



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Souběžný výskyt laktóзовé intolerance a intolerance bílkoviny kravského mléka v české populaci

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: **LABORATORNÍ DIAGNOSTIKA**

Autor: Sára Marie Nestávalová

Vedoucí práce: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, PhD.

České Budějovice 2023

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „*Souběžný výskyt laktóзовé intolerance a intolerance bílkoviny kravského mléka v české populaci*“ jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby bakalářské práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé bakalářské práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 2. 5. 2023

.....

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla věnovat poděkování za ochotu, za odborné vedení a cenné rady během zpracování mé bakalářské práce vedoucí Mgr. Dagmarě Riegert Bystřické, Ph.D. Mé poděkování směřuje také k mé rodině, která se mnou měla trpělivost v průběhu studia, a která mě ve všem podporovala.

Souběžný výskyt laktóзовé intolerance a intolerance bílkoviny kravského mléka v české populaci

Abstrakt

Laktóзовá intolerance je jednou z nejčastěji se objevujících potravinových intolerancí ve světě. Světová prevalence laktóзовé intolerance se pohybuje mezi 57 až 65 %. Laktóзовou intolerancí způsobuje snížení nebo úplnou ztrátu enzymu laktázy. Enzym laktázy štěpí mléčný cukr na dva jednoduché monosacharidy glukózu a galaktózu. Podle původu úbytku laktázy lze laktóзовou intolerancí rozdělit do čtyř skupin: kongenitální (vrozený) nedostatek laktázy, vývojový nedostatek laktázy, primární nedostatek laktázy (hypolaktázie v dospělosti) a sekundární nedostatek laktázy. Vyšetřované polymorfismy asociované s laktóзовou intolerancí v evropské populaci jsou dva, polymorfismus C/T-13910 a G/A-22018. Wild type genotyp CC nebo GG je spjatý s laktóзовou intolerancí, heterozygotní genotyp CT nebo GC se spjatý s částečnou laktóзовou intolerancí a mutovaný homozygotní genotyp TT a AA je spojen s perzistencí laktázy. Alergie na bílkovinu kravského mléka (kasein) je na rozdíl od laktóзовé intolerance imunologicky zprostředkovaná reakce na kasein. Jedná se zpravidla o dětské onemocnění objevující se v kojeneckém věku. Po ukončení kojení se alergie vytrácí, perzistence alergie v dospělosti je vzácná. Světová prevalence alergie na bílkovinu kravského mléka se pohybuje od 3 do 6 %.

V praktické části jsem se věnovala vyšetření laktóзовé intolerance metodou PCR-RFLP. Byly testovány dva polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018. Získaná data byla statisticky zpracována a mohou sloužit pro stanovení prevalence laktóзовé intolerance v české populaci. Intolerance kravského mléka a kaseinu byla vyšetřena pomocí imunoenzymatické metody používané ke stanovení potravinových intolerancí, založené na principu měření specifických IgG₄ protilátek. Výsledky testů byly statisticky zpracovány. U osob testovaných, jak na intolerancí laktózy, tak na intolerancí bílkoviny kravského mléka byl vyhodnocen souběžný výskyt obou intolerancí.

Klíčová slova

Laktóзовá intolerance; Alergie na bílkovinu kravského mléka; C/T-13910 polymorfismus; G/A-22018 polymorfismus; Potravinová intolerance

Co-occurrence of lactose intolerance and cow's milk protein intolerance in Czech population

Abstract

Lactose intolerance is one of the most common food intolerances in the world. The global prevalence of lactose intolerance ranges from 57% to 65%. Lactose intolerance is caused by a reduction or complete loss of the enzyme lactase. The enzyme lactase breaks down milk sugar into two simple monosaccharides glucose and galactose. According to the origin of the lactase depletion, lactose intolerance can be divided into four groups: congenital lactase deficiency, developmental lactase deficiency, primary lactase deficiency (adulthood hypolactasia), and secondary lactase deficiency. There are two polymorphisms associated with lactose intolerance in the European population. Polymorphisms C/T-13910 and G/A-22018. Wild type genotype CC or GG is associated with lactose intolerance. Heterozygous genotype CT or GC is associated with partial lactose intolerance. Mutant homozygous genotype TT and AA is associated with lactase persistence. Allergy to cow's milk protein (casein), unlike lactose intolerance, is an immunologically mediated reaction to casein. It is usually a childhood disease appearing in infancy. After breastfeeding is discontinued, the allergy resolves, and persistence of the allergy into adulthood is rare. The worldwide prevalence of cow's milk protein allergy is 3 to 6%.

In the practical part, I examined RFLP-PCR for genotyping of C/T-13910 and G/A-22018 polymorphisms. The results are statistically processed. The processed data serve as a prevalence of lactose intolerance in the Czech population. Allergy was investigated using immuno-enzymatic method to determine food allergens. Specific IgG4 antibodies against food allergens were examined. The results were statistically processed. From the results of subjects tested for both lactose intolerance and cow's milk protein allergy, statistics of the co-occurrence of lactose intolerance and cow's milk protein allergy were created.

Key words

Lactose intolerance; Cow's milk protein allergy; C/T-13910 polymorphism; G/A-22018 polymorphism; Food intolerance

Obsah

1	Úvod	9
2	Teoretická část.....	10
2.1	Mléko	10
2.1.1	Mléčné bílkoviny	10
2.1.1.1	Kaseiny.....	11
2.1.1.2	Syrovátka.....	11
2.1.2	Vitamíny a minerály.....	11
2.1.3	Mléčné tuky.....	11
2.1.4	Laktóza.....	12
2.1.4.1	Laktáza	12
3	Laktózová intolerance	14
3.1	Pojmy používané k popisu stavu trávení laktózy	14
3.2	Druhy laktózové intolerance	15
3.2.1	Kongenitální (vrozený) nedostatek laktázy.....	15
3.2.2	Vývojový nedostatek laktázy	15
3.2.3	Primární nedostatek laktázy	16
3.2.4	Sekundární nedostatek laktázy.....	16
3.3	Laktázová persistence	16
3.4	Klinický obraz a komplikace při laktózové intoleranci	16
3.5	Genetická podstata (genetika laktázy)	17
3.6	Diagnostika laktózové intolerance	19
3.6.1	Genetický test.....	19
3.6.2	LacTEST	20
3.6.3	Vodíkový dechový test.....	20
3.6.4	Laktázový toleranční test	20
3.6.5	Rychlý laktázový test (biopsie sliznice).....	21
3.6.6	Supresní a provokační test s mlékem	21
3.6.7	Test kyselosti stolice	21
3.7	Možnosti léčby	21
3.7.1	Bezlaktózové výrobky a výrobky s nízkým obsahem laktózy	21
3.7.2	Nemléčné náhražky	22
3.7.3	Příjem enzymu laktázy	22
3.7.4	Probiotika	22

3.8	Syndrom dráždivého tračníku	22
4	Intolerance vs alergie bílkoviny kravského mléka	24
4.1	Intolerance bílkoviny kravského mléka	24
4.2	Alergie na bílkovinu kravského mléka	24
4.2.1	Patofyziologie ABKM	25
4.2.2	Klinické příznaky	26
4.2.3	Diagnostika	26
4.2.4	Léčba	27
4.2.5	Asociace alergie s IgG ₄ protilátkami.....	27
5	Cíle práce a hypotézy	29
5.1	Cíle práce	29
5.2	Hypotézy	29
6	Praktická část.....	30
6.1	Vyšetření laktózové intolerance	30
6.1.1	Odběr primárních vzorků	30
6.1.2	Izolace DNA.....	30
6.1.2.1	Izolace DNA z bukalního stěru	32
6.1.2.2	Izolace DNA z periferní krve	33
6.1.3	Měření koncentrace DNA	34
6.1.4	PCR	35
	Kontrola PCR produktu	37
6.1.5	Restrikční štěpení	39
6.2	Vyšetření potravinových intolerancí	42
6.2.1	Odběr vzorků.....	42
6.2.2	Princip testu.....	43
6.2.3	Složení soupravy	43
6.2.4	Pracovní postup	45
6.2.5	Vyhodnocení	46
7	Výsledky.....	48
7.1	Výsledky laktózové intolerance	48
7.2	Výsledky imuno-enzymatických testů pro potravinové intolerance	52
7.3	Výsledky souběžného výskytu intolerance laktózy a intolerance kaseinu.....	57
8	Diskuse	59
9	Závěr.....	62

Seznam použitých zdrojů.....	63
10 Přílohy	73
11 Seznam obrázků.....	75
12 Seznam tabulek.....	76
13 Seznam zkratek.....	77

1 Úvod

V této bakalářské práci se zabývám nesnášenlivostí mléka, mezi které patří laktózová intolerance, intolerance kaseinu a alergie na bílkovinu kravského mléka (kasein). Laktózová intolerance je způsobena sníženou aktivitou či úplnou ztrátou střevního enzymu laktázy, který štěpí mléčný cukr (laktózu) na jednoduché monosacharidy glukózu a galaktózu. Světová prevalence tohoto onemocnění se pohybuje kolem 57 až 65 %. Prevalence alergie na bílkovinu kravského mléka se pohybuje okolo 7 % zejména u dětí, zřídka u dospělých. Alergie na bílkovinu kravského mléka je nepřiměřená imunologická reakce, při níž dochází k produkci protilátek nebo spuštění imunologické reakce zprostředkované buňkami imunitního systému.

Hlavním cílem mé bakalářské práce bylo zpracování odborné rešerše na téma laktózová intolerance a alergie na bílkovinu kravského mléka. V rámci praktické části bylo nutné zvládnout provedení dvou testů: genetického testu na laktózovou intoleranci a imuno-enzymatického testu na intoleranci kaseinu a kravského mléka. Genetické testování laktózové intolerance bylo provedeno metodou PCR-RFLP, která byla použita pro stanovení SNP C/T-13910 a G/A-22018 asociovaných s laktózovou intolerancí nebo tolerancí. Pro zjištění intolerance kaseinu byla použita imuno-enzymatická metoda založená na principu stanovení specifických IgG₄ protilátek. Získaná data z obou testů byla statisticky hodnocena a byl sledován souběžný výskyt laktózové intolerance a intolerance kaseinu.

Výsledky práce mohou mít význam pro zjištění reálného výskytu obou testovaných intolerancí v české populaci a mohou zpřesnit příčinu nesnášenlivosti mléčných výrobků obecně.

2 Teoretická část

2.1 *Mléko*

Podle Mehta a Cheunga (2015) je mléko heterogenní směsí, kterou můžeme definovat jako složitou chemickou látku, složenou z tuku emulgovaného ve formě kapiček, hlavní mléčné bílkoviny (kaseinu), minerálních látek v koloidním stavu a laktózy spolu s některými minerálními látkami a rozpustnými syrovátkovými bílkovinami ve formě pravého roztoku. Složení mléka různých druhů savců ukazuje Tabulka 1.

Tabulka 1. Typické chemické složení mléka od různých savců v %.

Druh mléka	Voda	Tuk	Bílkovina	Laktóza	Minerály
Oslí	90,0	1,3	1,7	6,5	0,5
Bizoní	84,2	6,6	3,2	5,2	0,8
Velbloudí	86,5	3,1	4,0	5,6	0,6
Kravské	86,6	4,6	3,4	4,9	0,5
Ovčí	79,4	8,6	6,7	4,3	1,0
Kozí	86,5	4,5	3,5	4,7	0,8
Lidské	87,7	3,6	1,8	6,8	0,1
Koňské	89,1	1,6	2,7	6,1	0,5

(Zdroj: Kailasapathy, 2008.)

Mléko savců je jejich první potravou a jako takové poskytuje veškerou energii a živiny potřebné k zajištění správného růstu a vývoje v postnatálním období. Konzumace mléka u savců je obvykle ukončena po odstavení od kojení. Výjimkou je člověk, který jej přijímá i v dospělosti (Pereira, 2014).

2.1.1 *Mléčné bílkoviny*

Mléko je v lidské stravě považováno za důležitý zdroj bílkovin, protože obsahuje přibližně 32 g bílkoviny na litr. Bílkoviny mléka lze rozdělit na rozpustné a nerozpustné. Jako rozpustné bílkoviny se označují syrovátkové bílkoviny a představují 20 % z celkové bílkoviny mléka. Nerozpustné bílkoviny v mléce jsou kaseiny, které představují 80 % z celkové bílkoviny (Séverin a Wenshui, 2005). Jsou klasifikované jako velice kvalitní bílkoviny s ohledem na výživové požadavky člověka z hlediska obsahu aminokyselin, stravitelnosti a biologické dostupnosti (Boyle et al., 2012). Obsah aminokyselin se u obou frakcí liší. Surovátka je obzvláště bohatá na aminokyseliny s

rozvětveným řetězcem jako je leucin, izoleucin, valin a lysin, zatímco kasein má vyšší podíl histidinu, methioninu a fenylalaninu (Tang et al., 2009.)

2.1.1.1 Kaseiny

Kasein obsahuje významný zdroj neesenciálních aminokyselin s vysokým stupněm fosforylace. Klíčová nutriční úloha kaseinů u novorozenců spočívá ve stabilizaci a transportu nanoklastrů fosforečnanu vápenatého prostřednictvím stravitelného polypeptidového vezikulu. Kaseiny lze dělit do 5 hlavních tříd: α -s1, α -s2, β , gama a κ -kaseiny (Kailasapathy, 2008). Kaseiny jsou uspořádané do makromolekulárních jednotek zvaných kaseinové micely (Kalyankar et al., 2016). Dávají vzniknout několika bioaktivním peptidům, které jsou přínosem pro lidské zdraví. Působí příznivě na kardiovaskulární, nervový, imunitní a trávicí systém (Pereira, 2014).

2.1.1.2 Syrovátka

Mezi syrovátkové proteiny patří α -laktalbumin, sérový albumin, laktoferin, laktoperoxidáza, lysozym, proteázový pepton, transferin a imunoglobuliny (Séverin a Wenshui, 2005). β -laktoglobulin je důležitým přenašečem retinolu zatímco laktoferin je klíčovým prvkem při vstřebávání železa, a má antioxidační a antikarcinogenní účinky. Laktoferin, laktoperoxidáza a lysozym jsou důležitými antimikrobiálními látkami. U laktoferinu spolu s β -laktoglobulinem a α -laktoalbuminem byly prokázány účinky potlačující vznik nádorů (Pereira, 2014).

2.1.2 Vitamíny a minerály

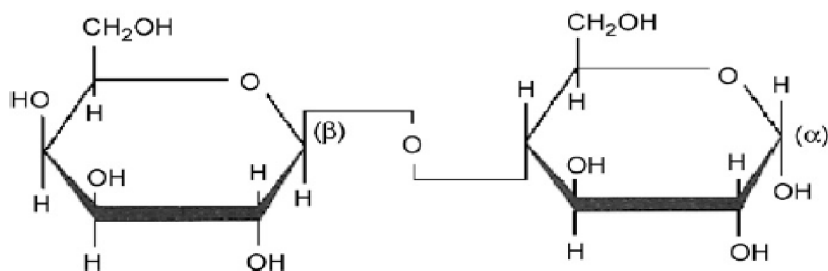
Mléko je považováno za základní zdroj vápníku, ale kromě vápníku obsahuje i fosfor, hořčík, selen a zinek. Vitamíny rozpustné v tucích obsažené v mléce jsou A, D, E. Komplexy vitamínů B a vitamín C jsou rozpustné ve vodě (Gaucheron, 2011).

2.1.3 Mléčné tuky

Tuky v mléce jsou přítomny v globulích, které jsou odolné lipolýze, dokud nejsou vystaveny trávení v žaludku. Triglyceridy tvoří 98 % tuků v mléce, diacylglycerol tvoří 2 %, cholesterol méně než 0,5 %, fosfolipidy asi 1 % a volné mastné kyseliny 0,1 %. Mléčný tuk patří mezi nejsložitější ze všech přírodních tuků, jelikož je složen z více než 400 různých mastných kyselin (Lindmark Månsson, 2008).

2.1.4 Laktóza

Laktóza (Obr. 1) je redukující disacharid tvořený galaktózou a glukózou (β -D-galaktopyranosyl-(1,4)-D-glukopyranósa) (Štěpánková, 2020). Laktóza je základním sacharidem v mléce většiny savců a je jedinečná tím, že je syntetizována pouze epiteliálními buňkami mléčných žláz a je také nezbytná pro vývoj a výživu kojenců (Sadovnikova et al., 2021). Patří mezi dobrý zdroj energie a může podporovat vstřebávání vápníku. Koncentrace laktózy v mléce se pohybuje v rozmezí od 4,2 % až do 5 %. Laktóza má nízkou relativní sladivost, je pouze z 25 % sladká jako sacharóza. Po zahřátí laktózy dochází k její dehydrataci a vzniká laktulóza. Ta stimuluje růst bakterií *Bifidobacterium bifidum*, a je tak prospěšná při vytváření mikroflóry ve střevech (Kailasapathy, 2008).



Obrázek 1. Chemická struktura laktózy (Zdroj: Schaafsma, 2008).

2.1.4.1 Laktáza

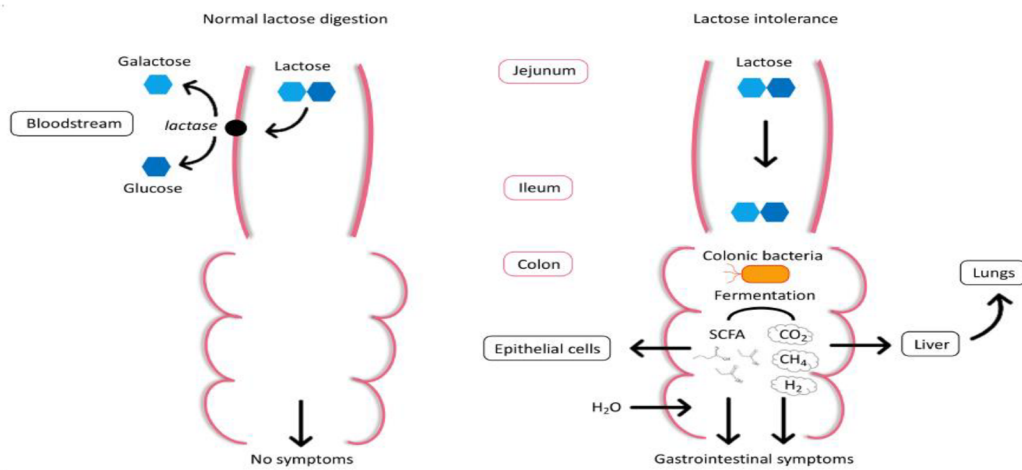
Enzym laktáza (LCT), též známý jako β -galaktozidáza nebo laktáza-florizin hydroláza (LPH) je zodpovědný za trávení laktózy u lidí (Anguita-Ruiz et al, 2020). Nachází na povrchu střevních mikroklků v jejunu a jeho výskyt klesá směrem k ileu. Gen kódující LCT se nachází na dlouhém rameni chromozomu 2 a skládá se ze 17 exonů (Campbell et al., 2005).

