0,0672	0,6990	0,0672	0,0756	0,2800	0,0819	0,0621
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,1830	0,0467	0,0247	0,0391	0,9580	0,0391	0,0407	0,1120	0,0467	0,0303
C20:1 (11c)	0,6690	0,3245	0,3318	0,2965	0,3790	0,2965	0,3265	0,5380	0,3245	0,3180
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,9030	0,1719	0,1668	0,1786	0,6560	0,1786	0,1705	0,8610	0,1719	0,1714
C18:4	0,4140	0,0758	0,1195	0,0436	0,3040	0,0436	0,0878	0,8690	0,0758	0,0898
C20:2(11,14)c	0,3610	0,3645	0,3850	0,3661	0,9750	0,3661	0,3702	0,2210	0,3645	0,3776
C22:0	0,6690	0,1217	0,1342	0,1229	0,9090	0,1229	0,1251	0,4160	0,1217	0,1298
C20:3(8,11,14)c	0,3120	1,5309	1,5374	1,7908	0,1280	1,7908	1,5327	0,3580	1,5309	1,6366
C22:1(13c)	0,5560	0,0563	0,0465	0,0428	0,5050	0,0428	0,0536	0,2810	0,0563	0,0451
C20:4 (5,8,11,14)c	0,4950	15,6658	12,9681	14,8113	0,8280	14,8113	14,9253	0,2700	15,6658	13,6893
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,8980	0,3960	0,4851	0,3512	0,7960	0,3512	0,4204	0,6430	0,3960	0,4327
C24:0	0,1820	0,1241	0,1970	0,1347	0,8600	0,1347	0,1441	0,0990	0,1241	0,1726
C24:1 (15c)	0,2860	0,0700	0,1100	0,0605	0,7760	0,0605	0,0810	0,2430	0,0700	0,0906
C22:4 (7,10,13,16)c	0,1280	3,8489	2,5823	3,5154	0,9920	3,5154	3,5012	0,0870	3,8489	2,9474
C22:5n-6	0,3040	0,5817	0,4345	0,5278	0,9260	0,5278	0,5412	0,1760	0,5817	0,4710
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,6480	1,7761	1,5065	1,6299	0,7170	1,6299	1,7021	0,3580	1,7761	1,5548
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,9160	2,8786	2,6973	2,7006	0,9090	2,7006	2,8288	0,6870	2,8786	2,6986
sat	0,5670	43,1758	46,1142	43,8320	0,6560	43,8320	43,9825	0,2910	43,1758	45,2212
mono-unsat	0,5850	19,1907	19,7821	18,0019	0,5280	18,0019	19,3531	0,7210	19,1907	19,0855
poly-unsat	0,5200	37,6334	34,0965	38,1661	0,7800	38,1661	36,6625	0,2770	37,6334	35,6890
TRANS	0,5420	0,6376	0,5778	0,5838	0,5010	0,5838	0,6212	0,2700	0,6376	0,5801
m/s	0,1160	0,4446	0,4331	0,4135	0,0460	0,4135	0,4414	0,1230	0,4446	0,4255
m/p	0,4930	0,6115	0,7492	0,4899	0,8280	0,4899	0,6493	0,3820	0,6115	0,6477
n3	0,9140	5,2984	4,9752	4,9039	0,7800	4,9039	5,2097	0,6760	5,2984	4,9473
n6	0,3300	32,2531	29,0624	33,1951	0,9260	33,1951	31,3773	0,2270	32,2531	30,6795
n3/n6	0,8220	0,1574	0,1663	0,1436	0,5690	0,1436	0,1598	0,9330	0,1574	0,1574



## 7.7 Priloga 7

	P-vrednost: LTA4H in GIN	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in GIN (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in GIN (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,0320	0,4143	0,4274	0,6469	0,0100	0,4243	0,6469	0,0980	0,4238	0,4850
C15:0	0,0230	0,2615	0,2768	0,3747	0,0090	0,2680	0,3747	0,0510	0,2664	0,3029
C16:0	0,2130	25,1385	27,1203	29,9640	0,1540	25,5209	29,9640	0,1140	25,2162	28,1104
NN1	0,7380	1,9990	2,1196	2,1874	0,7820	2,0637	2,1874	0,4400	2,0531	2,1202
C16:1	0,4700	0,3897	0,3305	0,3307	0,4560	0,3742	0,3307	0,2250	0,3825	0,3468
C17:0	0,0300	0,4826	0,5345	0,6462	0,0230	0,4955	0,6462	0,0230	0,4880	0,5652
C18:0	0,1430	20,6009	21,2746	26,2210	0,0530	21,0079	26,2210	0,2150	20,9571	23,0515
NN2	0,8590	3,2718	3,3767	3,6478	0,9150	3,3854	3,6478	0,5980	3,3871	3,4468
C18:1 (6+9+11)t	0,0140	0,5032	0,5835	0,8568	0,0110	0,5315	0,8568	0,0130	0,5216	0,6530
C18:1 (9c)	0,0510	16,0405	16,7956	20,1366	0,0180	16,3575	20,1366	0,0980	16,2741	17,8186
C18:1 (11c)	0,2100	1,3513	1,3940	1,5044	0,1420	1,3684	1,5044	0,1190	1,3635	1,4471
C18:2 (9,12)c	0,1510	10,2855	11,8550	6,9358	0,0640	10,3292	6,9358	0,7220	10,0386	10,2349
C20:0	0,1170	0,1514	0,1768	0,2229	0,0850	0,1599	0,2229	0,0680	0,1567	0,1889
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,7830	0,0602	0,0677	0,0618	0,7960	0,0611	0,0618	0,4870	0,0598	0,0676
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,0460	0,0348	0,0609	0,0000	0,0900	0,0363	0,0000	0,4280	0,0316	0,0449
C20:1 (11c)	0,0400	0,2881	0,2947	0,4257	0,0110	0,2895	0,4257	0,1730	0,2885	0,3253
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,1760	0,1522	0,1757	0,2864	0,1660	0,1606	0,2864	0,0790	0,1577	0,1989
C18:4	0,0410	0,1781	0,2064	0,6520	0,0130	0,1939	0,6520	0,1270	0,1915	0,3228
C20:2(11,14)c	0,2530	0,3480	0,3497	0,2802	0,1010	0,3477	0,2802	0,3200	0,3473	0,3298
C22:0	0,0390	0,1221	0,1497	0,2010	0,0140	0,1256	0,2010	0,0750	0,1210	0,1617
C20:3(8,11,14)c	0,0740	1,5373	1,3986	0,7673	0,0250	1,4846	0,7673	0,1440	1,5010	1,1810
C22:1(13c)	0,7370	0,0491	0,0544	0,0259	0,4490	0,0505	0,0259	0,8520	0,0497	0,0428
C20:4 (5,8,11,14)c	0,0450	12,9313	9,8540	5,5851	0,0310	12,2275	5,5851	0,0340	12,6796	8,4566
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,5790	0,3755	0,3939	0,2379	0,3170	0,3828	0,2379	0,8350	0,3806	0,3301
C24:0	0,0160	0,1403	0,1713	0,3549	0,0060	0,1488	0,3549	0,0410	0,1445	0,2193
C24:1 (15c)	0,7550	0,0985	0,0833	0,1615	0,4570	0,1014	0,1615	0,6680	0,1049	0,1213
C22:4 (7,10,13,16)c	0,1360	3,0116	2,1804	1,1020	0,1010	2,8482	1,1020	0,0750	2,9755	1,8077
C22:5n-6	0,0030	0,6202	0,2834	0,1077	0,0240	0,5405	0,1077	0,0010	0,5894	0,2260
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,1010	1,3745	1,0681	0,5210	0,0430	1,2936	0,5210	0,1140	1,3366	0,8743
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,0780	2,7393	2,0453	0,9937	0,0310	2,5407	0,9937	0,1030	2,6351	1,6953
sat	0,0730	47,3117	50,1314	58,6316	0,0430	48,1509	58,6316	0,0570	47,7736	53,0850
mono-unsat	0,0460	19,0399	19,9296	23,8376	0,0180	19,4025	23,8376	0,0750	19,3020	21,1450
poly-unsat	0,0660	33,6484	29,9390	17,5308	0,0350	32,4467	17,5308	0,0610	32,9243	25,7700
TRANS	0,0160	0,5633	0,6512	0,9186	0,0110	0,5926	0,9186	0,0160	0,5814	0,7206
m/s	0,9360	0,4058	0,3979	0,4072	0,9830	0,4053	0,4072	0,7410	0,4067	0,3987
m/p	0,0700	0,6889	0,8489	1,3853	0,0350	0,7368	1,3853	0,0680	0,7155	1,0231
n3	0,3740	4,8196	3,8894	2,6910	0,1800	4,5716	2,6910	0,3200	4,7016	3,4214
n6	0,0750	28,7686	25,9819	14,7780	0,0310	27,8140	14,7780	0,0930	28,1629	22,2810
n3/n6	0,7330	0,1662	0,1600	0,1910	0,4310	0,1641	0,1910	0,7220	0,1648	0,1647

