



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Magistrsko delo

**Vpliv polimorfizmov v celotnem genomu na profile
maščobnih kislin pri bolnikih s kronično vnetno črevesno
boleznijo**

avgust, 2016

Gregor Jezernik



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Gregor Jezernik

**Vpliv polimorfizmov v celotnem genomu na profile
maščobnih kislin pri bolnikih s kronično vnetno črevesno
boleznijo**

Magistrsko delo

Maribor, 2016



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Vpliv polimorfizmov v celotnem genomu na profile maščobnih kislin pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo

Magistrsko delo študijskega programa II. stopnje

Študent: Gregor Jezernik

Študijski program: magistrski študijski program II. stopnje Kemijska tehnika

Predvideni strokovni naslov: magister/magistrica inženir/ka kemijske tehnike

Mentor: red. prof. dr. Uroš Potočnik

Komentor: asist. dr. Katja Repnik

Maribor, 2016



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo
in kemijsko tehnologijo

Številka: K2001094

Datum: 21.03.2016

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 44/2015) izdajam

SKLEP O MAGISTRSKEM DELU

Gregor Jezernik, študent-ka študijskega programa 2. stopnje KEMIJSKA TEHNIKA, izpolnjuje pogoje, zato se ji-mu dovoljuje izdelati magistrsko delo.

Tema magistrskega dela je pretežno s področja Katedre za kemijo.

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

Somentor-ica: asist. dr. Katja Repnik

Datum veljavnosti teme: 21.03.2017

Tema podaljšana:

Naslov magistrskega dela:

VPLIV POLIMORFIZMOV V CELOTNEM GENOMU NA PROFILE MAŠČOBNIH KISLIN PRI BOLNIKI S KRONIČNO VNETNO ČREVESNO BOLEZNIJO

Naslov magistrskega dela v angleškem jeziku:

INFLUENCE OF GENOME WIDE POLYMORPHISMS ON FATTY ACID PROFILES IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Magistrsko delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo magistrskega dela« in ga do 21.03.2017 v treh izvodih oddati v referatu za študentske zadeve Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

V skladu z Navodili o pripravi in oddaji e-diplom je potrebno magistrsko delo oddati v Digitalno knjižnico Univerze v Mariboru.

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. Zdravko Kravanja



FAKULTETA ZA KEMIO IN
KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Kazalo

1	Uvod.....	1
2	Teoretični del.....	2
2.1	Kronična vnetna črevesna bolezen [1-3].....	2
2.1.1	Genetski dejavniki v KVČB.....	3
2.1.2	Patogeneza KVČB.....	5
2.1.3	Imunske celice v KVČB.....	7
2.1.3.1	Makrofagi [13].....	7
2.1.3.2	T celice.....	7
2.1.3.3	Biokemijsko delovanje izbranih KVČB genov [9].....	8
2.1.4	Okoljski dejavniki.....	10
2.1.4.1	Črevesni mikrobi [7].....	10
2.1.4.2	Dieta.....	11
2.1.4.3	Kajenje.....	12
2.1.5	Profili maščobnih kislin pri KVČB.....	13
2.1.6	Maščobno tkivo.....	15
2.1.7	Kardiovaskularnimi simptomi v KVČB.....	16
2.2	Metabolizem maščobnih kislin.....	17
2.2.1	Direktno delovanje prostih maščobnih kislin.....	20
2.2.1.1	PPAR.....	20
2.2.1.2	TLR.....	21
2.2.1.3	FFAR.....	22
3	Eksploimentalni del.....	23
3.1	Precizen pregled literature.....	23
3.2	Bioinformacijska analiza.....	23
3.2.1	Immunohip.....	23
3.2.2	Programska oprema.....	24
3.2.2.1	PLINK.....	24
3.2.2.2	Haploview.....	24
3.2.2.3	R.....	24
4	Rezultati in diskusija.....	25
4.1	Presek literature.....	25
4.2	Bioinformacijska analiza.....	28
4.2.1	FADS regija.....	37
4.2.2	Preostale genske regije s signifikantimi signali.....	38
4.3	Statistične analize.....	39
5	Zaključek.....	40
6	Literatura.....	42
7	Življenjepis.....	50

Izjava

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

Vir: National Center for Biotechnology (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Gesla:	Število referenc
inflammatory bowel disease IN fatty acid profile	18
inflammatory bowel disease IN arachidonic acid IN eicosanoid	43
inflammatory bowel disease IN GWA	12
inflammatory bowel disease IN adipose tissue	57
inflammatory bowel disease IN platelet IN lipids	20
inflammatory bowel disease IN macrophages IN eicosanoid	54
GWA IN fatty acids	4
GWA IN blood lipids	28
GWA IN adipose tissue	9

Skupno število pregledanih člankov: 245

Maribor, avgust 2016

Gregor Jezernik
podpis

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju red. prof. dr. Urošu Potočniku za možnost opravljanja magistrskega dela na temi, ki me zelo zanima. Prav tako se zahvaljujem dr. Katji Repnik za vso pomoč pri oblikovanju magistrskega dela.

Vpliv polimorfizmov v celotnem genomu na profile maščobnih kislin pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo

Povzetek

V magistrskem delu smo s intenzivno bioinformacijsko analizo preučevali povezave med profili maščobnih kislin in polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP-ji), ki so bili genotipizirani na SNP mikromreži, ki obsega več kot 200.000 SNP-jev celotnega genoma. Namen tega dela je bil najti genetske regije, ki vplivajo na deleže maščobnih kislin v membranah rdečih krvnih celic bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo (KVČB) in razložiti, kako s tem prispevajo k patogenezi bolezni ali njenemu poteku. Pri bioinformacijski analizi smo uporabili več programskih orodij, med njimi PLINK, R in Haploview.

Bioinformacijska analiza je pokazala močan statistično značilen signal v FADS regiji, ki vpliva na delež dihomogama-linolenske kisline ($p = 6.84 \times 10^{-7}$). Signal je del večjega haplotipskega bloka, katerega vpliv na kinetiko metabolizma maščobnih kislin in eikozanoidov je že dobro opisan. Haplotip D namreč poveča sintezo daljših maščobnih kislin. V prisotnosti moderne zahodnjaške diete bogate s krajšimi omega-6 maščobnimi kislinami vodi do proizvodnje velikih količin arahidonske kisline, katere derivati delujejo vnetno. Ta mehanizem je lahko patogen za kronično vnetno črevesno bolezen. Haplotip D v KVČB deluje negativno tudi s porabo esencialnih maščobnih kislin v času hudega vnetja in s tem vpliva na potek bolezni.

Rezultati te asociacijske študije kažejo na vlogo maščobnih kislin v poteku KVČB. Nadaljnje raziskave na tem področju bi prispevale k napovedovanju poteka bolezni in uspešnosti terapij ter odkrivanju novih terapevtskih tarč.

Ključne besede: kronična vnetna črevesna bolezen, profil maščobnih kislin, asociacijska študija, študija celotnega genoma

UDK: 612.336(043.2)

Influence of genome wide polymorphisms on fatty acid profiles in patients with Inflammatory bowel diseases

Abstract

In this thesis we performed a comprehensive bioinformatical analysis between the fatty acids profiles and single nucleotide polymorphisms (SNP), which were genotyped on a genome-wide human SNP microarray consisting of more than 200.000 SNP. The aim of this work was to find genetic regions that affect the fatty acids profile in red blood cell membranes of patients with inflammatory bowel disease and explain how they contribute to the pathogenesis of the disease or its progression. We used several software tools in the bioinformatical analysis, including Plink, R and Haploview.

The bioinformatics analysis showed a strong statistically significant signal in the FADS gene region ($p = 6.84 \times 10^{-7}$), which affects the proportion of dihomo- γ -linolenic acid. The signal is part of a larger haplotype block whose effect on the kinetics of fatty acids metabolism and eicosanoids has been well described. Haplotype D increases the synthesis of long chain fatty acids. In the presence of the modern western diet rich in shorter ω -6 fatty acids, it leads to the production of large amounts of arachidonic acid, which produces inflammatory derivatives. This mechanism can be pathogenic for inflammatory bowel disease. Haplotype D in IBD also acts negatively by consuming essential fatty acids during severe colon inflammation and thus influences the course of the disease.

The results of the association studies highlight the role of fatty acids in the disease course of IBD. Further research in this field could contribute to better prediction of disease course and therapy success and potential discovery of new therapeutic targets.

Key words: inflammatory bowel disease, fatty acids profile, association study, genome wide study

UDK: 612.336(043.2)

Seznam tabel

Tabela 1 - Pregled izbranih KVČB genov	8
Tabela 2 - Pregled študij maščobnih kislin pri bolnikih s KVČB.....	13
Tabela 3 - Pregled ω -3 in ω -6 maščobnih kislin.....	19
Tabela 4 - Presek med 201 KVČB geni in izbranimi GWA študijami	25
Tabela 5 - Seznam bioloških parametrov.....	28
Tabela 6 - Ponavljajoči se vzorec komandnih vrstic za kvantitativne asociacijske študije	29
Tabela 7 - Ponavljajoči se vzorec komandnih vrstic za oblikovanje šopov SNP-jev	30
Tabela 8 - Seznam SNP-jev v FADS regije pri DGLA in vseh vzorcih; QASSOC	31
Tabela 9 - Seznam SNP-jev v prvem PTGER4 signalu pri oleinski kislini in vseh vzorcih; GXE	31
Tabela 10 - Seznam SNP-jev v drugem PTGER4 signalu pri DPA in vseh vzorcih; GXE.....	31
Tabela 11 - Seznam SNP-jev v PTGER4 signalu pri DHA in vseh vzorcih; GXE	31
Tabela 12 - Seznam SNP-jev v SPRED2 signalu pri γ -linolenski kislini in vseh vzorcih; GXE	32
Tabela 13 - Seznam SNP-jev v SPRED2 signalu pri γ -linolenski kislini in kontrolnih vzorcih; QASSOC.....	32
Tabela 14 - Seznam SNP-jev v SPRED2 signalu pri γ -linolenski kislini in kontrolnih vzorcih; GXE	33
Tabela 15 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri DHA in vseh vzorcih; GXE.....	33
Tabela 16 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri SA in vseh vzorcih; GXE.....	34
Tabela 17 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri PUFA in vseh vzorcih; GXE	34
Tabela 18 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri arahidonski kislini in vseh vzorcih; GXE	34
Tabela 19 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri adrenski kislini in vseh vzorcih; GXE...	34
Tabela 20 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu in oleinski kislini pri KVČB vzorcih; QASSOC.....	35
Tabela 21 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu in arahidonski kislini pri KVČB vzorcih; QASSOC.....	35
Tabela 22 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu in adrenski kislini pri KVČB vzorcih; QASSOC.....	36
Tabela 23 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu in Osbondovi kislini pri KVČB vzorcih; QASSOC.....	36
Tabela 24 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu pri DGLA in vseh vzorcih; QASSOC	37

Seznam slik

Slika 1 - Ilustracija črevesne sluznice v zdravem tkivu, Crohnovi bolezni in ulceroznem kolitisu; povzeto po [4].....	5
Slika 2 - Potek patogeneze KVČB v krovnem tkivu in notranjosti čreva; povzeto po [11].....	6
Slika 3 - Shema elongacije in desaturacije ω -3 in ω -6 maščobnih kislin; povzeto po [92] ...	17
Slika 4 - Shema sinteze derivatov arahidonske kisline; povzeto po [100]	18
Slika 5 - Proteinska struktura skupna TLR receptorjev; povzeto po [118]	21
Slika 6 - LD graf za FADS regijo	30

Uporabljeni simboli in kratice

Kratice

CD	Crohnova bolezen
DGLA	dihomo- γ -linolenska kislina
DHA	dokozaheksaenoinska kislina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPA	dokozapentaenoinska kislina
GWA	asociacijska analiza celotnega genoma
GXE	interakcija gen-okolje
HDL	lipoprotein visoke gostote
KVČB	kronična vnetna črevesna bolezen
LD	ang. linkage disequilibrium
LDL	lipoprotein nizke gostote
MUFA	enkrat nenasičene maščobne kisline
NCBI	National Center for Biotechnology Information
PUFA	večkrat nenasičene maščobne kisline
QASSOC	kvantitativna asociacija
SA	nasičene maščobne kisline
SNP	polimorfizem posameznega nukleotida
UC	ulcerozni kolitis

1 Uvod

Za patogenezo kompleksnih bolezni je značilna vpletenost genetskih in okoljskih dejavnikov. Genetika teh bolezni je kompleksna, kar pomeni, da vzrok obolenja ni en sam gen, ampak interakcija več genetskih dejavnikov, ki v prisotnosti okolja izzovejo bolezen. Med kompleksne bolezni spadajo motnje metabolizma, avtoimunske bolezni kot tudi motnje homeostaze, fizičnih in mentalnih funkcij. Raziskovanje genetike teh bolezni prinaša potencialne terapevtske tarče za farmakologijo, kot tudi možnost napovedovanja tveganja za nastanek obolenja in tarčno predpisovanje zdravil.

Lipidi in njihovi derivati imajo v telesu raznolike funkcije. V osnovi so vir energije in sestavni del celične membrane, prav tako pa transportirajo nepolarne molekule, regulirajo imunski odziv, vnetja in druge telesne funkcije, npr. nevrološke. Profili maščobnih kislin v različnih krvnih frakcijah se raziskujejo v sklopu kardiovaskularnih, imunsko pogojenih kot tudi nekaterih nevroloških bolezni. Znanje s tega področja je uporabno v predpisovanju diete za bolnike kot tudi za namene diagnostike.

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je kompleksna bolezen, kjer nepravilen imunski odziv na črevesno floro v genetsko pogojenem gostitelju povzroča kronično napredujoče vnetja prebavnega trakta. Klinično definirani sta dve podvrsti KVČB, to sta Crohnova bolezen (CD) in ulcerozni kolitis (UC). Več študij je opazilo bistvene spremembe profila maščobnih kislin v KVČB, kar bi pomenilo, da obstajajo primarne nepravilnosti v metabolizmu maščobnih kislin in njihovih derivatov v tej bolezni.

Iz tega razloga je bila narejena intenzivna bioinformatična analiza, katere cilj je bil odkriti povezave med profili maščobnih kislin bolnikov s KVČB in polimorfizmi celotnega genoma.

Raziskovalni hipotezi sta sledeči:

- Določeni SNP-ji povzročijo spremembo v metabolizmu maščob, kar prispeva k patogenezi.
- Določeni SNP-ji povzročijo spremembo v imunskem oz. vnetnem odzivu, kar posredno vodi do spremenjenega profila maščobnih kislin v krvi bolnikov s KVČB.

2 Teoretični del

2.1 Kronična vnetna črevesna bolezen [1-3]

Za kompleksne bolezni je značilno, da patogeneza ni pogojena z enim samim genom, ampak s večjim številom genetskih dejavnikov, ki v prisotnosti okoljskih dejavnikov izzovejo bolezensko stanje.

Kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) je pogosta kompleksna bolezen, za katero je značilno kronično in progresivno vnetje prebavnega trakta, ki nastane kot posledica nepravilnosti v odzivu imunskega sistema na mikrobo v črevesju. V Evropi je prizadetih več kot 2,5 milijona ljudi, po podatkih iz leta 2007 je bilo v ZDA obolelih 1,5 milijona ljudi. Število prizadetih raste tudi v Aziji in drugih državah v razvoju.

Glavni klinični značilnosti KVČB sta driska in kronične bolečine v trebuhu, kot tudi dovzetnost za raka na debelem črevesju, krvavitve v prebavnem traktu in nenačrtovana izguba teže. Klinično sta definirani dve podvrsti KVČB, to sta Crohnova bolezen (CD) in ulcerozni kolitis (UC). Razširjenost CD v Evropi je 1 na 310 oseb, za UC pa 1 na 198 oseb [4]. Smrtnost v primerjavi s splošno populacijo je višja pri CD (faktor je 1,39), za UC pa je le-ta primerljiva (faktor je 1,1) [5].

25% vseh primerov KVČB se pojavi v prvih dveh desetletjih življenja. Izmed teh zgodnjih primerov je pri večini postavljena diagnoza v otroštvu (od 13 do 18 let). Statistika kaže na vse večjo razširjenost in pojavnost zgodnje KVČB [5].

Pri UC nastane vnetje v črevesni sluznici v danki, od koder se širi po črevesju, medtem lahko pri Crohnovi bolezni vnetje nastane kjerkoli v prebavnem sistemu od ust do danke, vendar se prvič pojavi najpogosteje v spodnjem delu debelega črevesja. Razlog temu je verjetno visoka koncentracija mikrobov v tem predelu prebavnega trakta, kar statistično poveča verjetnost napačnega imunskega odziva.

Za CD so značilne fistule in stenoze, kot tudi pogosti sekundarni simptomi, ki zmanjšujejo kvaliteto življenja. Vnetje se lahko širi tudi skozi tkivo prebavnega trakta, pri UC pa se vnetje širi skoraj izključno po črevesni sluznici. Pri CD se redkeje pojavi krvava driska, ki je pogost pojav pri UC. Pri obeh podvrstah bolezni se lahko okužbe oz. zastrupitve črevesja zapletejo, za kar je potreben kirurški poseg. Za bolnike s CD je odstranitev obolelega tkiva začasna rešitev, v primeru UC pa lahko pomeni popolno ozdravitev.

2.1.1 Genetski dejavniki v KVČB

Kronična vnetna črevesna bolezen je poligenetska, kar pomeni da je v genetiko te bolezni vključenih več genov oz. genskih regij. KVČB se običajno pojavi sporadično, le 5% do 10% vseh primerov je družinske oblike. Obstajajo redke monogenetske oblike KVČB, za katere so značilne variante v *IL10*, *IL10RA* ali *IL10RB* genih [6].

Enojajčni dvojčki s CD imajo fenotipsko konkordanco med 50 in 75%, kar pomeni, da če zboli prvi dvojček, je verjetnost, da zboli tudi drugi za identično boleznijo med 50 in 75%; novejša študija omenjajo nižje vrednosti (med 27% in 56%) [7]. Tveganje za nastanek te bolezni pri enojajčnih dvojčkih s družinsko obliko CD je 800-krat večja kot v splošni populaciji. Študije enojajčnih dvojčkov s UC so pokazale bistveno manjšo fenotipsko konkordanco, ki je med 10 in 20%. Iz tega se sklepa, da je dednost manj pomemben faktor v UC, bolj pomembni so drugi dejavniki, to so okoljski in epigenetski. [8]

Asociacijska študija celotnega genoma iz leta 2012 izpostavlja 163 genskih regij, nadgradnja študije iz 2015 pa še dodaja 38 dodatnih genskih regij, ki prispevajo k dovzetnosti za KVČB [1, 2]. Izmed 201 izpostavljenih genskih regij je 37 vezanih izključno na CD in 27 izključno na UC. Kljub velikemu številu genov v preseku obeh podvrst KVČB ni nujno, da so genetske variante v teh območjih funkcionalno, strukturno in po pomembnosti identične.

Tako v preseku ne najdemo značilnih CD genov, kot so npr. določeni receptorski geni (*NOD2*), geni citoplazemske celične smrti (*ATG16L1* in *IRGM*) in intelektini (*ITLN1*). Pri UC so kot faktorji tveganja posebej izpostavljene variante v regulatornih poteh (npr. *IL10* in *ARPC2*), nekaterih ligazah (npr. *HERC2*) in celic črevesnega krovnega tkiva (*ECM1*).

HLA/MHC gensko področje ima vlogo pri nastanku KVČB, posebej v UC. To gensko področje je povezano z avtoimunimi boleznimi, med katere je po klasičnem razumevanju spadala tudi KVČB. Moderno razumevanje KVČB poudarja zapletene motnje v funkcijah sluznice in krovnega tkiva, avtoimunosti pa ne poudarja kot ključnega dela patogeneze [4].