Hydrolýzou laktózy zprostředkovanou enzymem laktázou vznikají dva monosacharidy, glukóza a galaktóza. Ty jsou vstřebávány aktivním transportem prostřednictvím transportéru-1 vázaným na sodík a glukózu nacházejícím se v membráně enterocytů. Tento transportér přenáší glukózu nebo galaktózu a dva sodíkové ionty ze střevního lumen do cytoplazmy těchto buněk. Následně jsou monosacharidy přenášeny z cytosolu do krve glukózovým transportérem-2, který je přítomen na druhé straně membrány enterocytů. Glukóza je využita jako zdroj energie, zatímco galaktóza se přeměňuje dále

na glukózu nebo se uplatňuje jako součást glykolipidů a glykoproteinů (Lomer et al., 2008, Ugidos-Rodríguez et al., 2018).

Enzym laktáza se aktivuje působením pankreatického trypsinu. Aktivita enzymu se zvyšuje u lidského plodu během 3. trimestru a svého maxima dosahuje po narození. Zejména během třetího až pátého roku začíná množství laktázy klesat až o 10 % a u mnoha jedinců zůstává v tomto množství po zbytek života (Ugidos-Rodríguez et al., 2018).

Při nedostatku laktázy se laktóza dostává do tlustého střeva, kde je zkvašena bakteriemi tlustého střeva. Produkty této fermentace vyvolávají příznaky laktózové intolerance jako jsou křeče v břiše, nadýmání a plynatost (Obr. 2) (Pozri et al., 2021).



Obrázek 2. Normální trávení laktózy vs trávení při LI (Zdroj: Pozri et al., 2021).

3 Laktózová intolerance

Laktózová intolerance je způsobena sníženou aktivitou nebo úplnou ztrátou střevního enzymu laktázy. Nedostatek laktázy způsobuje zvýšenou osmotickou zátěž v tenkém střevě a následnou fermentaci laktózy bakteriemi tenkého střeva, která pak vede k vysoké tvorbě mastných kyselin s krátkým řetězcem a plynů (zejména vodíku a metanu) ve střevě. Mezi hlavní příznaky patří bolest břicha, plynatost a průjmy. S termínem laktózové intolerance souvisí termín hypolaktázie, který označuje nedostatek enzymu laktázy. Hypolaktázie vede k malabsorpci laktózy, která je definovaná jako neschopnost trávit laktózu (Catanzaro et al., 2021, Matthews et al., 2005). Pro účinný metabolismus a využití laktózy stačí cca 50 % aktivita laktázy (Swallow, 2003).

Laktózová intolerance závisí na aktivitě enzymu laktázy. Podle stupně aktivity laktázy lze stanovit dva stavy: alaktázie a hypolaktázie. Alaktázie se projevuje úplnou ztrátou aktivity enzymu, hypolaktázie pak velmi nízkou aktivitou laktázy v jejunální sliznici a nerovnováhou mezi množstvím přijaté laktózy a schopností ji hydrolyzovat (Deng et al., 2015).

Prevalence intolerance laktózy se celosvětově pohybuje mezi 57 % a 65 % (Catanzaro et al., 2021). Její rozložení ve světě je velmi nerovnoměrné, v Americe je asi 50 %, v Asii 70 % a v Africe téměř 100 %. V Evropě je prevalence LI asi 28 % (Storhaug et al., 2017, Lember, 2012).

3.1 Pojmy používané k popisu stavu trávení laktózy

Klasický pojem laktózová intolerance se používá při rozvoji gastrointestinálních příznaků po požití většího množství mléka nebo potravin obsahujících laktózu. Mezi tyto příznaky patří plynatost, nadýmání, křeče v břiše a bolest někdy spojená s kašovitým až vodnatým průjmem a příležitostně také s nevolností a zvracením. U dospělých se často zaměňuje intolerance laktózy s poruchou trávení laktózy (maldigesce laktózy). Tento termín může být matoucí, jelikož laktózová intolerance nemusí vždy následovat po maldigesci laktózy. Pojmům souvisejícím s laktózovou intolerancí a maldigescí laktózy se věnuje Tabulka 2. (Szilagyi a Ishayek, 2018).

Tabulka 2. Pojmy související s LI a maldigescí laktózy.

Pojem	Definice
Laktázová persistence (LP)	LP se vyznačuje schopností trávit laktózu po celou dobu dospělosti. LP je obvykle spojená s přetrvávajícími vysokými hladinami laktázy v dospělosti.
Laktázová non-persistence (LNP)	LNP je spojena s poklesem střevní laktázy na < 10 % U/g tkáně někdy mezi ukončením kojení a dospělosti.
Deficience (nedostatek) laktázy	Snížení množství enzymu střevní laktázy z jakékoli příčiny, ať už genetické nebo sekundárně tzn. v případě onemocnění nebo poranění sliznice proximální části tenkého střeva.
Maldigesce laktózy	Neschopnost trávit laktózu z jakékoli příčiny, ať už se jedná o primární nedostatek laktázy nebo sekundární nedostatek laktázy.
Laktázová intolerance (LI)	Nežádoucí příznaky vyplývající z požití laktózy, včetně plynatosti, nadýmání, křečí, průjmů a vzácně zvracení. LI se může projevit i bez maldigesce laktózy.
Samopodezření na laktózovou intoleranci	Osoby, které se domnívají, že trpí intolerancí laktózy, aniž by byly vyšetřeny na LI.
Citlivost na laktózu	Výskyt nežádoucích příznaků nebo i bez příznaková LI. Může zahrnovat i depresi, bolest hlavy a únavu, ať už s LI nebo bez ní. Příznaky se mohou překrývat s příznaky syndromu dráždivého tračníku.

(Zdroj: Szilagyi a Ishayek, 2018.)

3.2 Druhy laktózové intolerance

V závislosti na původu lze laktózovou intoleranci rozdělit do čtyř skupin: kongenitální (vrozený) nedostatek laktázy, vývojový nedostatek laktázy, primární nedostatek laktázy (hypolaktázie v dospělosti) a sekundární nedostatek laktázy (Ugidos-Rodríguez et al., 2018).

3.2.1 Kongenitální (vrozený) nedostatek laktázy

Vrozený nedostatek laktázy je extrémně vzácný a je způsobený dědičností dvou defektních alel LCT genu. Kojenec trpí vodnatými průjmy po kojení nebo po pozření potravin, které obsahují laktózu. Průjmové stavy mohou vést k dehydrataci, alkalóze a opožděnému růstu v důsledku nedostatku výživných složek mléka. (Heyman, 2006).

Je charakterizován úplnou ztrátou enzymu laktázy, který začíná po narození a přetrvává celý život. Vyskytuje se velmi zřídka, většina případů byla popsána ve Finsku. V minulosti byly následky tohoto onemocnění smrtelné, ale v dnešní době lze úmrtím novorozenců zabránit pomocí bezlaktózové stravy (Koukkanen et al., 2006).

3.2.2 Vývojový nedostatek laktázy

Je způsoben nízkou hladinou laktázy díky předčasnému porodu (28. až 32. týden), protože aktivita laktázy se u plodu zvyšuje až od 34. týdne a svého maxima dosahuje při

narození. Bakteriální metabolismus laktózy v tlustém střevě snižuje pH stolice (normální hodnota je 5,0 -5,5), což má u malých dětí příznivý účinek a podporuje určité organismy (např. druhy *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*) namísto potenciálních patogenů (druhy *Proteus*, *Escherichia coli* a *Klebsiella*). Toto osídlení bakteriemi zabraňuje průjmům a podvýživě (Heyman, 2006).

3.2.3 Primární nedostatek laktázy

Primární nedostatek laktázy se rozvíjí u dětí od odstavení od kojení do 5 let věku. Patří mezi nejčastější a nejrozšířenější deficit laktázy, který postihuje zhruba 70 % populace (Fojtík et al., 2013).

Jedná se o autozomálně recesivní onemocnění projevující se snižováním aktivity enzymu laktázy, ke kterému nedojde před dosažením 2 let věku dítěte. Většinou se tento nedostatek projeví mezi 5. a 6. rokem u bělošské populace a u nebělošské populace o něco dříve. V některých rasových skupinách se objevuje až během dospívání (Vandenplas, 2015).

3.2.4 Sekundární nedostatek laktázy

Tento typ deficitu laktázy se nachází u se u gastrointestinálních onemocnění jako jsou virové gastroenteritidy, celiakie, alergie na mléčnou bílkovinu, giardióza a Crohnova choroba. Jedná se o onemocnění, při kterých je postižen kartáčový lem enterocytů tenkého střeva (Fojtík et al., 2013).

3.3 Laktázová persistence

Enzym LCT a jeho exprese se u většiny savců a zhruba u 68 % dospělých lidí snižuje v okamžiku odstavení od mateřského mléka. U některých lidí je ale laktáza exprimována po celou dobu dospělosti. Tento stav se nazývá laktázová persistence (LP) (Gerbault, 2013).

3.4 Klinický obraz a komplikace při laktózové intoleranci

Mezi typické příznaky intolerance laktózy patří bolesti břicha, nadýmání, kručení v břiše, nevolnost, zvracení, plynatost nebo průjem a v některých případech i zácpa. Nejčastěji se tyto příznaky projevují s odstupem hodin po pozření potravin obsahující laktózu, ale příznaky mohou přijít také dříve či později (Szilagyi a Ishayek, 2018).

Produkcí plynu způsobuje fermentace laktózy, jelikož laktóza není trávena a vstřebávána. Zvýšená produkce plynu pak způsobuje kručení v břiše, plynatost, abdominální distenzi a bolest. Tyto příznaky se neprojevují u všech intolerantních jedinců stejně, závisí na jejich citlivosti a na střevní distenzi. Například pacienti se syndromem dráždivého tračníku mají závažnější komplikace než jedinci s intolerancí laktózy (Catanzaro et al., 2021).

Průjem je způsoben překyselením střevního obsahu v důsledku vysoké produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, díky tomu pak dochází ke zvýšení sekrece elektrolytů a tekutin a zrychlení střevního tranzitu (Swagerty et al., 2002).

Kromě běžných příznaků se u osob s intolerancí laktózy mohou vyskytovat i mimostřevní příznaky jako jsou poruchy paměti, bolesti hlavy, bolesti pohybového aparátu, poruchy srdečního rytmu, deprese, úzkostné stavy, vředy na sliznici dutiny ústní, poruchy menstruačního cyklu, ekzémy, alergické patologie (sinusitida, rýma, astma), akné, zvýšená frekvence močení a další (Matthews et al., 2005, Aghasi et al., 2019).

Bylo prokázáno, že příjem mléka snižuje riziko vzniku kolorektálního karcinomu, to by mohlo být způsobeno jeho složkami jako je vápník a vitamin D (Amiri et al., 2015). Vápník je považován za antikarcinogenní faktor, jelikož zřejmě váže sekundární žlučové kyseliny a ionizované mastné kyseliny (Aune et al., 2012).

Je možné, že konzumace mléčných výrobků poskytuje ochranu před vznikem rakoviny močového měchýře (Bermejo et al., 2019). Bylo zjištěno, že nízkotučné mléčné výrobky a jogurty snižují riziko rakoviny prsu. Zde je ochranný antikarcinogenní účinek spojován s vápníkem, vitaminem D, butyrátem a laktoferinem a konjugovanou kyselinou linolovou (Guo et al., 2015).

3.5 Genetická podstata (genetika laktázy)

Gen, kódující laktázu (Obr. 3) se nachází na dlouhém ramenu chromozomu 2 v pozici 2q21 a obsahuje 17 exonů (Ugidos-Rodríguez et al., 2018). Enhattah et al. v roce 2002 sekvenoval dva možné jednonukleotidové polymorfismy (SNPs) asociované s přetrváním nebo nedostatkem laktázy v dospělosti. Polymorfismy byly nalezeny v genu *MCM6* (minichromosome maintenance complex component 6), který se nachází v blízkosti genu pro laktázu. Gen *MCM6* se nepodílí na syntéze laktázy přímo, ale

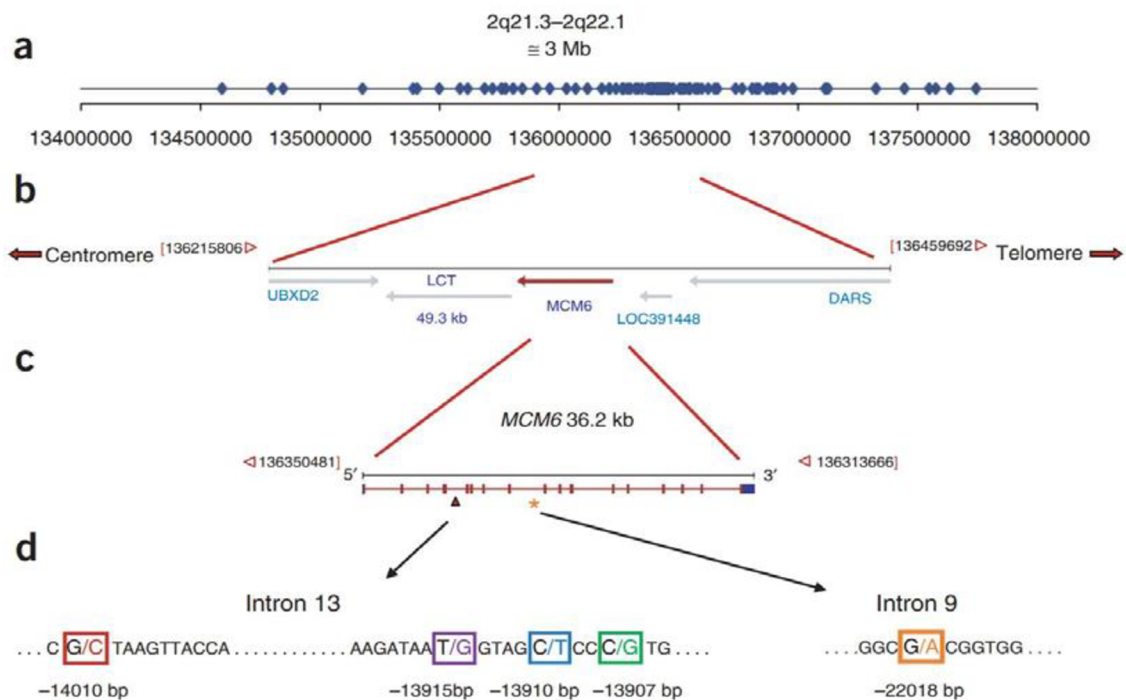
překrývá se s oblastí genu kódujícího laktázu a působí jako klíč, který aktivuje nebo inhibuje expresi enzymu laktáza (Magiera et al., 2010).

Nejvíce frekventovaným polymorfismem je C/T-13910, který se přibližně nachází v oblasti 14 kb od 5' konce genu pro laktázu (LCT). Je založen na přítomnosti jednoho cytosinu (C) nebo thyminu (T) v pozici 13910. Varianta C/C je zodpovědná za intolerantní fenotyp, který je spojený s neaktivitou laktázy. Fenotyp TT a CT je spojen s přetrvávající aktivitou laktázy. Osoby s fenotypem CT mají predispozici pro rozvoj laktóзовé intolerance, např.: vlivem stresu (Ugidos-Rodríguez et al., 2018).

Druhým zkoumaným polymorfismem je polymorfismus G/A-22108, který se nachází v oblasti 22 kb od 5' konce genu pro laktázu (LCT). Genotyp G/G je spojen s neaktivní laktázou, zatímco genotypy G/A a A/A zodpovídají za přetrvávající aktivitu laktázy. Osoby s fenotypem GA mají predispozici pro rozvoj laktóзовé intolerance, např.: vlivem stresu (Jiménez Montoya a Martínez Sarabia, 2017).

Enzym laktáza je syntetizován v přítomnosti alespoň jedné variantní alely spojené s přetrvávající aktivitou laktázy. Pokud není přítomná ani jedna takováto variantní alela, aktivita enzymu je omezena. Uvedené polymorfismy mohou být použity jako indikátory laktóзовé persistence u evropské populace, nelze je však použít globálně, jelikož v africké populaci byly identifikované jiné polymorfismy ve stejné chromozomální oblasti (Kelly, 2013). Polymorfismy zjištěné v africké a blízkovýchodní populaci jsou C/G-13915 a G/C-14010. V etiopské populaci byl zjištěn polymorfismus T/G-14009.(Hassan et al., 2016). V současné době bylo popsáno celkem 11 genových polymorfismů, které rozdělujeme na čtyři haplotypy označené A, B, C a U (Ugidos-Rodríguez et al.,2018).

Principiálně existuje několik mechanismů zodpovědných za intolerantní fenotyp. Mezi tyto mechanismy patří pokles produkce mRNA, změna v genetické transkripci a translaci a pokles počtu enterocytů produkujících laktázu (McBean a Miller, 1998).



Obrázek 3. Mapa oblasti genu pro laktázu (LCT) a genu MCM6 (Tishkoff et al., 2007).

3.6 Diagnostika laktóзовé intolerance

V dnešní době existuje několik diagnostických přístupů k identifikaci osob trpících laktózovou intolerancí. Některé z nich testují reakci trávicího traktu na podání čisté laktózy, a ne na podání potravin obsahujících laktózu.

Existuje test na toleranci mléčných výrobků, který byl přizpůsoben individuálním stravovacím návykům testovaných pacientů. Díky tomuto testu je možné identifikovat nejen osoby u kterých se objeví příznaky intolerance laktózy i po malé dávce mléčných výrobků, ale i osoby, které jsou schopné tolerovat určité množství mléčných výrobků, a osoby kterým stačí pouze omezení, příjmu mléčných výrobků bez jejich plného vyloučení (Lukito et al., 2015).

3.6.1 Genetický test

Genetické testování je užitečné pro odlišení primární a sekundární laktóзовé intolerance a pro odhalení predispozice k laktóзовé intoleranci u pacientů, kteří nejsou nutně nemocní. Cílem testování je detekce různých polymorfismů v genu *MCM6* a na základě zjištěného genotypu pomůže určit pacienty inklinující k toleranci nebo intoleranci laktózy. Jak již bylo výše uvedeno, v genu kódujícím enzym laktázu byly odhaleny nejméně dva důležité polymorfismy, které predisponují jedince k toleranci/intoleranci

laktózy. Použití genetického testu spočívá v izolaci DNA a analýze polymorfismů LCT – 13910 C> T a LCT-22018G> A. Genetické testování můžeme zařadit mezi rychlé, definitivní a neinvazivní metody. Jejich nevýhodou je potřeba specializovaných laboratoří a vyšší cena vyšetření (Santonocito et al., 2015, Enattah et al., 2002).

3.6.2 *LacTEST*

Test spočívá v podání 4-galactosil xylózy. Množství xylózy se pak detekuje ve vzorku moči sbírané za 24 hodin. Výhodou tohoto testu je vyšší citlivost a specifická ve srovnání s ostatními metodami a jeho nižší cena (Darba et al., 2014).