## 7.8 Priloga 8

	P-vrednost: LTA4H in KVČB	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in KVČB (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in KVČB (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,0890	0,3710	0,3394	0,4417	0,0550	0,3649	0,4417	0,4900	0,3710	0,4086
C15:0	0,4550	0,2482	0,2399	0,2827	0,2240	0,2466	0,2827	0,4900	0,2482	0,2688
C16:0	0,1240	25,0949	22,4667	26,5386	0,1820	24,5877	26,5386	0,9530	25,0949	25,2212
NN1	0,7570	2,2303	2,3031	2,0896	0,5060	2,2443	2,0896	0,7930	2,2303	2,1587
C16:1	0,5360	0,3956	0,3343	0,3973	0,4470	0,3837	0,3973	0,9920	0,3956	0,3769
C17:0	0,3450	0,4629	0,4278	0,4986	0,2360	0,4561	0,4986	0,7630	0,4629	0,4757
C18:0	0,2470	20,1934	18,3432	20,4130	0,5200	19,8363	20,4130	0,5720	20,1934	19,7434
NN2	0,7670	3,6198	3,8813	3,3938	0,6670	3,6702	3,3938	0,9380	3,6198	3,5515
C18:1 (6+9+11)t	0,2160	0,6544	0,5687	0,6901	0,3520	0,6378	0,6901	0,7550	0,6544	0,6509
C18:1 (9c)	0,1440	17,7763	16,6168	18,5519	0,1100	17,5525	18,5519	0,6830	17,7763	17,9258
C18:1 (11c)	0,0280	1,4532	1,2415	1,3822	0,8770	1,4124	1,3822	0,0550	1,4532	1,3367
C18:2 (9,12)c	0,4540	9,9143	10,0382	9,1011	0,2200	9,9382	9,1011	0,2760	9,9143	9,4043
C20:0	0,6340	0,1714	0,1616	0,1606	0,4600	0,1695	0,1606	0,3400	0,1714	0,1609
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,8460	0,0781	0,0837	0,0805	0,5750	0,0792	0,0805	0,7500	0,0781	0,0816
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,0530	0,0387	0,0720	0,0393	0,4960	0,0451	0,0393	0,2860	0,0387	0,0499
C20:1 (11c)	0,0170	0,3461	0,2765	0,3328	0,9360	0,3327	0,3328	0,0470	0,3461	0,3146
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,5000	0,1528	0,1876	0,1567	0,8860	0,1595	0,1567	0,4960	0,1528	0,1667
C18:4	0,0270	0,1644	0,0951	0,2513	0,0290	0,1510	0,2513	0,5720	0,1644	0,2007
C20:2(11,14)c	0,2870	0,3573	0,3228	0,3385	0,4860	0,3506	0,3385	0,1420	0,3573	0,3334
C22:0	0,0460	0,1461	0,1229	0,1230	0,2360	0,1416	0,1230	0,0190	0,1461	0,1230
C20:3(8,11,14)c	0,2730	1,4669	1,6379	1,3467	0,2530	1,4999	1,3467	0,9380	1,4669	1,4409
C22:1(13c)	0,1920	0,0501	0,0564	0,0337	0,0850	0,0513	0,0337	0,3750	0,0501	0,0411
C20:4 (5,8,11,14)c	0,1460	12,1842	15,4548	11,3009	0,2900	12,8153	11,3009	0,7410	12,1842	12,6448
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,2540	0,3432	0,4762	0,3397	0,5340	0,3689	0,3397	0,5660	0,3432	0,3838
C24:0	0,0510	0,1644	0,1032	0,1600	0,2420	0,1526	0,1600	0,5630	0,1644	0,1416
C24:1 (15c)	0,1460	0,1187	0,0644	0,1378	0,2610	0,1082	0,1378	0,8000	0,1187	0,1140
C22:4 (7,10,13,16)c	0,1210	3,1669	3,8936	2,7135	0,1170	3,3071	2,7135	0,7930	3,1669	3,0953
C22:5n-6	0,1950	0,4783	0,6053	0,4260	0,1930	0,5028	0,4260	0,9070	0,4783	0,4840
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,2160	1,4011	1,9013	1,3643	0,4730	1,4976	1,3643	0,5860	1,4011	1,5380
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,0390	2,2154	3,4969	1,9328	0,0720	2,4627	1,9328	0,9070	2,2154	2,4389
sat	0,1110	46,8524	42,2047	48,6181	0,2040	45,9555	48,6181	0,8530	46,8524	46,5432
mono-unsat	0,1070	21,1861	19,5300	21,9905	0,1120	20,8665	21,9905	0,8150	21,1861	21,1945
poly-unsat	0,0780	31,9615	38,2653	29,3913	0,1190	33,1781	29,3913	0,9610	31,9615	32,2623
TRANS	0,2300	0,7325	0,6525	0,7706	0,3520	0,7170	0,7706	0,7780	0,7325	0,7324
m/s	0,8030	0,4569	0,4649	0,4582	0,9700	0,4584	0,4582	0,6760	0,4569	0,4604
m/p	0,0650	0,8093	0,5906	0,9627	0,0920	0,7671	0,9627	0,8760	0,8093	0,8423
n3	0,0980	4,2768	6,1571	4,0448	0,2950	4,6397	4,0448	0,6200	4,2768	4,7282
n6	0,1280	27,6066	32,0245	25,2660	0,1470	28,4591	25,2660	0,9070	27,6066	27,4526
n3/n6	0,3460	0,1460	0,1828	0,1553	0,7700	0,1531	0,1553	0,2390	0,1460	0,1642