Določene genske regije povezane s KVČB so patogene tudi v velikem številu drugih bolezenskih stanj, pogosteje v imunskih boleznih [9]. Med njimi so:

- sladkorna bolezen tipa I (*PTPN22*, *PTPN2*)
- sladkorna bolezen tipa II (*CDKALI*, *ITLN1*)
- astma (*ORMDL3*, *ITLN1*)
- luskavica (*CDKALI* in *GCKR*)
- lupus (*PTPN22*)
- revmatoidni artritis (*PTPN22*, *PTGER4*)
- Gravesova bolezen (*PTPN22*)
- shizofrenija (*GNAI2*)
- rak na dojkah (*CDH1*, *PARD3*)
- miomi maternice (*LAMB1*)
- celiakija (*MAGI2*, *PARD3*, *PTPN2*)

V splošnem imajo genske variante povezane s KVČB zmerni oz. nizek faktor tveganja, ki je pogosto med 1,1 in 1,3. Izjema temu so nekatere *NOD2* variante v evropski populaciji, ki imajo faktor tveganja od 1,5 do 4,3 in so povezane z izgubo funkcije gena [6].

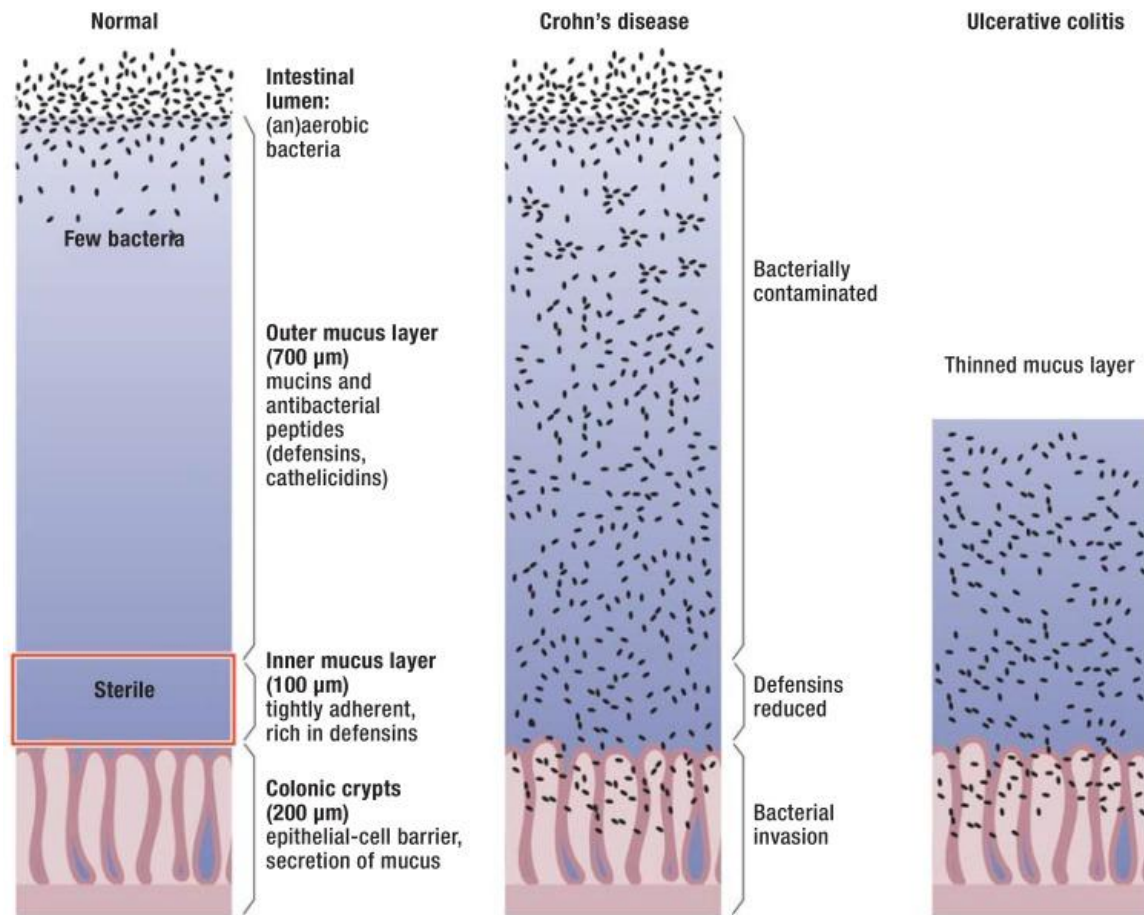
Do danes odkriti in opisani genetski dejavniki skupaj tvorijo od 10% do 20% celotnega tveganja za nastanek KVČB. Za veliko izpostavljenih genskih območij še ni znana ključna varianta, v nekaterih primerih pa še ni jasno, kateri izmed genov v regiji je patogen.

Med populacijami so precejšnje razlike v pomembnosti določenih genskih območij tveganja. Tako je npr. v belski populaciji med vodilnimi patogenimi geni *NOD2*, ki pa nima iste statistične signifikance v azijskih bolnikih. Kljub temu so okoljski dejavniki (npr. prehrana, kajenje itd.), ki so povezani z nastankom KVČB med populacijami praktično identični. Pri bolnikih različnih etničnih izvorov se razvijejo isti simptomi, prav tako se na zdravila odzovejo zelo podobno. Iz teh opažanj sledi, da KVČB kljub raznolikemu genetskemu ozadju konvergira na isti fenotip v prisotnosti določenih okoljskih dejavnikov. [8]

2.1.2 Patogeneza KVČB

Kronična vnetna črevesna bolezen je po sodobnem razumevanju kompleksna bolezen črevesne pregrade, kjer genetski in okoljski faktorji povzročijo spremembe v črevesni flori, motnje v propustnosti črevesne sluznice kot tudi nepravilnosti imunskega sistema. Te spremembe so najbolj opazne v debelem črevesu in ileumu (končnemu delu tankega črevesa), kjer je koncentracija mikrobov najvišja [4].

Na Slika 1 - Ilustracija črevesne sluznice v zdravem tkivu, Crohnovi boleznini in ulceroznem kolitisu; povzeto po [4] je ilustrišana črevesna sluznica in mikrobná flóra v zdravem tkivu, pri CD in UC.



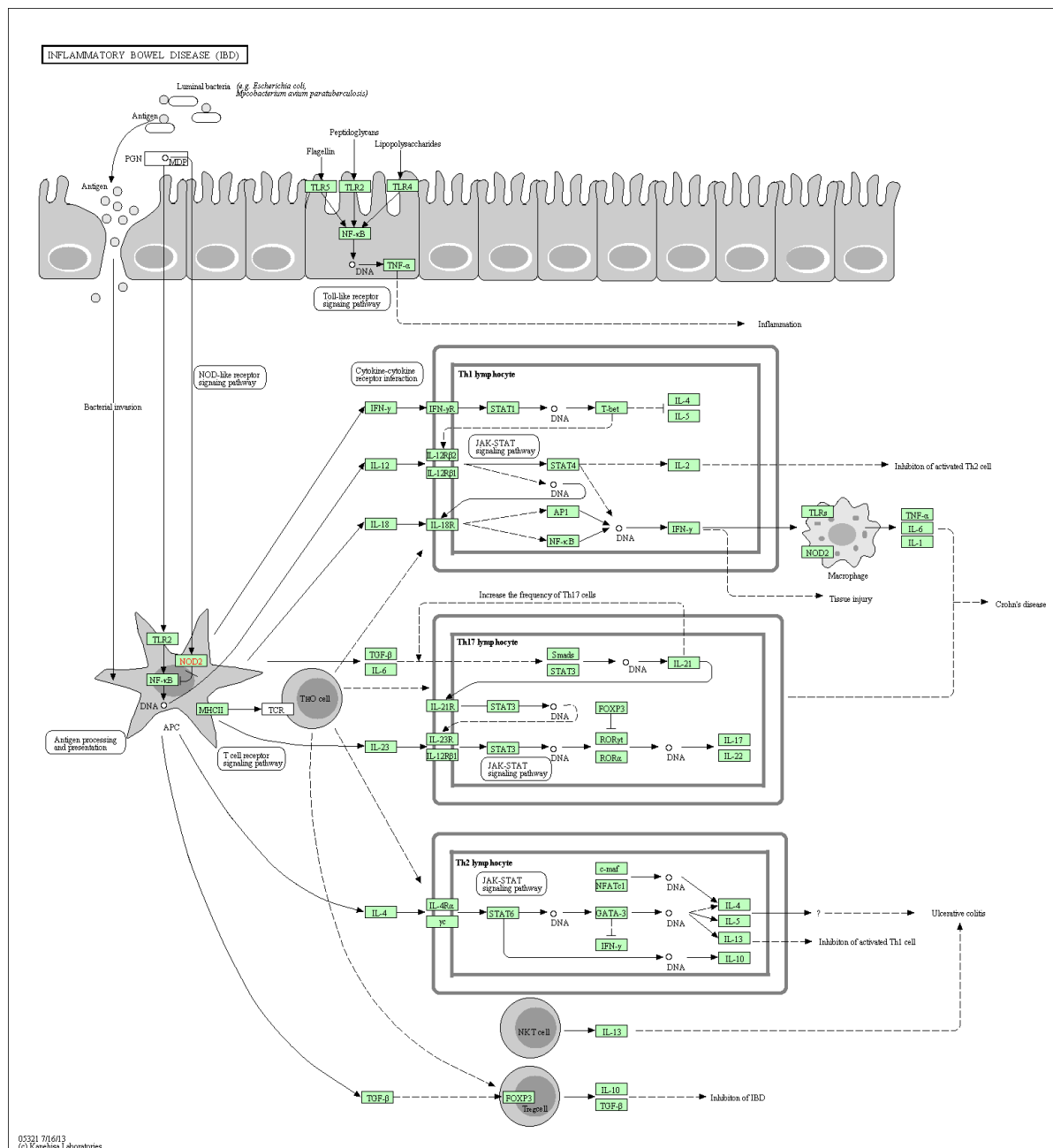
Slika 1 - Ilustracija črevesne sluznice v zdravem tkivu, Crohnovi boleznini in ulceroznem kolitisu; povzeto po [4]

Bakterije se lahko v zdravi črevesni sluznici nahajajo le v zgornjem sloju, ker je notranjost zaščitena s mucini in drugimi protibakterijskimi peptidi, kot so npr. defensini. CD in UC je skupno, da je črevesna sluznica kontaminirana po celotni dolžini in da slaba integriteta ščetkastega obrobka omogoči invazijo bakterij v notranjost. Za UC je značilno tudi, da je črevesna sluznica tanjša. [4]

Podvrsti KVČB se na podobne fiziološke spremembe črevesne sluznice odzoveta različno. Za CD je predvsem značilna motena proizvodnja zaščitnih peptidov in aktivacija specifične imunosti zaradi manjših defektov v avtofagiji, nespecifični imunosti, funkciji monocitov in prepoznavanju bakterijskih patogenov (*NOD2*) [4, 6]. V UC ima pomembnejšo vlogo motena regulacija limfocitov, povečana aktivacija T celic in moteno delovanje le-teh [6].

Spremembe profila mikrobov v črevesni flori so nekoliko bolj izrazite v CD [6, 10].

Razlog hudim bolezenskim stanjem je invazija bakterij v ščetkast obrobek oziroma imunski odziv tkiva na mikrobo. Slika 2 - Potek patogeneze KVČB v krvnem tkivu in notranjosti čreva; povzeto po prikazuje okolje celic krvnega tkiva in natančen biokemijski odziv imunskih celic na invazijo mikrobov.



Slika 2 - Potek patogeneze KVČB v krvnem tkivu in notranjosti čreva; povzeto po [11]

Pri normalnih pogojih bi v primeru bakterijske kontaminacije celice črevesnega krvnega tkiva sprožile vnetje po prepoznavanju komponent bakterij (npr. flagelin, peptidoglikan in lipopolisaharidi). V KVČB je motena integriteta tesnega stika med celicami, ki omogoči bakterijskim patogenom vstop v notranjost, kjer antigen prezentirajoče celice sprožijo še eno vrsto imunskega odziva. Interakcija obeh odzivov vodi do patogenega stanja.

2.1.3 Imunske celice v KVČB

V KVČB so značilne spremembe delovanja celic imunskega sistema, npr. hiperaktivne B celice [12], makrofagi [13] in APC oz. dendritske celice [14, 15]. Za CD so značilne tudi spremembe v Th1 in Th17 celicah in visoki nivoji IFN- γ , IL-17 in IL-22, medtem ko so za UC posebej izpostavljene Th2 in naravne celice ubijalke ter nivoji IL-4, IL-5, IL-10 in IL-13 molekul.

2.1.3.1 Makrofagi [13]

Makrofagi so imunske celice, ki so sestavni del nespecifične imunosti. Prisotne so po vsem telesu, v črevesju opravljajo pomembno funkcijo zaščite telesa pred mikrobi in patogenimi snovmi. Za makrofage je značilna visoka plastičnost, tj. sposobnost integracije okoljskih signalov in odziv na nje s spremembo celičnih procesov.

Največ makrofagov v črevesju se nahaja tik pod krovnim tkivom ščetkastega obrobka. V splošnem so makrofagi prisotni v debelem in tankem črevesu bolj tolerantni za antigene kot tisti, ki se nahajajo v drugih tkivih. Tako sprožijo vnetje le v primerih, ko je koncentracija antigenov v hrani dovolj visoka. Iz tega razloga je zmanjšana njihova ekspresija receptorjev za prepoznavanje tujkov in so bolj odvisni od drugih aktivacijskih faktorjev.

Kronično vnetje v KVČB bistveno spremeni raznolik profil črevesnih makrofagov, kot tudi njihovo število. Napake v tesnem stiku povzročijo, da makrofagi prehajajo v druga tkiva. Posledica mešanja makrofagov iz različnega tkivnega okolja so motnje v regulaciji in odzivu imunskega sistema. Za UC je značilno delovanje makrofagov v črevesni sluznici, v CD pa prihajajo makrofagi tudi iz maščobnega tkiva, ki obdaja črevo.

Makrofagi iz maščobnega tkiva so posebej značilni po delovanju na vnetja preko povišanega metabolizma maščobnih kislin in njihovih derivatov, kot tudi po večji dovzetnosti za proste maščobne kisline [16]. Maščobne kisline na makrofage delujejo preko PPAR γ [17], TLR2 in TLR4. To se kaže v protivnetnem delovanju nenasičenih maščobnih kislin [18] in vnetnem delovanju nasičenih maščobnih kislin [19]. Proste maščobne kisline v teh makrofagih prav tako sprožijo sintezo vnetnega levkotriena C4 [20] in sodelujejo v procesih s TNF- α [21].

2.1.3.2 T celice

T celice, imenovane tudi T limfociti, so podvrsta belih krvničk, ki opravljajo mnoge funkcije v vseh področjih imunskega sistema. V črevesni sluznici uravnavajo toleranco na mikrobo kot tudi odziv na patogene molekule, v črevesnem tkivu pa delujejo predvsem v vnetjih.

Delovanje T celic je spremenjeno v KVČB, v aktivnem vnetju so tudi ključen faktor za širjenje vnetja in ohranjanje vnetnega stanja. Motena je homeostaza T regulatornih celic, njihovo število je zmanjšano tako v krvi kot v tkivih, s tem pa je zmanjšana sposobnost imunskega telesa za uravnavanje vnetja [22, 23]. Prav tako je v KVČB spremenjena plastičnost Th17 celic, v CD pa je spremenjeno tudi razmerje med Th1 in Th17 celicami [24, 25].

2.1.3.3 Biokemijsko delovanje izbranih KVČB genov [9]

Ključni del patogeneze KVČB so spremembe v črevesni sluznici in ščetkastem obrobku. Tabela 1 - Pregled izbranih KVČB genov prikazuje izbrane KVČB gene, ki sodelujejo v teh celičnih sistemih.

Tabela 1 - Pregled izbranih KVČB genov

CDH1	<p>Nahaja se v 16q22 lokusu. Značilen je za CD in UC.</p> <p>CDH1 kodira E-kadherin, ki sodeluje pri oblikovanju tesnega stika med celicami.</p> <p>Variante v tem genu povzročijo moteno delovanje proteina in s tem nepravilnosti v tesnem stiku. To omogoča invazijo bakterij v krovno tkivo. Nekatere patogene bakterije so sposobne razgradnje E-kadherina, kar dodatno oslabi tesen stik in pospeši širjenje infekcije. Genetske variante tega gena so tudi povezane z črevesnimi tumorji.</p>
LAMB1	<p>Nahaja se v 7q31 lokusu. Značilen je le za UC.</p> <p>LAMB1 kodira laminin $\beta 1$, tj. podenota laminin membranskih glikoproteinov, ki sodelujejo v migraciji in diferenciaciji celic kot tudi oblikovanju stika med njimi.</p> <p>Zaradi defektov v tej podenoti se ti glikoproteini ne vgrajujejo pravilno v membrane, kar vodi do oslabitve stika celica-celica pri UC. Na podobnem principu defekti v tem genu pospešijo nastanek miomov maternice.</p>
PARD3	<p>Nahaja se v 10p11 lokusu. Značilen je za UC v nekaterih populacijah.</p> <p>PARD3 sodeluje pri polarizaciji celic, kot tudi pri organizaciji tesnega stika. Veže se namreč na direktno adhezijske molekule in omogoči vezavo drugih proteinov.</p> <p>Moteno delovanje tega gena oslabi sposobnost vezave določenih proteinov v tesnem stiku, kar bi naj imelo posledice pri signalizaciji in celjenju ran.</p>
GNA12	<p>Nahaja se v 7p22 lokusu. Značilen je le za UC.</p> <p>GNA12 kodira $G\alpha 12$ protein, ki spada med G proteine. $G\alpha 12$ je GTPaza vezana na membrano in direktno regulira propustnost krovnega tkiva.</p> <p>Variante GNA12 povzročijo nepravilno regulacijo propustnosti krovnega tkiva v UC. Iz živalskih modelov se sklepa, da je GNA12 vpleten tudi v moteno regulacijo imunskega sistema v eksperimentalnih modelih UC.</p>
MAGI2	<p>Nahaja se v 7q21 lokusu. Značilen je za CD in UC kot tudi za celiakijo.</p> <p>MAGI2 je membranska kinaza, ki deluje kot "gradbeni oder" za medcelične strukture, med drugim tudi za tesen stik; vlogo ima tudi pri celični migraciji in proliferaciji.</p> <p>Funkcija variant v tem genu še ni točno razložena. Defekti povezani s CD in UC so najverjetneje tisti, ki prizadenejo integriteto "gradbenega odra" in s tem testni stik.</p>
MYO9B	<p>Nahaja se v 19p13 lokusu. Značilen je za CD in UC.</p> <p>MYO9B kodira enega izmed članov miozinske družine razreda IX. Protein deluje tudi kot rho-GTPaza, le-te pa regulirajo rho-odvisne signalne poti, preoblikovanje aktinskih filamentov kot tudi integriteto tesnih stikov.</p> <p>Podatki o povezavi s CD in UC so nasprotujoči, predvsem zaradi populacijskih razlik. Sklepa se, da so v patogenezo potencialni defekti vpleteni preko slabe integritete tesnega stika in s tem povezanih poškodb krovnega tkiva.</p>
PTPN2	<p>Nahaja se v 18p11 lokusu. Značilen je za CD in UC.</p> <p>PTPN2 je tirozinska fosfataza tipa 2 brez receptorja, ki ima mnogo funkcij. Za KVČB je predvsem pomembna interakcija PTPN2 s $IFN-\gamma$.</p> <p>Genetske variante v PTPN2 spremenijo ekspresijo tega gena s tem pa posredne spremembe v sistemih, kjer deluje $INF-\gamma$.</p>