3.6.3 *Vodíkový dechový test*

Jedná se o nejčastěji používanou metodu pro diagnostiku laktóзовé intolerance díky výhodám jako je vysoká senzitivita a specifická, nízká cena provedení, jednoduchost provedení a snadná interpretace výsledků (Robles a Priefer, 2020). Tento test je založen na tomto principu. Přijatá laktóza není strávena a hromadí se ve střevech, zde dochází k její fermentaci mikrobiální flórou a hromadění plynů včetně vodíku. Při testu se měří vydechovaný vodík nalačno a po podání 25 – 50 g laktózy. Následně se měří každých 15 minut jeho koncentrace po dobu 3 až 6 hodin. Pokud se zvýší koncentrace vydechovaného vodíku o 20 ppm (parts per million) proti výchozímu měření, je diagnostikována hypolaktázie (Swagerty et al., 2002). Nevýhodou testu je jeho zdoluhavost, spočívající v nutnosti provedení 12 až 24 měření. Z tohoto důvodu byl protokol upraven na čtyřvzorkový vodíkový dechový test, u kterého se provádí pouze 4 měření v průběhu 3 hodin. Klasický dechový test a čtyř vzorkový test vykazují vysokou shodu výsledků (Yang et al., 2015).

3.6.4 *Laktázový toleranční test*

Tento test spočívá v podání 50 g laktózy a následném měření glykémie před příjmem laktózy a pak po 30, 60 a 120 minutách. Pokud je laktóza správně trávena dochází ke zvýšení glykémie, zvýšení glykémie ukazuje na nedostatečnou absorpci laktózy (Swagerty et al., 2002). Bohužel tento typ testu má nízkou specifickou i senzitivitu. Falešně pozitivní a falešně negativní výsledky se objevují u 20 % měření. Tyto výsledky jsou ovlivněny dobou vyprazdňování žaludku a metabolismem glukózy, jedná se o subjektivní faktory (Ugidos-Rodríguez et al., 2018).

3.6.5 Rychlý laktázový test (biopsie sliznice)

Rychlý test laktázy spočívá v provedení biopsie duodenální sliznice. Následuje inkubace obranné sliznice s laktózou na testovací destičce. Přítomnost aktivity laktázy se projeví tmavě modrým zbarvením, částečná aktivace se pak ukáže světle modrým zbarvením a pokud enzym laktáza neprojevuje žádnou aktivitu, nedojde k žádné barevné reakci, což predikuje těžkou hypolaktázií (Kuokkanen et al., 2006).

3.6.6 Supresní a provokační test s mlékem

Test spočívá v eliminaci laktózy z jídelníčku po dobu dvou týdnů. Poté se laktóza opět do jídelníčku opět zavede. Pokud symptomy zmizí a poté se znovu objeví po nasazení laktózy, naznačuje to, že osoba trpí intolerancí laktózy. Nevýhodou tohoto testu je, že neumožňuje diagnostiku asymptomatických jedinců trpících laktózovou intolerancí (Ugidos-Rodríguez et al., 2018).

3.6.7 Test kyselosti stolice

U intolerantních lidí je po požití laktózy stolice kyselá. Toto snížení pH je způsobeno přítomností těkavých mastných kyselin vznikajících bakteriálním trávením neabsorbované laktózy. Pokud je pH nižší než 5,5 je to dobrým ukazatelem intolerance laktózy. Tento test má smysl pouze u osob užívajících laktózu. Nevýhodou tohoto testu je nízká specifita a citlivost (Ugidos-Rodríguez et al., 2018).

3.7 Možnosti léčby

U osob s laktózovou intolerancí dochází k nedostatečnému vstřebávání živin přítomných v mléce a mléčných výrobcích. Příkladem je vitamín D a vápník, který je důležitý pro růst a výživu kostí u dětí i dospělých. Mléčné produkty poskytují v přepočtu na kalorie více vápníku, bílkovin, hořčíku, draslíku, zinku a fosforu než kterékoli jiné potraviny vyskytující se ve stravě dospělých. Léčba laktózové intolerance jako takové je poměrně jasná. Doplnková terapie je potřebná, pokud pro vyléčení není samotné omezení laktózy dostatečné (Szilagyi a Ishayek, 2018).

3.7.1 Bezlaktózové výrobky a výrobky s nízkým obsahem laktózy

První možností léčby je stravování se pomocí bezlaktózových výrobků nebo výrobků s nízkým obsahem laktózy. Úplné vyloučení laktózy z jídelníčku u osob s laktózovou

intolerancí se již nedoporučuje, jelikož tyto osoby jsou schopny tolerovat 12 až 15 g laktózy denně (Rozenberg et al., 2016).

3.7.2 Nemléčné náhražky

Další možností je užívání nemléčných náhražek. Tyto produkty jsou především rostlinného původu a jsou vyrobeny ze sóji, rýže, konopí, ovsa, kokosu, mandlí a dalších ořechů. Nemléčné potraviny mohou být obohaceny o jeden nebo více z následujících prvků: vápník, vitamíny D, A, B12 a riboflavin (Szilagyi a Ishayek, 2018).

3.7.3 Příjem enzymu laktázy

K trávení laktózy také může pomáhat užívání enzymu laktázy ve formě gelů, tekutin, tablet nebo kapslí. Laktáza se získává převážně z hub nebo kvasinek a je používána před konzumací mléčných výrobků anebo je přidávána přímo do nich, aby pomohla trávení požité laktózy (Lin et al., 1993). Ve své studii Ibba et al. (2014) použil dvě tablety obsahující 7500 IU laktázy u pacientů, kteří požili 25 g laktózy rozpuštěné ve vodě. Toto množství laktózy odpovídá 500 ml mléka. U 22 % zúčastněných měl enzym negativní účinek, u 18 % zúčastněných došlo k významnému snížení vodíkového dechového testu a u zbylých nebyl zjištěn žádný významný rozdíl oproti výchozímu stavu.

3.7.4 Probiotika

Probiotika mohou také příznivě ovlivnit osoby s laktózovou intolerancí. Probiotika jsou definována jako živé mikroorganismy, které při podávání v přiměřeném množství přinášejí hostiteli zdravotní prospěch. Bakterie obsahující β -galaktozidázu (bakteriální laktázu) jsou potencionálně užitečné pro trávení nadbytečné střevní laktózy a tím zabraňují klasickým projevům laktózové intolerance. Bakterie jako *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* a kmeny laktobacilů a bifidobakterií obsahují bakteriální laktázu, která hydrolyzuje laktózu. Probiotika mohou být podávána přirozeně v rámci fermentace mléka a mléčných výrobků ve formě jogurtu nebo kefíru (Hill et al., 2014 a Savajano, 2014).

3.8 Syndrom dráždivého tračníku

Syndrom dráždivého tračníku neboli IBS (Irritable bowel syndrome) je jednou z nejčastějších funkčních gastrointestinálních poruch. Neexistuje žádný biomarker pro

jeho diagnostiku, proto probíhá diagnostika tohoto onemocnění pouze na základě symptomů (Masuy et al., 2020). Prevalence IBS se pohybuje mezi 5 a 20 % v závislosti na zeměpisné oblasti a kritériích používaných pro stanovení diagnózy. Charakteristickými příznaky IBS jsou opakující se bolesti břicha spojené se změnami stolice (průjem, zácpa nebo obojí). Spektrum, závažnost a trvání příznaků je individuální, pokud jsou příznaky obzvláště nepříjemné, je narušen i osobní život jedinců (Moayyedi et al., 2017).

IBS a laktózová intolerance se u dospělé populace vyskytují velmi často, navíc mají velmi podobné příznaky, které se často překrývají. Některé studie popisují zvýšený výskyt laktózové intolerance u osob trpících IBS. Uvažuje se, že souběžný výskyt těchto dvou onemocnění není čistě náhodný (Vernia, 2004).

Kritérium ROME IV kategorizuje IBS do čtyř skupin, jedná s o: IBS s převahou průjmu (IBS-D), IBS s převahou zácpy (IBS-C), IBS se směsí průjmu a zácpy (IBS-M) a IBS bez podtypu (Zhu et al., 2019).

4 Intolerance vs alergie bílkoviny kravského mléka

Výskyt potravinových alergií a intolerancí se celosvětově zvyšuje. Mezi nejčastější alergeny patří kravské mléko, a to zejména u malých dětí. Alergie a intolerance bývají často zaměňovány. Potravinové alergie jsou výsledkem imunologické reakce na určitý typ potravin, která má dopad na řadu tělesných orgánů, zatímco potravinové intolerance představují neimunologické reakce zahrnující metabolické, toxické, farmakologické a další nedefinované mechanismy (Manuyakorn a Tanpowpong, 2018).

4.1 Intolerance bílkoviny kravského mléka

Intolerance bílkoviny kravského mléka je zánětlivý gastrointestinální proces, který postihuje 3 až 7 % kojenců během prvního roku života. Tato intolerance se obvykle projeví po přechodu kojenců na umělou stravu obsahující bílkovinu kravského mléka (Ludman et al., 2013).

Příznaky intolerance u kojenců mohou být různorodé. Patří sem přetrvávající kolika, reflux, potíže s krmením, průjem, hlenovitá stolice, krev ve stolici a střevní dysmotilita (Cordova et al., 2016).

Kojenci s intolerancí bílkoviny kravského mléka přecházejí na výživu založenou na aminokyselinách, anebo se používá kaseinový hydrolyzát, který je již enzymaticky naštěpen a tedy lépe stravitelný. Tento typ výživy se obvykle používá do jednoho roku věku dítěte a následně se přechází na stravu obsahující sójovou bílkovinu nebo bílkovinu kravského mléka. Přístup je založen na pozorování, kdy intolerantní kojenci se stávají tolerantními do 12 měsíců věku dítěte (Lazare et al., 2014).

Doposud neexistují žádné validované laboratorní testy k diagnostice intolerance bílkoviny kravského mléka. Diagnostika je tedy prováděna pouze na základě klinických příznaků. Za intolerantní je považována osoba, která po konzumaci jídla obsahujícího bílkovinu kravského mléka vykazuje alespoň 2 příznaky ze 3 uvedených: gastroezofageální reflux, časná sytost nebo bolest břicha nebo nadbříšku. Diagnóza je potvrzena, pokud po eliminaci potravin obsahujících bílkovinu kravského mléka příznaky odezní, anebo pokud se příznaky opět projeví po konzumaci těchto bílkovin (Rowe et al., 2016).

4.2 Alergie na bílkovinu kravského mléka

Alergie na bílkovinu kravského mléka (ABKM) je definována jako nežádoucí reakce na bílkovinu kravského mléka, která je imunologicky zprostředkovaná. Tato alergie patří mezi první potravinové alergie v dětském věku a může vést k rozvoji dalších potravinových alergií, zejména k alergii na arašídý a vejce. Alergie se vyvíjí v novorozeneckém věku nebo během prvního roku života, přičemž má tendenci ustupovat. Perzistence v dospělosti je vzácná (Fiocchi et al., 2010). Nejčastějšími alergeny v kravském mléce jsou α -laktalbumin, β -laktoglobulin a kasein (Solinas et al., 2010).

4.2.1 Patofyziologie ABKM

ABKM je nežádoucí reakce způsobená vazbou imunoglobulinu E (IgE) na antigeny schopné vyvolat imunitní reakci. Alergická reakce nemusí být zprostředkována pouze IgE, ale i jinými třídami imunoglobulinů, imuno-komplexy nebo imunitními buňkami (Vandenplas et al., 2007). ABKM může být zprostředkována kterýmkoliv ze 4 typů imunologických mechanismů. Tyto typy mechanismů jsou: imunopatologická reakce I. typu (reakce zprostředkována IgE), II. typu (cytotoxická reakce), III. typu a IV. typu (Fiocchi et al., 2010). Nejčastější dělení reakcí u ABKM je dělení na IgE zprostředkované reakce a na non-IgE zprostředkované reakce.

Imunopatologická reakce I. typu představuje klasickou a bezprostřední alergickou reakci zprostředkovanou IgE protilátkami, která má za následek okamžité příznaky jako je anafylaktický šok. Zbylé tři typy reakcí jsou non-IgE zprostředkované a jsou méně prozkoumané. Při reakcích II. typu se antigen váže na povrch buněk a přítomnost protilátek (IgG, IgM nebo IgA) narušuje membránu buňky, což vede k její buněčné smrti. Při imunopatologické reakci III. typu se protilátky (IgG, IgM, IgA, a IgE) zachycují v malých krevních cévách nebo ledvinových glomerulech a reakce IV. typu je zprostředkována senzibilovanými T-lymfocyty.

Za normálních okolností jsou mléčné bílkoviny odbourávány žaludečními a lumenálními trávicími enzymy. Aktivované T-lymfocyty a B-lymfocyty aktivují zánětlivou reakci v daném orgánu, která vede ke klinickým projevům ABKM (Johansson et al., 2003 a Fiocchi et al., 2010).

IgE zprostředkované alergické reakce postihují ve vyspělých zemích 3 až 6 % dětí a mezi nejčastější alergeny patří vejce a bílkovina kravského mléka. ABKM je obecně

popisována jako dětská alergie, která se může objevit již v raném věku, a to ještě před požitím bílkoviny kravského mléka. To naznačuje, že konzumace bílkoviny není jediným způsobem senzibilizace. Pokud se již objevila ABKM, stačí k vyvolání alergické reakce i nepřímá expozice např.: políbkem nebo vdechováním výparu mléka. IgE zprostředkované alergické reakce se obvykle objevují během několika minut po expozici a jejich závažnost se pohybuje od mírné (např. kopřivka) až po závažnou a potenciálně život ohrožující anafylaxi (respirační nebo kardiovaskulární komplikace až kolaps). Děti s ABKM až v 70 % tolerují ohřívání mléka, jelikož díky varu se zničí epitopy alergenů (Du Toit et al., 2010).

4.2.2 Klinické příznaky

Příznaky ABKM mohou být s okamžitým anebo pozdním nástupem. Mezi okamžité příznaky patří časté říhání, zvracení, kopřivka nesouvisející s akutními infekcemi, otok rtů nebo očních víček, sípání, rýma, výtok z nosu a chronický suchý kašel (Solinas et al., 2010). Opožděné příznaky jsou středně těžká až těžká atopická dermatitida, průjem, krev ve stolici, anémie z nedostatku železa, gastroezofageální reflux, zácpa nebo koliky (Kemp et al., 2008).

4.2.3 Diagnostika

Pro vyslovení diagnózy ABKM se vychází z anamnézy a klinických nálezů, které jsou stěžejní. U anamnézy je důležité určit dobu, kdy se objevili první příznaky a jejich povahu a frekvenci, dále časový odstup mezi požitím a nástupem příznaků, způsob expozice (požití, inhalace, kontakt s kůží), délku doby do odeznění příznaků, množství mléka potřebné k vyvolání příznaků a způsob přípravy mléka. Důležité je také uvést možný vliv vnějších faktorů jako je cvičení, hormonální změny nebo emoční stres (Samson, 1999 a Kawano et al., 2001).

Zlatým standardem v diagnostice je provokační test, který spočívá v eliminaci bílkovin kravského mléka, následné provokaci bílkovinami kravského mléka a jejich opětovné eliminaci. U mladších dětí je tento provokační test dostatečným důkazem pro diagnózu ABKM. Tento postup je kontraindikován u těžké ABKM, kde se objevila předchozí anafylaxe. Pokud výsledky provokačního testu vyjdou pozitivně, kojenci pokračují v eliminační dietě nejméně po dobu šesti měsíců. Děti, u kterých se během provokačního testu nerozvinuli příznaky, nemají ABKM (Caffarelli et al., 2010).

Kožní prick testy jsou dalším možným diagnostickým přístupem. Jedná se o rychlý a levný prostředek pro detekci senzibilizace u onemocnění zprostředkovaných IgE a lze jej provést i u kojenců. Za pozitivní výsledek se považuje otok větší než 3 mm v místě aplikace alergenu.

Další možností je kvantitativní měření potravinově specifických IgE protilátek. Za pozitivní výsledek lze považovat, pokud hodnota specifických IgE je větší než 40,35 U/ml. Jak kožní prick test, tak měření IgE protilátek se považuje za užitečné k předpovídání průběhu onemocnění. (Garcia-Ara et al., 2001).

4.2.4 Léčba

Léčba u ABKM spočívá ve vyřazení mléka a mléčných výrobků z jídelníčku. Tak se zabrání expozici dotyčným alergenům. U kojenců s ABKM se využívají tři druhy stravy a to sójová, extenzivně hydrolyzovaná a aminokyselinová.

Sójové přípravky byly historicky předepisované jako první, nejsou ale zcela vhodné pro výživové potřeby kojenců, jelikož sója není hypoalergenní. Až 10 % dětí s IgE zprostředkovanou alergií a 60 % dětí s non-IgE zprostředkovanou alergií je také alergických na sóju.

První volbou bývá extenzivně hydrolyzovaná strava pro kojence mladší 6 měsíců. Aminokyselinová formule je vhodná u dětí s těžkou ABKM.

Některé studie naznačují, že další možnou alternativou je konzumace velbloudího či oslího mléka, která by mohla být snášena imunologicky lépe. Ovšem problémem je právě jejich odlišné složení od lidského mléka, což by mohlo naopak působit potíže (Kemp et al., 2008 a Benhamou et al., 2009).

4.2.5 Asociace alergie s IgG₄ protilátkami

IgG₄ protilátky jsou nejméně zastoupenou podtřídou IgG. Tyto protilátky se uplatňují zejména v regulaci imunitní odpovědi. IgG₄ jsou tvořeny po silné nebo chronické antigenní stimulaci. (Chovancová et al., 2022). IgG₄ protilátky nejsou schopny vytvářet imunitní komplexy a aktivovat tak dráhu komplementu, nevykazují tedy zánětlivé vlastnosti.

Alergenně specifické IgG₄ hrají u alergických onemocnění mnohostrannou roli, která může být buď to protektivní nebo patogenní v závislosti na alergenech anebo podmínkách expozice.

Mezi nejčastěji přisuzované vlastnosti IgG₄ protilátek patří protizánětlivost a navození tolerance u alergických onemocnění. Klinická zkoumání prokázala ochranou funkci IgG₄ u různých typů alergenů, včetně potravinových alergenů, jako jsou mléko a vejce.

Z odborné literatury je známo, že IgG₄ protilátky jsou vyšší u alergických pacientů než u nealergických. Několik studií potvrdilo, že potravinově specifické IgG₄ slouží jako anafylaktické protilátky proti některým potravinám u astmatu a dalších atopických onemocněních. V jiných studiích bylo uvedeno, že omezení potravin s pozitivními IgG₄ protilátkami zlepšilo alergické příznaky (Qin et al., 2022).

5 Cíle práce a hypotézy

5.1 Cíle práce

1. Prvním cílem mé bakalářské práce bylo vypracování odborné rešerše na téma laktózové intolerance, intolerance a alergie bílkoviny kravského mléka s použitím informací publikovaných v odborné literatuře.
2. Druhým cílem mé práce bylo praktické zvládnutí některých molekulárně-biologických metod umožňujících detekci laktózové intolerance pomocí genetického testu a dále zvládnutí metody založené na imuno-enzymatické detekci specifických protilátek třídy IgG4 v plazmě.

Praktická část bakalářské práce se uskutečnila v genetické laboratoři GENLABS.