## 7.9 Priloga 9

	P-vrednost: LTA4H in POL	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in POL (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in POL (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,7360	0,6219	0,5047	0,5291	0,5270	0,6024	0,5291	0,4350	0,6219	0,5221
C15:0	0,6700	0,3368	0,2730	0,3201	0,8330	0,3261	0,3201	0,6960	0,3368	0,3066
C16:0	0,5030	31,6638	32,8864	29,8960	0,2920	31,8676	29,8960	0,6260	31,6638	30,7504
NN1	0,6780	1,7647	1,5162	1,9095	0,5270	1,7233	1,9095	0,9220	1,7647	1,7971
C16:1	0,9880	0,5214	0,5584	0,5379	1,0000	0,5276	0,5379	0,9220	0,5214	0,5438
C17:0	0,8370	0,6486	0,6030	0,5852	0,5980	0,6410	0,5852	0,5580	0,6486	0,5903
C18:0	0,9770	25,4245	25,7087	24,9018	0,8330	25,4719	24,9018	0,8450	25,4245	25,1324
NN2	0,7500	2,9832	2,5169	3,1756	0,7520	2,9055	3,1756	0,8450	2,9832	2,9874
C18:1 (6+9+11)t	0,2220	0,8595	0,7342	0,6603	0,0920	0,8386	0,6603	0,1180	0,8595	0,6814
C18:1 (9c)	0,4540	20,5333	22,8343	20,4543	0,9160	20,9168	20,4543	0,3800	20,5333	21,1343
C18:1 (11c)	0,3280	1,6580	1,8399	1,7366	0,6730	1,6883	1,7366	0,5580	1,6580	1,7661
C18:2 (9,12)c	0,3290	6,9736	5,6743	7,2205	0,7520	6,7571	7,2205	0,4950	6,9736	6,7787
C20:0	0,5420	0,1873	0,1636	0,1909	0,3990	0,1834	0,1909	0,8450	0,1873	0,1831
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,2880	0,0329	0,0780	0,1284	0,1640	0,0404	0,1284	0,1220	0,0329	0,1140
C18:3 (6,9,12)c GLA	1,0000	0,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000	1,0000	0,0000	0,0000
C20:1 (11c)	0,6100	0,3702	0,3921	0,3599	0,5270	0,3739	0,3599	1,0000	0,3702	0,3691
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,3360	0,1422	0,1375	0,0871	0,1400	0,1414	0,0871	0,2410	0,1422	0,1015
C18:4	0,8240	0,4180	0,5669	0,3619	0,5980	0,4428	0,3619	0,8450	0,4180	0,4205
C20:2(11,14)c	0,9770	0,3888	0,3718	0,3739	0,8330	0,3860	0,3739	0,8450	0,3888	0,3733
C22:0	0,9000	0,1807	0,1945	0,1765	1,0000	0,1830	0,1765	0,7700	0,1807	0,1816
C20:3(8,11,14)c	0,2010	0,7993	0,5626	1,0845	0,1140	0,7598	1,0845	0,4950	0,7993	0,9354
C22:1(13c)	0,8650	0,0461	0,0552	0,0475	0,9090	0,0476	0,0475	0,6730	0,0461	0,0497
C20:4 (5,8,11,14)c	0,3730	4,8888	3,2530	6,4280	0,2460	4,6162	6,4280	0,6960	4,8888	5,5209
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,6660	0,2924	0,4012	0,3070	0,9160	0,3106	0,3070	0,6260	0,2924	0,3339
C24:0	0,7610	0,2963	0,3095	0,2693	0,4610	0,2985	0,2693	0,5580	0,2963	0,2808
C24:1 (15c)	0,5920	0,2208	0,3168	0,1623	0,3430	0,2368	0,1623	0,6260	0,2208	0,2064
C22:4 (7,10,13,16)c	0,3720	1,0929	0,6415	1,3563	0,2060	1,0177	1,3563	0,5580	1,0929	1,1521
C22:5n-6	0,2170	0,1296	0,0617	0,2241	0,1090	0,1183	0,2241	0,4290	0,1296	0,1777
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,3550	0,3601	0,2691	0,5704	0,1700	0,3449	0,5704	0,4350	0,3601	0,4843
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,4160	0,5512	0,2704	0,7513	0,2460	0,5044	0,7513	0,6260	0,5512	0,6139
sat	0,5020	59,3599	60,6433	56,8689	0,2460	59,5738	56,8689	0,4350	59,3599	57,9473
mono-unsat	0,4760	24,5702	27,0686	24,2376	0,5980	24,9866	24,2376	0,7700	24,5702	25,0465
poly-unsat	0,4800	16,0699	12,2880	18,8935	0,3990	15,4396	18,8935	0,9220	16,0699	17,0062
TRANS	0,7550	0,8924	0,8122	0,7887	0,4610	0,8791	0,7887	0,6260	0,8924	0,7955
m/s	0,9260	0,4148	0,4498	0,4250	0,7520	0,4206	0,4250	0,6960	0,4148	0,4321
m/p	0,4400	1,7612	2,2133	1,5557	0,4610	1,8365	1,5557	0,9220	1,7612	1,7436
n3	0,5550	1,7639	1,6451	2,0776	0,2920	1,7441	2,0776	0,3290	1,7639	1,9540
n6	0,4800	14,2731	10,5649	16,6874	0,3990	13,6551	16,6874	0,9220	14,2731	14,9381
n3/n6	0,6660	0,1268	0,1607	0,1272	0,9160	0,1325	0,1272	0,6260	0,1268	0,1368