HNF4A	<p>Nahaja se v 20q13. Značilen je za CD in UC.</p> <p>HNF4A je transkripcijski faktor. Sodeluje predvsem pri celični diferenciaciji.</p> <p>Za patogenezo KVČB se poudarja njegova vloga pri homeostazi črevesne sluznice, transportu ionov, interakcija s LAMB1 in vloga pri nastanku raka na debelem črevesu.</p>
ECM1	<p>Nahaja se v 1q21.2. Značilen je predvsem za UC.</p> <p>ECM1 kodira zunajcelični matrični protein 1. Pomemben je predvsem pri integriteti kože, saj deluje kot "lepilo" za strukturne proteine med celicami. V črevesju naj bi imel podobno funkcijo za zagotavljanje strukturne integritete črevesne stene.</p> <p>Funkcijski defekti in spremembe v ekspresiji bi dodatno oslabile črevesno steno in s tem povečale tveganje za okužbo in nastanek KVČB.</p>
MUC3A	<p>Nahaja se v 7q22. Značilen je za CD in UC.</p> <p>MUC3A je transmembranski mucin v notranjem zaščitnem sloju sluznice.</p> <p>Redkejša variante v tem genu so povezane z zmanjšano glikolizacijo kodirajočega proteina in s tem lažjo degradacijo v črevesni sluznici. Podobno kot v primeru cistične fibroze bi lahko spremembe v ekspresiji tega gena vplivale na patogenezo KVČB preko interakcij z določenimi membranskimi receptorji.</p>
MUC19	<p>Nahaja se v 12q12. Značilen je predvsem za CD.</p> <p>MUC19 je mucin v zunanjem delu sluznice. Nahaja se v zgornjem prebavnem traktu.</p> <p>Razlaga obstoječe povezave z patogenezo CD je otežena, ker se MUC19 ne pojavi v spodnjem delu črevesju, kjer je bolezen najbolj aktivna. Do sedaj se sklepa, da pride do interakcij med nepravilnostmi v ustih in spodnjih delih prebavil.</p>
ITLN1	<p>Nahaja se v 1q23. Značilen je predvsem za CD.</p> <p>ITLN1 je intelektin 1. Ta protein ščiti ščetkasti obrobek pred paraziti in ima vlogo pri transportu laktoferina, ki ima protivnetne lastnosti. Njegova struktura je prav tako 100% homologna z adiponektinom omentin, ki deluje protivnetno v ožilju.</p> <p>V pacientih z CD je stopnja intelektina oz. omentina zmanjšana, kar ovira delovanje protivnetnega laktoferina v ključnih tkivih v črevesju in prispeva k kardiovaskularnim stranskim simptomom v času aktivne bolezni.</p>
PTGER4	<p>Nahaja se v 5p13.1. Značilen je za CD in UC.</p> <p>PTGER4 je receptor za prostaglandin E₂. Najpogostejša funkcija je sprožitev vnetnega odziva, vendar ima PTGER4 tudi vlogo pri rehabilitaciji tkiva po prenehanju vnetja.</p> <p>Variante povezane z KVČB so v območju vezave transkripcijskega faktorja NF-κB in so najverjetneje razlog za povišano ekspresijo v bolnikih z KVČB.</p>
CARD15 [26]	<p>Nahaja se v 5q31. Značilen je izključno za CD.</p> <p>CARD15 oz. NOD2 je receptor, ki prepoznava patogene molekule.</p> <p>Izguba funkcije tega proteina pomeni, da se črevesje na bakterije ne odzove takoj in se lahko le-te širijo nekontrolirano. S tem se imunski odziv močno zakasni.</p>

2.1.4 Okoljski dejavniki

Raznolikost okoljskih dejavnikov vpletenih v patogenezo KVČB otežuje razumevanje bolezni in oblikovanje preventivnih ukrepov za zmanjšanje tveganja nastanka bolezni [27].

Do zdaj so študije opisale pomembno vlogo profila črevesnih mikrobov, infekcije s določenimi vrstami bakterij [28], prehrane, uporabe antibiotikov v otroštvu, kajenje [29, 30], odstranitev slepiča kot tudi pretirana ali zanemarjena higiena [7]. Manj raziskovani faktorji so stres, fizična aktivnost [31], alkoholne pijače [32, 33], dojenje in uporaba prehranskih dopolnil [7].

Raziskave poudarjajo povečan vpliv okoljskih dejavnikov v otroštvu. Ta vpliv je najbolj opazen v študijah na priseljencih, ki so emigrirali v države s večjo razširjenostjo KVČB. Prva generacija priseljencev ni imela povišanega tveganja za nastanek KVČB, v drugi generaciji pa je tveganje primerljivo s domačo populacijo, kljub različnemu genetskemu ozadju [5, 27].

2.1.4.1 Črevesni mikrobi [7]

Človeško črevesje je gostitelj velikemu številu bakterij, glivic in virusov, ki pri normalnih pogojih živijo v sožitju s človekom. S svojo raznovrstnostjo lahko črevesna flora razgradi neprebavljive snovi, proizvaja vitamine in druga esencialna hranila, deluje lahko tudi kot dodaten sloj zaščite pred okoljskimi vplivi in patogenimi mikrobi pa tudi kot kompenzator za spremembe v prehrani.

Dosedanje raziskave ne morejo opredeliti, ali so spremembe posledica KVČB ali del njene patogeneze. Znano je, da genetski profil oblikuje profil črevesne flore [34], mikrobi pa vplivajo na epigenetiko gostiteljskih celic [7]. To vzajemno in zapleteno delovanje obeh sistemov otežuje pojasnitev kaj je vzrok in kaj je posledica.

Profil črevesne flore je spremenjen v KVČB, s tem pa so posledično motene funkcije flore v črevesju. Slaba integriteta tesnega stika, motena obramba črevesne sluznice in spremenjena toleranca na mikrobe omogočijo flori prodor v krovno tkivo ščetkastega obrobka, kar dodatno pospeši nepravilen vnetni odziv na simbiozne mikrobe in potencira spremenjen profil črevesne flore.

Motnje profila črevesne flore v KVČB se kažejo predvsem v višji koncentraciji invazivnih *Escherichia coli* sevov [5], kot tudi sevov *Clostridium* bakterij [10]. Prav tako se zazna večje število invazivne *Fusobacterium* v ustih in debelem črevesju, ki je značilna v tumorskih tvorbah [35]. V CD so prisotni tudi sevi psihotropskih bakterij rodu *Yersinia spp* in *Listeria spp* [36], ki so najverjetneje prišle v črevesje iz zamrznjene in hlajene hrane.

Analize kažejo tudi na signifikantno manjšo prisotnost *Roseburia* in *Phascolarctobacterium* bakterij [10]. Nekateri sevi, ki spadajo v rodove *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* in *Faecalibacterium*, delujejo protektivno proti KVČB [35], prisotnost teh pa je značilno manjša v bolezenskem stanju [28]. Infekcija s *Helicobacter pylori* prav tako deluje zaščitno proti KVČB in nekaterim avtoimunim boleznim, najverjetneje s svojo sposobnostjo spreminjanja mikrobne tolerance gostitelja [37]. Primerjava raziskav v različnih populacij kaže zelo podobne spremembe profilov mikrobov v KVČB; npr. med ZDA/EU in Južno Korejo [38].

Novejše raziskave črevesne flore kažejo na pomembno vlogo bakteriofagov (virusi ki prežijo na bakterijah) v oblikovanju profila mikrobov v črevesju. Profil bakteriofagov je spremenjen v KVČB, spremenjeno je tudi njihovo število. V še nebolelem tkivu je teh virusov več, v vnetem tkivu pa jih je mnogo manj kot v tkivu zdrave populacije [39].

2.1.4.2 Dieta

Dieta vpliva na patogenezo in potek KVČB preko direktnega delovanja hranil na telesne funkcije ali posredno s spreminjanjem profila črevesnih mikrobov [7, 40]. V splošnem je dieta povezana s KVČB bogata s proteini in preprostimi ogljikovimi hidrati ter maščobami, vendar pa revna z vlakninami in ω -3 maščobnimi kislinami [5].

Raziskave so v povezavi s KVČB preiskovale skoraj celoten spekter hranil.

Ogljikove hidrate delimo na dva načina. Glede na njihovo dolžino razlikujemo monosaharide in disaharide (glukoza, saharoza), oligosaharide (fruktooligosaharidi) in polisaharide (škrob, celuloza). Lahko jih delimo tudi po biološki dostopnosti v črevesju. Prebavljive ogljikove hidrate je možno hidrolizirati in absorbirati, neprebavljive lahko fermentirajo le bakterije v debelem črevesu, netopni pa se izločijo skoraj nespremenjeni [40].

V KVČB je tanko črevo preobremenjeno z absorpcijo prebavljivih ogljikovih hidratov, posledično višje koncentracije hranil pa povzročijo prekomerno rast črevesne flore, tudi v notranjost črevesne sluznice. Nizki vnos probiotikov (neprebavljivi ogljikovi hidrati), ki spodbujajo raznolikost flore v debelem črevesu, vpliva na spremembe profila mikrobov. Probiotiki pospešijo tudi proizvodnjo kratkih maščobnih kislin v bakterijah, ki imajo pomembno vlogo v homeostazi prebavil, pomanjkanje teh pa je značilno za KVČB [40, 41].

Prvotne raziskave so pokazale povezavo med dieto bogato s maščobami in tveganjem za KVČB, novejša študija pa posebej izpostavljajo le določene vrste maščob. Tako so v ospredju ω -3 in ω -6 maščobne kisline. V splošnem imajo te esencialne maščobne kisline in njihovi derivati ključno vlogo pri vnetnih procesih. Za ω -3 posplošeno velja da so protivnetne, ω -6 pa delujejo vnetno, predvsem z arahidonsko kislino. [40, 42]

Zahodnjaška dieta je bogata z ω -6 maščobnimi kislinami, vsebuje pa manj ali le zmerne količine ω -3 maščobnih kislin. To bi pomenilo, da maščobni profil skrajno teži k vnetnim procesom. Iz tega razloga so bile v preteklosti za KVČB bolnike predpisane prehranske intervencije s zelo visoko vsebnostjo ω -3 maščobnih kislin. Novejša terapija so osredotočene na ohranjanje razmerja med ω -3 in ω -6 maščobnimi kislinami. Vpliv prehranskih ω -3 maščobnih kislin na KVČB je podrobno raziskan [43-51]. Poleg protivnetnih lastnosti imajo pozitiven učinek na psihološko stanje [52-54], ta pa posredno izboljša potek KVČB [55-57].

Vloga prehranskih proteinov v patogenezi KVČB je bila preiskana vzporedno s drugimi hranili. Raziskave kažejo na določeno stopnjo vpletenost živalskih proteinov v KVČB, vendar je ta zanemarljiva v primerjavi s živalskimi ω -6 maščobnimi kislinami. Profil prehranskih proteinov najverjetneje deluje le posredno na potek bolezni s spreminjanjem črevesne flore. [40]

Študije vpliva diete na prebavila so raziskovale tudi vpliv vnosa alkohola. Alkoholne pijače delujejo na aktivnost imunskih celic in črevesne flore predvsem z etanolom, določene sladke alkoholne pijače pa tudi z visoko vsebnostjo topnih ogljikovih hidratov [33]. V splošnem delujejo na prebavila vnetno. Višji vnos alkoholnih pijač je povezan z večjimi prebavnimi težavami pri KVČB, ne pa tudi s patogenezo [32].

2.1.4.3 Kajenje

Kajenje spada med najpomembnejše in najbolj raziskane okoljske dejavnike za KVČB, vendar mehanizem patogeneze ni popolnoma jasen. Dosedanje razumevanje vloge kajenja v patogenezi KVČB izpostavlja zmanjšano raznolikost črevesne flore, ki je opažena pri kadilcih kot tudi pri pasivnem kajenju [30, 58]. Rezultati raziskav kažejo, da je kajenje povezano z večjim tveganjem za CD, v primeru UC pa deluje zaščitniško. [27]

52% bivših kadilcev, pri katerih se pojavi UC, zboli v prvih treh letih po prenehanju kajenja. Bivši kadilci imajo višje tveganje za UC, prenehanje kajenja v času aktivne bolezni pa negativno vpliva na njen potek. Analogno ima ponoven začetek kajenja pozitiven učinek na bolezenske simptome. V splošnem so bolezenski simptomi kadilcev blažji, prav tako je značilno manjša verjetnost hospitalizacije in operativnih posegov. Opažanja kažejo tudi, da je pozitiven učinek kajenja pri UC signifikatno bolj izražen pri moških. [27, 59]

Tveganje za nastanek CD je dvakrat večje pri kadilcih kot pri nekadilcih [60]. Kajenje je povezano tudi z bolj agresivnimi bolezenskimi simptomi, frekvenco komplikacij (npr. fistule), višjo potrebo po steroidih kot tudi z verjetnostjo operativnega posega [29, 60]. Rezultati študij kažejo, da je ponovitev bolezni manjša pri pacientih, ki so prenehali s kajenjem, prav tako je izid kirurških posegov ugodnejši. Iz tega razloga je opuščanje kajenja del terapevtskih strategij. Vpliv kajenja na CD je bolj izrazit pri ženskah. [27]

2.1.5 Profili maščobnih kislin pri KVČB

Več raziskav je opisalo opazne spremembe v profilih maščobnih kislin pri KVČB. Spremembe so opazne tako v krvni plazmi, membranah eritrocitov, maščobnem tkivu kot tudi v črevesni sluznici. Spremenjeni profili so produkt slabe absorpcije hranil v črevesju, vnetij in primarnih abnormalnosti v metabolizmu maščobnih kislin. Pregled literature vezane na profile maščobnih kislin v KVČB je zbran v Tabela 2 - Pregled študij maščobnih kislin pri bolnikih s KVČB.

Tabela 2 - Pregled študij maščobnih kislin pri bolnikih s KVČB

<p>Analiza prostih fosfolipidov in holesterola v krvnem serumu. KVČB je aktivna. [61]</p>	<p>V raziskavi so opazili statistično signifikantno manj celokupnega holesterola in posebej manj LDL pri bolnikih s KVČB. Pri posameznih maščobnih kislinah so bili opaženi le statistični trendi. Med opažanji so bile tudi signifikantne interakcije med parametri. HDL je v obratni korelaciji s vsemi merjenimi vnetnimi indikatorji. Delež arahidonske kisline je v obratnem sorazmerju z rezultati vprašalnika kvalitete življenja, predvsem pri UC. Delež DPA je v obratnem sorazmerju s C-reaktivnim proteinom. Nasičene maščobne kisline so v direktni povezavi s CRP in IL-6.</p>
<p>Analiza fosfolipidov v krvnem serumu in maščobnem tkivu. KVČB je v remisiji ali pa se je prvič pojavila. [62]</p>	<p>V KVČB vzorcih je statistično signifikantno manjši delež ω-3 maščobnih kislin, arahidonske kisline in DHA, medtem ko je bilo opaženo več DPA kot v zdravih kontrolah.</p>
<p>Analiza prostih fosfolipidov v krvnem serumu. KVČB je aktivna. [63]</p>	<p>Analize so v KVČB vzorcih pokazale signifikantno večji delež DHA in alfa-linolenske kisline kot tudi manjši delež DGLA. Raziskava je pokazala korelacijo med deležem ω-6 maščobnih kislin in trajanjem bolezni. Deleži določenih maščobnih kislin so torej časovno odvisni.</p>
<p>Analiza prostih fosfolipidov v krvnem serumu. KVČB je neaktivna. [64]</p>	<p>Raziskava je nadaljevanje zgornje raziskave [63]. Tudi pri bolnikih z neaktivno KVČB so bili opaženi signifikantno višji deleži DHA kisline. Tokrat je bil signifikanten tudi delež nasičenih maščobnih kislin. Primerjava aktivnih in neaktivnih vzorcev je pokazala, da imajo bolniki s aktivno KVČB višji delež vseh ω-6 maščobnih kislin v krvnem serumu.</p>
<p>Analiza prostih fosfolipidov v krvnem serumu. KVČB je aktivna. [65]</p>	<p>Bolniki s KVČB so imeli statistično signifikantno manj arahidonske kisline v krvnem serumu, delež je bil v korelaciji s trajanjem bolezni. Med bolniki, ki so prejeli različna zdravila, niso bile opažene bistvene razlike. Deleži ω-3 maščobnih kislin so ostali normalni ne glede na trajanje bolezni in druge parametre.</p>
<p>Analiza fosfolipidov membran rdečih krvničk. KVČB se je pojavila prvič. [66]</p>	<p>Zaradi blagih simptomov in nedavne diagnoze so vzorci enakovredni tistim z neaktivno KVČB. V eritrocitih bolnikov s KVČB je bilo signifikantno več arahidonske kisline in manj linolne kisline. Spremenjen profil je bolj opazen pri CD kot pri UC.</p>
<p>Analiza fosfolipidov membran rdečih krvničk. KVČB je zmerno aktivna. [67]</p>	<p>V raziskavo so bili vključeni KVČB bolniki z nizko ali zmerno aktivnostjo bolezni. Opažene so bili signifikantno višji deleži vseh ω-6 maščobnih</p>

	kislin. Višji delež linolne kisline je bil opažen le v UC vzorcih.
Analiza fosfolipidov v celicah črevesne sluznice. KVČB je aktivna. [68]	Celice črevesne sluznice v KVČB vzorcih so imele signifikantno večji delež arahidonske kisline. Od 75% do 95% arahidonske kisline se nahaja v membranskih fosfolipidih. Opažen je bil tudi trend nižjih deležev oleinske kisline v KVČB. Jemanje zdravil ni vplivalo na profile maščobnih kislin.
Analiza fosfolipidov v celicah črevesne sluznice. KVČB je aktivna. [69]	KVČB vzorci imajo signifikantno višje deleže daljših ω -6 maščobnih kislin (arahidonska kislina, DPA in DHA) in manjši delež oleinske kisline.
Analiza fosfolipidov v celicah črevesne sluznice v človeku in v mišjih modelih. KVČB je aktivna. [70]	Skladno z prejšnjimi raziskavami so imeli bolniki s KVČB signifikantno večje deleže arahidonske kisline, DPA in DHA ter zmanjšan delež oleinske kisline. Raziskava je pokazala tudi povezave med KVČB in nasičenimi maščobnimi kislinami. Dodatna analiza tkiva bolnikov z neaktivno KVČB je pokazala, da so maščobni profili po vrednostih med kontrolami in aktivnimi vzorci. Razlike med CD in UC so bile opazne a ne signifikantne.
Analiza fosfolipidov v krvni plazmi in črevesni sluznici bolnikov s UC pred in po operacijskem posegu. [71]	Krvni maščobni profil povezan s KVČB izgine po operacijskem posegu v UC, vendar so še vedno opazne spremembe v črevesni sluznici, značilne za to bolezen. Tako je v črevesni sluznici signifikantno večji delež ω -3 kot tudi vseh daljših maščobnih kislin.
Analiza prostih fosfolipidov in vitaminov v krvnem serumu. Vzorci so imeli različno aktivnost KVČB. [72]	Raziskava je pokazala, da je večji masni delež enkrat nenasičenih maščobnih kislin in nižje koncentracije karotenoidov in vitamina C v krvni plazmi bolnikov s KVČB neodvisen od bolezenske aktivnosti in prehrane.

Iz rezultatov raziskav citiranih v zgornji tabeli sledi, da so opazne signifikantne razlike v metabolizmu maščobnih kislin v bolnikih s KVČB tako v času aktivne bolezni kot tudi v času remisije.

Raziskave vezane na plazemske fosfolipide oz. maščobne kisline so pokazale, da je v času aktivne bolezni več proste arahidonske kisline, v času remisije ali nizke aktivnosti pa je le-te manj kot v zdravih vzorcih. Analize eritrocitov so pokazale, da je v času neaktivne ali manj aktivne bolezni delež arahidonske kisline signifikantno višji. Najverjetnejši razlog temu je mobilizacija in migracija arahidonske kisline k tarčnim tkivom za sintezo njenih derivatov.

Ne glede na aktivnost bolezni se KVČB vzorci v splošnem razlikujejo od zdravih po nižjih deležih krajših esencialnih maščobnih kislin (to sta linolna in alfa-linolenska) in višjem deležu daljših maščobnih kislin, z izjemo linolne kisline v UC v japonski populaciji. Glede vloge in trendov sprememb ω -3 maščobnih kislin so rezultati študij nasprotujoči.