5.2 Hypotézy

1. Liší se výskyt intolerance laktózy a intolerance kaseinu v české populaci a jak?
2. Jaký je souběžný výskyt obou výše uvedených intolerancí (laktózy i kaseinu) v české populaci?

6 Praktická část

Praktickou část své bakalářské práce jsem provedla v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích pod vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické.

6.1 *Vyšetření laktóзовé intolerance*

6.1.1 *Odběr primárních vzorků*

Pro stanovení laktóзовé intolerance jsou použity 2 druhy primárních vzorků, a to bukální stěr a nesrážlivá periferní krev.

Pro stěr z bukální sliznice je použita speciální souprava pro bukální stěr, která je pacientovi poskytována laboratoři spolu se žádankou a informovaným souhlasem s molekulárně-genetickým vyšetřením. Stěr je proveden pomocí sterilní vatové tyčinky, která je uložena ve sterilní zkumavce. Stěr z bukální sliznice se provádí po vypláchnutí úst vodou a samotný stěr je nutné provádět silným tlakem po dobu 1 minuty. Před provedením stěru se nesmí min. 1 hodinu konzumovat jídlo a negativním faktorem je i kouření. Stěr se pak vloží do sterilní zkumavky, která se uzavře se. Je nutné, aby nedošlo k vnější kontaminaci. Stěr se pak dopraví do laboratoře spolu s vyplněnou žádankou a informovaným souhlasem a neměl by být starší 48 hodin.

Laboratoř GENLABS nemá vlastní odběrovou stanici pro odběr nesrážlivé periferní krve. Periferní krev se odebírá pro laboratoř GENLABS na EUC poliklinikách. Krev je odebírána do zkumavek s antikoagulačním činidlem K₃EDTA. Nejmenší potřebné množství je 1 ml krve, krev je nutné pro odběr promíchat, aby nedošlo ke vzniku sraženin. Samotný vzorek je stabilní po dobu jednoho týdne při teplotě 4 °C a je nutné jej v tomto časovém intervalu dopravit do laboratoře spolu s vyplněnou žádankou a informovaným souhlasem.

6.1.2 *Izolace DNA*

Pro většinu molekulárně-genetických analýz je potřebný vodný extrakt NK bez podílu bílkovin, proto se provádí šetrná extrakce DNA z nativních tkání, tělesných tekutin nebo buněčné kultury. Tento proces se nazývá izolace DNA (Beránek, 2016).

Izolace DNA začíná lýzou buněk, která slouží k rozrušení buněčných membrán a tím i k uvolnění obsahu buňky. Dalším krokem je přidání proteolytických enzymů, ty slouží

k degradaci enzymů štěpících NK a buněčných proteinů, které tvoří komplex s DNA. Dalším krokem je přesrážení alkoholem, postupné promývání a následná eluce DNA (Penka a Slavičková, 2011).

Izolace DNA byla provedena z bukálního stěru nebo ze vzorku nesrážlivé periferní krve periferní krve. U přijatých vzorků v laboratoři se nejdříve zkontroluje žádanka a informovaný souhlas. Dále se každý vzorek označí pomocí LIČ, tak aby se LIČ na žádance shodoval s LIČ vzorku.

Použité přístroje k izolaci DNA:

- Sada automatických pipet v různém rozmezí (2 μ l až 1000 μ l)
- Centrifuga
- Mini centrifuga/vortex
- Microspin 12, Biosan
- Inkubátor
- Kombinovaná chladnička pro laboratorní použití

Reagencie k izolaci DNA:

- Proteináza K
- BL pufr
- 96% ethanol
- BW pufr
- TW pufr
- AE pufr

Spotřební materiál k izolaci DNA:

- Špičky k pipetám
- Kolonky

- 2 ml sběrné zkumavky
- 1,5 ml mikrozkušavky
- Rukavice

6.1.2.1 Izolace DNA z bukálního stěru

Izolace DNA z bukálního stěru byla provedena pomocí komerční sady Exgene™ Clinic SV od firmy GeneAll®.

Pracovní postup izolace:

Nejprve jsem si připravila potřebné reagenty a označené primární vzorky bukální vzorků do boxu. Dále jsem si připravila automatické pipety a špičky.

K bukálním stěrům jsem napipetovala 25 µl proteinázy K o koncentraci 20 mg/ml a 300 µl BL pufru. Vzorek s reagenty jsem důkladně promíchala pomocí vortexu a nechala 10 minut inkubovat při 56 °C. Ve volném čase jsem si připravila kolonky se sběrnou zkumavkou a řádně je označila. Totéž jsem udělala i s 1,5 ml zkumavkami, které jsem použila později.

Po inkubaci jsem zkumavku krátce stočila, aby se odstranily kapky z vnitřní strany zkumavky. Dále jsem ke vzorku přidala 300 µl 96% ethanolu, vzorky zvortexovala v pulzech a krátce stočila.

Následně jsem všechnu směs ze zkumavky přenesla na kolonku a nechala centrifugovat 1 minutu při 8 000 rpm. Po centrifugaci jsem nahradila sběrnou zkumavku novou sběrnou zkumavkou a přidala na kolonku 600 µl BW pufru a nechala opět centrifugovat 1 minutu při 8 000 rpm.

Opět jsem nahradila sběrnou zkumavku novou sběrnou zkumavkou a přidala a na kolonku 700 µl TW pufru. Opakovala jsem centrifugaci při 8 000 rpm po 1 minutu a po centrifugaci jsem odstranila supernatant ze sběrné zkumavky. Zkumavku vrátila na kolonku a nechala stočit při nejvyšších otáčkách k dokonalému odstranění promývacích pufrů.

Sběrnou zkumavku jsem nahradila popsanou 1,5 ml zkumavkou a na střed kolonky napipetovala 50 µl AE pufru. Následovala inkubace 5 minut při pokojové teplotě. Poté

jsem nechala zkumavku centrifugovat 1 minutu při nejvyšších otáčkách, získaný eluát jsem po centrifugaci napipetovala znovu na kolonku, znovu inkubovala a opět stočila při nejvyšších otáčkách.

Po odstranění kolonky byl izolát DNA použit pro měření koncentrace DNA.

6.1.2.2 Izolace DNA z periferní krve

Pro izolaci DNA z periferní krve byla použita stejná komerční sada jako pro izolaci DNA z bukalního stěru ExgeneTM Clinic SV od firmy GeneAll[®].

Pracovní postup izolace:

Jako první krok jsem si připravila potřebné reagentie a automatické pipety se špičkami. Odebrané zkumavky nesrážlivé periferní krve jsem promíchala a z každé zkumavky odebrala 300 µl krve do nové, popsané 1,5 ml zkumavky.

Ke vzorkům krve jsem napipetovala 20 µl proteinázy K o koncentraci 20 mg/ml a 200 µl BL pufru. Vzorek s reagentii jsem důkladně promíchala pomocí vortexu a nechala 10 minut inkubovat při 56 °C. Ve volném čase jsem si připravila kolonky se sběrnou zkumavkou a řádně je označila. Totéž jsem udělala i s 1,5 ml zkumavkami, které jsem použila později.

Po inkubaci jsem zkumavku krátce stočila, aby se odstranili kapky z vnitřní strany zkumavky. Dále jsem přidala 200 µl 96% ethanolu a zortexovala zkumavky v pulzech a nechala zkumavky krátce stočit.

Po stočení jsem všechnu směs ze zkumavky přenesla na kolonku a nechala centrifugovat 1 minutu při 8 000 rpm. Po centrifugaci jsem nahradila sběrnou zkumavku novou sběrnou zkumavkou a přidala na kolonku 600 µl BW pufru a nechala opět centrifugovat 1 minutu při 8 000 rpm. Pokud supernatant nebyl čirý přidala jsem znovu 600 µl BW pufru a nechala znovu centrifugovat při 8 000 rpm po 1 minutu.

Opět jsem nahradila sběrnou zkumavku novou sběrnou zkumavkou a přidal a na kolonku 700 µl TW pufru. Opakovala jsem centrifugaci při 8 000 rpm po 1 minutu a po centrifugaci jsem odstranila supernatant ze sběrné zkumavky, zkumavku vrátila na kolonku a nechala ji stočit při nejvyšších otáčkách.

Sběrnou zkumavku jsem nahradila popsanou 1,5 ml zkumavkou a na střed kolonky napipetovala 50 µl AE pufru a vzorek inkubovala 5 minut při 56 °C. Po inkubaci jsem zkumavku stočila 1 minutu při nejvyšších otáčkách. Po stočení jsem získaný eluát napipetovala znovu na kolonku, inkubovala jako v předešlém kroku a znovu stočila při nejvyšších otáčkách.

Získaný izolát DNA jsem dále použila pro měření koncentrace DNA.

6.1.3 Měření koncentrace DNA

Měření izolované DNA bylo provedeno pomocí Qubit™ dsDNA BR Assay Kit a fluorometru Qubit® 2.0 Fluorometer.

Přístroje:

- Qubit® 2.0 Fluorometer
- Mini centrifuga/vortex
- Microspin 12, Biosan
- Kombinovaná chladnička pro laboratorní použití
- Automatické pipety (1 µl – 200 µl)
- Kombinovaná chladnička pro laboratorní použití

Reagencie:

- Qubit™ Working Solution

Spotřební materiál:

- Špičky k automatickým pipetám
- Rukavice
- Mikrozkušavky Qubit™ Assays tubes

Pracovní postup:

Nejdříve jsem si z chladničky vyndala pracovní roztok (Qubit™ Working Solution) a nechala jej vytemperovat na laboratorní teplotu.

Mikrozkumavky jsem si popsal čísla vzorků a do každé jsem odpipetovala 198 μ l pracovního roztoku a 2 μ l odizolované DNA.

Zkumavky jsem zvortexovala, krátce stočila a inkubovala při laboratorní teplotě 2 minuty. Po inkubaci jsem pomocí fluorometru změřila koncentraci DNA a výsledky zaznamenala.

6.1.4 PCR

PCR (řetězová polymerázová reakce) patří mezi metody, které umožňují amplifikaci specifického úseku DNA. Reakce probíhá v přístroji zvaném termocyklér. Samotná reakce je tvořena třemi, cyklicky se opakujícími, dílčími kroky. Prvním z nich je denaturace dsDNA, při které dochází k rozpletení dsDNA sloužící jako templát pro nově amplifikovanou DNA. Druhým krokem je nasedání primerů, ty jsou komplementární ke koncovým sekvencím amplifikovaného úseku na protilehlých řetězcích DNA. Posledním krokem je elongace, kdy probíhá syntéza nových řetězců DNA (Penka a Slavičková, 2011).

Příprava pro PCR reakci byla provedena v laminárním boxu. Vyšetřovanými polymorfismy spojenými s laktózovou intolerancí byly C/T-13910 a G/A-22018. Pro vyšetření byla použita souprava MyTaqTM Red DNA Polymerase od značky Bioline.

Přístroje:

- Teplotní cycler
- Mini centrifuga/vortex
- Microspin 12, Biosan
- Automatické pipety
- Kombinovaná chladnička pro laboratorní použití

Reagencie:

- Destilovaná H₂O
- MyTaq Red Reaction Buffer
- MyTaq Polymeráza

- DMSO
- For primer pro LAC 13910 C/T a LAC 22018 G/A
- Rev primer pro LAC 13910 C/T a LAC 22018 G/A

Spotřební materiál:

- Špičky k automatickým pipetám
- Zkumavky
- Rukavice

Pracovní postup:

Nejprve jsem si vyndala potřebné reagentie z chladicího boxu a nechala je rozmrznout. Po rozmrznutí jsem je krátce zvortexovala a stočila. DNA polymerázu, u které by mělo zvortexování negativní vliv, jsem pouze stočila.

V laminárním boxu jsem si připravila do chladicího stojánku mikrozukavky a namíchala master mix zvlášť pro polymorfismus C/T-13910 (Tabulka 3) a zvlášť pro polymorfismus G/A-22018 (Tabulka 4). Master mixy jsem zvortexovala a stočila.

Do každé označené zkumavky (včetně negativní a pozitivní kontroly) jsem rozpipetovala vždy 48 μ l připraveného master mixu. Mimo laminární box, proto aby nedošlo k jeho kontaminaci, jsem k master mixu přidala 2 μ l izolované DNA daného vzorku. Jako pozitivní kontrola sloužily vzorky se známými genotypy. Do negativní kontroly nebyla přidána DNA ale 2 μ l H₂O. Zkumavky jsem zvortexovala, krátce stočila a vložila do teplotního cycleru. Průběh PCR reakce pro polymorfismus C/T-13910 a polymorfismus G/A-22018 je uveden v tabulce 5.

Tabulka 3. Složení master mixu pro polymorfismus C/T-13910 a jednu reakci.

Reagentie	Objem [μ l]
Destilovaná H ₂ O	34,3
MyTaq Red Reaction Buffer	10
MyTaq Polymerase (5U/ μ l)	0,2
DMSO (100%)	2,5

For primer pro LAC 13910 C/T (20 pmol)	0,5
Rev primer pro LAC 13910 C/T (20 pmol)	0,5
Celkem	48

(Zdroj: vlastní)

Tabulka 4. Složení master mixu pro polymorfismus G/A-22018 a jednu reakci.

Reagencie	Objem [μl]
Destilovaná H₂O	34,3
MyTaq Red Reaction Buffer	10
MyTaq Polymerase (5U/μl)	0,2
DMSO (100%)	2,5
For primer pro LAC 22018 G/A (20 pmol)	0,5
Rev primer pro LAC 22018 G/A (20 pmol)	0,5
Celkem	48

(Zdroj: vlastní)

Tabulka 5. PCR reakční profily pro oba polymorfismy.

		Polymorfismus C/T-13910		Polymorfismus G/A-22018	
Počet cyklů	Druh cyklu	Čas [min]	Teplota[°C]	Čas [min]	Teplota[°C]
1	Denaturace	5	95	5	95
35	Denaturace	1	95	1	95
	Annealing	1	57,4	1	60,3
	Elongace	1	72	1	72
1	Závěrečná extenze	5	72	5	72

(Zdroj: vlastní)

Kontrola PCR produktu

Výsledkem PCR jsou PCR produkty, které je potřeba zkontrolovat pomocí gelové elektroforézy. Gelová elektroforéza probíhá na 4% agarózovém gelu.

Přístroje:

- Mupid[®]-One Electrophoresis Systém
- FastGene[®] GelPic LED Box
- Mupid[™] LED Illuminator
- Mikrovlnná trouba
- Automatická pipeta

Reagencie:

- 1x TBE pufr
- Agarózové tablety
- Fluorescenční barva Midori Green Advanced DNA Stain
- 100 bp DNA Ladder H3RTU

Spotřební materiál a pomůcky:

- Špičky k automatickým pipetám
- Kádinka a odměrný válec
- Špachtle
- Elektroforetická forma s hřebeny
- Rukavice

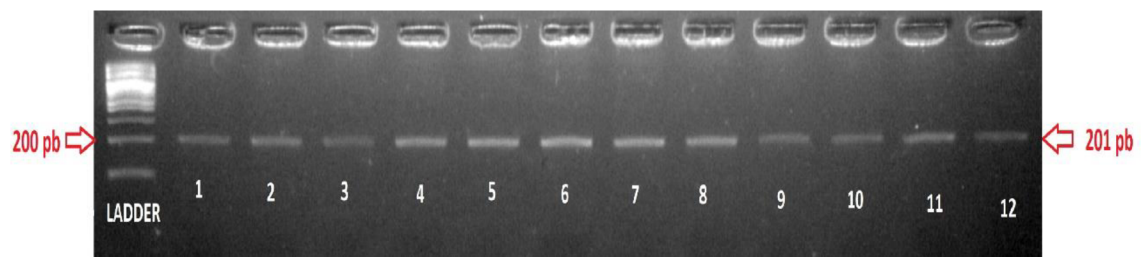
Pracovní postup:

Příprava 4% gelu spočívá v rozpuštění 2 g agarózových tablet v 50 ml 1x TBE pufru. Směs agarózy a pufru v kádince jsem následně vložila do mikrovlnné trouby a na nejvyšší výkon nechala směs zahřívát. Do tekuté gelové směsi jsem přidala 15 μ l fluorescenční barvičky Midori Green Advanced DNA Stain, směs jsem promíchala, nalila do připravené elektroforetické formy s hřebeny a nechala ztuhnout.

Ze zatuhlého gelu jsem vyndala hřeben, díky kterému vznikly malé jamky. Gel jsem vložila do elektroforetické vany, obsahující 1x TBE pufr, tak aby byl gel řádně ponořený. Do první jamky jsem napipetovala 5 μ l 100 bp DNA LADDER H3RTU, který slouží jako hmotnostní marker. Do zbylých jamek jsem napipetovala po 5 μ l PCR produktu. Elektroforéza probíhala 15 minut při 135 V. Po ukončení elektroforézy se gen přenesla na detekční systém a vyhodnotila výsledek PCR pro jednotlivé vzorky. Detekční systém umožňuje nejen vizualizovat DNA, ale také gel vyfotit a pomocí paměťové karty se foto gelu přenese do PC a uloží.

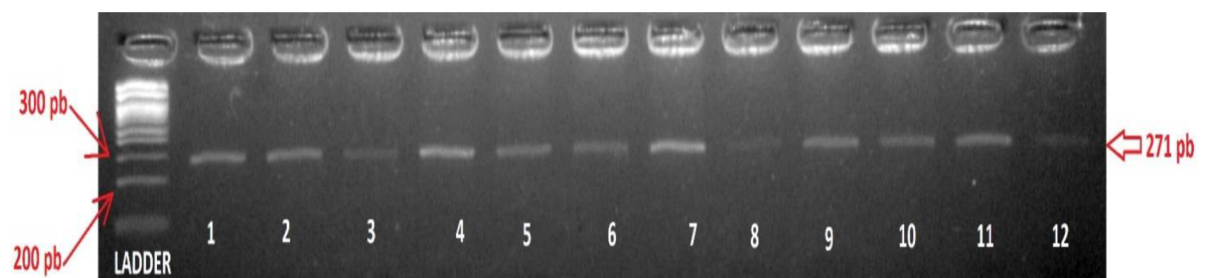
Vyhodnocení:

Výsledkem amplifikační reakce je PCR produkt o velikosti 201 bp pro polymorfismus C/T-13910. Foto gelu vidíme na obrázku 4.



Obrázek 4. Vizualizace PCR produktů pro polymorfismus C/T-13910 na agarózovém gelu. Ladder – hmotnostní marker, 1-12 - PCR produkty. (Zdroj: vlastní).

Výsledná velikost PCR produktu pro polymorfismus G/A-22018 je 271 bp. Foto gelu je vidět na obrázku 5.



Obrázek 5. Vizualizace PCR produktů pro polymorfismus G/A-22018 na agarózovém gelu. Ladder-hmotností marker, 1-12 PCR produkty.(Zdroj: vlastní).