## 7.10 Priloga 10

	P-vrednost: PTGS2 in CON	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: PTGS2 in CON (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: PTGS2 in CON (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,2920	0,4234	0,3950	0,2781	0,1300	0,4173	0,2781	0,3790	0,4234	0,3794
C15:0	0,3490	0,2463	0,2462	0,1628	0,1510	0,2463	0,1628	0,7990	0,2463	0,2350
C16:0	0,3920	23,4573	24,1626	18,3984	0,1760	23,6101	18,3984	0,7990	23,4573	23,3941
NN1	0,3650	2,0287	2,0120	2,7856	0,1630	2,0251	2,7856	0,4850	2,0287	2,1151
C16:1	0,1710	0,3950	0,4396	0,2422	0,0800	0,4047	0,2422	0,9410	0,3950	0,4133
C17:0	0,7960	0,4558	0,4247	0,3689	0,5240	0,4490	0,3689	0,6750	0,4558	0,4173
C18:0	0,0690	19,3837	17,4625	18,3409	0,7200	18,9675	18,3409	0,0230	19,3837	17,5796
NN2	0,3180	3,8907	3,3065	5,2662	0,1300	3,7641	5,2662	0,6510	3,8907	3,5678
C18:1 (6+9+11)t	0,1810	0,5564	0,5022	0,3556	0,0670	0,5446	0,3556	0,4060	0,5564	0,4826
C18:1 (9c)	0,7030	16,3558	15,8625	14,4497	0,4030	16,2489	14,4497	0,8370	16,3558	15,6741
C18:1 (11c)	0,5680	1,3153	1,3309	1,1573	0,3810	1,3187	1,1573	0,7740	1,3153	1,3078
C18:2 (9,12)c	0,7010	10,4414	12,3254	10,7905	0,4030	10,8496	10,7905	0,7120	10,4414	12,1207
C20:0	0,1440	0,1602	0,1539	0,2097	0,0730	0,1588	0,2097	0,8500	0,1602	0,1614
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,7190	0,0723	0,0785	0,0996	0,4440	0,0736	0,0996	0,6120	0,0723	0,0813
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,7580	0,0376	0,0452	0,0550	0,6810	0,0393	0,0550	0,4720	0,0376	0,0465
C20:1 (11c)	0,5960	0,3234	0,3007	0,3457	0,3590	0,3185	0,3457	0,9020	0,3234	0,3067
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,7000	0,1676	0,1549	0,1793	0,6900	0,1649	0,1793	0,5650	0,1676	0,1582
C18:4	0,6250	0,0938	0,0448	0,0284	0,4950	0,0831	0,0284	0,3840	0,0938	0,0426
C20:2(11,14)c	0,7480	0,3695	0,3684	0,3413	0,4490	0,3693	0,3413	0,8760	0,3695	0,3648
C22:0	0,9410	0,1231	0,1214	0,1272	0,7800	0,1228	0,1272	0,9150	0,1231	0,1222
C20:3(8,11,14)c	0,3170	1,5101	1,8095	1,3586	0,5500	1,5749	1,3586	0,2600	1,5101	1,7494
C22:1(13c)	0,7650	0,0487	0,0543	0,0584	0,9360	0,0499	0,0584	0,5070	0,0487	0,0548
C20:4 (5,8,11,14)c	0,3180	14,6613	14,6139	20,6192	0,1300	14,6510	20,6192	0,6510	14,6613	15,4146
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,8720	0,4095	0,3903	0,4422	0,6050	0,4053	0,4422	0,9280	0,4095	0,3972
C24:0	0,3570	0,1485	0,1406	0,0843	0,1510	0,1468	0,0843	0,6630	0,1485	0,1331
C24:1 (15c)	0,2210	0,0796	0,0797	0,0000	0,0890	0,0796	0,0000	0,8280	0,0796	0,0691
C22:4 (7,10,13,16)c	0,5290	3,4989	3,2651	4,8038	0,2820	3,4483	4,8038	0,9800	3,4989	3,4703
C22:5n-6	0,5790	0,5316	0,5137	0,7270	0,3390	0,5277	0,7270	0,9280	0,5316	0,5421
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,6840	1,6720	1,6127	2,2041	0,4730	1,6591	2,2041	0,8120	1,6720	1,6915
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,8130	2,7172	2,7383	3,5262	0,5770	2,7217	3,5262	0,9020	2,7172	2,8434
sat	0,4590	44,3984	43,1069	37,9703	0,2170	44,1186	37,9703	0,5710	44,3984	42,4221
mono-unsat	0,5800	19,4168	18,9324	16,8545	0,3190	19,3119	16,8545	0,9800	19,4168	18,6554
poly-unsat	0,4190	36,1827	37,9606	45,1752	0,1890	36,5679	45,1752	0,7490	36,1827	38,9226
TRANS	0,3270	0,6286	0,5807	0,4552	0,1400	0,6183	0,4552	0,4750	0,6286	0,5639
m/s	0,4660	0,4401	0,4436	0,4433	0,8110	0,4409	0,4433	0,2210	0,4401	0,4436
m/p	0,4910	0,6696	0,5348	0,3778	0,2480	0,6404	0,3778	0,9280	0,6696	0,5139
n3	0,6400	5,0600	4,9409	6,3803	0,4260	5,0342	6,3803	0,8240	5,0600	5,1329
n6	0,3770	31,0504	32,9412	38,6952	0,1630	31,4601	38,6952	0,5930	31,0504	33,7084
n3/n6	0,8690	0,1567	0,1456	0,1639	0,8110	0,1543	0,1639	0,7120	0,1567	0,1481