2.1.6 Maščobno tkivo

Adipozno oz. maščobno tkivo deluje kot centralni metabolni organ. Belo maščobno tkivo je pomembni energijski rezervoar za druge organe, rjavo maščobno tkivo pa ohranja telesno temperaturo. Z izločanjem hormonov, citokinov in adipokinov regulira energijsko ravnovesje v telesu. Različni okoljski dejavniki lahko sprožijo preoblikovanje maščobnega tkiva, npr. sprememba dieta [73]. Moderno razumevanja maščobnega tkiva poudarja tudi vlogo pri vnetjih in regulaciji določenih poti imunskega sistema preko lastnih makrofagov [74].

Značilen indikator aktivnosti KVČB je postopno ovijanje vnetega črevesja z maščobnim tkivom. To je povezano z mišično hipertrofijo, transmuralnim vnetjem in lokalno tesnenje prebavnega trakta. Kljub temu, da je bil simptom opisan že v začetku prejšnjega stoletja še ni pojasnjen vzrok za migracijo trebušnega maščobnega tkiva k prebavnemu traktu pri KVČB. [75, 76]

Maščobno tkivo ovito okrog črevesja se razlikuje od zdravega mezenteričnega maščobnega tkiva v trebuhu. Adipociti (maščobne celice) so bistveno manjši, njihovo število pa je do štirikrat večje kot v zdravem tkivu. Na molekularnem nivoju imajo spremenjen ekspresijski profil, v splošnem proizvajajo povečane količine citokinov in kemokinov (npr. leptin in adiponektin) in zmanjšane količine protivnetnih mediatorjev, prav tako so manj dovzetni za signale iz okoljskih tkiv. V CD je značilno tudi kopičenje makrofagov asociiranih z adipoznim tkivom. Razlog temu je visoka koncentracija kemokinov, ki povečajo migracijo monocitov in makrofagov v maščobno tkivo, kot tudi sposobnost preoblikovanja adipocitov v makrofage. [75]

Citokini in kemokini, ki jih proizvaja ovito maščobno tkivo, imajo direktni vpliv na potek bolezni. Adipociti okrog črevesja proizvajajo velike količine leptina in adiponektina. Leptin direktno regulira sintezo več citokinov, posebej v T celicah, preko regulacije $\text{INF-}\gamma$ in nekaterih interlevkinov pa vpliva posredno na razmerje med Th1 in Th2 celicami, kar prispeva k patogenezi KVČB. Adiponektin kot tudi leptin povečata stopnjo vnetja v bližnjih tkivih [77, 78], opažene visoke koncentracije adiponektina in leptina v krvnem serumu pa poveča splošno stopnjo vnetja v ožilju in drugih delih telesa [79].

2.1.7 Kardiovaskularnimi simptomi v KVČB

Povezave med kardiovaskularnimi težavami in KVČB so že dolgo znane in več študij je bilo objavljenih na to temo [80-83].

Najpogostejši simptom je ateroskleroza, tj. postopno nalaganje holesterola na stene žil. Pogoj za nastanek ateroskleroze je zmanjšana strukturna integriteta sten krvnih žil, kar je posledica visokih koncentracij citokinov, CRP in homocisteina, kar je značilno za aktivno KVČB. Genetsko nagnjenje k motnjam tesnega stika krovnega tkiva črevesja v KVČB lahko delno prispeva k slabemu stiku med celicami sten krvnih žil [80].

Stopnja koagulacijskih faktorjev je prav tako povečana ob hudih vnetjih v telesu, kar vodi do patogenega nalaganja holesterola na stene žil [81]. Opažanja kažejo tudi na določene podobnosti med krvnim profilom bolnikov s kardiovaskularnimi boleznimi in aktivno KVČB [80].

Ateroskleroza s oženjem žil povzroča povišan krvni pritisk, posredno pa poveča tveganje za srčni infarkt, tromboembolijo, koronarno arterijsko bolezen in cerebrovaskularne bolezni, v KVČB pa tudi tveganje za mezenterično ishemijo [80]. Med naštetimi bolezenskimi stanji je v KVČB posebej pogosta tromboembolija v venah in pljučih. Iz tega razloga so redni pregledi stanja ožilja in uporaba zmernih količin antikoagulantov del modernih terapevtskih strategij za KVČB [83].

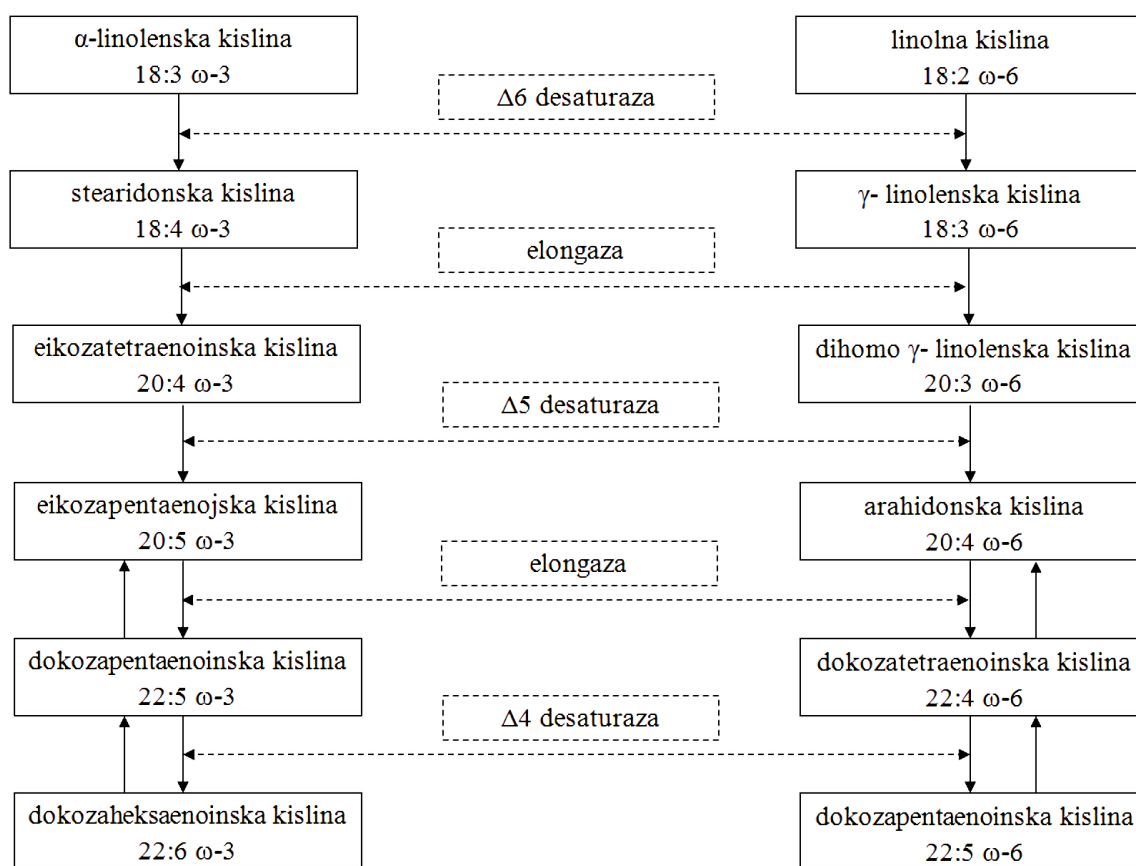
Dodaten razlog za povečano tveganje za kardiovaskularne težave povezane s koagulacijo so najverjetneje opažene spremembe v trombocitih pri bolnikih s KVČB; te so nepopolna oblika diska, prisotnost presvdopodija, povečana velikost, gostota in višja koncentracija prostih trombocitov. Na molekularni ravni proizvajajo preveč molekul, ki so specifične za trombocite, prav tako je opažena povišana gostota receptorjev [84]. Ker so te spremembe signifikantne, so študije preučevale KVČB kot posledico vzajemnih nepravilnosti v imunosti in koagulaciji [85].

2.2 Metabolizem maščobnih kislin

Maščobne kisline so karboksilne kisline, ki jih po lastnostih njihovih alifatskih verig ločimo na nasičene in nenasičene. V biokemiji se dodatno delijo po zadnjem mestu dvojne verige oz. kjer so nazadnje nenasičene, pogoste so ω -3, ω -6 in ω -9 maščobne kisline (npr. ω -3 pomeni, da je zadnja dvojna veriga tri ogljikove atome pred koncem). Pomembna lastnost je tudi število dvojnih verig oz. kolikokrat so nenasičene, v grobem tako ločimo enkrat- in večkrat-nenasičene maščobne kisline. [86-89]

Človeško telo uporablja različne maščobne kisline (in maščobe) kot osnovni gradnik celičnih membran (fosfolipidni dvosloj), vir energije, transport snovi in za sintezo bioaktivnih snovi, večina teh spada med eikozanoide. Eikozanoidi so derivati arahidonske, dihomo- γ -linolenske in eikosapentanojske kisline, ki delujejo kot signalne molekule v velikem številu telesnih procesov, posebej pa v vnetjih. [90, 91]

Slika 3 - Shema elongacije in desaturacije ω -3 in ω -6 maščobnih kislin; povzeto po [92] prikazuje osnovni metabolizem ω -3 in ω -6 esencialnih maščobnih kislin. Najpomembnejša procesa sta podaljševanje z elongazami (geni *ELOVL*) in oblikovanje novih dvojnih vezi oz. nastanek nenasičenih mest s maščobno kislinskimi desaturazami (geni *FADS*).



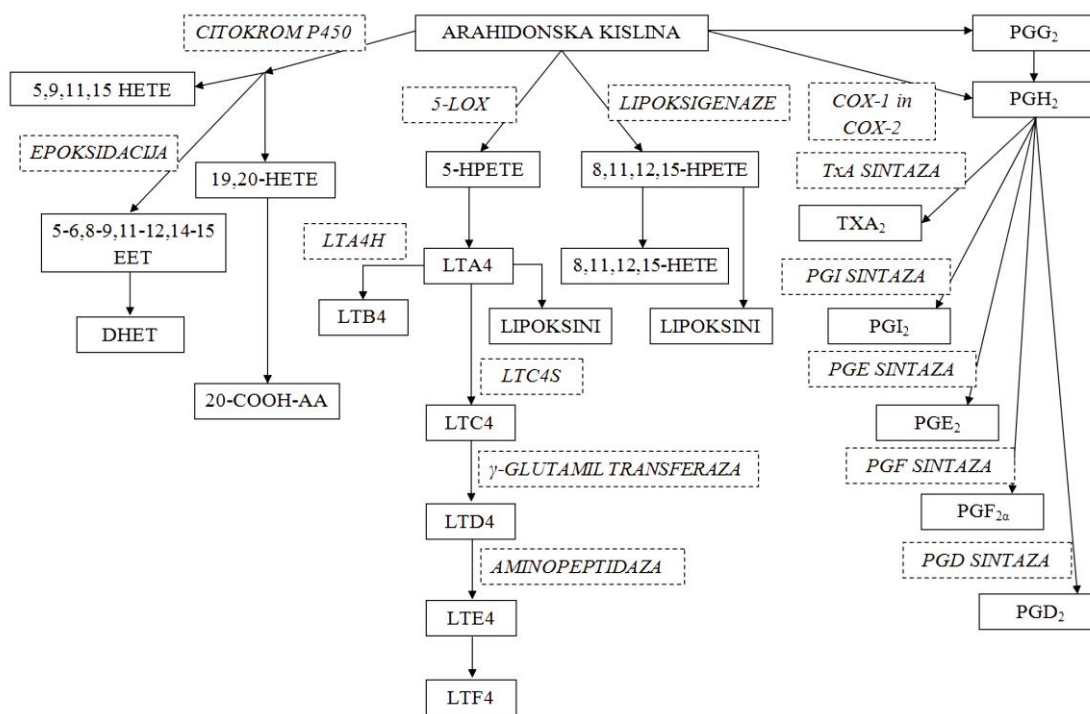
Slika 3 - Shema elongacije in desaturacije ω -3 in ω -6 maščobnih kislin; povzeto po [92]

Arahidonska kislina (vključno z njenimi derivati) je izmed vseh maščobnih kislin, ki delujejo v človeškem telesu najpomembnejša za iniciacijo in propagacijo vnetij [93, 94]. Predela se namreč v:

- prostaglandine
- levkotriene
- tromboksane
- lipoksine
- eoksine
- hepoksiline
- anandamid

Izmed zgoraj naštetih eikozanoidov so v raziskavah patogeneze pogostih kroničnih bolezni najpogosteje omenjeni prostaglandini in levkotrieni, predvsem zaradi njihovega vnetnega in imunskega delovanja. Tako delujejo oboji na imunski sistem preko npr. Th1 (ang. T helper 1) in Th17 (ang. T helper 17) celic, tudi z modulacijo razmerja med njimi [95-99].

Slika 4 - Shema sinteze derivatov arahidonske kisline; povzeto po [100] prikazuje poenostavljeno shemo metabolizma arahidonske kisline do njenih končnih derivatov in encime, ki sodelujejo v teh procesih.



Slika 4 - Shema sinteze derivatov arahidonske kisline; povzeto po [100]

Analogni in sorodni encimi po vzporednih poteh predelujejo druge maščobne kisline (npr. dihomo- γ -linolensko in eikosapentanojsko kislino) v bioaktivne molekule, ki prav tako sodelujejo pri različnih procesih [88, 90, 91].

V Tabela 3 - Pregled ω -3 in ω -6 maščobnih kislin so zbrani podatki o ω -3 in ω -6 maščobnih kislinah v človeškem telesu. [90, 92]

Tabela 3 - Pregled ω -3 in ω -6 maščobnih kislin

Linolna kislina C18:2 (9,12)c	Kratka esencialna ω -6 maščobna kislina.
Konjugirana linolna kislina	Izomeri linolne kisline. Človeška črevesna flora jo sintetizira v debelem črevesu, prisotna je tudi v mlečnih izdelkih. Sodeluje pri regulaciji vnetnih sistemov in imunske tolerance na črevesno floro. [101-104]
γ -linolenska kislina C18:3 (6,9,12)c	ω -6 maščobna kislina. Nastane iz linolne kisline. Višje koncentracije te maščobne kisline so povezane z zmanjšanimi levkotrieni, najverjetneje preko delovanja na 5-lipoksigenazo. [105]
Dihomo- γ -linolenska kislina C20:3(8,11,14)c	ω -6 maščobna kislina. Nastane iz γ -linolenske kisline. Iz nje se sintetizirajo eikozanoidi, ki delujejo primarno protivnetno.
Arahidonska kislina C20:4 (5,8,11,14)c	Esencialna ω -6 maščobna kislina. Nastane iz dihomo- γ -linolenske kisline. Iz nje se sintetizirajo številni eikozanoidi, ki delujejo primarno vnetno. Kot metabolit je pomembna tudi pri nevroloških procesih.
Adrenska kislina C22:4 (7,10,13,16)c	ω -6 maščobna kislina. Nastane iz arahidonske kisline, v katero se lahko pretvori tudi nazaj. Njena vloga v razvoju in funkciji možganov še ni podrobno raziskana. [52, 54, 106, 107]
Osbondova kislina C22:5 ω -6	ω -6 maščobna kislina. Nastane iz adrenske kisline, v katero se lahko pretvori tudi nazaj. Njena biološka vloga ostaja nejasna.
α -linolenska kislina C18:3 (9,12,15)c	Kratka esencialna ω -3 maščobna kislina.
Stearidonska kislina C18:4 (6,9,12,15)c	ω -3 maščobna kislina. Nastane iz α -linolenske kisline. Zaradi ugodnih kemijskih lastnosti in biološke dostopnosti je dober vir ω -3 maščobnih kislin.
Eikozatetraenoinska kislina C20:4 (8,11,14,17)c	ω -3 maščobna kislina. Nastane iz stearidonske kisline. S delovanjem na lipoksigenazo in ciklooksigenazo arahidonske kisline ima protivneten značaj.
Eikozapentaenoinska kislina C20:5 (5,8,11,14,17)c	ω -3 maščobna kislina. Nastane iz eikozatetraenoinske kisline. Iz nje se sintetizirajo eikozanoidi, ki imajo značilen protivneten učinek.
Dokozapentaenoinska kislina C22:5 (7,10,13,16,19)c	ω -3 maščobna kislina. Nastane iz eikozapentaenoinske kisline, v katero se lahko pretvori tudi nazaj. Iz nje se sintetizira prva skupina resolvinov, ki razrešijo procese, povzročene zaradi eikozanoidov.
Dokozaheksaenoinska kislina C22:6 (4,7,10,13,16,19)c	ω -3 maščobna kislina, nekateri viri jo navajajo kot esencialno. Nastane iz dokozapentaenoinske kisline, v katero se lahko pretvori tudi nazaj. Iz nje se sintetizira druga skupina resolvinov, ki razrešijo procese, povzročene zaradi eikozanoidov. DHA deluje tudi samostojno na imunske celice, predvsem na dendritske. [108-110]

2.2.1 Direktno delovanje prostih maščobnih kislin

Proste maščobne kisline lahko samostojno delujejo na potek človeških življenjskih procesov preko določenih receptorjev, npr. PPAR γ , TLR4 in FFAR4. V nadaljevanju so na kratko v splošnem opisani PPAR, TLR in FFAR receptorji.

2.2.1.1 PPAR

Peroksisom-profilator-aktivirani receptorji so jedrni receptorji. PPAR so proteini, ki delujejo tako kot transkripcijski faktorji sposobni vezave na DNK in regulacije genske ekspresije; delujejo tudi kot receptorji znotraj celice z vezavo ligandov. Za PPAR so ligandi maščobe, predvsem maščobne kisline in derivati. Sprva je bila dokazana le vloga PPAR receptorjev v sintezi lipidov in energijski bilanci, pozneje so raziskave pokazale, da imajo vlogo v vnetnih procesih, kjer delujejo maščobne kisline in njihovi derivati. [111]

Pri človeku poznamo tri takšne receptorje, to so:

- PPAR α
- PPAR β , imenovan tudi PPAR δ
- PPAR γ

Ti trije receptorji se razlikujejo predvsem po vrsti ligandov, na katere se odzovejo. Tako se npr. na levkotrien B4 odzove le PPAR α , PPAR γ pa se ne veže z nasičenimi maščobnimi kislinami, za razliko od ostalih dveh. [111]

PPAR γ je izmed teh treh najbolj preiskovan, ker ima večjo vlogo v vnetnih procesih in je povezan s patogenezo določenih kompleksnih bolezni. Povezan je s KVČB preko sodelovanja z NF- κ B (nuklearni faktor κ B) in vlogo v sintezi in regulaciji nekaterih interlevkinov in tumor nekroznega faktorja α [112, 113]. V KVČB lahko pojasnimo terapevtsko delovanje konjugirane linolne kisline z njenim inhibitorским delovanjem na PPAR γ v makrofagih [101, 102, 104].

Pri drugih bolezenskih stanjih je poudarjeno njegovo delovanje v makrofagih in adipocitih, kjer regulira sintezo kemokinov; PPAR γ je povezan tudi s stopnjo stresa na endoplazemskem retikulumu in ekspresijskimi potmi, v katerih delujejo TLR receptorji [17, 114].