6.1.5 Restrikční štěpení

Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP) představuje molekulárně-genetickou metodu, kdy pomocí vybraných restrikčních enzymů dochází k sekvenčně

specifickému rozštěpení DNA. Různá délka rozštěpených fragmentů a jejich mobilita v gelu pak slouží k identifikaci alel. Modifikovaným postupem je PCR-RFLP, kdy je výchozím materiálem PCR produkt, který je rozštěpen restriční enzymem a očekávané délky vzniklých fragmentů lze identifikovat na agarózovém gelu (Beránek, 2016).

RFLP pro polymorfismus C/T-13910 používá restriční enzym Hinf I, pro G/A-22018 je to restriční enzym Hin6 I.

Přístroje:

- Mupid[®]-One Electrophoresis Systém
- FastGene[®] GelPic LED Box
- Mupid[™] LED Illuminator
- Automatická pipeta
- Microspin 12, Biosan
- Inkubátor
- Kombinovaná chladnička pro laboratorní použití

Reagencie:

- Enzym HinfI (pro polymorfismus C/T-13910)
- 10x CutSmart[™] buffer (pro polymorfismus C/T-13910)
- Hin6I (pro polymorfismus G/A-22018)
- 10x Tango buffer (pro polymorfismus G/A-22018)

Spotřební materiál:

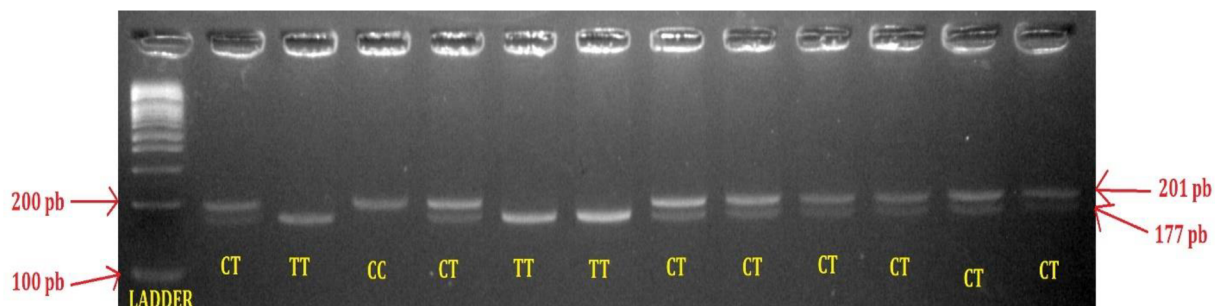
- Zkumavky
- Špičky k automatickým pipetám
- Rukavice

Pracovní postup:

Nejdříve jsem si vyndala restrikční enzymy z mrazáku a jim odpovídající reakční pufrů. Enzymy jsme vložila do chladicího stojánku. Po rozmrznutí a zvortexování pufrů jsem všechny reagenty krátce stočila. Enzymy jsou velmi citlivé, a proto není možné je vortexovat, snížila by se jejich aktivita. Pro každou zkumavku obsahující PCR produkt jsem si připravila reakční směs obsahující 10 U enzymu a 1x příslušný pufr. Nejprve jsem si připravila pro každý polymorfismus směs enzymu a reakčního pufru pro všechny plánované reakce. V případě polymorfismu C/T-13910 jsem pro jednu reakci smíchala 4 µl pufru 10x CutSmart™ Buffer a 1 µl enzymu Hinf I (odpovídá 10 U enzymu) a tuto směs jsem přidala k 45 µl příslušného PCR produktu. Pro polymorfismus G/A-22018 jsem smíchala 4 µl pufru 10x Tango Buffer a 1 µl (10 U) enzymu Hin6 I a tuto směs jsem přidala k 45 µl příslušného PCR produktu. Zkumavky jsem inkubovala min. 1 hodinu při 37 °C. Po inkubaci jsem provedla gelovou elektroforézu na 4% agarózovém gelu při 135 V po dobu 15 a více minut. Výsledky restrikčního štěpení jsem vyhodnotila, gel vyfotila a foto uložila. Příprava gelu a provedení gelové elektroforézy je popsáno v kapitole 6.1.4.1.

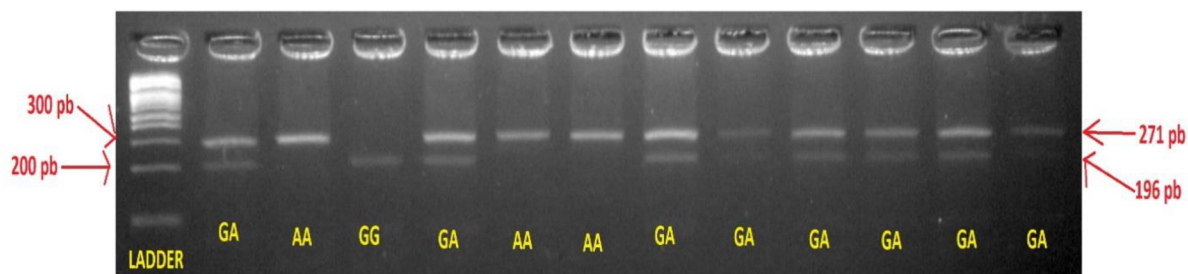
Vyhodnocení:

Restrikční enzym HinfI rozštěpil PCR produkt polymorfismu C/T-13910 v přítomnosti mutace TT na dva fragmenty a to velikostí 177 bp a 24 bp. U wild type genotypu CC (homozygot) nedochází k žádnému štěpení a velikost produktu zůstává na 201 bp. V případě heterozygotního genotypu CT se PCR produkt rozštěpí a vzniknou tři fragmenty o velikosti 201 bp, 177 bp a 24 bp. Nejkratší fragment 24 bp není možné zviditelnit z důvodu jeho krátké velikosti. Výsledky restrikčního štěpení vizualizované na 4% agarózovém gelu můžeme vidět na obrázku 6.



Obrázek 6. Vizualizace restrikčních fragmentů u polymorfismu C/T-13910. Pod jamkami jsou uvedené odečtené genotypy, v první jamce je napipetován ladder, který slouží jako hmotnostní marker. (Zdroj: vlastní).

Pro polymorfismus G/A-22018 byl použit restrikční enzym *Hin6I*, který rozštěpil PCR produkt o velikosti 271 bp v případě wild type genotypu GG na dva fragmenty o velikosti 196 bp a 175 bp. Heterozygotní genotyp GA se pomocí enzymu rozštěpil pouze částečně za vzniku tří fragmentů o velikosti 271 bp, 196 bp a 75 bp. Homozygotní genotyp AA se nerozštěpil a velikost produktu zůstala na 271 bp. Nejkratší fragment 75 bp nebylo možné zviditelnit vzhledem k jeho velikosti. Výsledky restrikčního štěpení vidíme na obrázku 7.



Obrázek 7. Vizualizace restrikčních fragmentů u polymorfismu G/A-22018. Pod jamkami jsou uvedené odečtené genotypy a ladder, který sloužil jako hmotnostní marker. (Zdroj vlastní).

6.2 Vyšetření potravinových intolerancí

Intolerance bílkoviny kravské mléka byla vyšetřena pomocí soupravy IgG4 Screen Nutritional 20 Lineblot od firmy Immunolab a doporučeného postupu od výrobce. K testování intolerance kaseinu bylo použita souprava IgG4 Nutritional MX1.

6.2.1 Odběr vzorků

Pro vyšetření potravinových intolerancí je primárním vzorkem sérum anebo plazma. Pro potřeby mé BP byli jako primární vzorky použity vzorky plazmy. Laboratoř

GENLABS nemá vlastní odběrovou stanici pro odběr nesrážlivé periferní krve. Periferní krev se odebírá pro laboratoř GENLABS na EUC poliklinikách. Krev je odebírána do zkumavek s antikoagulačním činidlem K₃EDTA. Krev je nutné pro odběr promíchat, aby nedošlo ke vzniku sraženin a dále je skladován při ledničkové teplotě. Samotný vzorek spolu s vyplněnou žádankou je následně dopraven do laboratoře GENLABS, vzorek je nutné zpracovat do 7 dnů od odběru. Plazmu získáme centrifugací, kdy se oddělí od ostatních krevních elementů. Oddělená plazma se poté přenese do čisté a popsané 1,5 ml zkumavky.

6.2.2 Princip testu

Testovací souprava je založena na principu enzymatické reakce. Testovací proužek obsahuje 20 různých potravinových antigenů a kontrolní linii. Složení potravinových antigenů na proužku se liší v závislosti na typu testu (Tabulka 6). Zkráceně, po inkubaci testovacího proužku v dilučním pufru s patientskou plazmou se protilátky IgG₄ naváží na odpovídající specifické antigeny, které jsou na testovacím proužku ukotveny ve známém pořadí. Následují promývací kroky, které odstraní nenavázané protilátky. Dále se přidá konjugát, dochází k další inkubaci a následnému promytí. Posledním krokem je přidání substrátu, kdy během inkubace dochází k barevné reakci na testovacím proužku. Proužek je pak opláchnut destilovanou vodou a výsledky enzymatické jsou viditelné pouhým okem.

6.2.3 Složení soupravy

Inkubační nosič

Slouží pro inkubaci testovacích proužků s roztoky. Skládá se z 8 jamek pro inkubaci 8 proužků.

Skenovací podložka

Jedná se o papírový arch, na který jsou nalepeny testovací proužky ve známém pořadí. Arch se naskenuje a dochází k vyhodnocení pomocí programu ImunoLine.

Nitrocelulózové testovací proužky

Nitrocelulózový proužek je potažen 20 různými antigeny (Tabulka 6) ve známé poloze a pořadí a jedním kontrolním proužkem. Sada obsahuje 16 proužků.

Enzymatický konjugát

Jedná se o antihumánní IgG4-AP (myš) v pufovacím roztoku s obsahem proteinů. Obsahuje 0,01% methylisothiazolonu, 0,01% bromonitrodioxanu a 5 mg/l přípravku Proclin™. Roztok je připraven od výrobce k použití. Celkový obsah roztoku je 18 ml.

Diluent

Diluent je složen z pufru PBS/BSA a přídavku 0,05% azidu sodného. Roztok je připraven od výrobce k použití. Celkový obsah roztoku je 60 ml.

Promývací pufr

Složení promývacího pufru je TBS + Tween 20. Jedná se o koncentrát. Roztok je připraven od výrobce k použití. Celkový obsah roztoku je 60 ml. Konečnou koncentraci roztoku získáme naředěním 1:9 s destilovanou vodou, takto naředěný roztok lze uchovávat při teplotě 2-8 °C po dobu 4 týdnů.

Substrát

Substrát obsahuje BCIP/NBT. Roztok je připraven od výrobce k použití. Celkový obsah roztoku je 18 ml.

Návod k použití

Návod k použití popisuje pracovní postup optimalizovaný pro správné provedení testu.

Tabulka 6: Distribuční schéma souprav IgG4 Nutritional MX1, MX2, MX3 a 20 LineBlot, pozice protilátek odpovídající jednotlivým potravinám.

Poloha	IgG4 Nutritional MX1	IgG4 Nutritional MX2	IgG4 Nutritional MX3	Screen Nutritional 20 LineBlot
CL	kontrola	kontrola	kontrola	kontrola
1	vejce žloutek	pšenice	mandle	vejce
2	vejce bílek	oves	kokosový ořech	kravské mléko
3	kravské mléko	rýže	kešu	pšenice
4	kozí mléko	kukuřice	kaštan	kukuřice
5	kasein	lepek	arašídy	rýže
6	vepřové	kvasnice	sója	sója
7	kuřecí	jablko	fazole	arašíd
8	krůtí	maliny	čočka	sezam
9	skopové	hroznové víno	dýně	kreveta
10	telecí	pomeranč	okurka	krab

11	treska	citrón	červená paprika	treska
12	losos	grapefruit	rajče	vepřové
13	tuňák	mango	brokolice	rajče
14	bílé ryby	ananas	špenát	brambor
15	krab	banán	žampion	mrkev
16	krevety	vodní meloun	mrkev	pomeranč
17	slávka	žlutý meloun	celer	kiwi
18	káva	datle	brambory	jahoda
19	kakao	olivy	cibule	banán
20	zázvor	zelená paprika	česnek	jablko

(Zdroj: Příbalový leták IgG4 Nutritional MX1, MX2, MX3 a 20 LineBlot od firmy Imunnolab)

6.2.4 Pracovní postup

Použité vybavení:

- Souprava IgG4 Nutritional MX1
- Automatické pipety
- Špičky k automatickým pipetám
- Vodní lázeň

Pracovní postup:

Nejdříve jsem si připravila testovací proužky značkami nahoru do inkubačního nosiče a zaznamenala si do skenovací podložky LIČ pacienta a číslo testovacího proužku.

K proužkům jsem přidala 1000 µl diluentu na nechala 5 minut inkubovat za stálého třepání. Intenzita třepání byla 70 rpm.

Po 5 minutách jsem diluent vylila a přidala opět 1000 µl diluentu obsahujícího 20 µl plazmy pacienta, který jsem si předtím připravila. Následovala inkubace 30 min za stálého třepání. Roztok jsme vylila. Pomocí 2 ml promývacího roztoku jsem testovací proužky promyla po dobu 2 minut a promývací roztok vylila. Promývání jsem opakovala celkem 3krát.

Do inkubační vaničky k testovacímu proužku jsem přidala 500 µl enzymatického konjugátu a nechala 30 minut inkubovat za stálého třepání. Pomocí 2 ml promývacího

roztoku jsem testovací proužky promyla po dobu 2 minut a promývací roztok vylila. Promývání jsem opakovala celkem 3krát.

Dalším krokem bylo přidání 500 µl substrátu, který jsem za stálého třepání inkubovala s testovacím proužkem 60 minut. Substrát jsem vylila a přidala 2 ml promývacího roztoku a nechala 5 minut třepat na vodní lázni. Promývací roztok jsem vylila a tím byla reakce ukončena.

Ještě mokré stripy jsem nalepila na skenovací podložku a nechala vyschnout. Poté jsem testovací proužky vyhodnotila pomocí programu ImunoLine.

6.2.5 Vyhodnocení

Skenovací podložka s testovacími proužky (Obr. 8) se vloží do skeneru, který skenovaný obrázek převede do programu ImunoLine. V programu ImunoLine se vyplní jméno pacienta a typ testovacího proužku. Program provede kvantitativní analýzu intenzity zabarvení. Výsledky specifických IgG₄ jsou vyjádřeny kvantitativně v U/ml nebo semikvantitativně ve třídách v rozsahu 0–4 (Tabulka 7). Potravinová intolerance se pak vyhodnocuje v laboratoři jako negativní, hraniční, pozitivní a silně pozitivní (Tabulka 8).

Tabulka 7 Kvantitativní vyhodnocení potravinových intolerancí.

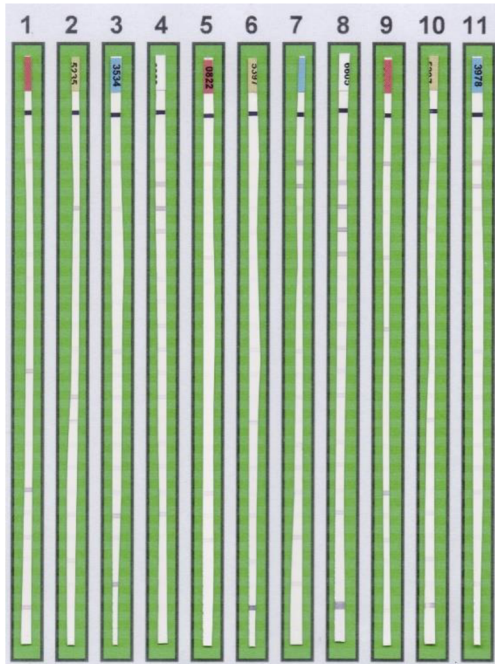
Třída	Jednotky [U/ml]	Interpretace
0	<1	negativní
1	1-3,4	negativní
2	3,5-17,4	hraniční
3	17,5-49,9	pozitivní
4	≥50	Silně pozitivní

(Zdroj: Příbalový leták IgG₄ Nutritional MX1, MX2, MX3 a 20 LineBlot od firmy Imunolab)

Tabulka 8. Vzor pro vyhodnocení potravinových intolerancí v závislosti na intenzitě reakce.

Výsledek	Signál	Kategorie
Negativní	Žádný nebo slabý signál u více antigenů	< 1
Hraniční	Slabý signál	1,2-2,9
Pozitivní	Střední signál	3,0-3,9
Silně pozitivní	Intenzivní signál	≥ 4

(Zdroj: vlastní)



Obrázek 8. Ilustrační foto testovacích proužků na skenovací podložce. (Zdroj: vlastní)

7 Výsledky

V rámci mé bakalářské práce byly statisticky zpracovány výsledky testů na laktózovou intoleranci a výsledky testů na intoleranci kravského mléka a kaseinu, které poskytla genetická laboratoř GENLABS. Data byla zpracována pomocí MS Excel 2019.

7.1 Výsledky laktózové intolerance

Celkový soubor (Příloha 1) osob vyšetřovaných na predispozici pro laktózovou intoleranci byl tvořen 2532 osobami, které podstoupili genetický test v období od roku 2014 do roku 2022. Tyto osoby byly testovány v laboratoři GENLABS na dva možné polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018, které jsou asociované s laktózovou intolerancí.

Z testovaných osob na predispozici k laktózové intoleranci byli testováni muži i ženy. Podíl testovaných žen a mužů ukazuje tabulka 9.

Tabulka 9. Zastoupení testovaných žen a mužů na predispozici k laktózové intoleranci.

Pohlaví	Žena	Muž
Zastoupení	1837	695
%	72,55 %	27,45 %

Tabulka 8 ukazuje, že většina testovaných byly ženy a to v 72,55 %. Ve 27,45 % případech se jednalo o muže.

Rozložení věkových skupin všech testovaných žen i mužů pro predispozici k laktózové intoleranci ukazuje tabulka 10.

Tabulka 10. Počty vyšetřených jedinců na laktózovou intoleranci v jednotlivých věkových kategoriích.

Věková skupina	Pohlaví				Celkem	
	Žena		Muž			
do 10 let	150	5,92 %	161	6,36 %	311	12,28 %
11-20 let	99	3,91 %	67	2,65 %	166	6,56 %

21-30 let	219	8,65 %	68	2,69 %	287	11,33 %
31-40 let	411	16,23 %	142	5,61 %	553	21,84 %
41-50 let	467	18,44 %	143	5,65 %	610	24,09 %
51-60 let	300	11,85 %	55	2,17 %	355	14,02 %
61-70 let	144	5,69 %	40	1,58 %	184	7,27 %
71-80 let	36	1,42 %	15	0,59 %	51	2,01 %
nad 80 let	11	0,43 %	4	0,16 %	15	0,59 %

Nejvíce testovaných osob (24,09 %) bylo ve věkové kategorii od 41 do 50 let. Další nejvyšší zastoupení měla věková skupina od 31 do 40 let, kde bylo testováno 21,84 %. Nejméně byli testováni senioři nad 80 let. Jednalo se pouze o 15 osob, tedy 0,59 %, v této věkové kategorii. V případě věkové skupiny od 71 do 80 let bylo testováno 51 jedinců, což odpovídá 2,01 %. Dá se tedy říct, že největší zájem o testování měli jedinci mezi 31 až 50 rokem života a nejnižší zájem o testování měli lidé starší 70 let.