## 7.11 Priloga 11

	P-vrednost: PTGS2 in KVČB	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: PTGS2 in KVČB (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: PTGS2 in KVČB (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,7980	0,4017	0,4306	0,3944	0,9590	0,4074	0,3944	0,5200	0,4246	0,4017
C15:0	0,9470	0,2660	0,2872	0,2570	0,9390	0,2702	0,2570	0,7430	0,2822	0,2660
C16:0	0,9090	25,6748	25,4603	26,8906	0,6820	25,6325	26,8906	0,7700	25,6986	25,6748
NN1	0,2370	2,1537	1,7458	1,7188	0,4730	2,0732	1,7188	0,0900	1,7413	2,1537
C16:1	0,6680	0,3977	0,4069	0,3713	0,9590	0,3995	0,3713	0,3940	0,4010	0,3977
C17:0	0,9290	0,4750	0,4908	0,4943	0,7200	0,4781	0,4943	0,7970	0,4914	0,4750
C18:0	0,4830	19,7902	20,5776	21,5060	0,3970	19,9456	21,5060	0,2670	20,7324	19,7902
NN2	0,1600	3,5770	2,6837	3,0073	0,6630	3,4007	3,0073	0,0580	2,7376	3,5770
C18:1 (6+9+11)t	0,4070	0,6625	0,6872	0,5101	0,2090	0,6674	0,5101	0,9810	0,6577	0,6625
C18:1 (9c)	0,6480	17,9318	18,6672	17,8088	0,8370	18,0770	17,8088	0,4400	18,5241	17,9318
C18:1 (11c)	0,7550	1,4206	1,4462	1,3781	0,9390	1,4256	1,3781	0,5050	1,4349	1,4206
C18:2 (9,12)c	0,4710	9,4667	10,2388	9,5733	0,9590	9,6191	9,5733	0,2620	10,1279	9,4667
C20:0	0,7220	0,1630	0,1678	0,1429	0,4730	0,1639	0,1429	0,9350	0,1636	0,1630
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,6850	0,0734	0,0667	0,0874	0,6050	0,0721	0,0874	0,6450	0,0702	0,0734
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,7470	0,0424	0,0421	0,0219	0,4480	0,0424	0,0219	0,7200	0,0388	0,0424
C20:1 (11c)	0,4540	0,3321	0,3427	0,2963	0,2930	0,3342	0,2963	0,7970	0,3350	0,3321
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,0080	0,1441	0,2026	0,1214	0,1990	0,1556	0,1214	0,0300	0,1890	0,1441
C18:4	0,8350	0,1857	0,1501	0,2200	0,6440	0,1787	0,2200	0,8520	0,1617	0,1857
C20:2(11,14)c	0,1350	0,3441	0,3901	0,3577	0,8370	0,3532	0,3577	0,0540	0,3847	0,3441
C22:0	0,3180	0,1376	0,1311	0,1158	0,1300	0,1364	0,1158	0,5470	0,1286	0,1376
C20:3(8,11,14)c	0,9210	1,4311	1,3995	1,3365	0,7780	1,4249	1,3365	0,7080	1,3890	1,4311
C22:1(13c)	0,1070	0,0412	0,0682	0,0362	0,7250	0,0465	0,0362	0,0700	0,0628	0,0412
C20:4 (5,8,11,14)c	0,7570	12,3876	10,8391	10,9874	0,8780	12,0820	10,9874	0,4620	10,8638	12,3876
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,6810	0,3668	0,3079	0,3298	0,5730	0,3552	0,3298	0,4070	0,3116	0,3668
C24:0	0,7440	0,1635	0,1598	0,1759	0,4420	0,1628	0,1759	0,7700	0,1625	0,1635
C24:1 (15c)	0,3390	0,1222	0,0951	0,1935	0,1900	0,1169	0,1935	0,8880	0,1115	0,1222
C22:4 (7,10,13,16)c	0,5050	3,0935	2,7017	2,2654	0,3560	3,0162	2,2654	0,3150	2,6290	3,0935
C22:5n-6	0,9150	0,4797	0,4162	0,4061	0,8980	0,4672	0,4061	0,7430	0,4145	0,4797
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,8120	1,4637	1,2629	1,1641	0,7200	1,4241	1,1641	0,5280	1,2464	1,4637
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,9690	2,1352	2,0934	2,2642	0,8980	2,1269	2,2642	0,8060	2,1218	2,1352
sat	0,7040	47,0718	47,7053	49,9769	0,5900	47,1968	49,9769	0,4270	48,0839	47,0718
mono-unsat	0,6210	21,3142	22,1836	20,8878	0,6440	21,4858	20,8878	0,5280	21,9677	21,3142
poly-unsat	0,8010	31,6140	30,1111	29,1353	0,8170	31,3174	29,1353	0,5050	29,9485	31,6140
TRANS	0,4380	0,7359	0,7539	0,5974	0,2090	0,7395	0,5974	0,8330	0,7278	0,7359
m/s	0,2230	0,4585	0,4678	0,4205	0,0950	0,4603	0,4205	0,8610	0,4599	0,4585
m/p	0,7810	0,8808	0,8822	0,8681	0,8370	0,8811	0,8681	0,4830	0,8798	0,8808
n3	0,9830	4,2954	4,0168	4,0995	0,9390	4,2405	4,0995	0,8520	4,0306	4,2954
n6	0,7020	27,2452	26,0276	24,9484	0,6630	27,0049	24,9484	0,4070	25,8477	27,2452
n3/n6	0,8910	0,1492	0,1465	0,1489	0,6440	0,1486	0,1489	0,7700	0,1469	0,1492

## 7.12 Priloga 12

	P-vrednost: LTA4H in bolniki	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in bolniki (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in bolniki (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,1270	0,4122	0,3953	0,4618	0,0500	0,4091	0,4618	0,3390	0,4122	0,4333
C15:0	0,3070	0,2621	0,2617	0,2911	0,1240	0,2620	0,2911	0,2990	0,2621	0,2785
C16:0	0,2660	25,3466	24,7589	26,8830	0,1210	25,2380	26,8830	0,4860	25,3466	25,9727
NN1	0,9630	2,2041	2,1494	2,1363	0,7910	2,1940	2,1363	0,8160	2,2041	2,1419
C16:1	0,3610	0,3934	0,3543	0,4094	0,2630	0,3861	0,4094	0,9070	0,3934	0,3858
C17:0	0,4830	0,4867	0,4798	0,5145	0,2370	0,4854	0,5145	0,5260	0,4867	0,4996
C18:0	0,4750	21,0292	20,4124	21,6396	0,3190	20,9151	21,6396	0,8700	21,0292	21,1136
NN2	0,9520	3,6286	3,5920	3,4923	0,7610	3,6218	3,4923	0,8790	3,6286	3,5350
C18:1 (6+9+11)t	0,0520	0,6146	0,5559	0,6867	0,0300	0,6038	0,6867	0,4970	0,6146	0,6307
C18:1 (9c)	0,0170	17,3814	17,1881	18,8605	0,0050	17,3456	18,8605	0,0800	17,3814	18,1438
C18:1 (11c)	0,3390	1,4049	1,3456	1,4411	0,4230	1,3939	1,4411	0,7240	1,4049	1,4002
C18:2 (9,12)c	0,3050	9,8278	10,3148	8,8828	0,1610	9,9179	8,8828	0,6250	9,8278	9,4965
C20:0	0,9190	0,1683	0,1710	0,1704	0,9860	0,1688	0,1704	0,7550	0,1683	0,1707
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,3150	0,0729	0,0791	0,0911	0,1370	0,0741	0,0911	0,2140	0,0729	0,0860
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,0510	0,0353	0,0545	0,0330	0,3940	0,0388	0,0330	0,2770	0,0353	0,0422
C20:1 (11c)	0,1540	0,3287	0,3066	0,3489	0,0920	0,3246	0,3489	0,6480	0,3287	0,3308
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,3330	0,1527	0,1744	0,1586	0,8130	0,1567	0,1586	0,3640	0,1527	0,1654
C18:4	0,0150	0,1805	0,1711	0,2787	0,0060	0,1788	0,2787	0,2120	0,1805	0,2326
C20:2(11,14)c	0,4490	0,3532	0,3427	0,3393	0,3490	0,3512	0,3393	0,2070	0,3532	0,3407
C22:0	0,5860	0,1402	0,1393	0,1402	0,5180	0,1401	0,1402	0,8810	0,1402	0,1398
C20:3(8,11,14)c	0,3500	1,4304	1,4795	1,3027	0,2000	1,4395	1,3027	0,7020	1,4304	1,3785
C22:1(13c)	0,1860	0,0504	0,0562	0,0379	0,0920	0,0514	0,0379	0,5320	0,0504	0,0457
C20:4 (5,8,11,14)c	0,2170	11,9418	12,4195	10,2541	0,0830	12,0301	10,2541	0,3080	11,9418	11,1821
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,1610	0,3330	0,4076	0,3108	0,3210	0,3468	0,3108	0,6060	0,3330	0,3523
C24:0	0,0230	0,1664	0,1433	0,1923	0,0280	0,1621	0,1923	0,7610	0,1664	0,1713
C24:1 (15c)	0,0680	0,1143	0,0908	0,1374	0,0500	0,1100	0,1374	0,6620	0,1143	0,1174
C22:4 (7,10,13,16)c	0,2190	3,0232	3,0866	2,4859	0,0820	3,0349	2,4859	0,2530	3,0232	2,7434
C22:5n-6	0,1370	0,5088	0,4645	0,3938	0,0630	0,5006	0,3938	0,0730	0,5088	0,4241
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,5610	1,2576	1,3694	1,1567	0,3240	1,2783	1,1567	0,7190	1,2576	1,2479
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,0530	2,2095	2,6289	1,6770	0,0240	2,2870	1,6770	0,3740	2,2095	2,0850
sat	0,2470	48,0116	46,7616	50,2929	0,1230	47,7805	50,2929	0,5590	48,0116	48,7795
mono-unsat	0,0210	20,6617	20,2625	22,3426	0,0060	20,5878	22,3426	0,1360	20,6617	21,4511
poly-unsat	0,1100	31,3267	32,9925	27,3646	0,0430	31,6348	27,3646	0,3240	31,3267	29,7765
TRANS	0,0400	0,6875	0,6351	0,7778	0,0190	0,6778	0,7778	0,3660	0,6875	0,7166
m/s	0,3890	0,4342	0,4368	0,4500	0,1810	0,4347	0,4500	0,2540	0,4342	0,4444
m/p	0,0440	0,8333	0,8167	1,0492	0,0150	0,8302	1,0492	0,2030	0,8333	0,9495
n3	0,1700	4,1333	4,7514	3,5817	0,1200	4,2476	3,5817	0,7750	4,1333	4,0830
n6	0,1030	27,1204	28,1620	23,6917	0,0380	27,3131	23,6917	0,2850	27,1204	25,6075
n3/n6	0,2380	0,1460	0,1657	0,1481	0,8540	0,1496	0,1481	0,1750	0,1460	0,1556