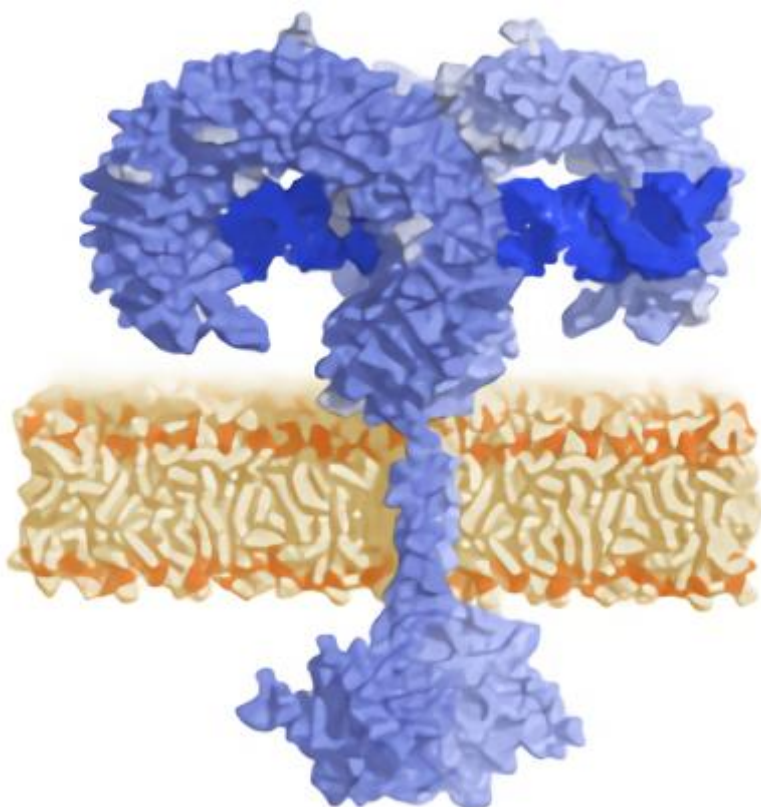
2.2.1.2 TLR

TLR (ang. Toll-like receptor) so receptorji v celični membrani, katerih primarna funkcija je prepoznavanje patogenov, predvsem mikrobnih. Pri človeku poznamo deset različnih TLR receptorjev. Najbolj so izraženi v črevesju, kjer prepoznavajo patogene mikrobnе molekule v črevesni sluznici in tako sprožijo imunski odziv v primeru kontaminacije črevesne flore. V patogenem smislu so genetski defekti v genih, ki kodirajo TLR, povezani predvsem s KVČB. Raziskani so sledeči vplivi [115]:

- defekti v TLR4 povečajo tveganje za KVČB
- defekti v TLR5 zmanjšajo tveganje za KVČB
- defekti v TLR9 povečajo tveganje za CD
- defekti v TLR1 in TLR2 povečajo tveganje za UC

Izmed izpostavljenih TLR genov je posebej zanimiv *TLR4*, saj se njegova signalna pot močno prekriva z ostrimi vnetnimi in imunskimi odzivi, prav tako pa ima pomembno vlogo pri oblikovanju tolerance na črevesno floro [115, 116]. *TLR4* se odzove na bakterijske lipopolisaharide, kot tudi na nasičene maščobne kisline, ki preko njega aktivirajo ciklooksigenazo (COX-2) in s tem sintezo vnetnih prostaglandinov [117].

Slika 5 - Proteinska struktura skupna TLR receptorjev; povzeto po [118] prikazuje skupno proteinsko strukturo TLR receptorjev.



Slika 5 - Proteinska struktura skupna TLR receptorjev; povzeto po [118]

2.2.1.3 FFAR

FFAR (ang. free fatty acid receptor) so skupina celičnih receptorjev, katerih ligandi so proste maščobne kisline. Pojavljajo se v različnih tkivih in sodelujejo v procesih, kot so npr. sinteza in regulacija sinteze maščob in maščobnih kislin, vnetja, inzulinski signalizaciji, regulaciji določenih želodčnih procesov (npr. sproščanje želodčnih peptidov) kot tudi v procesu okušanja [119].

V tej skupini celičnih receptorjev je najpogosteje raziskan FFAR4 zaradi vloge v vnetjih v številnih celičnih linijah. Nanj delujejo ω -3 maščobne kisline, predvsem α -linolenska kislina, eikozapentaenoinska kislina (EPA) in dokozaheksaenoinska kislina (DHA).

V makrofagih DHA vpliva na ekspresijo ciklooksigenaze preko FFAR4, s tem zavira proizvodnjo vnetnih prostaglandinov iz arahidonske kisline [109, 120]. V krovnem tkivu tankega čreva se FFAR4 odzove na maščobne kisline iz hrane in regulira imunost in vnetja v črevesni sluznici, kar bi razložilo samostojno protivnetno delovanje ω -3 maščobne kisline v KVČB [121].

3 Eksperimentalni del

3.1 Precizen pregled literature

Za načrtovanje poteka magistrske naloge, potrditve smiselnosti rezultatov bioinformatične analize in oblikovanje razlage rezultatov je bil potreben precizen pregled obstoječe literature in ciljno iskanje ključnih študij, ki upravičijo raziskovanje v izbrano smer. Pri iskanju sem največkrat uporabil sledeče ključne besede in njihove logične kombinacije:

- kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) (ang. inflammatory bowel disease - IBD)
 - Crohnova bolezen (ang. Crohn's disease)
 - ulcerozni kolitis (ang. ulcerative colitis)
- maščobne kisline (ang. fatty acids)
 - proste maščobne kisline (ang. free fatty acids)
 - profil maščobnih kislin (ang. fatty acid profile)
 - krvne maščobe (ang. blood lipids)
 - arahidonska kislina (ang. arachidonic acid)
 - dihomo- γ -linolenska kislina (ang. dihomo- γ -linolenic acid)
- eikozanoidi (ang. eicosanoids)
 - prostaglandini (ang. prostaglandins)
 - levkotrieni (ang. leukotriene)

3.2 Bioinformatična analiza

Bioinformatična analiza je katerakoli statistična analiza, ki uporablja biološke parametre. V primeru te magistrske naloge so bili biološki parametri genotipski podatki s SNP mikromreže ImmunoChip in deleži maščobnih kislin v membranah rdečih krvničk (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) zdrave kontrolne skupine in bolnikov s KVČB.

Analiza je potekala v več stopnjah:

- priprava pravilnega formata podatkov
- avtomatizacija analiznih postopkov
- kvantitativna asociacijska analiza
- groba orientacijska meta analiza podatkov
- oblikovanje signalnih šopov na osnovi LD-ja
- preverjanje ustreznosti podatkov s permutacijami
- izbira tarčnih signalov s pomočjo literature in heuristike

3.2.1 ImmunoChip

ImmunoChip je SNP mikromreža, ki jo je podjetje Illumina Infinium leta 2009 oblikovalo na osnovi genskih področij povezanih z imunsko-posredovanimi boleznimi. Med njimi so primarna bilijarna ciroza, diabetes tipa 1, avtoimunska bolezen ščitnice, revmatoidni artritis, Crohnova bolezen, luskavica in ankilozirajući spondilitis. Čip obsega več kot 200.000 SNP-jev po celotnem genomu. S tem čipom je bilo genotipiziranih več kot 200 slovenskih bolnikov s KVČB in 200 zdravih posameznikov.

3.2.2 Programska oprema

3.2.2.1 PLINK

PLINK je brezplačen odprt set programskih orodij za študije celotnega genoma. V času izvajanja bioinformacijskih analiz je bila najnovejša dostopna različica v1.90b3.33, ki sem jo tudi uporabljal. PLINK je zelo močno in optimirano orodje, ki opravi tudi širše preproste analize v sekundah, redkeje minutah. Izjema so analize z več permutacijami, ki so dolgotrajne tudi za trenutno zelo zmogljive procesorje.

Kvantitativne asociacijske študije celotnega genoma v PLINK so v osnovi nekoliko modificirani Wald testi. Primerjalna regresijska kvantitativna asociacijska študija celotnega genoma je le preprosta primerjava regresijskih koeficientov dveh ali več skupin, uporablja se s namenom iskanja razlik med skupinami vzorcev.

3.2.2.2 Haploview

Haploview je brezplačna odprta programska oprema napisana v Java jeziku, ki nudi širši spekter orodij, pogosto uporabljenih v molekularni biologiji in genetiki. Za namen te magistrske naloge se je uporabljal za orientacijski izris Manhattan grafov in tudi za risanje LD trikotnikov za končne izbrane signale.

3.2.2.3 R

R je brezplačno programsko okolje za statistično računanje in risanje. Znotraj njega sem uporabil paket "qqman", s katerim sem risal precizne Manhattan grafe iz dobljenih rezultatov kvantitativne asociacijske študije celotnega genoma.

4 Rezultati in diskusija

4.1 Presek literature

Tarčni članki pri iskanju literature so bile raziskave celotnega genoma, vezane na KVČB in/ali maščobne kisline oz. maščobe. Prva obsežna GWA študija je identificirala 163 genskih območij povezanih s patogenezo KVČB, naslednja študija je našla še 38 novih območij, tako da je število KVČB genov 201 [1, 2].

GWA študije, ki so proučevale deleže maščobnih kislin v zvezi z genomom so velikokrat vezane na kardiovaskularne bolezni, npr. ateroskleroza. Našel sem devet takšnih GWA študij. Skupino genov, ki so jih povezale z maščobnimi kislinami oz. maščobami, sem primerjal s 201 KVČB geni. Geni v preseku so prikazani v Tabela 4 - Presek med 201 KVČB geni in izbranimi GWA študijami.

Tabela 4 - Presek med 201 KVČB geni in izbranimi GWA študijami

RAZISKAVA	GEN	<i>p</i> vrednost in signifikanten biološki parameter
<p><i>Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids.</i> [122]</p> <p>100184 vzorcev; zdrave kontrole in bolniki s kardiovaskularni boleznimi. Biološki parametri so trigliceridi, holesterol in delež LDL in HDL. Identificiranih 95 genov. Verjetnost naključnega pokrivanja 11 med skupinama z 201 in 95 geni: $p = 6.69 \times 10^{-10}$</p>	<i>GCKR</i>	p (trigliceridi) = 5.68×10^{-133} p (holesterol) = 7.31×10^{-27}
	<i>ABCG5</i>	p (holesterol) = 1.18×10^{-19} p (LDL) = 1.11×10^{-23}
	<i>SLC39A8</i>	p (HDL) = 7.20×10^{-11}
	<i>HLA</i>	p (trigliceridi) = 1.60×10^{-15} p (LDL) = 2.40×10^{-15} p (holesterol) = 3.96×10^{-19}
	<i>FADS</i>	p (holesterol) = 2.08×10^{-22} p (LDL) = 1.17×10^{-21} p (HDL) = 1.50×10^{-22} p (trigliceridi) = 5.41×10^{-24}
	<i>STARD3</i>	p (HDL) = 2.84×10^{-14}
	<i>TRIB1</i>	p (holesterol) = 5.02×10^{-36} p (LDL) = 2.59×10^{-29} p (HDL) = 6.35×10^{-19} p (trigliceridi) = 3.29×10^{-55}
	<i>USP1</i>	p (holesterol) = 4.90×10^{-41} p (LDL) = 2.63×10^{-18} p (trigliceridi) = 8.84×10^{-43}
	<i>CEP250</i>	p (holesterol) = 3.82×10^{-10}
	<i>HNF4A</i>	p (holesterol) = 5.72×10^{-13} p (HDL) = 1.05×10^{-15}
<i>NEURL2</i>	p (HDL) = 1.90×10^{-22} p (trigliceridi) = 4.69×10^{-18}	
<p><i>Discovery and refinement of loci associated with lipid levels.</i> [123]</p> <p>Več kot 196000 vzorcev; zdrave kontrole in bolniki s kardiovaskularni boleznimi. Biološki parametri so trigliceridi, holesterol in delež LDL in HDL. Identificiranih 157 genov. Verjetnost naključnega pokrivanja 7 med skupinama z 201 in 157 geni:</p>	<i>ABCG5</i>	p (LDL) = 3×10^{-73}
	<i>HLA</i>	p (holesterol) = 1×10^{-21}
	<i>CEP250</i>	p (trigliceridi) = 5×10^{-11}
	<i>GCKR</i>	p (trigliceridi) = 3×10^{-42}
	<i>TRIB1</i>	p (trigliceridi) = 1×10^{-107}
	<i>FADS</i>	p (trigliceridi) = 2×10^{-39}
	<i>STARD3</i>	p (HDL) = 3×10^{-17}

$p = 3.99 \times 10^{-4}$		
<p><i>Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum.</i> [124]</p> <p>1644 vzorcev iz KORA študije. Biološki parametri so 363 metabolitov, med njimi 208 maščobnih.</p> <p>Po statistični obdelavi je ostal signifikanten le FADS1 gen za maščobne parametre.</p>	<i>FADS1</i>	p (arahidonska kislina) = 5.30×10^{-7}
<p><i>Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI Study.</i> [92]</p> <p>1075 vzorcev iz InCHIANTI študije in 1076 vzorcev iz GOLDN študije. Biološki parametri so deleži večkrat nenasičenih maščobnih kislin v krvni plazmi.</p> <p>Po statistični obdelavi sta ostala signifikantna dva signala.</p>	<i>FADS</i>	p (arahidonska kislina) = 5.95×10^{-46}
<p><i>Genetic loci associated with plasma phospholipid n-3 fatty acids: a meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE Consortium.</i> [125]</p> <p>8866 vzorcev iz CHARGE študije. Biološki parametri so deleži ω-3 večkrat nenasičenih maščobnih kislin v krvni plazmi.</p> <p>Po statistični obdelavi so ostali signifikantni trije signali.</p>	<i>FADS</i>	p (α -linolenska kislina) = 3×10^{-64}
	<i>GCKR</i>	p (eikozapentaenoinska kislina) = 5×10^{-58}
	<i>AGPAT3</i>	p (dokozaheksaenoinska kislina) = 1×10^{-15}
<p><i>Genome-wide association study of plasma N6 polyunsaturated fatty acids within the cohorts for heart and aging research in genomic epidemiology consortium.</i> [126]</p> <p>8631 vzorcev; po izvoru: 3269 iz ARIC, 1507 iz CARDIA, 2404 iz CHS, 1075 iz InCHIANTI in 707 iz MESA študije</p> <p>Biološki parametri so deleži ω-6 večkrat nenasičenih maščobnih kislin v krvni plazmi.</p>	<i>FADS</i>	p (γ -linolenska kislina) = 2.3×10^{-72} p (dihomo- γ -linolenska kislina) = 2.6×10^{-151} p (adrenska kislina) = 6.3×10^{-140}

Po statistični obdelavi je ostalo signifikantnih pet signalov.		
<p><i>A genome-wide association study of saturated, mono- and polyunsaturated red blood cell fatty acids in the Framingham Heart Offspring Study.</i>[89]</p> <p>2633 vzorcev iz Framingham Heart Offspring študije. Biološki parametri so deleži maščobnih kislin v membranah rdečih krvnih celic. Identificiranih je 191 SNP-jev.</p>	<i>FADS</i>	p (dihomo- γ -linolenska kislina) = 3.29×10^{-305}
<p><i>Genome-wide association study identifies novel loci associated with circulating phospho- and sphingolipid concentrations.</i> [127]</p> <p>4034 vzorcev; zdrave kontrole in bolniki s kardiovaskularni boleznimi iz več študij različnega etničnega izvora. Biološki parametri so fosfolipidov v plazmi. Identificiranih je 14 genov. Verjetnost naključnega pokrivanja 2 med skupinama z 201 in 14 geni: $p = 6.23 \times 10^{-3}$</p>	<i>KCNH7</i>	p (fosfolipidi) = 2.27×10^{-202}
	<i>GCKR</i>	p (fosfolipidi) = 1.72×10^{-09}
<p><i>Abundant genetic overlap between blood lipids and immune-mediated diseases indicates shared molecular genetic mechanisms.</i> [128]</p> <p>Več kot dvesto tisoč vzorcev; zdrave kontrole in bolniki s kronično vnetno črevesno boleznijo, revmatoidnim artritisom, diabetesom tipa 1, celiakija, luskavico ali sarkoidozo. Biološki parametri so trigliceridi, holesterol in delež LDL in HDL ter nekateri imunološki parametri. Identificiranih je bilo 88 trigliceridnih lokusov, 87 LDL lokusov in 52 HDL lokusov. Verjetnost naključnega pokrivanja 12 med skupinama s 201 in 88 geni: $p = 1.56 \times 10^{-11}$ Verjetnost naključnega pokrivanja 10 med skupinama s 201 in 87 geni: $p = 4.36 \times 10^{-9}$ Verjetnost naključnega pokrivanja 11 med skupinama s 201 in 52 geni: $p = 7.40 \times 10^{-13}$</p>	<i>USP1</i>	Fosfolipidi; LDL
	<i>FOSL2</i>	Fosfolipidi
	<i>BRE</i>	Fosfolipidi
	<i>SLC39A8</i>	Fosfolipidi
	<i>IL22</i>	Fosfolipidi
	<i>GCKR</i>	Fosfolipidi
	<i>C6orf15</i>	Fosfolipidi
	<i>HLA</i>	Fosfolipidi; LDL; HDL
	<i>C6orf10</i>	Fosfolipidi
	<i>TRIB1</i>	Fosfolipidi; LDL; HDL
	<i>FADS</i>	Fosfolipidi; LDL; HDL
	<i>MMP9</i>	Fosfolipidi; HDL
	<i>SLC22A1</i>	LDL
	<i>CDKN2D</i>	LDL
	<i>SLC44A2</i>	LDL
	<i>FUT2</i>	LDL
	<i>HNF4A</i>	LDL
<i>BTNL2</i>	LDL	
<i>RFT1</i>	HDL	
<i>RSPO3</i>	HDL	
<i>IKZF1</i>	HDL	
<i>PCNXL3</i>	HDL	
<i>RPAP1</i>	HDL	
<i>SMPD3</i>	HDL	
<i>STARD3</i>	HDL	

Geni oz. genska območja, ki se v preseku nabora genov iz GWA študij večkrat pojavljajo, so sledeči: FADS regija, HLA regija, GCKR, TRIB1 in AGPAT3.

4.2 Bioinformacijska analiza

Pred bioinformacijsko analizo sem naredil preprosto statistično primerjavo med kontrolnimi in bolezenskimi vzorci. Statistično najbolj signifikantne razlike so opazne pri arahidonski kislini kot tudi pri vsoti vseh ω -6 maščobnih kislin. Ugotovitve se skladajo s tujimi študijami, ki so proučevale krvne profile maščobnih kislin v bolnikih s KVČB.

Zaradi velike količine podatkov (169548 SNP-jev s čipa; 46 bioloških parametrov za 132 oseb) je pravilno formatiranje osnova uspešne bioinformacijske analize. Podatki bioloških parametrov izvirajo direktno iz doktorskega dela Zdenke Cenčič Kodbe [129] ali pa so izračunane iz njih. Oblikovanih je bilo več vzporednih datotek, tako je program vsakič opravil točno eno analizo za en set podatkov. V Tabela 5 - Seznam bioloških parametrov so zbrani uporabljeni biološki parametri.

Tabela 5 - Seznam bioloških parametrov

ŠT.	BIOLOŠKI PARAMETER
1	Miristinska kislina
2	Pentadekanojska kislina
3	Palmitinska kislina
4	Palminat
5	Palmitoleinska kislina
6	Margarinska kislina
7	Stearinska kislina
8	Stearat
9	Vsota vseh enkrat nenasičenih trans maščobnih kislin
10	Oleinska kislina
11	cis-Vakcenska kislina
12	Linolna kislina
13	Arahidinska kislina
14	(9E,12Z,15E)-9,12,15-oktadekatrienojska kislina
15	γ -linolenska kislina
16	Gondoinska kislina
17	alfa-Linolenska kislina
18	Stearidonska kislina
19	Eikozadienoinska kislina
20	Behenska kislina
21	dihomo- γ -linolenska kislina
22	Erukinska kislina
23	Arahidonska kislina
24	Eikozapentaenoinska kislina
25	Lignocerinska kislina
26	Nervonska kislina
27	Adrenska kislina
28	Osbondova kislina
29	Dokozapentaenoinska kislina (DPA)

30	Dokozaheksaenoinska kislina (DHA)
31	Nasičene maščobne kisline (SA)
32	Enkrat nenasičene maščobne kisline (MUFA)
33	Večkrat nenasičene maščobne kisline (PUFA)
34	Trans-maščobne kisline
35	Razmerje med enkrat nenasičenimi in nasičenimi maščobnimi kislinami
36	Razmerje med enkrat in večkrat nenasičenimi maščobnimi kislinami
37	ω -3 maščobne kisline
38	ω -6 maščobne kisline
39	Razmerje med ω -3 in ω -6 maščobnimi kislina
40	Vsota vseh esencialnih maščobnih kislin
41	Ocena aktivnosti FADS2 oz. razmerje med dihomo- γ -linolensko in linolno kislino
42	Ocena aktivnosti FADS1 oz. arahidonsko in dihomo- γ -linolensko kislino
43	Ocena aktivnosti SCD oz. razmerje med palmitoleinsko in palmitinsko kislino
44	Alternativna ocena aktivnosti SCD oz. razmerje med oleinsko in stearinsko kislino
45	Ocena aktivnosti ELOVL oz. adrensko in arahidonsko kislino
46	Alternativna ocena aktivnosti FADS2 oz. razmerje med γ -linolensko in dihomo- γ -linolensko kislino

Število načrtovanih kvantitativnih asociacijskih analiz je bilo 184, zato sem ob velikem številu komandnih vrstic oblikoval BAT datoteke, s katerimi sem proces poenotil in pospešil. V Tabela 6 - Ponavljajoči se vzorec komandnih vrstic za kvantitativne asociacijske študije je prikazan ponavljajoči se vzorec komandnih vrstic za program PLINK, s katerimi so bile opravljene kvantitativne analize.