V genu související s laktózovou intolerancí MCM6 byly testovány dva SNP C/T-13910 a G/A-22018. Genotypy a odpovídající fenotypy pro tyto polymorfismy ukazuje tabulka 11.

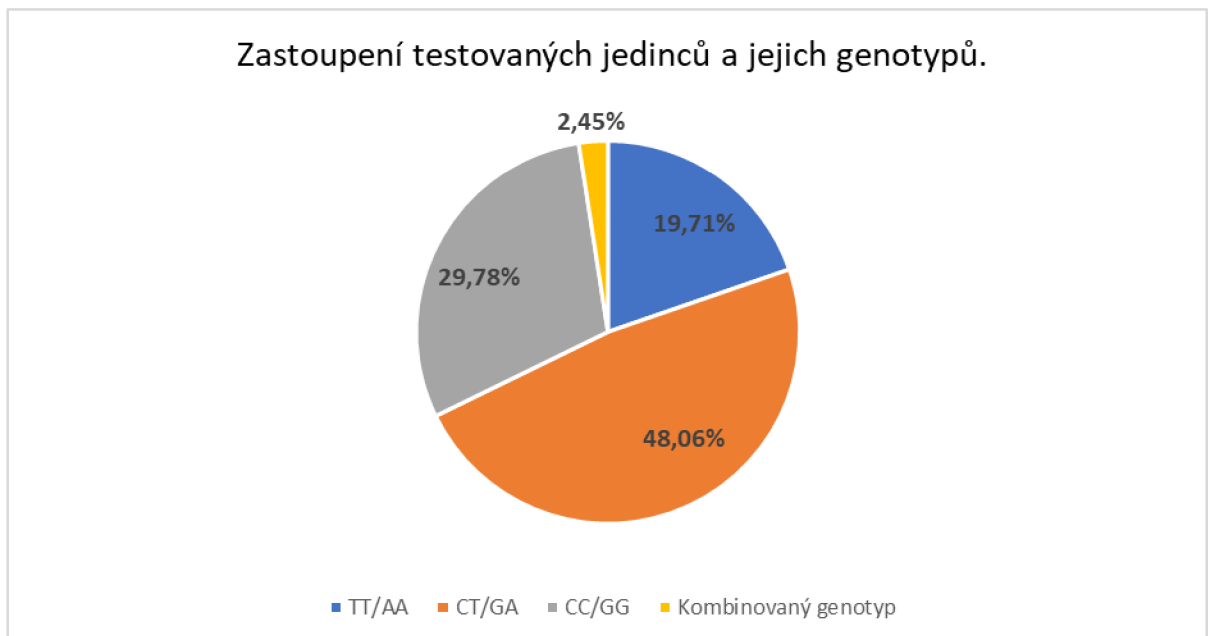
Tabulka 11. Přehled genotypů a fenotypů pro polymorfismy SNP C/T-13910 a G/A-22018.

Fenotyp		Genotyp	
Tolerance/intolerance laktózy	Typ	SNP C/T-13910	SNP G/A-22018
Laktózová intolerance	Wild type	CC	GG
Částečná laktózová intolerance	Heterozygot	CT	GA
Laktózová tolerance	Mutace	TT	AA

V naprosté většině případů se genotypy obou polymorfismů vyskytují ve stejné genotypové konstituci, tzn. jako wild type, heterozygot nebo homozygot. Např.: jedinec s heterozygotním genotypem CT pro C/T-13910 je také heterozygot GA pro polymorfismus G/A-22018. V několika málo případech však genotypy obou polymorfismů nekorelují a objevují se kombinované (variantní) genotypy CC/GA nebo CC/AA. V tabulce číslo 12 lze vidět zastoupení jedinců s heterozygotním, mutantním, wild type a kombinovaných genotypem. Zastoupení je vizualizováno graficky na obrázku 9.

Tabulka 12. Zastoupení testovaných jedinců a jejich genotypů.

Genotyp	Zastoupení	%
TT/AA	499	19,71 %
CT/GA	1217	48,06 %
CC/GG	754	29,78 %
Kombinovaný	62	2,45 %



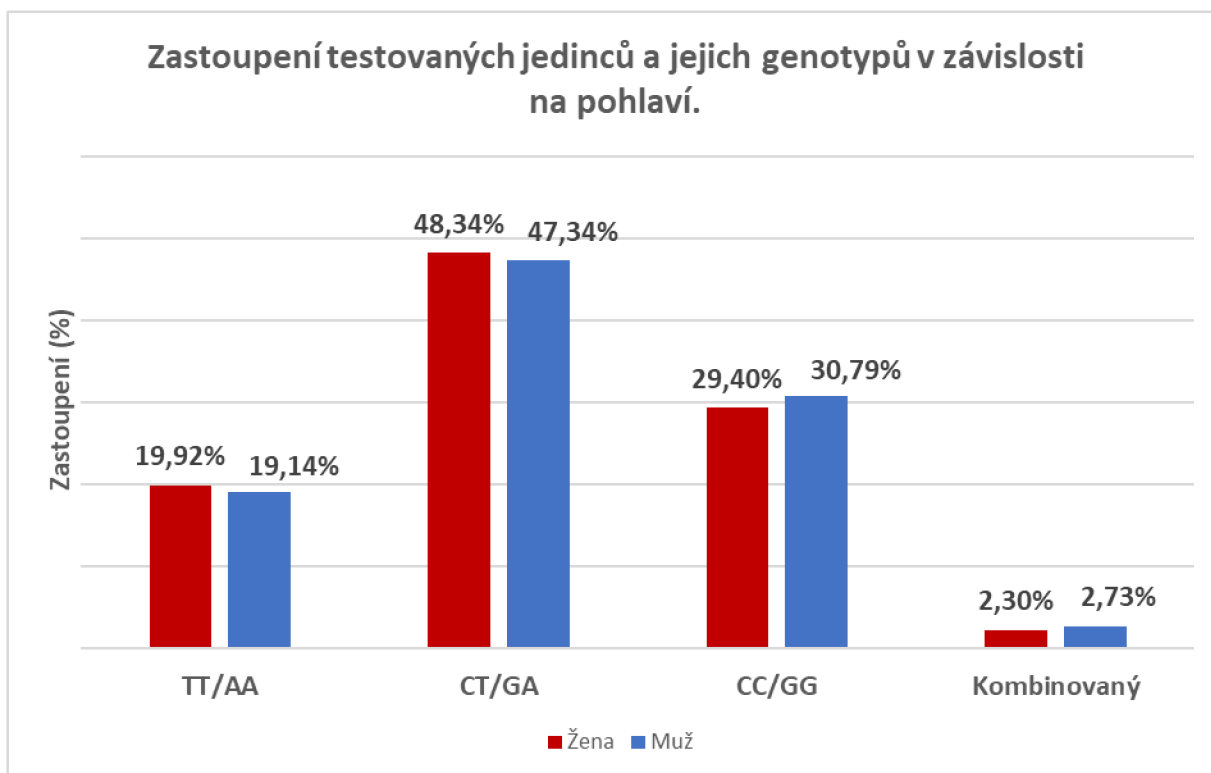
Obrázek 9. Zastoupení testovaných jedinců a jejich genotypů.

Nejvíce testovaných osob (48,06 %) mělo heterozygotní genotyp v obou SNP, který se vyznačuje částečnou laktózovou intolerancí, a tedy mírným poklesem enzymu laktázy. U 29,78 % osob byl zachycen wild type genotyp, který je spojen s úplnou laktózovou intolerancí. Zastoupení jedinců s laktózovou tolerancí činilo 19,71 %. Nejnižší zastoupení (2,45 %) měly osoby s kombinovaným genotypem.

Jak lze vidět v tabulce 13, trpí úplnou nebo částečnou laktózovou intolerancí zhruba stejně ženy (29,4 % versus 48,34 %) jako muži (30,79 % versus 47,34 %). V případě tolerance laktózy bylo zastoupení u žen a mužů opět velmi podobné (19,92 % versus 19,14 %). Pro lepší znázornění výsledků byl vytvořen graf na obrázku 10.

Tabulka 13. Zastoupení testovaných jedinců a jejich genotypů v závislosti na pohlaví.

Genotyp	Pohlaví			
	Žena (n=1873)		Muž (n=695)	
TT/AA	366	19,92 %	133	19,14 %
CT/GA	888	48,34 %	329	47,34 %
CC/GG	540	29,4 %	214	30,79 %
Kombinovaný	43	2,3 %	19	2,73 %



Obrázek 10 Zastoupení testovaných jedinců a jejich genotypů v závislosti na pohlaví. Červené sloupce ukazují ženy, modré muže.

7.2 Výsledky imuno-enzymatických testů pro potravinové intolerance

Celkový soubor (Příloha 2) osob vyšetřovaných na potravinovou intoleranci kaseinu a kravského mléka byl tvořen 964 osobami, které podstoupili sérologický test v období od roku 2019 do roku 2022. Tito jedinci byli testováni v laboratoři GENLABS pomocí soupravy IgG₄ Nutritional MX1 od firmy Immunolab.

Tabulka 14 ukazuje poměr obou pohlaví. Celkem bylo testováno 741 (76,87 %) žen a 223 (23,13 %) mužů. Toto zastoupení je obdobné jako u testování laktóзовé intolerance, lze tedy říct, že ženy mají větší zájem o tyto testy.

Tabulka 14. Zastoupení testovaných žen a mužů na intoleranci kravského mléka a kaseinu.

Pohlaví	Žena	Muž
Zastoupení	741	223
%	76,87 %	23,13 %

V tabulce 15 jsou uvedeny jednotlivé věkové kategorie. Nejvyšší zájem o testování měla věková skupina od 41 do 50 let (29,98 %) a druhé nejvyšší zastoupení bylo ve věkové kategorii od 31 do 40 let (22,30 %). Nejméně jedinců bylo ve věkové skupině osob starších 80 let (0,52 %).

Tabulka 15. Počty vyšetřených jedinců na intoleranci kravského mléka a kaseinu v závislosti na věku a pohlaví.

Věková skupina	Pohlaví				Celkem	
	Žena (n=741)		Muž (n=223)			
do 10 let	11	1,14 %	24	2,49 %	311	3,63 %
11-20 let	13	1,35 %	10	1,04 %	166	2,39 %
21-30 let	70	7,26 %	16	1,66 %	287	8,92 %
31-40 let	158	16,39 %	57	5,91 %	553	22,30 %
41-50 let	223	23,13 %	66	6,85 %	610	29,98 %
51-60 let	176	18,26 %	28	2,90 %	355	21,16 %
61-70 let	61	6,33 %	16	1,66 %	184	7,99 %
71-80 let	25	2,59 %	5	0,52 %	51	3,11 %
nad 80 let	4	0,41 %	1	0,10 %	15	0,52 %

Tabulka 16 ukazuje výsledky získané testováním intolerance kravského mléka. Většina testovaných jedinců vyšla v testu negativní (44,71 %). Hraničně vyšlo 24,27 % jedinců, pozitivně 16,08 % jedinců a silně pozitivně nejméně a to 14,94 % jedinců. Z výsledků vidíme, že intoleranci (pozitivní a silně pozitivní) trpělo zhruba 30 % jedinců.

Tabulka 16. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kravského mléka.

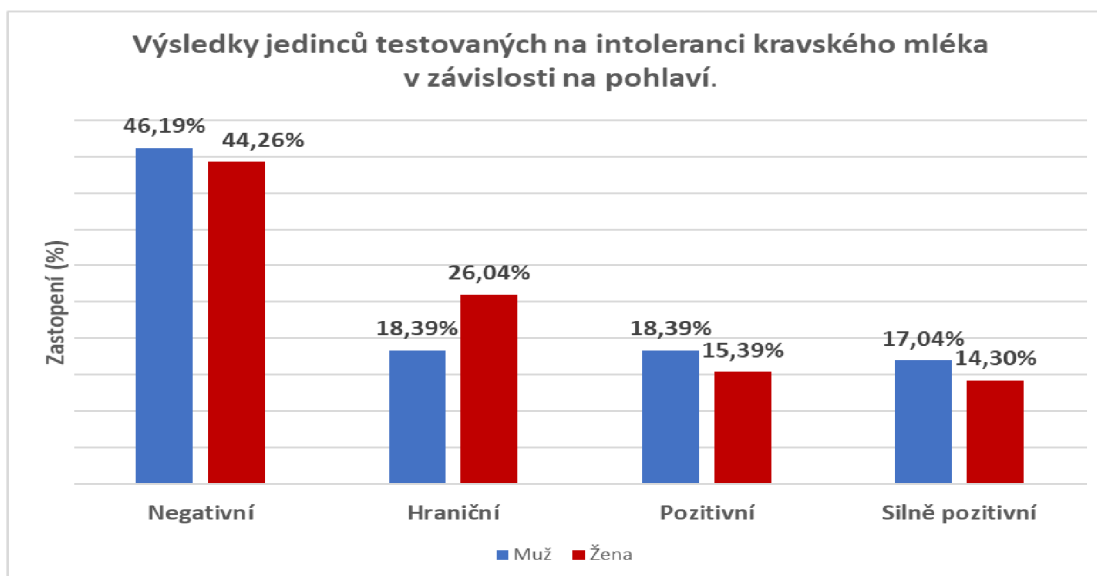
Výsledek	Negativní	Hraniční	Pozitivní	Silně pozitivní

Zastoupení	431	234	155	144
%	44,71 %	24,27 %	16,08 %	14,94 %

V tabulce 17 vidíme celkem 14,94 % silně pozitivních výsledků pro intoleranci kravského mléka u 14,30% žen a 17,04% mužů. Negativní výsledky mělo 44,6% žen a 46,19% u mužů. Zastoupení kategorií pro intolerance je vizuálně znázorněno na obrázku 11.

Tabulka 17. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kravského mléka v závislosti na pohlaví.

Výsledek	Pohlaví				Celkem (n=964)	
	Muž (n=223)		Žena (n=741)			
Negativní	103	46,19 %	328	44,26 %	431	44,71 %
Hraniční	41	18,39 %	193	26,04 %	234	24,27 %
Pozitivní	41	18,39 %	114	15,39 %	155	16,08 %
Silně pozitivní	38	17,04 %	106	14,30 %	144	14,94 %



Obrázek 11. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kravského mléka v závislosti na pohlaví.

Tabulka 18 ukazuje výsledky zjištěné u intolerance kaseinu, kdy bylo celkem testováno 964 jedinců. Více než polovina testovaných jedinců vyšla z testu negativní (59,85 %). Hraničně vyšlo 20,02 % jedinců, pozitivně 11,41 % jedinců a silně pozitivně nejméně jedinců a to 8,71 %. Dá se říci, že jedinci s pozitivní a silně pozitivní intolerancí byli zastoupeni 5x méně častěji (20,12 %).

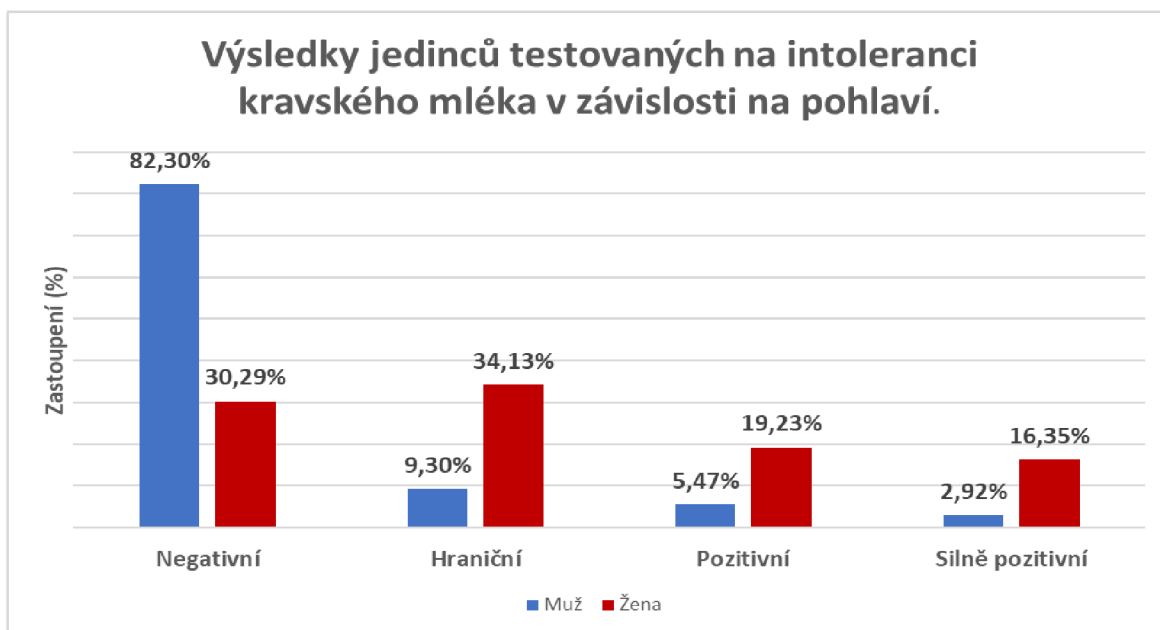
Tabulka 18. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kaseinu.

Výsledek	Negativní	Hraniční	Pozitivní	Silně pozitivní
Zastoupení	577	193	110	84
%	59,85 %	20,02 %	11,41 %	8,71 %

V tabulce 19 lze vidět, že z 548 testovaných mužů bylo pouze 2,92 % silně pozitivních a 5,47 % pozitivních. Žen bylo testováno 416, z toho silně pozitivních 16,35 % a pozitivních 19,23 %. Muži byli většinou na kasein negativní (82,3 %) a ženám byla diagnostikována negativní intolerance pouze ve 30,29 %. Negativní pro kasein byli ve srovnání se ženami daleko více muži. Zastoupení intolerance kaseinu pro obě pohlaví je vizuálně znázorněno na obrázku 12.

Tabulka 19. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kaseinu v závislosti na pohlaví.

Výsledek	Pohlaví				Celkem (n=964)		
	Muž (n=548)		Žena (n=416)				
Negativní	451	82,3 %	126	30,29 %		577	59,85 %
Hraniční	51	9,3 %	142	34,13 %		193	20,02 %
Pozitivní	30	5,47 %	80	19,23 %		110	11,41 %
Silně pozitivní	16	2,92 %	68	16,35 %		84	8,71 %



Obrázek 12 Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kaseinu v závislosti na pohlaví.

V tabulce 20 lze vidět souběžný výskyt intolerance kravského mléka a kaseinu. U sedmi případů byl výsledek pro intoleranci kaseinu negativní, zatímco výsledek intolerance kravského mléka byl silně pozitivní. To znamená, že tyto jedinci snášejí kasein, ale mohou být intolerantní na jinou bílkovinu obsaženou v kravském mléce. Negativních jedinců pro obě intolerance bylo 44,5 %, hraničních 11,5 %, pozitivních 7,3 % a silně pozitivních 8,7 %.

Tabulka 20. souběžný výskyt intolerance kravského mléka a kaseinu.