## 7.13 Priloga 13

	P-vrednost: PTGS2 in bolniki	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: PTGS2 in bolniki (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: PTGS2 in bolniki (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,8300	0,4297	0,4374	0,3944	0,8320	0,4311	0,3944	0,6420	0,4313	0,4297
C15:0	0,9350	0,2762	0,2810	0,2570	0,8320	0,2770	0,2570	0,7240	0,2776	0,2762
C16:0	0,9680	26,1858	25,6642	26,8906	0,8170	26,0937	26,8906	0,9810	25,8394	26,1858
NN1	0,4060	2,1418	1,8748	1,7188	0,4420	2,0947	1,7188	0,1940	1,8525	2,1418
C16:1	0,5350	0,4189	0,4008	0,3713	0,8630	0,4157	0,3713	0,2720	0,3966	0,4189
C17:0	0,8320	0,4999	0,4856	0,4943	0,9230	0,4974	0,4943	0,5970	0,4868	0,4999
C18:0	0,8980	20,7560	20,8203	21,5060	0,6440	20,7674	21,5060	0,8350	20,9183	20,7560
NN2	0,3060	3,5687	2,9309	3,0073	0,6310	3,4562	3,0073	0,1240	2,9418	3,5687
C18:1 (6+9+11)t	0,3420	0,6756	0,6902	0,5101	0,1660	0,6782	0,5101	0,9810	0,6645	0,6756
C18:1 (9c)	0,9440	18,3307	18,4137	17,8088	0,7580	18,3453	17,8088	0,9740	18,3273	18,3307
C18:1 (11c)	0,9250	1,4613	1,4489	1,3781	0,8030	1,4591	1,3781	0,8410	1,4388	1,4613
C18:2 (9,12)c	0,2380	9,1443	10,0570	9,5733	0,8630	9,3053	9,5733	0,1010	9,9879	9,1443
C20:0	0,5700	0,1709	0,1711	0,1429	0,2990	0,1709	0,1429	0,5800	0,1670	0,1709
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,6670	0,0758	0,0662	0,0874	0,6140	0,0741	0,0874	0,5990	0,0692	0,0758
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,8350	0,0335	0,0379	0,0219	0,6580	0,0343	0,0219	0,8190	0,0356	0,0335
C20:1 (11c)	0,4190	0,3402	0,3416	0,2963	0,1910	0,3405	0,2963	0,7730	0,3351	0,3402
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,0030	0,1414	0,1969	0,1214	0,2040	0,1512	0,1214	0,0110	0,1862	0,1414
C18:4	0,8900	0,1966	0,1871	0,2200	0,6720	0,1949	0,2200	0,9420	0,1918	0,1966
C20:2(11,14)c	0,4030	0,3575	0,3848	0,3577	1,0000	0,3623	0,3577	0,2060	0,3809	0,3575
C22:0	0,1870	0,1474	0,1356	0,1158	0,0770	0,1453	0,1158	0,2960	0,1328	0,1474
C20:3(8,11,14)c	0,9680	1,3558	1,3940	1,3365	0,9390	1,3625	1,3365	0,8410	1,3858	1,3558
C22:1(13c)	0,5860	0,0470	0,0605	0,0362	0,5650	0,0494	0,0362	0,5420	0,0570	0,0470
C20:4 (5,8,11,14)c	0,9590	11,4382	10,8684	10,9874	0,9080	11,3376	10,9874	0,8350	10,8854	11,4382
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,7230	0,3534	0,3029	0,3298	0,5770	0,3445	0,3298	0,4610	0,3067	0,3534
C24:0	0,8820	0,1770	0,1736	0,1759	0,6440	0,1764	0,1759	0,9810	0,1740	0,1770
C24:1 (15c)	0,3690	0,1260	0,1173	0,1935	0,2030	0,1245	0,1935	0,8880	0,1282	0,1260
C22:4 (7,10,13,16)c	0,7790	2,8865	2,7266	2,2654	0,5010	2,8583	2,2654	0,6650	2,6608	2,8865
C22:5n-6	0,9590	0,4387	0,4192	0,4061	0,7880	0,4353	0,4061	0,8510	0,4173	0,4387
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,9710	1,2654	1,2196	1,1641	0,9540	1,2573	1,1641	0,8410	1,2117	1,2654
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,6660	1,8810	2,0366	2,2642	0,7000	1,9085	2,2642	0,3700	2,0691	1,8810
sat	0,9640	48,6430	48,1688	49,9769	0,7880	48,5593	49,9769	0,9430	48,4271	48,6430
mono-unsat	0,8300	21,7889	21,9340	20,8878	0,5640	21,8146	20,8878	0,9940	21,7846	21,7889
poly-unsat	0,9990	29,5680	29,8971	29,1353	0,9690	29,6261	29,1353	0,9940	29,7883	29,5680
TRANS	0,3790	0,7514	0,7564	0,5974	0,1720	0,7523	0,5974	0,8350	0,7337	0,7514
m/s	0,3710	0,4530	0,4590	0,4205	0,1660	0,4541	0,4205	0,8160	0,4535	0,4530
m/p	0,9940	0,9945	0,9183	0,8681	0,9230	0,9810	0,8681	0,9810	0,9112	0,9945
n3	0,8380	3,8378	3,9431	4,0995	0,8780	3,8564	4,0995	0,5530	3,9655	3,8378
n6	0,9800	25,6544	25,8878	24,9484	0,8780	25,6956	24,9484	0,8600	25,7536	25,6544
n3/n6	0,7070	0,1421	0,1478	0,1489	0,6720	0,1431	0,1489	0,5970	0,1480	0,1421