Tabela 6 - Ponavljajoči se vzorec komandnih vrstic za kvantitativne asociacijske študije

Vrsta študije	Vzorec komandnih vrstic brez poti datotek
Kvantitativna asociacijska študija (QASSOC)	plink --fam --bed --bim --assoc --qt-means
Primerjalna regresijska kvantitativna asociacijska študija (GXE)	plink --fam --bed --bim --gxe --covar

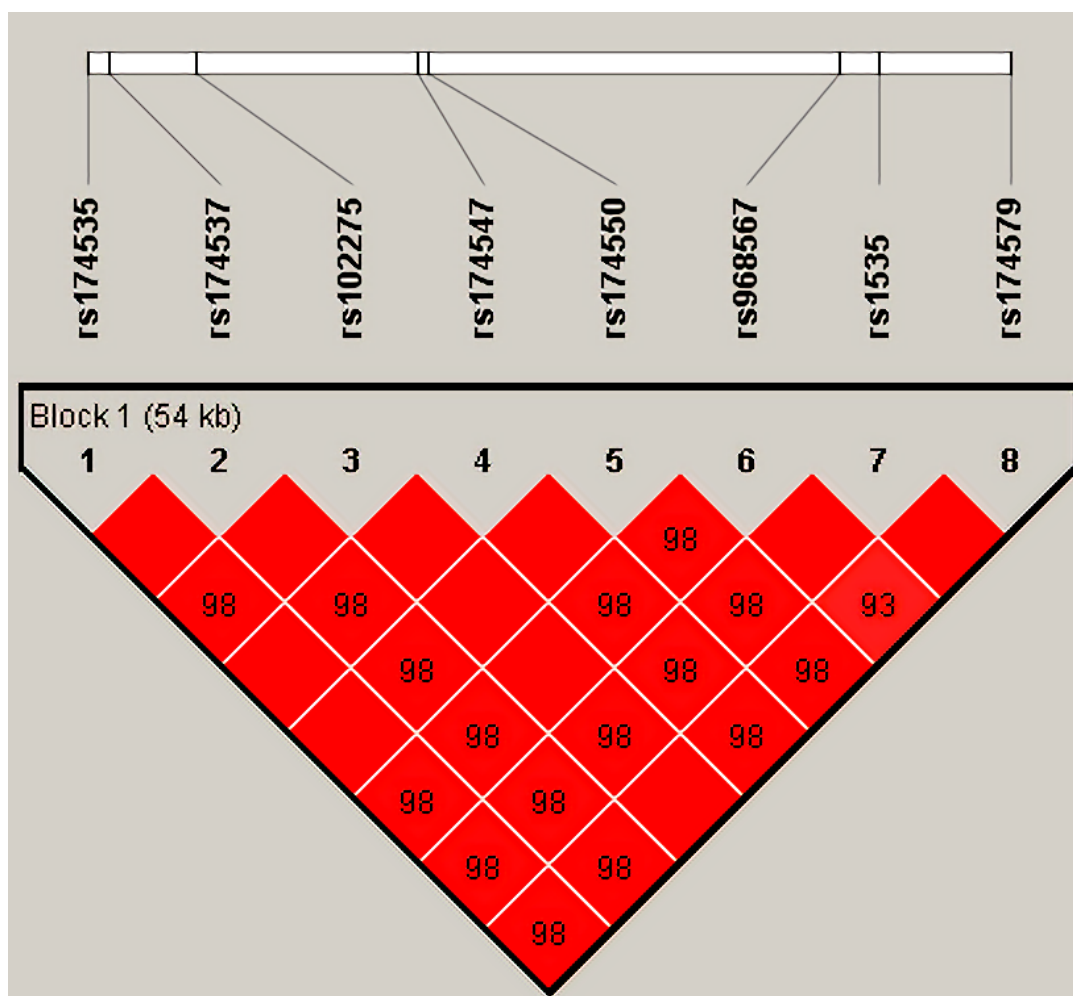
Opravljene so bile tri preproste kvantitativne asociacijske študije, ena za kontrolno skupino, ena za KVČB skupino in ena za vse vzorce skupaj. Četrta študija je bila primerjalna regresijska kvantitativna asociacijska študija, ki preprosto primerja regresijske koeficiente med vzorci, v tem primeru razlike med kontrolami in KVČB vzorci.

Količina rezultatov je bila precejšnja, iz tega razloga groba orientacijska meta analiza, ki p vrednosti vzporednih raziskav združi, ni zadostovala za izbiro ključnih signalov. Tudi Manhattan grafi, ki jih je izrisal Haploview oz. pozneje R, niso dovolj natančni za izbiro ključnih signalov. Iz tega razloga sem znotraj programske opreme PLINK uporabil ukaz "--clump", ki na osnovi izračunanega vezavnega neravnovesja (LD, ang. linkage disequilibrium) oblikuje šope SNP-jev, ki so po lokaciji blizu in se zelo pogosto skupaj dedujejo. Podobno kot za kvantitativne analize sem oblikoval BAT datoteke, katerih ponavljajoči se vzorec je prikazan v Tabela 7 - Ponavljajoči se vzorec komandnih vrstic za oblikovanje šopov SNP-jev.

Tabela 7 - Ponavljajoči se vzorec komandnih vrstic za oblikovanje šopov SNP-jev

Vrsta študije	Vzorec komandnih vrstic brez poti datotek
Kvantitativna asociacijska študija (QASSOC)	plink --fam --bed --bim --clump --clump-verbose
Primerjalna regresijska kvantitativna asociacijska študija (GXE)	plink --fam --bed --bim --clump --clump-field P_GXE --clump-verbose

Za dodatno potrditev veljavnosti podatkov (predvsem p vrednosti) sem ponovil analize s permutacijami, ki so dale p vrednosti z minimalno in dopustno razliko. Nato sem še preveril ali je PLINK pravilno izračunal LD in oblikoval šope; to sem storil s Haploview programsko opremo, ki je izrisala LD trikotnike, primer je na Slika 6 - LD graf za FADS regijo.



Slika 6 - LD graf za FADS regijo

Izbira ključnih signalov je bila opravljena na osnovi heuristike in s pomočjo pregledane literature. Izločili so se osamljeni SNP-ji, ki niso oblikovali šopa, nato so bili razvrščeni po p vrednostih, po biokemijski relevanci in po raziskanih haplotipskih blokih, če ti obstajajo. Končni seznam SNP-jev je zbran v Tabela 8-Tabela 24.

Tabela 8 - Seznam SNP-jev v FADS regije pri DGLA in vseh vzorcih; QASSOC

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs174535	MYRF	8.85×10^{-7}	večji delež DGLA
rs174537	MYRF	6.84×10^{-7}	
rs102275	TMEM258	2.9×10^{-6}	
rs174547	FADS1	8.85×10^{-7}	
rs174550	FADS1	8.85×10^{-7}	
rs968567	FADS2	8.98×10^{-7}	
rs1535	FADS2	6.84×10^{-7}	
rs174579	FADS2	3.35×10^{-6}	

Tabela 9 - Seznam SNP-jev v prvem PTGER4 signalu pri oleinski kislini in vseh vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs115113641	PTGER4	2.46×10^{-5}	manjši delež oleinske
rs74372174	PTGER4	1.88×10^{-4}	
rs74570089	PTGER4	1.88×10^{-4}	

Tabela 10 - Seznam SNP-jev v drugem PTGER4 signalu pri DPA in vseh vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs16870224	PTGER4	8.05×10^{-5}	večji delež DPA
rs79272198	PTGER4	3.33×10^{-4}	
rs6451534	PTGER4	3.33×10^{-4}	
rs4957341	PTGER4	3.33×10^{-4}	

Tabela 11 - Seznam SNP-jev v PTGER4 signalu pri DHA in vseh vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs115113641	PTGER4	2.46×10^{-5}	večji delež DHA
rs74372174	PTGER4	1.88×10^{-4}	
rs74570089	PTGER4	1.88×10^{-4}	

Tabela 12 - Seznam SNP-jev v SPRED2 signalu pri γ -linolenski kislini in vseh vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs268120	SPRED2	6.52×10^{-5}	zmanjšan delež γ -linolne kisline
rs7583793	SPRED2	4.26×10^{-3}	
rs34158596	SPRED2	2.57×10^{-3}	
rs13022819	SPRED2	2.12×10^{-3}	
rs12623455	SPRED2	2.12×10^{-3}	
rs11687598	SPRED2	2.12×10^{-3}	
rs268134	SPRED2	6.52×10^{-5}	
rs59173238	SPRED2	2.12×10^{-3}	
rs3732102	SPRED2	2.12×10^{-3}	
rs6740462	LOC440867	1.88×10^{-3}	

Tabela 13 - Seznam SNP-jev v SPRED2 signalu pri γ -linolenski kislini in kontrolnih vzorcih; QASSOC

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs1876518	SPRED2	2.32×10^{-5}	zmanjšan delež γ -linolne kisline
rs2271198	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs7581149	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs10188563	SPRED2	1.01×10^{-3}	
rs10186240	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs7559283	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs1396210	SPRED2	8.38×10^{-5}	
rs6738087	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs906578	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs268122	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs174847	SPRED2	2.32×10^{-5}	
rs11689314	SPRED2	2.32×10^{-5}	
rs1194849	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs268139	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs198478	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs268138	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs268132	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs268131	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs1039764	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs4303705	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs2661796	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs2661797	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs2661798	SPRED2	1.54×10^{-4}	

Tabela 14 - Seznam SNP-jev v SPRED2 signalu pri γ -linolenski kislini in kontrolnih vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs1876518	SPRED2	2.32×10^{-5}	povečan delež γ -linolne kisline
rs2271198	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs7581149	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs10188563	SPRED2	1.01×10^{-3}	
rs10186240	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs7559283	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs1396210	SPRED2	8.38×10^{-5}	
rs6738087	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs71398630	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs268122	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs174847	SPRED2	2.32×10^{-5}	
rs11689314	SPRED2	2.32×10^{-5}	
rs1194849	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs268139	SPRED2	1.54×10^{-4}	povečan delež γ -linolne kisline
rs198478	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs268138	SPRED2	5.18×10^{-4}	
rs268132	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs268131	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs1039764	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs4303705	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs2661796	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs2661797	SPRED2	1.54×10^{-4}	
rs2661798	SPRED2	1.54×10^{-4}	

Tabela 15 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri DHA in vseh vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT ALELOV
rs2290449	LTBP1	1.98×10^{-7}	T: več DHA C: manj DHA
rs6728094	LTBP1	3.72×10^{-4}	G: več DHA A: manj DHA
rs17641906	LTBP1	2.30×10^{-6}	A: več DHA G: manj DHA
rs2290448	LTBP1	2.47×10^{-6}	A: več DHA G: manj DHA

Tabela 16 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri SA in vseh vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT ALELOV
rs2290449	LTBP1	2.30×10^{-7}	T: manj SA C: več SA
rs6728094	LTBP1	8.22×10^{-5}	G: manj SA A: več SA
rs17641906	LTBP1	3.08×10^{-6}	A: manj SA G: več SA
rs2290448	LTBP1	5.82×10^{-6}	A: manj SA G: več SA

Tabela 17 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri PUFA in vseh vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT ALELOV
rs2290449	LTBP1	5.60×10^{-7}	T: manj PUFA C: več PUFA
rs6728094	LTBP1	2.57×10^{-4}	G: manj PUFA A: več PUFA
rs17641906	LTBP1	4.85×10^{-6}	A: manj PUFA G: več PUFA
rs2290448	LTBP1	8.64×10^{-6}	A: manj PUFA G: več PUFA

Tabela 18 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri arahidonski kislini in vseh vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT ALELOV
rs2290449	LTBP1	1.17×10^{-6}	T: več arahidonske kisline C: manj arahidonske kisline
rs6728094	LTBP1	2.91×10^{-4}	G: več arahidonske kisline A: manj arahidonske kisline
rs17641906	LTBP1	6.59×10^{-6}	A: več arahidonske kisline G: manj arahidonske kisline
rs2290448	LTBP1	1.88×10^{-5}	A: več arahidonske kisline G: manj arahidonske kisline

Tabela 19 - Seznam SNP-jev v LTBP1 signalu pri adrenski kislini in vseh vzorcih; GXE

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT ALELOV
rs2290449	LTBP1	7.84×10^{-5}	T: več adrenske kisline C: manj adrenske kisline
rs6728094	LTBP1	5.87×10^{-3}	G: več adrenske kisline A: manj adrenske kisline
rs17641906	LTBP1	2.89×10^{-4}	A: več adrenske kisline G: manj adrenske kisline
rs2290448	LTBP1	9.65×10^{-5}	A: več adrenske kisline G: manj adrenske kisline

Tabela 20 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu in oleinski kislini pri KVČB vzorcih; QASSOC

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs1502762	MCCC1	5.49×10^{-5}	manj oleinske kisline
rs11928508	MCCC1	6.68×10^{-4}	
rs7640612	MCCC1	6.68×10^{-4}	
rs2292057	MCCC1	6.68×10^{-4}	
rs1604586	MCCC1	9.38×10^{-5}	
rs2314737	MCCC1	5.47×10^{-4}	
rs7624867	MCCC1	5.47×10^{-4}	
rs9823766	MCCC1	3.16×10^{-4}	
rs9822789	MCCC1	3.16×10^{-4}	
rs16833689	MCCC1	3.16×10^{-4}	
rs11711441	MCCC1	2.07×10^{-3}	
rs73178990	MCCC1	2.07×10^{-3}	
rs73178993	MCCC1	2.07×10^{-3}	
rs11716740	MCCC1	2.07×10^{-3}	

Tabela 21 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu in arahidonski kislini pri KVČB vzorcih; QASSOC

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs1502762	MCCC1	4.77×10^{-5}	več arahidonske kisline
rs11928508	MCCC1	7.18×10^{-4}	
rs7640612	MCCC1	7.18×10^{-4}	
rs2292057	MCCC1	7.18×10^{-4}	
rs1604586	MCCC1	1.22×10^{-4}	
rs2314737	MCCC1	1.68×10^{-3}	
rs7624867	MCCC1	1.68×10^{-3}	
rs9823766	MCCC1	3.06×10^{-4}	
rs9822789	MCCC1	3.06×10^{-4}	
rs16833689	MCCC1	3.06×10^{-4}	
rs11711441	MCCC1	1.36×10^{-3}	
rs73178990	MCCC1	1.36×10^{-3}	
rs73178993	MCCC1	1.36×10^{-3}	
rs11716740	MCCC1	1.36×10^{-3}	
rs73178998	MCCC1	8.02×10^{-3}	

Tabela 22 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu in adrenski kislini pri KVČB vzorcih; QASSOC

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs1502762	MCCC1	3.04×10^{-5}	več adrenske kisline
rs11928508	MCCC1	5.72×10^{-4}	
rs7640612	MCCC1	5.72×10^{-4}	
rs2292057	MCCC1	5.72×10^{-4}	
rs1604586	MCCC1	2.35×10^{-4}	
rs2314737	MCCC1	6.49×10^{-4}	
rs7624867	MCCC1	6.49×10^{-4}	
rs9823766	MCCC1	3.38×10^{-4}	
rs9822789	MCCC1	3.38×10^{-4}	
rs16833689	MCCC1	3.38×10^{-4}	
rs11711441	MCCC1	1.06×10^{-3}	
rs73178990	MCCC1	1.06×10^{-3}	
rs73178993	MCCC1	1.06×10^{-3}	
rs11716740	MCCC1	1.06×10^{-3}	
rs73178998	MCCC1	5.35×10^{-3}	

Tabela 23 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu in Osbondovi kislini pri KVČB vzorcih; QASSOC

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs1502762	MCCC1	4.03×10^{-6}	več arahidonske kisline
rs11928508	MCCC1	1.06×10^{-4}	
rs7640612	MCCC1	1.06×10^{-4}	
rs2292057	MCCC1	1.06×10^{-4}	
rs1604586	MCCC1	6.07×10^{-5}	
rs2314737	MCCC1	6.65×10^{-5}	
rs7624867	MCCC1	6.65×10^{-5}	
rs9823766	MCCC1	1.20×10^{-4}	
rs9822789	MCCC1	1.20×10^{-4}	
rs16833689	MCCC1	1.20×10^{-4}	
rs11711441	MCCC1	1.51×10^{-3}	
rs73178990	MCCC1	1.51×10^{-3}	
rs73178993	MCCC1	1.51×10^{-3}	
rs11716740	MCCC1	1.51×10^{-3}	
rs73178998	MCCC1	8.63×10^{-3}	

Tabela 24 - Seznam SNP-jev v MCCC1 signalu pri DGLA in vseh vzorcih; QASSOC

SNP	GEN	<i>p</i> VREDNOST	EFEKT REDKEJŠEGA ALELA
rs1502762	MCCC1	9.58e-05	več DGLA
rs11928508	MCCC1	0.00976	
rs7640612	MCCC1	0.00976	
rs2292057	MCCC1	0.00976	
rs1604586	MCCC1	0.00535	
rs2314737	MCCC1	0.00142	
rs7624867	MCCC1	0.00212	
rs9823766	MCCC1	0.00804	
rs9822789	MCCC1	0.00804	
rs16833689	MCCC1	0.00804	

Razen FADS in HLA regije bioinformacijska analiza ni našla statistično signifikantnih ($p < 10^{-4}$) signalov pri genih, ki so se večkrat pojavljali v preseku 201 KVČB genov in GWA študij, ki so preučevale maščobe. Tako ni bilo statistično signifikantnega signala za gene *GKCR*, *TRIB1* in *AGPAT3*. KVČB geni, na novo povezani s maščobnimi kislinami v tem magistrskem delu so *PTGER4*, *SPRED2*, *LTBP1* in *MCCC1*.

Signalov v HLA regiji je bilo 13, med njimi 10 ni v LD-ju med sabo in so tako unikatni. Pojavljajo se pri vseh štirih tipih raziskav in različnih maščobnih kislinah, med njimi stearidonska, DGLA, arahidonska, adrenska, Osbondova in DPA, torej večinoma pri ω -6 maščobnih kislinah daljših od DGLA.

4.2.1 FADS regija

FADS regija je gensko območje, kjer se tesno skupaj nahajajo geni *FADS1*, *FADS2* in *FADS3*. Nekateri viri še navajajo gene *MYRF*, *TMEM258* in *FEN1* kot del te regije, saj se v njih nahajajo promotorji kot tudi SNP-ji, ki vplivajo na gensko ekspresijo. Natančneje so del haplotipskega bloka, ki vpliva na kinetiko metabolizma maščobnih kislin [88]. Signal se je pojavil pri DGLA, ki je najbolj dovzetna na genotipe v FADS regiji [87-89, 92, 126].