		Kravské mléko			
		Negativní	Hraniční	Pozitivní	Silně pozitivní
Kasein	Negativní	44,5 % (429)	12,8 % (123)	1,9 % (18)	0,7 % (7)
	Hraniční	0,2 % (2)	11,5 % (111)	7,0 % (67)	1,3 % (13)
	Pozitivní	0,0 % (0)	0,0 % (0)	7,3 % (70)	4,1 % (40)
	Silně pozitivní	0,0 % (0)	0,0 % (0)	0,0 % (0)	8,7 % (84)

7.3 Výsledky souběžného výskytu intolerance laktózy a intolerance kaseinu

Celkový počet jedinců současně vyšetřovaných na laktózovou intoleranci a intoleranci kaseinu byl 293. U těchto osob byl sledován souběžný výskyt obou intolerancí.

Tabulka 21 ukazuje počet testovaných jedinců na obě intolerance, jejich pohlaví a věk.

Tabulka 21. Počet testovaných jedinců na laktózovou intoleranci a intoleranci kaseinu, jejich pohlaví a věk.

	Zastoupení	Průměrný věk
Muž	32,08 % (94)	34,43
Žena	67,92 % (199)	41,11

V tabulce 22 lze vidět souběžný výskyt laktóзовé a kaseinové intolerance. Nejvyšší počty jedinců pro všechny genotypy laktóзовé intolerance byly negativní pro intoleranci kaseinu, a naopak nejnižší počty pak u silně pozitivních výsledků pro intoleranci kaseinu. Větším problémem je tedy intolerance laktóзы, zatímco intolerance kaseinu není tak častá. Nejvíce negativních, hraničních, pozitivních i silně pozitivních výsledků u intolerance kaseinu se vyskytovalo společně s genotypem CT/GA. Pouze 2,73 % jedinců trpělo laktóзовou intolerancí a bylo zároveň silně pozitivních pro kasein. Tito pacienti tak nemohou konzumovat ani bezlaktóзовé mléko. 15,36 % jedinců trpí laktóзовou intolerancí, ale mají negativní intoleranci kaseinu, takže mohou konzumovat mléčné výrobky, které obsahují mléčnou bílkovinu ne však laktóзу. U 12,29 % jedinců byla zjištěna laktóзовá tolerance a tolerance na bílkovinu kravského mléka. Těm by neměly mléčné výrobky vadit.

Tabulka 22. Souběžný výskyt laktóзовé intolerance a alergie bílkoviny kravského mléka.

		Kasein							
		Negativní		Hraniční		Pozitivní		Silně pozitivní	
Genotyp LI	TT/AA	36	12,29 %	15	5,12 %	9	3,07 %	9	3,07 %
	CT/GA	81	27,65 %	28	9,56 %	18	6,14 %	10	3,41 %
	CC/GG	45	15,36 %	19	6,48 %	11	3,75 %	8	2,73 %
	Kombinovaný genotyp	4	1,37 %	0	0,00 %	0	0,00 %	0	0,00 %

8 Diskuse

Laktózová intolerance je neschopnost těla štěpit mléčný cukr laktózu. Intolerance je způsobena sníženou aktivitou nebo úplnou ztrátou střevního enzymu laktázy. Nedostatek laktázy ve střevech způsobuje následnou fermentaci laktózy, která vede k hlavním příznakům laktózové intolerance jako je bolest břicha, plynatost a průjemy (Catanzaro et al., 2021, Matthews et al., 2005). Genetické testování je důležité pro rozlišení primární nebo sekundární laktózové intolerance (Enattah et al., 2002).

Laktózová intolerance je často zaměňována za alergii na bílkovinu kravského mléka, přičemž mléko představuje významný alergen. Potravinová alergie se prezentuje jako intolerance laktózy, cukru v mléce, nebo alergie na mléčnou bílkovinu. Přestože mají obě intolerance odlišnou symptomatologii, záměny mezi alergickými stavy na mléko a jeho mediátory jsou běžné. Alergie na mléčné bílkoviny vzniká na základě přítomnosti bílkovinných složek v mléce, které vyvolávají alergické reakce imunitního systému buď na bílkovinné frakce v emulzi (kaseiny), nebo v syrovátce (mléčný albumin).

V rámci mé bakalářské práce byl zpracován soubor 2532 osob testovaných na predispozici pro laktózovou intoleranci. Všechny osoby byly otestovány pomocí metody PCR-RFLP na dva možné polymorfismy asociované s laktózovou intolerancí/tolerancí a to C/T-13910 a G/A-22018.

Na základě vyhodnocení výsledků PCR-RFLP bylo zjištěno, že nejčastějším genotypem byl heterozygotní genotyp CT/GA, který je asociován s částečnou laktózovou intolerancí (48,06 %). Druhým nejčastěji zastoupeným genotypem byl homozygotní genotyp CC/GG, který je spjat s úplnou laktózovou intolerancí a ve vyšetřovaném souboru představoval 29,78 %. Nejméně vyskytujícím se genotypem byl genotyp pro laktózovou toleranci a vyskytoval se u 19,71 % testovaných jedinců. Zbýlých 2,45 % vyšetřovaných jedinců vykazovalo kombinovaný genotyp. Storhaug (2017) uvádí, že laktózovou intolerancí celosvětově trpí okolo 68 % populace a v zemích střední Evropy pak 47 % osob, v České republice uvádí 81 %. Výsledky získané v této bakalářské práci se výrazně liší od uvedených dat. Vrozená intolerance laktózy byla zjištěna u téměř 30 % jedinců. Důvodem může být to, že v dnešní době existuje velké množství náhražek mléka a podle Dewiasty (2021) je vyšší prevalence laktózové intolerance u osob konzumujících mléčné výrobky než u těch osob, kteří je nekonzumují.

V rámci testování výskytu intolerance kravského mléka a kaseinu byl vyšetřován soubor 964 jedinců. Vyšetření proběhlo pomocí soupravy IgG₄ Nutritional MX1 od firmy Immunolab, která detekuje IgG₄ protilátky.

Celková prevalence u potravinových alergií se pohybuje celosvětově okolo 3 až 6 % a má významný dopad na kvalitu života. Výsledky testů na intoleranci kravského mléka a kaseinu zpracované v této práci byly hodnoceny jako negativní, hraniční, pozitivní a silně pozitivní (viz tabulka 8). V případě intolerance kravského mléka bylo 30,99 % testovaných jedinců pozitivních, z toho 16,08 % pozitivních a 14,94 % silně pozitivních. Pokud šlo o intoleranci kaseinu, pozitivních bylo méně a to 20,12 % případů, z toho 11,41 % jedinců pozitivních a 8,71 % silně pozitivních. Ve srovnání s celkovou světovou prevalencí nesnášenlivosti mléka vyšla intolerance kravského mléka až 5x vyšší a intolerance kaseinu 3x vyšší. Tato velká nesrovnalost může být způsobena nejen výběrem testu, ale i problémy při určování prevalence potravinových alergií jako je chybná klasifikace onemocnění, nedostatek jednoduchých diagnostických testů, rychlý vývoj onemocnění a velké množství potenciálních spouštěčů. Obecně se prevalence liší podle věku, zeměpisné polohy a případně i rasy/etnika. (Sicherer, 2008).

Stanovované protilátky IgG₄ proti potravinovým alergenům se označují jako vedlejší a neměly by být používány jako diagnostický nástroj pro potravinové alergie. Objevují se ovšem studie prokazující, že omezení potravin pozitivních na IgG₄ protilátky, zlepšuje alergické příznaky. (Qin et al.,2022). V práci Ito et al. (2012) se ukázalo, že vysoké hladiny kasein-specifických protilátek IgG₄ jsou spojeny s tolerancí kaseinu u osob senzibilizovaných na mléko. Ochranná úloha protilátek IgG₄ je stále nejasná. Dosud nebylo uznáno, že měření IgG₄ protilátek má klinický význam pro diagnostiku potravinových intolerancí či počínajících alergií. Bude nutné provést další výzkumy, které objasní možnosti využití měření specifických IgG₄ protilátek pro diagnostiku nesnášenlivosti mléka.

Intolerance kaseinu byla zjištěna u 20,12 % případů (11,41 % pozitivních a 8,71 % silně pozitivních). V případě laktóзовé intolerance bylo pozitivních 29,78 % jedinců. Rozdíl pro obě intolerance činil cca 10 %, přičemž více zastoupená byla ve sledovaném souboru laktóзовá intolerance. Jedná se o vrozenou predispozici, která objevuje spíše v pozdějším věku, zatímco alergie na bílkovinu kravského mléka je popisována ve většině případů u kojenců a po období kojení mizí.

Pro souběžný výskyt laktózové intolerance a intolerance bílkoviny kravského mléka bylo vyšetřeno 293 osob. Bylo zjištěno, že nejčastěji se vyskytuje intolerance bílkoviny kravského mléka u osob s genotypem CT/GA, který je asociován s částečnou laktózovou intolerancí. Zhruba 5 % jedinců bylo intolerantních na laktózu (CC/GG) i kasein současně. U 6 % jedinců se vyskytovala tolerance laktózy (TT/AA) a pozitivní intolerance kaseinu. Intolerance kaseinu a laktózová intolerance jsou dvě rozdílná onemocnění, lišící se svou příčinou, vznikem a průběhem. Souběžný výskyt těchto onemocnění není vyloučen, a tedy může se projevit zejména v případech, jde-li o sekundární laktózovou intoleranci, která může být ovlivněna nebo i spuštěna intolerancí kravského mléka (Novikova et al., 2019).

9 Závěr

V teoretické části bakalářské práce jsem se soustředila na zpracování poznatků o laktóзовé intoleranci a alergii na bílkovinu kravského mléka. U laktóзовé intolerance je popsáno, jak vzniká, její druhy, klinické příznaky, možná diagnostika a následná léčba. Je zde uvedena také souvislost s výskytem syndromu dráždivého tračníku. V případě alergie na bílkovinu kravského mléka je popsána její patofyziologie, příznaky, diagnostika, léčba a možná asociace s protilátkami třídy IgG₄.

Praktická část probíhala v genetické laboratoři GENLABS v Českých Budějovicích. V praktické části práce jsem se věnovala zvládnutí základních molekulárně-biologických metod pro stanovení polymorfismů asociovaných s laktóзовou intolerancí/tolerancí. Stanoveny byly dva polymorfismy, a to SNP C/T-13910 a SNP G/A-22018 genu *MCM6* metodou PCR-RFLP. Následovalo retrospektivní statistické vyhodnocení dat získaných v období od roku 2014 do roku 2022. Jejich zpracování přineslo přehled o prevalenci laktóзовé tolerance a intolerance v české populaci.

Druhou metodou prováděnou v rámci praktické části bylo stanovení IgG₄ protilátek imuno-enzymatickou metodou. Hodnoceny byly dva alergeny, a to kravské mléko a kasein. Provedení testů a retrospektivní zpracování výsledků od roku 2019 do roku 2022 poskytlo informace o výskytu intolerancí způsobených těmito alergeny a byl zjištěn i jejich společný výskyt.

Poslední částí bylo stanovení souběžného výskytu laktóзовé intolerance a intolerance bílkoviny kravského mléka. Zpracování výsledků nám umožnilo zjistit paralelní výskyt těchto různých intolerancí. Jedná se o zcela originální výsledky, protože práce zabývající se současně intolerancí laktóзы i kaseinu nebyly dosud publikovány.

Seznam použitých zdrojů

1. AGHASI, M., GOLZARAND, M., SHAB-BIDAR, S., AMINIANFAR, A., OMIDIAN, M., TAHERI, F., 2019. Dairy intake and acne development: A meta-analysis of observational studies. *Clinical Nutrition*. 38(3), 1067-1075, doi:10.1016/j.clnu.2018.04.015.
2. ALLEN, K., J., DAVIDSON, G., P., DAY, A., S., 2009. Management of cow's milk protein allergy in infants and young children: An expert panel perspective. *Journal of Paediatrics and Child Health*. 45(9), 481-486, doi:10.1111/j.1440-1754.2009.01546.x.
3. AMIRI, M., DIEKMANN, L., VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M., NAIM, H., 2015. The Diverse Forms of Lactose Intolerance and the Putative Linkage to Several Cancers. *Nutrients*. 7(9), 7209-7230, doi:10.3390/nu7095332.
4. ANGUIA-RUIZ, A., AGUILERA C., M., GIL, A., 2020. Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies. *Nutrients*. 12(9), doi:10.3390/nu12092689.
5. AUNE, D., LAU, R., CHAN, D., S., M., VIEIRA, R., GREENWOOD, D., C., KAMPMAN, E., NORAT, T., 2012. Dairy products and colorectal cancer risk: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Annals of Oncology*. 23(1), 37-45, doi:10.1093/annonc/mdr269.
6. BENHAMOU, A., H., SCHPPI, T., BELLI, D., C., EIGENMANN, P., A., 2009. An overview of cow's milk allergy in children. *Swiss Medical Weekly*. doi:10.4414/smw.2009.12258.
7. BERÁNEK, M., 2016. *Molekulární genetika pro bioanalytiky*. Praha: Karolinum. ISBN 978-80-246-3224-7.
8. BERMEJO, L., LÓPEZ-PLAZA, B., SANTURINO, C., CAVERO-REDONDO, I., GÓMEZ-CANDELA, C., 2019. Milk and Dairy Product Consumption and Bladder Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis of Observational Studies. *Advances in Nutrition*. 10, S224-S238, doi:10.1093/advances/nmy119.

9. BOYE, J., WIJESINHA-BETTONI, R., BURLINGAME, B., 2012. Protein quality evaluation twenty years after the introduction of the protein digestibility corrected amino acid score method. *British Journal of Nutrition*. 108(S2), 183-211, doi:10.1017/S0007114512002309.
10. CAFFARELLI, C., BALDI, F., BENDANDI, B., CALZONE, L., MARANI, M., PASQUINELLI, P., 2010. Cow's milk protein allergy in children: a practical guide. *Italian Journal of Pediatrics*. 36(1), doi:10.1186/1824-7288-36-5.
11. CAMPBELL, A., K., WAUD, J., P., MATTHEWS S., B., 2005. The Molecular basis of Lactose Intolerance. *Science Progress* . 88(3), 157-202, doi:10.3184/003685005783238408.
12. CATANZARO, R., SCIUTO, M., MAROTTA, F., 2021. Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Nutrition Research*. 89, 23-34, doi:10.1016/j.nutres.2021.02.003.
13. CORDOVA, J., SRIRAM, S., PATTON, T., JERICHO, H., GOKHALE, R., WEINSTEIN, D., SENTONGO, T., 2016. Manifestations of Cow's-Milk Protein Intolerance in Preterm Infants. *Journal of Pediatric Gastroenterology & Nutrition*. 62(1), 140-144, doi:10.1097/MPG.0000000000000933.
14. DARBÀ, J., KASKENS, L., GRACIA, A., 2014. Estudio de impacto presupuestario y coste-efectividad de la introducción de LacTEST en el diagnóstico de la hipolactasia en España. *PharmacoEconomics Spanish Research Articles*. 11(4), 123-134, doi:10.1007/s40277-013-0025-4.
15. DENG, Y., MISSELWITZ, B., DAI, N., FOX, M., 2015. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients* [online]. 7(9), 8020-8035, doi:10.3390/nu7095380.
16. DEWIASTY, E., SETIATI, S., AGUSTINA, R., ROOSHEROE, A., G., ABDULLAH, M., INSTANTI, R., GROOT, L., 2021. Prevalence of lactose intolerance and nutrients intake in an older population regarded as lactase non-persistent. *Clinical Nutrition ESPEN*. 43, 317-321, doi:10.1016/j.clnesp.2021.03.033.

17. DU TOIT, G., MEYER, R., SHAH, N., HEINE, R., G., THOMSON, M. A., LACK, G., FOX, A., T., 2010. Identifying and managing cow's milk protein allergy. *Archives of Disease in Childhood - Education and Practice*. 95(5), 134-144. doi:10.1136/adc.2007.118018.
18. ENATTAH, N., S., SAHI, T., SAVILAHTI, E., TERWILLIGER, J., D., PELTONEN, L., JÄRVELÄ, I., 2002. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature Genetics*. 30(2), 233-237, doi:10.1038/ng826.
19. Fiocchi, A., Brozek, J., Schünemann, H., Bahna, S. L., von Berg, A., Beyer, K., Bozzola, M., Bradsher, J., Compalati, E., Ebisawa, M., Guzmán, M. A., Li, H., Heine, R. G., Keith, P., Lack, G., Landi, M., Martelli, A., Rancé, F., Sampson, H., Stein, A., 2010. World Allergy Organization (WAO) Special Committee on Food Allergy. World Allergy Organization (WAO) Diagnosis and Rationale for Action against Cow's Milk Allergy (DRACMA) Guidelines. *Pediatric allergy and immunology: European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, 21, 1-125, doi:10.1111/j.1399-3038.2010.01068.x.
20. FOJÍK, P., FALT, P., URBAN, O., NOVOSAD, P., RICHTEROVÁ, L., BÓDAY, A., 2013. Laktózová intolerancia. *Practicus*. 13(5), 7-12. ISSN 1213-8711.
21. GARCÍA-ARA, C., BOYANO-MARTÍNEZ, T., DÍAZ-PENA, J., M., MARTÍN-MUÑOZ, F., RECHE-FRUTOS, M., MARTÍN-ESTEBAN, M., 2001. Specific IgE levels in the diagnosis of immediate hypersensitivity to cows' milk protein in the infant. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 107(1), 185-190, doi:10.1067/mai.2001.111592.
22. GAUCHERON, F., 2011. Milk and Dairy Products: A Unique Micronutrient Combination. *Journal of the American College of Nutrition*. 30(sup5), 400-409, doi:10.1080/07315724.2011.10719983.
23. GERBAULT, P., 2013. The Onset of Lactase Persistence in Europe. *Human Heredity*. 76(3-4), 154-161, doi:10.1159/000360136.

24. GUO, Y., , SHAN, Z., REN, H., CHEN, W., 2015. Dairy Consumption and Gastric Cancer Risk: A Meta-Analysis of Epidemiological Studies. *Nutrition and Cancer*. 67(4), 555-568, doi:10.1080/01635581.2015.1019634.
25. HEYMAN, M., B., 2006. Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents. *Pediatrics*. 118(3), 1279-1286, doi:10.1542/peds.2006-1721.
26. HILL, C., GUARNER, F., REID, G., 2014. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*. 11(8), 506-514, doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
27. CHOVANCOVÁ, Z., FILIPENSKÝ, P., ROTNÁGLOVÁ, S., STANICZKOVÁ ZAMBO, I., SHATOKHINA, T., NOVOSÁDOVÁ, K., LITZMAN, J., 2022. IgG4 immunoglobulin subclass and related pathological conditions or how to effectively imitate cancer disease. *Klinická onkologie*. 35(1), doi:10.48095/ccko202220.
28. IBBA, I., GILLI, A., BOI, M., F., USAI, P., 2014. Effects of Exogenous Lactase Administration on Hydrogen Breath Excretion and Intestinal Symptoms in Patients Presenting Lactose Malabsorption and Intolerance. *BioMed Research International*. 2014, 1-7,doi:10.1155/2014/680196
29. IBRAHIM, M. OMAR, S. A., LEMA, G., NYAMBO, T. B., GHORI, J., BUMPSTEAD, S.,
30. ITO, K., FUTAMURA, M., MOVÉRARE, R., TANAKA, A., KAWABE, T., SAKAMOTO, T., BORRES, M., 2012. The usefulness of casein-specific IgE and IgG4 antibodies in cow's milk allergic children. *Clinical and Molecular Allergy*. 10(1), doi:10.1186/1476-7961-10-1.
31. JIMÉNEZ MONTOYA, L., MARTÍNEZ SARABIA, J., 2017. Lactasa no persistene: causas, edectos, diagnóstico y tratamiento. Revisión. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias*. 11(1), 85-90, doi:10.5209/RCCV.55219.
32. JOHANSSON, S., G., O., BIEBER, T., DAHL, R., 2004. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the

World Allergy Organization, October 2003. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 113(5), 832-836, doi:10.1016/j.jaci.2003.12.591.