## 7.14 Priloga 14

	P-vrednost: PTGS2 in vsi vzorci	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: PTGS2 in vsi vzorci (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: PTGS2 in vsi vzorci (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,52	0,4275	0,4196	0,3479	0,26	0,4261	0,3479	0,843	0,4275	0,4094
C15:0	0,566	0,2655	0,2664	0,2193	0,289	0,2656	0,2193	0,643	0,2655	0,2597
C16:0	0,82	25,2069	25,0345	23,4937	0,535	25,1765	23,4937	0,916	25,2069	24,8144
NN1	0,689	2,1012	1,9323	2,1455	0,764	2,0714	2,1455	0,508	2,1012	1,9628
C16:1	0,438	0,4103	0,4171	0,3196	0,222	0,4115	0,3196	0,432	0,4103	0,4032
C17:0	0,639	0,4841	0,4601	0,4442	0,771	0,4799	0,4442	0,344	0,4841	0,4578
C18:0	0,431	20,2637	19,4122	20,2399	0,948	20,1134	20,2399	0,231	20,2637	19,5305
NN2	0,469	3,6842	3,0884	3,9108	0,511	3,5791	3,9108	0,448	3,6842	3,2059
C18:1 (6+9+11)t	0,14	0,6328	0,6113	0,4483	0,049	0,6290	0,4483	0,388	0,6328	0,5880
C18:1 (9c)	0,754	17,6221	17,3438	16,4652	0,475	17,5730	16,4652	0,646	17,6221	17,2183
C18:1 (11c)	0,659	1,4089	1,3994	1,2898	0,409	1,4072	1,2898	0,929	1,4089	1,3838
C18:2 (9,12)c	0,215	9,6096	11,0083	10,0602	0,493	9,8565	10,0602	0,08	9,6096	10,8728
C20:0	0,684	0,1671	0,1639	0,1696	0,707	0,1665	0,1696	0,539	0,1671	0,1647
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,67	0,0745	0,0713	0,0923	0,404	0,0740	0,0923	0,981	0,0745	0,0743
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,754	0,0350	0,0410	0,0351	0,984	0,0361	0,0351	0,484	0,0350	0,0401
C20:1 (11c)	0,866	0,3342	0,3245	0,3161	0,606	0,3325	0,3161	0,758	0,3342	0,3233
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,111	0,1508	0,1793	0,1446	0,493	0,1558	0,1446	0,102	0,1508	0,1744
C18:4	0,71	0,1597	0,1274	0,1433	0,876	0,1540	0,1433	0,413	0,1597	0,1297
C20:2(11,14)c	0,429	0,3618	0,3779	0,3512	0,75	0,3646	0,3512	0,279	0,3618	0,3741
C22:0	0,374	0,1387	0,1296	0,1203	0,229	0,1371	0,1203	0,278	0,1387	0,1283
C20:3(8,11,14)c	0,435	1,4111	1,5682	1,3453	0,7	1,4388	1,3453	0,302	1,4111	1,5364
C22:1(13c)	0,479	0,0476	0,0579	0,0451	0,743	0,0494	0,0451	0,322	0,0476	0,0561
C20:4 (5,8,11,14)c	0,644	12,5946	12,4391	14,8401	0,357	12,5671	14,8401	0,892	12,5946	12,7821
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,838	0,3735	0,3395	0,3748	0,97	0,3675	0,3748	0,567	0,3735	0,3446
C24:0	0,878	0,1668	0,1598	0,1393	0,645	0,1656	0,1393	0,717	0,1668	0,1569
C24:1 (15c)	0,96	0,1093	0,1015	0,1161	0,992	0,1080	0,1161	0,784	0,1093	0,1036
C22:4 (7,10,13,16)c	0,869	3,1063	2,9525	3,2808	0,844	3,0791	3,2808	0,691	3,1063	2,9994
C22:5n-6	0,819	0,4720	0,4588	0,5345	0,529	0,4697	0,5345	0,881	0,4720	0,4696
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,906	1,4113	1,3844	1,5801	0,659	1,4065	1,5801	0,922	1,4113	1,4124
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,573	2,1810	2,3309	2,7690	0,409	2,2075	2,7690	0,371	2,1810	2,3935
sat	0,899	47,1201	46,0461	45,1743	0,673	46,9306	45,1743	0,753	47,1201	45,9216
mono-unsat	0,602	20,9379	20,6753	19,2745	0,315	20,8915	19,2745	0,689	20,9379	20,4752
poly-unsat	0,795	31,9412	33,2786	35,5512	0,499	32,1772	35,5512	0,782	31,9412	33,6033
TRANS	0,173	0,7074	0,6827	0,5405	0,067	0,7030	0,5405	0,325	0,7074	0,6624
m/s	0,461	0,4484	0,4526	0,4296	0,348	0,4491	0,4296	0,649	0,4484	0,4493
m/p	0,762	0,8779	0,7575	0,6720	0,464	0,8567	0,6720	0,747	0,8779	0,7453
n3	0,75	4,2763	4,3616	5,0118	0,453	4,2913	5,0118	0,729	4,2763	4,4545
n6	0,84	27,5904	28,8457	30,4471	0,56	27,8119	30,4471	0,776	27,5904	29,0745
n3/n6	0,953	0,1473	0,1469	0,1549	0,888	0,1473	0,1549	0,758	0,1473	0,1480