Haplotipska bloka sta imenovana D s frekvenco 62.1% (pri nas: 63.24%) in A s frekvenco 37.9% (pri nas: 36.76%). 4.9% predstavlja štiri redke rekombinacije, ki so funkcionalno identične haplotipskemu bloku A, zato se štejejo kot le-ta. Haplotipski blok D poveča biosintezo daljših ω -3 in ω -6; to so arahidonska, adrenska, Osbondova, eikozapentaenoinska kislina, DPA in DHA, s tem posledično zmanjša vrednosti krajših ω -3 in ω -6 maščobnih kislin. Haplotipski blok A se je pojavil nekje v času migracije človeka skozi Sirijo v druga območja. Spremenjena dieta z večjo količino esencialnih maščob je ob migraciji v Evropo in Azijo favorizirala haplotip A, saj je ta z večjo sintezo daljših maščobnih kislin omogočil boljše nevrološke, vnetne in druge funkcije. Danes je haplotip A povezan s kardiološkimi problemi, saj je količina zaužitih maščob v povprečju prevelika, kar skoraj patološko poveča koncentracije arahidonske kisline [88]. Tako je za SNP-je, ki so del haplotipa D značilno, da so povezani tudi s spremembami v proizvodnji eikozanoidov, natančneje večjo proizvodnjo tistih, ki nastanejo z encimom ALOX5 [86].

Obratno velja za haplotip A, za katerega je metabolizem višjih maščobnih kislin zmanjšan, vpliv na eikozanoide pa še ni točno preiskan oz. potrjen.

4.2.2 Preostale genske regije s signifikantnimi signali

PTGER4 je med 201 geni, povezanimi s KVČB. Gen kodira enega izmed štirih receptorjev, na katerega direktno deluje prostaglandin E2. V človeškem telesu predvsem aktivira faktorje za T-celice in s tem sodeluje pri imunskih procesih. Miši brez tega gena so imele zmanjšano ekspresijo oz. aktivacijo LDL gena, ki prenaša trigliceride iz krvne plazme v periferna tkiva, iz tega razloga so imele miši povišan skupni holesterol in niso normalno pridobivale telesne mase [130]. Na *PTGER4* deluje inhibitorni protein *EPRAP*, ki ga izražajo le makrofagi. Miši s deficitom *EPRAP* so razvile vnetje debelega črevesja kot tudi polipe, kar se skladna s opaženimi motnjami proizvodnje *EPRAP* v UC [131]. Iz tega razloga je *EPRAP* s farmakološkega vidika dobra tarčna molekula za zdravljenje KVČB kot tudi polipov debelega črevesa.

PTGER4 se izraža tudi v trombocitih, kjer regulira agregacijo le-teh, iz tega razloga je zanimiva farmakološka tarča za zdravila proti strjevanju krvi [132]. Opažene spremembe v trombocitih pri KVČB (povečana koagulacija, proizvodnja vnetnih faktorjev [84, 85]) so lahko posledica večje koncentracije prostaglandina E2 opažene pri KVČB kot tudi sprememb v ekspresiji *PTGER4* receptorja.

Opažene povezave med genotipom *PTGER4* in oleinsko kislino ni možno razložiti z literaturo. Signal je morda povezan s inverzno korelacijo med deleži oleinske in arahidonske kisline, opažene tako v splošnih študijah eritrocitov [133], kot tudi raziskavah na tkivih in eritrocitih pri KVČB [68-70]. Tako bi lahko bil delež oleinske kisline posredno povezan z inverznim deležem arahidonske kisline, ki je predstopnja prostaglandina E2, ki deluje na *PTGER4*. Povezavi med *PTGER4* in DPA ter DHA lahko razložimo le z njihovim delovanjem znotraj makrofagov, kjer je *PTGER4* povišano izražen [17, 20, 113, 114, 120].

SPRED2 sodi v družino *SPRED* proteinov, ki regulirajo aktivacijo MAP kinazne kaskade inducirane z rastnimi faktorji. Do zdaj je edina raziskana povezana z lipidi oz. njihovimi derivati opažena sposobnost *SPRED2*, da aktivira ERK metabolno pot pod vplivom določenih eikozanoidov [134].

Opaženo povezavo med genotipom *SPRED2* in γ -linolensko kislino je moč razložiti le z delovanjem te maščobne kisline v prosti obliki. Višje koncentracije γ -linolenske kisline delujejo na zmanjšanje levkotrienov, verjetno z delovanjem na 5-lipoksigenazo [105]. To bi pomenilo, da manjši deleži eikozanoidov proizvedenih s 5-lipoksigenazo pomeni manjši vpliv na *SPRED2* in s tem redkeje aktivirano ERK metabolno pot.

LTBP1 spada v družino latentnih TGB- β vezajočih proteinov. Produkti tega gena se vežejo na latentne faktorje TGB- β (ang. transforming growth factor beta; slo. transformirajoči rastni faktor beta) v zunajcelični matrici, kjer latentni citokini aktivirajo druge procese. Do danes ni opisane povezave med *LTBP1* in lipidi. Glede na to, da delno sodeluje tudi pri aterosklerozi, kjer ima pomemben vpliv tudi holesterol, lahko sklepamo le na skupno delovanje obeh faktorjev, torej genotip *LTBP1* in profil holesterola.

Signal *LTBP1* je bil opažen pri arahidonski in adrenski kislini ter DHA, kot tudi pri vsoti nasičenih maščobnih kislin in vsoti večkrat nenasičenih maščobnih kislin. Slednji dve sta povezani s profilom holesterola, kar bi lahko razložijo biokemijsko ozadje signala [89, 123].

MCCCI kodira veliko podenoto 3-metilokrotonoil-KoA karboksilaza (kr. MCC), ki v mitohondrijih procesira levcin. Razen avtosomno recesivnega sindroma povezanega s MCC deficitom gen ni signifikantno povezan s drugimi patološkimi odkloni. Signalov se ne da razložiti s smiselno biokemijsko razlago.

Signifikantni rezultati v HLA genski regiji so razpršeni po tipih raziskav (QASSOC-CON, QASSOC-IBD, QASSOC-ALL in GXE), pojavljajo se pri maščobnih kislinah daljših od DGLA, med sabo se zelo razlikujejo, prav tako pa nobeden izmed njih ni v delu HLA regije, ki je edina dobro povezana s KVČB v belski populaciji. Posamični SNP-ji v teh signalih in sosednji geni niso bili do zdaj povezani s deleži maščobnih kislin, le s holesterolom. Iz tega razloga ni bilo možno sestaviti jasne slike o tem, kako so ti signali povezani med sabo, s KVČB in/ali s maščobnimi kislinami.

4.3 Statistične analize

Vse statistične analize so potekale v programu PLINK, signali so že prikazani kot rezultati.

Tudi pri razširitvi na vse bolezenske vzorce (astma, miomi maternice, polipi debelega čreva) obravnavane v diplomskem delu Uroša Veseliča [135] je povezava med haplotipom D oz. A in spremenjenimi vrednosti DGLA visoka ($p = 2.83 \times 10^{-4}$), tudi efekt alelov je identičen (haplotip D je povezan z nižjo vrednostjo DGLA).

5 Zaključek

Oblikovani raziskovalni hipotezi sta bili sledeči:

- Določeni SNP-ji povzročijo spremembo v metabolizmu maščob, kar prispeva k patogenezi.
- Določeni SNP-ji povzročijo spremembo v imunskem oz. vnetnem odzivu, kar posredno vodi do spremenjenega profila maščobnih kislin v krvi bolnikov s KVČB.

Delovanje haplotipa D v FADS regiji potrjuje prvo raziskovalno hipotezo. SNP-ji znotraj tega haplotipa povzročijo spremembo kinetike metabolizma maščobnih kislin in prispevajo k patogenezi s biokemijskimi spremembami celičnega okolja.

Drugo raziskovalno hipotezo lahko potrdim le posredno s *PTGER4* signalom, ki ima vlogo v vnetnem odzivu. Povečana ekspresija tega gena lahko vodi do spremenjenega profila v krvi bolnikov s KVČB s spremenjenim delovanjem vnetnega odziva makrofagov in trombocitov.

Rezultati bioinformatične analize so potrdili pomembnost in funkcijo specifičnega haplotipa v FADS regiji, kot tudi nekaj novih signalov. FADS haplotip D je povezan s povečano proizvodnjo daljših ω -3 in ω -6 maščobnih kislin iz krajših esencialnih, posredno je haplotip A povezan s normalnimi oz. zmanjšanimi vrednostmi. V času migracije človeka v Evropo in Azijo je bil haplotip D zelo koristen, saj je zagotovil zadostno količino daljših maščobnih kislin ob spremembi diete.

Moderna dieta z visoko količino ω -6 maščob je povezana z zdravstvenimi težavami. Ob upoštevanju vpliva haplotipa D imamo višek arahidonske kisline, ki izvira iz biosinteze kot tudi direktno iz hrane. Visok delež te maščobne kisline ob spremenjenem razmerju med ω -3 in ω -6 maščobnimi kislinami pomeni, da je okolje v telesu nagnjeno k vnetjem. SNP-ji v haplotip D so povezani tudi s povečano proizvodnjo določenih vnetnih eikozanoidov [105]. To je eden izmed možnih patogenih mehanizmov, ki bi lahko deloval v KVČB.

Drug potencialni patogen mehanizem FADS haplotipa D ni povezan z nastankom bolezni, ampak z njenim potekom. V času hudega vnetja prebavnega trakta namreč nastopi slaba absorpcija hranil, med njimi tudi maščobnih kislin. Slabo absorbirane kratke esencialne maščobne kisline se v primeru haplotipa D hitro porabijo za nastanek tako vnetnih kot protivnetnih eikozanoidov. Pri pomanjkanju esencialnih maščobnih kislin prične telo kompenzirati s proizvodnjo Mead kisline, katere derivati delujejo šibko protivnetno; to je posebej opazno pri otrocih s KVČB [136].

Prihodnost raziskav na FADS regiji bi bilo smotrno opravljati s širšim pogledom na sintezo maščobnih kislin in eikozanoidov. Tako bi v sklopu karakterizacije pacienta preverili še gene ELOVL, ALOX5, COX2, LTA4H in druge, ki so del te metabolne poti in imajo dokazan vpliv na kinetiko tega sistema [137]. Vzporedno bi se predpisovale dietarne intervencije, predvsem za zagotavljanje razmerja med ω -3 in ω -6 maščobnih kislin. Prav tako bi bilo smotrno, da bi medicinska praksa pričela uporabljati intravenozne emulzije z esencialnimi maščobnimi kislinami za lajšanje simptomov KVČB v epizodah vnetja črevesja [138].

Med študijem literature sem sestavil hipotezo o potencialnem razlogu za obdajanje črevesja s mezenteričnim abdominalnim adipoznim tkivom pri bolnikih s KVČB. Črevesje potrebuje za normalno energijsko bilanco kratke maščobne kisline, npr. masleno in konjugirano linolno kislino. Le-te proizvajajo simbiotične bakterije. Moten profil črevesne flore, opažen pri KVČB posledično povzroči moteno oskrbo s temi maščobnimi kislinami. Telo to kompenzira z migracijo maščobnega tkiva k črevesju, ki potrebuje maščobe. Vzporedno so raziskave na adipoznem tkivu pri KVČB opazile spremembe v njenih makrofagih in v splošnem v izločanju citokinov, to so molekule, ki povzročijo migracijo celic. Ali sta ta procesa vzporedna ali vzročno zaporedna bi lahko pokazali le eksperimenti [21, 73, 74, 139].

Druga hipoteza, ki sem jo sestavil med študijem literature, se navezuje na opažene motnje v koagulaciji pri KVČB. V času aktivne bolezni je namreč povečano tveganje za aterosklerozo, ki napreduje skoraj identično kot pri bolnikih s kardiovaskularnimi boleznimi. Trombociti pri KVČB imajo prav tako spremenjeno koagulacijo, ki lahko vodi v tromboze. V obeh procesih sodelujejo maščobne kisline posredno (aterosklerozna) ali neposredno (lastnosti membrane trombocitov), med njimi najbolj trans-maščobne kisline [81, 84, 85, 132, 140, 141]. Lastnosti trombocitov so tudi odvisne od sestave membrane, v tem primeru bi bil signal PTGER4, opažen v tej raziskavi, vezan na to hipotezo.

6 Literatura

1. Jostins, L., et al., *Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease*. Nature, 2012. **491**(7422): p. 119-24.
2. Liu, J.Z., et al., *Association analyses identify 38 susceptibility loci for inflammatory bowel disease and highlight shared genetic risk across populations*. Nat Genet, 2015. **47**(9): p. 979-86.
3. Rubin, D.C., A. Shaker, and M.S. Levin, *Chronic intestinal inflammation: inflammatory bowel disease and colitis-associated colon cancer*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 107.
4. Wehkamp, J., et al., *Inflammatory Bowel Disease*. Dtsch Arztebl Int, 2016. **113**(5): p. 72-82.
5. Ye, Y., et al., *The epidemiology and risk factors of inflammatory bowel disease*. Int J Clin Exp Med, 2015. **8**(12): p. 22529-42.
6. Bianco, A.M., M. Girardelli, and A. Tommasini, *Genetics of inflammatory bowel disease from multifactorial to monogenic forms*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(43): p. 12296-310.
7. Fofanova, T.Y., J.F. Petrosino, and R. Kellermayer, *Microbiome-Epigenome Interactions and the Environmental Origins of Inflammatory Bowel Diseases*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2016. **62**(2): p. 208-19.
8. Kaser, A., S. Zeissig, and R.S. Blumberg, *Inflammatory bowel disease*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 573-621.
9. McCole, D.F., *IBD candidate genes and intestinal barrier regulation*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(10): p. 1829-49.
10. Morgan, X.C., et al., *Dysfunction of the intestinal microbiome in inflammatory bowel disease and treatment*. Genome Biol, 2012. **13**(9): p. R79.
11. <http://www.kegg.jp/pathway/hsa05321>. **Inflammatory bowel disease (IBD) - Homo sapiens (human)**. 2016.
12. Noronha, A.M., et al., *Hyperactivated B cells in human inflammatory bowel disease*. J Leukoc Biol, 2009. **86**(4): p. 1007-16.
13. Kuhl, A.A., et al., *Diversity of Intestinal Macrophages in Inflammatory Bowel Diseases*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 613.
14. Steinbach, E.C. and S.E. Plevy, *The role of macrophages and dendritic cells in the initiation of inflammation in IBD*. Inflamm Bowel Dis, 2014. **20**(1): p. 166-75.
15. Bates, J. and L. Diehl, *Dendritic cells in IBD pathogenesis: an area of therapeutic opportunity?* J Pathol, 2014. **232**(2): p. 112-20.
16. Jung, S.H., et al., *The role of adipose tissue-associated macrophages and T lymphocytes in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. Cytokine, 2013. **61**(2): p. 459-68.
17. Nguyen, M.T., et al., *Regulation of chemokine and chemokine receptor expression by PPARgamma in adipocytes and macrophages*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e34976.
18. L'Homme, L., et al., *Unsaturated fatty acids prevent activation of NLRP3 inflammasome in human monocytes/macrophages*. J Lipid Res, 2013. **54**(11): p. 2998-3008.
19. Chen, H., et al., *PGC-1beta suppresses saturated fatty acid-induced macrophage inflammation by inhibiting TAK1 activation*. IUBMB Life, 2016. **68**(2): p. 145-55.
20. Long, E.K., et al., *Fatty acids induce leukotriene C4 synthesis in macrophages in a fatty acid binding protein-dependent manner*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1831**(7): p. 1199-207.

21. Suganami, T., J. Nishida, and Y. Ogawa, *A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2005. **25**(10): p. 2062-8.
22. Pedros, C., et al., *Disrupted regulatory T cell homeostasis in inflammatory bowel diseases*. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(3): p. 974-95.
23. Yamada, A., et al., *Role of regulatory T cell in the pathogenesis of inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(7): p. 2195-205.
24. Galvez, J., *Role of Th17 Cells in the Pathogenesis of Human IBD*. *ISRN Inflamm*, 2014. **2014**: p. 928461.
25. Ueno, A., et al., *Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(43): p. 12283-95.
26. Kim, Y.K., J.S. Shin, and M.H. Nahm, *NOD-Like Receptors in Infection, Immunity, and Diseases*. *Yonsei Med J*, 2016. **57**(1): p. 5-14.
27. Legaki, E. and M. Gazouli, *Influence of environmental factors in the development of inflammatory bowel diseases*. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2016. **7**(1): p. 112-25.
28. Hold, G.L., et al., *Role of the gut microbiota in inflammatory bowel disease pathogenesis: what have we learnt in the past 10 years?* *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(5): p. 1192-210.
29. Frolkis, A.D., et al., *The Association of Smoking and Surgery in Inflammatory Bowel Disease is Modified by Age at Diagnosis*. *Clin Transl Gastroenterol*, 2016. **7**: p. e165.
30. van der Heide, F., et al., *Differences in genetic background between active smokers, passive smokers, and non-smokers with Crohn's disease*. *Am J Gastroenterol*, 2010. **105**(5): p. 1165-72.
31. Bilski, J., et al., *The impact of physical activity and nutrition on inflammatory bowel disease: the potential role of cross talk between adipose tissue and skeletal muscle*. *J Physiol Pharmacol*, 2013. **64**(2): p. 143-55.
32. Swanson, G.R., et al., *Pattern of alcohol consumption and its effect on gastrointestinal symptoms in inflammatory bowel disease*. *Alcohol*, 2010. **44**(3): p. 223-8.
33. Engen, P.A., et al., *The Gastrointestinal Microbiome: Alcohol Effects on the Composition of Intestinal Microbiota*. *Alcohol Res*, 2015. **37**(2): p. 223-36.
34. Knights, D., et al., *Complex host genetics influence the microbiome in inflammatory bowel disease*. *Genome Med*, 2014. **6**(12): p. 107.
35. Kostic, A.D., R.J. Xavier, and D. Gevers, *The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead*. *Gastroenterology*, 2014. **146**(6): p. 1489-99.
36. Stappenbeck, T.S., et al., *Crohn disease: a current perspective on genetics, autophagy and immunity*. *Autophagy*, 2011. **7**(4): p. 355-74.
37. Rokkas, T., et al., *The association between Helicobacter pylori infection and inflammatory bowel disease based on meta-analysis*. *United European Gastroenterol J*, 2015. **3**(6): p. 539-50.
38. Eun, C.S., et al., *Does the intestinal microbial community of Korean Crohn's disease patients differ from that of western patients?* *BMC Gastroenterol*, 2016. **16**: p. 28.
39. Babickova, J. and R. Gardlik, *Pathological and therapeutic interactions between bacteriophages, microbes and the host in inflammatory bowel disease*. *World J Gastroenterol*, 2015. **21**(40): p. 11321-30.
40. Dixon, L.J., et al., *Combinatorial effects of diet and genetics on inflammatory bowel disease pathogenesis*. *Inflamm Bowel Dis*, 2015. **21**(4): p. 912-22.