## 7.15 Priloga 15

	P-vrednost: LTA4H in vsi vzorci	Povp. delež lipida (Wild Type)	Povp. delež lipida (HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in vsi vzorci (WT+HE vs. HO)	Povp. delež lipida (WT+HE)	Povp. delež lipida (HO)	P-vrednost: LTA4H in vsi vzorci (WT vs. HE+HO)	Povp. delež lipida (WT)	Povp. delež lipida (HE+HO)
C14:0	0,163	0,4076	0,4192	0,4497	0,062	0,4098	0,4497	0,139	0,4076	0,4366
C15:0	0,419	0,2554	0,2611	0,2781	0,215	0,2564	0,2781	0,253	0,2554	0,2708
C16:0	0,213	24,5728	24,9638	26,2147	0,079	24,6451	26,2147	0,246	24,5728	25,6786
NN1	0,706	2,2005	2,0829	2,0782	0,523	2,1787	2,0782	0,412	2,2005	2,0802
C16:1	0,666	0,3896	0,3837	0,4060	0,368	0,3885	0,4060	0,586	0,3896	0,3964
C17:0	0,608	0,4732	0,4841	0,4955	0,39	0,4752	0,4955	0,347	0,4732	0,4906
C18:0	0,333	20,6957	19,9455	21,0774	0,328	20,5569	21,0774	0,824	20,6957	20,5923
NN2	0,806	3,6157	3,4981	3,4061	0,523	3,5940	3,4061	0,598	3,6157	3,4455
C18:1 (6+9+11)t	0,103	0,6006	0,5433	0,6527	0,072	0,5900	0,6527	0,775	0,6006	0,6058
C18:1 (9c)	0,082	17,1015	16,9867	18,1090	0,026	17,0803	18,1090	0,193	17,1015	17,6280
C18:1 (11c)	0,651	1,3724	1,3601	1,4075	0,451	1,3702	1,4075	0,942	1,3724	1,3872
C18:2 (9,12)c	0,433	9,9196	10,5933	9,5352	0,588	10,0442	9,5352	0,582	9,9196	9,9887
C22:0	0,681	0,1358	0,1375	0,1367	0,442	0,1361	0,1367	0,863	0,1358	0,1371
C18:3 (9t, 12c, 15t)	0,536	0,0751	0,0722	0,0863	0,274	0,0745	0,0863	0,59	0,0751	0,0803
C18:3 (6,9,12)c GLA	0,442	0,0380	0,0443	0,0343	0,401	0,0391	0,0343	0,844	0,0380	0,0386
C20:1 (11c)	0,341	0,3277	0,3152	0,3384	0,244	0,3254	0,3384	0,946	0,3277	0,3285
C18:3 (9,12,15)c ALA	0,441	0,1572	0,1718	0,1626	0,939	0,1599	0,1626	0,353	0,1572	0,1665
C18:4	0,077	0,1557	0,1535	0,2316	0,027	0,1553	0,2316	0,289	0,1557	0,1982
C20:2(11,14)c	0,633	0,3559	0,3571	0,3447	0,34	0,3561	0,3447	0,573	0,3559	0,3500
C22:0	0,681	0,1358	0,1375	0,1367	0,442	0,1361	0,1367	0,863	0,1358	0,1371
C20:3(8,11,14)c	0,705	1,4542	1,4993	1,4004	0,545	1,4626	1,4004	0,959	1,4542	1,4428
C22:1(13c)	0,19	0,0518	0,0528	0,0389	0,07	0,0520	0,0389	0,322	0,0518	0,0449
C20:4 (5,8,11,14)c	0,227	12,8251	12,6068	11,1655	0,089	12,7847	11,1655	0,195	12,8251	11,7832
C20:5 (5,8,11,14,17)c EPA	0,255	0,3480	0,4340	0,3189	0,275	0,3639	0,3189	0,805	0,3480	0,3683
C24:0	0,112	0,1564	0,1616	0,1808	0,04	0,1573	0,1808	0,301	0,1564	0,1726
C24:1 (15c)	0,269	0,1038	0,0974	0,1220	0,108	0,1026	0,1220	0,379	0,1038	0,1115
C22:4 (7,10,13,16)c	0,146	3,2190	2,9144	2,6918	0,098	3,1627	2,6918	0,061	3,2190	2,7872
C22:5n-6	0,101	0,5261	0,4542	0,4206	0,089	0,5128	0,4206	0,036	0,5261	0,4350
C22:5 (7,10,13,16,19)c DPA	0,535	1,3806	1,4162	1,2513	0,266	1,3872	1,2513	0,53	1,3806	1,3220
C22:6 (4,7,10,13,16,19)c DHA	0,091	2,3682	2,6522	1,8817	0,035	2,4207	1,8817	0,36	2,3682	2,2119
sat	0,302	46,8647	46,5405	49,0007	0,126	46,8047	49,0007	0,427	46,8647	47,9463
mono-unsat	0,087	20,3128	20,0985	21,4744	0,029	20,2732	21,4744	0,256	20,3128	20,8847
poly-unsat	0,167	32,8225	33,3695	29,5249	0,059	32,9237	29,5249	0,272	32,8225	31,1726
TRANS	0,048	0,6757	0,6155	0,7390	0,043	0,6646	0,7390	0,813	0,6757	0,6861
m/s	0,934	0,4367	0,4356	0,4427	0,714	0,4365	0,4427	0,782	0,4367	0,4397
m/p	0,103	0,7807	0,7936	0,9374	0,033	0,7831	0,9374	0,207	0,7807	0,8758
n3	0,213	4,4097	4,8278	3,8462	0,118	4,4870	3,8462	0,696	4,4097	4,2669
n6	0,169	28,3378	28,4694	25,5924	0,059	28,3622	25,5924	0,217	28,3378	26,8254
n3/n6	0,271	0,1487	0,1659	0,1472	0,758	0,1519	0,1472	0,31	0,1487	0,1552

## 8 Življenjepis



Curriculum vitae

**OSEBNI PODATKI** Gregor Jezernik

📍 Rošnja 18c, 2205 Starše, Slovenija

✉ gregor.jezernik@triera.net

Spol M | Datum rojstva 04/05/1992 | Državljanstvo Slovensko

**ZELENO PODROČJE DELA** Biomedicina, biokemija, biokemijska tehnologija, molekularna biologija

**IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE**

2011-2014 **Diplomirani inženir kemijske tehnologije (UN)**

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru

- Anorganska in organska kemija, analitika, optimiranje procesov, biokemija in molekularna biologija; veščine laboratorijskega dela

**KOMPETENCE**

**Materni jezik** slovenščina

**Drugi jeziki**

	RAZUMEVANJE		GOVORJENJE		PISNO SPOROČANJE
	Slušno razumevanje	Bralno razumevanje	Govorno sporazumevanje	Govorno sporočanje	
Nemščina	C1	C1	C1	C1	C1
	DSD - Deutsch Sprachdiplom. Stufe II				
Angleščina	C1	C1	C1	C1	C1

**Računalniške kompetence** ▪ Dobro obvladovanje orodij MS Office

**Vozniško dovoljenje** ▪ AM, B1, B, G