41. Looijer-van Langen, M.A. and L.A. Dieleman, *Prebiotics in chronic intestinal inflammation*. *Inflamm Bowel Dis*, 2009. **15**(3): p. 454-62.
42. Durchschein, F., W. Petritsch, and H.F. Hammer, *Diet therapy for inflammatory bowel diseases: The established and the new*. *World J Gastroenterol*, 2016. **22**(7): p. 2179-94.
43. Woodworth, H.L., et al., *Dietary fish oil alters T lymphocyte cell populations and exacerbates disease in a mouse model of inflammatory colitis*. *Cancer Res*, 2010. **70**(20): p. 7960-9.
44. Calder, P.C., *Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance*. *Biochim Biophys Acta*, 2015. **1851**(4): p. 469-84.
45. Uchiyama, K., et al., *N-3 polyunsaturated fatty acid diet therapy for patients with inflammatory bowel disease*. *Inflamm Bowel Dis*, 2010. **16**(10): p. 1696-707.
46. Bosco, N., et al., *Effects of increase in fish oil intake on intestinal eicosanoids and inflammation in a mouse model of colitis*. *Lipids Health Dis*, 2013. **12**: p. 81.
47. Yates, C.M., P.C. Calder, and G. Ed Rainger, *Pharmacology and therapeutics of omega-3 polyunsaturated fatty acids in chronic inflammatory disease*. *Pharmacol Ther*, 2014. **141**(3): p. 272-82.
48. Camuesco, D., et al., *Dietary olive oil supplemented with fish oil, rich in EPA and DHA (n-3) polyunsaturated fatty acids, attenuates colonic inflammation in rats with DSS-induced colitis*. *J Nutr*, 2005. **135**(4): p. 687-94.
49. Andoh, A., et al., *N-3 fatty acid-rich diet prevents early response of interleukin-6 elevation in trinitrobenzene sulfonic acid-induced enteritis*. *Int J Mol Med*, 2003. **12**(5): p. 721-5.
50. Farrukh, A. and J.F. Mayberry, *Is there a role for fish oil in inflammatory bowel disease?* *World J Clin Cases*, 2014. **2**(7): p. 250-2.
51. Marion-Letellier, R., et al., *Polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel diseases: a reappraisal of effects and therapeutic approaches*. *Inflamm Bowel Dis*, 2013. **19**(3): p. 650-61.
52. Sinn, N., C. Milte, and P.R. Howe, *Oiling the brain: a review of randomized controlled trials of omega-3 fatty acids in psychopathology across the lifespan*. *Nutrients*, 2010. **2**(2): p. 128-70.
53. Grosso, G., et al., *Omega-3 fatty acids and depression: scientific evidence and biological mechanisms*. *Oxid Med Cell Longev*, 2014. **2014**: p. 313570.
54. Liu, J.J., et al., *Pathways of polyunsaturated fatty acid utilization: implications for brain function in neuropsychiatric health and disease*. *Brain Res*, 2015. **1597**: p. 220-46.
55. Sajadinejad, M.S., et al., *Psychological issues in inflammatory bowel disease: an overview*. *Gastroenterol Res Pract*, 2012. **2012**: p. 106502.
56. Mikocka-Walus, A.A., et al., *A magic pill? A qualitative analysis of patients' views on the role of antidepressant therapy in inflammatory bowel disease (IBD)*. *BMC Gastroenterol*, 2012. **12**: p. 93.
57. Naliboff, B.D., et al., *Gastrointestinal and psychological mediators of health-related quality of life in IBS and IBD: a structural equation modeling analysis*. *Am J Gastroenterol*, 2012. **107**(3): p. 451-9.
58. Lashner, B.A., et al., *Passive smoking is associated with an increased risk of developing inflammatory bowel disease in children*. *Am J Gastroenterol*, 1993. **88**(3): p. 356-9.
59. Lakatos, P.L., T. Szamosi, and L. Lakatos, *Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly?* *World J Gastroenterol*, 2007. **13**(46): p. 6134-9.

60. Mahid, S.S., et al., *Smoking and inflammatory bowel disease: a meta-analysis*. Mayo Clin Proc, 2006. **81**(11): p. 1462-71.
61. Romanato, G., et al., *Plasma lipids and inflammation in active inflammatory bowel diseases*. Aliment Pharmacol Ther, 2009. **29**(3): p. 298-307.
62. Geerling, B.J., et al., *Fat intake and fatty acid profile in plasma phospholipids and adipose tissue in patients with Crohn's disease, compared with controls*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(2): p. 410-7.
63. Esteve-Comas, M., et al., *Plasma polyunsaturated fatty acid pattern in active inflammatory bowel disease*. Gut, 1992. **33**(10): p. 1365-9.
64. Esteve-Comas, M., et al., *Abnormal plasma polyunsaturated fatty acid pattern in non-active inflammatory bowel disease*. Gut, 1993. **34**(10): p. 1370-3.
65. Esteve-Comas, M., et al., *Determinants of plasma Fatty Acid abnormalities in patients with active inflammatory bowel disease: a multivariate analysis*. Inflamm Bowel Dis, 1995. **1**(2): p. 95-100.
66. Uchiyama, K., et al., *The fatty acid profile of the erythrocyte membrane in initial-onset inflammatory bowel disease patients*. Dig Dis Sci, 2013. **58**(5): p. 1235-43.
67. Ueda, Y., et al., *Elevated concentrations of linoleic acid in erythrocyte membrane phospholipids in patients with inflammatory bowel disease*. Nutr Res, 2008. **28**(4): p. 239-44.
68. Pacheco, S., K. Hillier, and C. Smith, *Increased arachidonic acid levels in phospholipids of human colonic mucosa in inflammatory bowel disease*. Clin Sci (Lond), 1987. **73**(4): p. 361-4.
69. Buhner, S., et al., *Ileal and colonic fatty acid profiles in patients with active Crohn's disease*. Gut, 1994. **35**(10): p. 1424-8.
70. Fernandez-Banares, F., et al., *Changes in mucosal fatty acid profile in inflammatory bowel disease and in experimental colitis: a common response to bowel inflammation*. Clin Nutr, 1997. **16**(4): p. 177-83.
71. Esteve, M., et al., *Plasma and mucosal fatty acid pattern in colectomized ulcerative colitis patients*. Dig Dis Sci, 1998. **43**(5): p. 1071-8.
72. Hengstermann, S., et al., *Altered status of antioxidant vitamins and fatty acids in patients with inactive inflammatory bowel disease*. Clin Nutr, 2008. **27**(4): p. 571-8.
73. Choe, S.S., et al., *Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders*. Front Endocrinol (Lausanne), 2016. **7**: p. 30.
74. Fink, C., et al., *Adipose tissue and inflammatory bowel disease pathogenesis*. Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(8): p. 1550-7.
75. Kredel, L.I. and B. Siegmund, *Adipose-tissue and intestinal inflammation - visceral obesity and creeping fat*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 462.
76. Goncalves, P., F. Magro, and F. Martel, *Metabolic inflammation in inflammatory bowel disease: crosstalk between adipose tissue and bowel*. Inflamm Bowel Dis, 2015. **21**(2): p. 453-67.
77. Olszanecka-Glinianowicz, M., et al., *Adipokines in the pathogenesis of idiopathic inflammatory bowel disease*. Endokrynol Pol, 2013. **64**(3): p. 226-31.
78. Ponemone, V., et al., *Apoptosis and inflammation: role of adipokines in inflammatory bowel disease*. Clin Transl Gastroenterol, 2010. **1**: p. e1.
79. Waluga, M., et al., *Serum adipokines in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(22): p. 6912-7.
80. Andersen, N.N. and T. Jess, *Risk of cardiovascular disease in inflammatory bowel disease*. World J Gastrointest Pathophysiol, 2014. **5**(3): p. 359-65.
81. Schicho, R., G. Marsche, and M. Storr, *Cardiovascular complications in inflammatory bowel disease*. Curr Drug Targets, 2015. **16**(3): p. 181-8.

82. Alatri, A., et al., *Prevalence and risk factors for venous thromboembolic complications in the Swiss Inflammatory Bowel Disease Cohort*. Scand J Gastroenterol, 2016: p. 1-6.
83. Alkim, H., et al., *Etiopathogenesis, Prevention, and Treatment of Thromboembolism in Inflammatory Bowel Disease*. Clin Appl Thromb Hemost, 2016.
84. Voudoukis, E., K. Karmiris, and I.E. Koutroubakis, *Multipotent role of platelets in inflammatory bowel diseases: a clinical approach*. World J Gastroenterol, 2014. **20**(12): p. 3180-90.
85. Yoshida, H. and D.N. Granger, *Inflammatory bowel disease: a paradigm for the link between coagulation and inflammation*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(8): p. 1245-55.
86. Hester, A.G., et al., *Relationship between a common variant in the fatty acid desaturase (FADS) cluster and eicosanoid generation in humans*. J Biol Chem, 2014. **289**(32): p. 22482-9.
87. Mathias, R.A., V. Pani, and F.H. Chilton, *Genetic Variants in the FADS Gene: Implications for Dietary Recommendations for Fatty Acid Intake*. Curr Nutr Rep, 2014. **3**(2): p. 139-148.
88. Ameer, A., et al., *Genetic adaptation of fatty-acid metabolism: a human-specific haplotype increasing the biosynthesis of long-chain omega-3 and omega-6 fatty acids*. Am J Hum Genet, 2012. **90**(5): p. 809-20.
89. Tintle, N.L., et al., *A genome-wide association study of saturated, mono- and polyunsaturated red blood cell fatty acids in the Framingham Heart Offspring Study*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2015. **94**: p. 65-72.
90. Patterson, E., et al., *Health implications of high dietary omega-6 polyunsaturated Fatty acids*. J Nutr Metab, 2012. **2012**: p. 539426.
91. Weylandt, K.H., et al., *Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids: The Way Forward in Times of Mixed Evidence*. Biomed Res Int, 2015. **2015**: p. 143109.
92. Tanaka, T., et al., *Genome-wide association study of plasma polyunsaturated fatty acids in the InCHIANTI Study*. PLoS Genet, 2009. **5**(1): p. e1000338.
93. Stenson, W.F., *The universe of arachidonic acid metabolites in inflammatory bowel disease: can we tell the good from the bad?* Curr Opin Gastroenterol, 2014. **30**(4): p. 347-51.
94. Le, H.D., et al., *The essentiality of arachidonic acid and docosahexaenoic acid*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009. **81**(2-3): p. 165-70.
95. Boniface, K., et al., *Prostaglandin E2 regulates Th17 cell differentiation and function through cyclic AMP and EP2/EP4 receptor signaling*. J Exp Med, 2009. **206**(3): p. 535-48.
96. Chen, H., et al., *Effects of leukotriene B4 and prostaglandin E2 on the differentiation of murine Foxp3+ T regulatory cells and Th17 cells*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2009. **80**(4): p. 195-200.
97. Napolitani, G., et al., *Prostaglandin E2 enhances Th17 responses via modulation of IL-17 and IFN-gamma production by memory CD4+ T cells*. Eur J Immunol, 2009. **39**(5): p. 1301-12.
98. Barrie, A., et al., *Prostaglandin E2 and IL-23 plus IL-1beta differentially regulate the Th1/Th17 immune response of human CD161(+) CD4(+) memory T cells*. Clin Transl Sci, 2011. **4**(4): p. 268-73.
99. Monk, J.M., et al., *Antagonizing arachidonic acid-derived eicosanoids reduces inflammatory Th17 and Th1 cell-mediated inflammation and colitis severity*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 917149.

100. Osterud, B. and E. Bjorklid, *Role of monocytes in atherogenesis*. *Physiol Rev*, 2003. **83**(4): p. 1069-112.
101. Bassaganya-Riera, J., et al., *Activation of PPAR gamma and delta by conjugated linoleic acid mediates protection from experimental inflammatory bowel disease*. *Gastroenterology*, 2004. **127**(3): p. 777-91.
102. Bassaganya-Riera, J. and R. Hontecillas, *CLA and n-3 PUFA differentially modulate clinical activity and colonic PPAR-responsive gene expression in a pig model of experimental IBD*. *Clin Nutr*, 2006. **25**(3): p. 454-65.
103. Bassaganya-Riera, J. and R. Hontecillas, *Dietary conjugated linoleic acid and n-3 polyunsaturated fatty acids in inflammatory bowel disease*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010. **13**(5): p. 569-73.
104. Bassaganya-Riera, J., et al., *Probiotic bacteria produce conjugated linoleic acid locally in the gut that targets macrophage PPAR gamma to suppress colitis*. *PLoS One*, 2012. **7**(2): p. e31238.
105. Belch, J.J. and A. Hill, *Evening primrose oil and borage oil in rheumatologic conditions*. *Am J Clin Nutr*, 2000. **71**(1 Suppl): p. 352S-6S.
106. Christensen, E., et al., *Adrenoleukodystrophy. The chain shortening of erucic acid (22:1(n-9)) and adrenic acid (22:4(n-6)) is deficient in neonatal adrenoleukodystrophy and normal in X-linked adrenoleukodystrophy skin fibroblasts*. *Biochim Biophys Acta*, 1989. **1002**(1): p. 79-83.
107. Wijendran, V., et al., *Significant utilization of dietary arachidonic acid is for brain adrenic acid in baboon neonates*. *J Lipid Res*, 2002. **43**(5): p. 762-7.
108. Kong, W., J.H. Yen, and D. Ganea, *Docosahexaenoic acid prevents dendritic cell maturation, inhibits antigen-specific Th1/Th17 differentiation and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Brain Behav Immun*, 2011. **25**(5): p. 872-82.
109. Li, X., Y. Yu, and C.D. Funk, *Cyclooxygenase-2 induction in macrophages is modulated by docosahexaenoic acid via interactions with free fatty acid receptor 4 (FFA4)*. *FASEB J*, 2013. **27**(12): p. 4987-97.
110. Liu, K.L., et al., *Docosahexaenoic acid inhibits inflammation via free fatty acid receptor FFA4, disruption of TAB2 interaction with TAK1/TAB1 and downregulation of ERK-dependent Egr-1 expression in EA.hy926 cells*. *Mol Nutr Food Res*, 2016. **60**(2): p. 430-43.
111. Varga, T., Z. Czimmerer, and L. Nagy, *PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1812**(8): p. 1007-22.
112. Annese, V., et al., *PPARgamma in Inflammatory Bowel Disease*. *PPAR Res*, 2012. **2012**: p. 620839.
113. Hontecillas, R., et al., *Immunoregulatory mechanisms of macrophage PPAR-gamma in mice with experimental inflammatory bowel disease*. *Mucosal Immunol*, 2011. **4**(3): p. 304-13.
114. Pararasa, C., C. Bailey, and H. Griffiths, *Macrophage polarisation by fatty acids is PPARgamma-dependent*. *Free Radic Biol Med*, 2014. **75 Suppl 1**: p. S31-2.
115. Frosali, S., et al., *How the Intricate Interaction among Toll-Like Receptors, Microbiota, and Intestinal Immunity Can Influence Gastrointestinal Pathology*. *J Immunol Res*, 2015. **2015**: p. 489821.
116. Fernandes, P., et al., *Differential expression of key regulators of Toll-like receptors in ulcerative colitis and Crohn's disease: a role for Tollip and peroxisome proliferator-activated receptor gamma?* *Clin Exp Immunol*, 2016. **183**(3): p. 358-68.

117. Lee, J.Y., et al., *Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 16683-9.
118. <http://www.invivogen.com/review-tlr>. *Toll-Like Receptors - Review*. 2016.
119. Oh da, Y. and E. Walenta, *Omega-3 Fatty Acids and FFAR4*. Front Endocrinol (Lausanne), 2014. **5**: p. 115.
120. Im, D.S., *Functions of omega-3 fatty acids and FFA4 (GPR120) in macrophages*. Eur J Pharmacol, 2015.
121. Anbazhagan, A.N., et al., *A novel anti-inflammatory role of GPR120 in intestinal epithelial cells*. Am J Physiol Cell Physiol, 2016. **310**(7): p. C612-21.
122. Teslovich, T.M., et al., *Biological, clinical and population relevance of 95 loci for blood lipids*. Nature, 2010. **466**(7307): p. 707-13.
123. Willer, C.J., et al., *Discovery and refinement of loci associated with lipid levels*. Nat Genet, 2013. **45**(11): p. 1274-83.
124. Gieger, C., et al., *Genetics meets metabolomics: a genome-wide association study of metabolite profiles in human serum*. PLoS Genet, 2008. **4**(11): p. e1000282.
125. Lemaitre, R.N., et al., *Genetic loci associated with plasma phospholipid n-3 fatty acids: a meta-analysis of genome-wide association studies from the CHARGE Consortium*. PLoS Genet, 2011. **7**(7): p. e1002193.
126. Guan, W., et al., *Genome-wide association study of plasma N6 polyunsaturated fatty acids within the cohorts for heart and aging research in genomic epidemiology consortium*. Circ Cardiovasc Genet, 2014. **7**(3): p. 321-31.
127. Demirkan, A., et al., *Genome-wide association study identifies novel loci associated with circulating phospho- and sphingolipid concentrations*. PLoS Genet, 2012. **8**(2): p. e1002490.
128. Andreassen, O.A., et al., *Abundant genetic overlap between blood lipids and immune-mediated diseases indicates shared molecular genetic mechanisms*. PLoS One, 2015. **10**(4): p. e0123057.
129. Kodba, Z.C., *DOLOČEVANJE SESTAVE MAŠČOBNIH KISLIN IN NJIHOVIH PROFILOV V MEMBRANAH RDEČIH KRVNIH CELIC BOLNIKOV Z RAZLIČNIMI BOLEZNIMI Z METODO PLINSKE KROMATOGRAFIJE*. Junij, 2011.
130. Cai, Y., et al., *Mice lacking prostaglandin E receptor subtype 4 manifest disrupted lipid metabolism attributable to impaired triglyceride clearance*. FASEB J, 2015. **29**(12): p. 4924-36.
131. Nakatsuji, M., et al., *EP4 Receptor-Associated Protein in Macrophages Ameliorates Colitis and Colitis-Associated Tumorigenesis*. PLoS Genet, 2015. **11**(10): p. e1005542.
132. Philipose, S., et al., *The prostaglandin E2 receptor EP4 is expressed by human platelets and potently inhibits platelet aggregation and thrombus formation*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010. **30**(12): p. 2416-23.
133. Høstmark, A.T. and A. Haug, *Percentages of oleic acid and arachidonic acid are inversely related in phospholipids of human sera*. Lipids Health Dis, 2013. **12**: p. 106.
134. García-Domínguez, C.A., et al., *Sprouty2 and Spred1-2 proteins inhibit the activation of the ERK pathway elicited by cyclopentenone prostanoids*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e16787.
135. Veselič, U., *Vpliv DNA polimorfizmov v genih FADS1, FADS2, ALOX5, ALOX15 in CYP4F3 na profile maščobnih kislin pri kompleksnih boleznih*. Avgust, 2015.

136. Socha, P., et al., *Essential fatty acid depletion in children with inflammatory bowel disease*. Scand J Gastroenterol, 2005. **40**(5): p. 573-7.
137. Lenihan-Geels, G., K.S. Bishop, and L.R. Ferguson, *Cancer Risk and Eicosanoid Production: Interaction between the Protective Effect of Long Chain Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acid Intake and Genotype*. J Clin Med, 2016. **5**(2).
138. Gramlich, L., et al., *Essential Fatty Acid Deficiency in 2015: The Impact of Novel Intravenous Lipid Emulsions*. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2015. **39**(1 Suppl): p. 61s-6s.
139. Batra, A., M. Zeitz, and B. Siegmund, *Adipokine signaling in inflammatory bowel disease*. Inflamm Bowel Dis, 2009. **15**(12): p. 1897-905.
140. Krogager, T.P., et al., *Hepatocytes respond differently to major dietary trans fatty acid isomers, elaidic acid and trans-vaccenic acid*. Proteome Sci, 2015. **13**: p. 31.
141. Clark, S.R., et al., *Characterization of platelet aminophospholipid externalization reveals fatty acids as molecular determinants that regulate coagulation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(15): p. 5875-80.

7 Življenjepis

OSEBNI PODATKI

Jezernik Gregor

 Jezdarska ulica 8B, 2000 Maribor (Slovenija)

 030 69 46 77

 gregor.jezernik@triera.net

IZOBRAŽEVANJE IN USPOSABLJANJE

2011–2014 **Diplomirani inženir kemijske tehnologije (UN)** Raven 6 EOK

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Maribor (Slovenija)

2014–2016 **Magister inženir kemijske tehnike** Raven 7 EOK

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Mariboru, Maribor (Slovenija)

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

Stopnja: A1 in A2: Osnovni uporabnik - B1 in B2: Samostojni uporabnik - C1 in C2: Usposobljeni uporabnik

Digitalna pismenost

SAMOVREDNOTENJE				
Obdelava informacij	Komunikacija	Ustvarjanje vsebin	Varnost	Reševanje problemov
Usposobljeni uporabnik	Samostojni uporabnik	Usposobljeni uporabnik	Usposobljeni uporabnik	Usposobljeni uporabnik

Izjava o istovetnosti tiskane in elektronske verzije