33. KAILASAPATHY, K., 2008. Chemical Composition, Physical and Functional Properties of Milk and Milk Ingredients. In: CHANDAN, R., C., *ed. Dairy Processing & Quality Assurance* . Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2008. s. 75-103. ISBN 9780813804033.
34. KALYANKAR, S., D., KHEDKAR, C., D. , PATIL, A., M. DEOSARKAR, S., S., 2016. Milk: Sources and Composition. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, 2016, s. 741-747. ISBN 9780123849533.
35. KAWANO, Y., NISHIDA, T., YAMAGISHI, R., NOMA, T., 2001. A case of milk allergy that presented anaphylaxis after cutaneous contact with allergen. *Allergology International*. 50(1), 105-107, doi:10.1046/j.1440-1592.2001.00208.x.
36. KUOKKANEN, M., KOKKONEN, J., ENATTAH, N. N. S., 2006. Mutations in the Translated Region of the Lactase Gene (LCT) Underlie Congenital Lactase Deficiency. *The American Journal of Human Genetics*. 78(2), 339-344, doi:10.1086/500053.
37. KUOKKANEN, M., MYLLYNIEMI, M., VAUHKONEN, M., 2006. A biopsy-based quick test in the diagnosis of duodenal hypolactasia in upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy*. 38(7), 708-712, doi:10.1055/s-2006-925354.
38. Lactose tolerance test shortened to 30 minutes: an exploratory study of its feasibility and impact. *Revista espanola de enfermedades digestivas*, 106(6), 381-385. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25361448/> Revista espanola de enfermedades digestivas.
39. Lactase persistence in Africa and Europe. *Nature Genetics*. 39(1), 31-40. ISSN 1061-4036.
40. LAZARE, F., B., BRAND, D., A., MARCIANO, T., A., DAUM, F., 2014. Rapid Resolution of Milk Protein Intolerance in Infancy. *Journal of Pediatric*

Gastroenterology & Nutrition. 59(2), 215-217,
doi:10.1097/MPG.0000000000000372.

41. LEMBER, M., 2012. Hypolactasia: a common enzyme deficiency leading to lactose malabsorption and intolerance. *Polish Archives of Internal Medicine.* 122(Suppl. 1), 60-64, doi:10.20452/pamw.1519.
42. LIN, M., DIPALMA, J., A., MARTINI, M., C., GROSS, C., J., HARLANDER, S., K., SAVAIANO, D., A., 1993. Comparative effects of exogenous lactase (?-galactosidase) preparations on in vivo lactose digestion. *Digestive Diseases and Sciences.* 38(11), 2022-2027, doi:10.1007/BF01297079.
43. LINDMARK MÅNSSON, H., 2008. Fatty acids in bovine milk fat. *Food & Nutrition Research.* 52(1), doi:10.3402/fnr.v52i0.1821.
44. LOMER, M. C. E., PARKES, G., C., SANDERSON, J., D., 2008. Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics.* 27(2), 93-103, doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x.
45. LUDMAN, S., SHAH, N., FOX, A., T., 2013. Managing cows' milk allergy in children. *BMJ.* 347, 5424-5424, doi:10.1136/bmj.f5424.
46. Lukito, W., Malik, S., G., Surono, G., S., Wahlqvist, M., L., 2015. From 'lactose intolerance' to 'lactose nutrition'. *Asia Pacific journal of clinical nutrition.* 24 (1), 1-8, doi:10.6133/apjcn.2015.24.s1.01.
47. MAGIERA, R., SCHUERER-MALY, C., MORTSIEFER, A., ABHOLZ, H., F. MALY, F., PENTZEK, M., 2014. Are there Differences between Patients with and without the Homozygous -13910CC Genetic Variant in the MCM-6 Gene Upstream from the Lactase Gene? - A Non-Randomised. *Clinical Laboratory.* 60, (10/2014), doi:10.7754/Clin.Lab.2014.140219.
48. MANUYAKORN, W., TANPOWPONG, P., 2019. Cow milk protein allergy and other common food allergies and intolerances. *Paediatrics and International Child Health.* 39(1), 32-40, doi:10.1080/20469047.2018.1490099.

49. MASUY, I., PANNEMANS, J., TACK, J., 2020. Irritable bowel syndrome: diagnosis and management. *Minerva Gastroenterologica e Dietologica*. 66(2), doi:10.23736/S1121-421X.19.02640-0.
50. MATTHEWS, S., B., WAUD, J., P., ROBERTS, A., G., CAMPBELL, A., K., 2005. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate Medical Journal*. 81(953), 167-173, doi:10.1136/pgmj.2004.025551.
51. MCBEAN, L., D., MILLER, G., D., 1998. Allaying Fears and Fallacies about Lactose Intolerance. *Journal of the American Dietetic Association*. 98(6), 671-676, doi:10.1016/S0002-8223(98)00152-7.
52. MEHTA, B., M., 2015. Chemical Composition of Milk and Milk Products. In: CHEUNG, P., C., MEHTA, B., M., ed. *Handbook of Food Chemistry*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2015, s. 511-553. ISBN 978-3-642-36604-8.
53. MOAYYEDI, P., MEARIN, F., AZPIROZ, F., 2017. Irritable bowel syndrome diagnosis and management: A simplified algorithm for clinical practice. *United European Gastroenterology Journal*. 5(6), 773-788, doi:10.1177/2050640617731968.
54. NOVIKOVA, V., BOGDANOVA, N., PROKOPYEVAN., LAPIN, S., KUZNETSOVA, D., VORONTSOV, P., 2019. P11 Secondary lactose intolerance and cow's milk protein allergy in infants. BMJ Publishing Group Ltd and Royal College of Paediatrics and Child Health.[cit. 2023-05-01], doi:10.1136/archdischild-2019-epa.367.
55. PENKA, M., SLAVÍČKOVÁ, E., 2011. *Hematologie a transfuzní lékařství*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3459-0.
56. PEREIRA, P., C., 2014. Milk nutritional composition and its role in human health. *Nutrition*. 30(6), 619-627, doi:10.1016/j.nut.2013.10.011.
57. PORZI, M., BURTON-PIMENTEL, K., J., WALTHER, B., VERGÈRES, G., 2021. Development of Personalized Nutrition: Applications in Lactose

- Intolerance Diagnosis and Management. *Nutrients* [online]. 13(5), doi:10.3390/nu13051503.
58. PRITCHARD, J. K., WRAY, G. A., DELONKAS, P., 2007. Convergent adaptation of human
59. QIN, L., TANG, L., CHENG, L., WANG, H., 2022. The clinical significance of allergen-specific IgG4 in allergic diseases. *Frontiers in Immunology*. 13, doi:10.3389/fimmu.2022.1032909.
60. ROBLES, L., PRIEFER, R., 2020. Lactose Intolerance: What Your Breath Can Tell You. *Diagnostics*. 10(6), doi:10.3390/diagnostics10060412.
61. ROWE, P., C., MARDEN, L., C., JASION, S., E., CRANSTON, E., M., FLAHERTY, M., A., K., KELLY, K., J., 2016. Cow's milk protein intolerance in adolescents and young adults with chronic fatigue syndrome. *Acta Paediatrica*. 105(9), 412-418, doi:10.1111/apa.13476.
62. ROZENBERG, S., BODY, J., BRUYÈRE, O., 2016. Effects of Dairy Products Consumption on Health: Benefits and Beliefs—A Commentary from the Belgian Bone Club and the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis, Osteoarthritis and Musculoskeletal Diseases. *Calcified Tissue International*. 98(1), 1-17, doi:10.1007/s00223-015-0062-x.
63. SADOVNIKOVA, A., GARCIA S., C., HOVEY, R., C., 2021. A Comparative Review of the Cell Biology, Biochemistry, and Genetics of Lactose Synthesis. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*. 26(2), 181-196, doi:10.1007/s10911-021-09490-7.
64. SAMPSON, H., A., 1999. Food allergy. Part 2: Diagnosis and management. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 103(6), 981-989, doi:10.1016/S0091-6749(99)70167-3.
65. SANTONOCITO, C., SCAPATICCI, M., GUARINO, D., 2015. Lactose intolerance genetic testing: Is it useful as routine screening? Results on 1426 south-central Italy patients. *Clinica Chimica Acta*. 439, 14-17, doi:10.1016/j.cca.2014.09.026.

66. SAVAIANO, D., A., 2014. Lactose digestion from yogurt: mechanism and relevance,. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 99(5), 1251-1255, doi:10.3945/ajcn.113.073023.
67. SÉVERIN, Si., WENSHUI, X., 2005. Milk Biologically Active Components as Nutraceuticals: Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* . 45(7-8), 645-656, doi:10.1080/10408690490911756.
68. SCHAAFSMA, G., 2008. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*. 18(5), 458-465, doi:10.1016/j.idairyj.2007.11.013.
69. SICHERER, S., H., 2011. Epidemiology of food allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 127(3), 594-602, doi:10.1016/j.jaci.2010.11.044.
70. SILVERMAN, J. S., POWELL, K., MORTENSEN, H. M., HIRBO, J. B., OSMAN, M.,
71. SOLINAS, C.,CORPINO, M., MACCIONI, R., PELOSI, U., 2010. Cow's milk protein allergy. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*. 23(3), 76-79, doi:10.3109/14767058.2010.512103.
72. STORHAUG, C., L., FOSSE, S., K., FADNES, L., T., 2017. Country, regional, and global estimates for lactose malabsorption in adults: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Gastroenterology & Hepatology*. 2(10), 738-746, doi:10.1016/S2468-1253(17)30154-1.
73. Swagerty, D., L., Walling, A., D., Klein, R., M., 2002. Lactose intolerance. *Am Fam Physician*.65(9):1845-1850.
74. Swagerty, D., L., Walling, A., D., Klein, R., M., 2002. Lactose intolerance. *American family physician*, 65(9), 1845–1850, dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12018807/>.
75. SWALLOW, D., M., 2003. Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance. *Annual Review of Genetics*. 37(1), 197-219, doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143820.

76. SZILAGYI, A., ISHAYEK, N., 2018. Lactose Intolerance, Dairy Avoidance, and Treatment Options. *Nutrients* [online]. 10(12), doi:10.3390/nu10121994.
77. ŠTĚPÁNKOVÁ, Š., 2020. *Obecná biochemie*. Pardubice. 213 s.ISBN 978-80-7560-342-0.
78. TANG, J., E., MOORE, D., R., KUJBIDA, G., W., TARNOPOLSKY, M., A., PHILLIPS, S., M., 2009. Ingestion of whey hydrolysate, casein, or soy protein isolate: effects on mixed muscle protein synthesis at rest and following resistance exercise in young men. *Journal of Applied Physiology* [online]. 107(3), 987-992, doi:10.1152/jappphysiol.00076.2009.
79. TISHKOFF, S. A., REED, F. A., RANCIARO, A., VOIGHT, B. F., BABBITT, C. C.,
80. UGIDOS-RODRÍGUEZ, S., MATALLANA-GONZÁLEZ, M., C., ÁNCHEZ-MATA M., C., 2018. Lactose malabsorption and intolerance: a review. *Food & Function* [online]. 9(8), 4056-4068, doi:10.1039/C8FO00555A.
81. VANDENPLAS, Y., BRUETON, M., DUPONT, C., HILL, D., SOLAURI, E., KOLETZKO, S., ORANJE, A., P., STAIANO, A., 2007. Guidelines for the diagnosis and management of cow's milk protein allergy in infants. *Archives of Disease in Childhood*. 92(10), 902-908, doi:10.1136/adc.2006.110999.
82. VERNIA, P., 2004. Self-reported milk intolerance in irritable bowel syndrome: what should we believe? *Clinical Nutrition*. 23(5), 996-1000, doi:10.1016/j.clnu.2003.12.005.
83. Yang, J., F., Fox, M., Chu, H., Zheng, X., Long, Y., Q., Pohl, D., 2015. Four-sample lactose hydrogen breath test for diagnosis of lactose malabsorption in irritable bowel syndrome patients with diarrhea. *World Journal of Gastroenterology*. 21(24), doi:10.3748/wjg.v21.i24.7563.
84. ZHU, S., WANG, B., JIA, Q., DUAN, L., 2019. Candidate single nucleotide polymorphisms of irritable bowel syndrome: a systemic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterology*. 19(1), doi:10.1186/s12876-019-1084-z

10 Přílohy

Příloha 1

Tabulka zastoupení genotypů podle pohlaví a věku ze souboru všech vyšetřovaných na laktózovou intoleranci v období let 2014–2022.

Věk/genotyp	do 10let		11-20let		21-30let		31-40let		41-50let		51-60let		61-70let		71-80let		nad 80let		Celkem
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	
CC/AA	0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
CC/GA	2	3	0	0	3	3	5	0	2	0	1	0	2	0	0	0	0	0	26
CC/GG	49	42	32	23	63	25	121	38	120	45	91	19	43	14	9	8	4	0	746
CT/AA	1	2	3	0	4	0	3	0	10	2	3	0	1	0	0	0	0	0	29
CT/GA	73	80	46	24	104	29	202	73	231	63	143	29	61	21	18	6	4	2	1209
CT/GG	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
TT/AA	23	30	18	17	43	11	77	30	101	33	59	7	36	2	6	1	1	2	497
TT/AG	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
CC	0	0	0	0	1	0	1	0	3	0	1	0	1	0	0	0	1	0	8
CT	2	0	0	1	1	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	8
TT	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2
Celkem	150	161	99	67	219	88	411	142	467	143	300	55	144	40	36	15	11	4	2532

Příloha 2

Tabulka zastoupení vyšetřovaných na intoleranci kaseinu podle pohlaví a věku v období let

Věk. Rozmezí	Pohlaví	Kasein				Celkem	
		Negativní	Hraniční	Pozitivní	Silně pozitivní		
do 10 let	F	0,62 % (6)	0,31 % (3)	0,21 % (2)	0,31 % (3)	1,45 % (14)	3,53 % (34)
	M	0,93 % (9)	0,73 % (7)	0,41 % (4)	0,00 % (0)	2,07 % (20)	
11-20 let	F	0,73 % (7)	0,31 % (3)	0,21 % (2)	0,10 % (1)	1,35 % (13)	2,39 % (23)
	M	0,52 % (5)	0,52 % (5)	0,00 % (0)	0,00 % (0)	1,04 % (10)	
21-30 let	F	4,77 % (46)	1,56 % (15)	0,52 % (5)	0,41 % (4)	7,26 % (70)	8,92 % (86)
	M	0,83 % (8)	0,31 % (3)	0,41 % (4)	0,10 % (1)	1,66 % (16)	
31-40 let	F	9,23 % (89)	3,32 % (32)	2,18 % (21)	1,66 % (16)	16,39 % (158)	22,30 % (215)
	M	4,05 % (39)	0,83 % (8)	0,62 % (6)	0,41 % (4)	5,91 % (57)	
41-50 let	F	14,32 % (138)	4,67 % (45)	2,18 % (21)	1,97 % (19)	23,13 % (223)	29,98 % (289)
	M	3,73 % (36)	1,76 % (17)	0,83 % (8)	0,52 % (5)	6,85 % (66)	
51-60 let	F	10,79 % (104)	3,42 % (33)	1,87 % (18)	2,18 % (21)	18,26 % (176)	21,16 % (204)
	M	1,24 % (12)	0,83 % (8)	0,62 % (6)	0,21 % (2)	2,90 % (28)	
61-70 let	F	4,05 % (39)	0,83 % (8)	0,83 % (8)	0,62 % (6)	6,33 % (61)	7,99 % (77)
	M	1,24 % (12)	0,31 % (3)	0,10 % (1)	0,00 % (0)	1,66 % (16)	
71-80 let	F	2,18 % (21)	0,10 % (1)	0,21 % (2)	0,10 % (1)	2,59 % (25)	3,22 % (31)
	M	0,41 % (4)	0,00 % (0)	0,10 % (1)	0,10 % (1)	0,62 % (6)	
nad 80 let	F	0,10 % (1)	0,21 % (2)	0,10 % (1)	0,00 % (0)	0,41 % (4)	0,52 % (5)
	M	0,10 % (1)	0,00 % (0)	0,00 % (0)	0,00 % (0)	0,10 % (1)	
		59,85 % (577)	20,02 % (193)	11,41 % (110)	8,71 % (84)	100,0 % (964)	

2019–2022.

11 Seznam obrázků

Obrázek 1. Chemická struktura laktózy (Zdroj: Schaafsma, 2008). **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 2. Normální trávení laktózy vs trávení při LI (Zdroj: Pozri et al., 2021). . **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 3. Mapa oblasti genu pro laktázu (LCT) a genu MCM6 (Tishkoff et al., 2007).
..... **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 4. Vizualizace PCR produktů pro polymorfismus C/T-13910 na agarózovém gelu. Ladder – hmotnostní marker, 1-12 - PCR produkty. (Zdroj: vlastní). **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 5. Vizualizace PCR produktů pro polymorfismus G/A-22018 na agarózovém gelu. Ladder-hmotností marker, 1-12 PCR produkty. (Zdroj: vlastní). **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 6. Vizualizace restrikčních fragmentů u polymorfismu C/T-13910. Pod jamkami jsou uvedené odečtené genotypy, v první jamce je napipetován ladder, který slouží jako hmotnostní marker. (Zdroj: vlastní). **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 7. Vizualizace restrikčních fragmentů u polymorfismu G/A-22018. Pod jamkami jsou uvedené odečtené genotypy a ladder, který sloužil jako hmotnostní marker. (Zdroj vlastní). **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 8. Ilustrační foto testovacích proužků na skenovací podložce. (Zdroj: vlastní)
..... **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 9. Zastoupení testovaných jedinců a jejich genotypů. **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 10 Zastoupení testovaných jedinců a jejich genotypů v závislosti na pohlaví. Červené sloupce ukazují ženy, modré muže. **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 11. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kravského mléka v závislosti na pohlaví. **Error! Bookmark not defined.**

Obrázek 12 Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kaseinu v závislosti na pohlaví. **Error! Bookmark not defined.**

12 Seznam tabulek

Tabulka 1. Typické chemické složení mléka od různých savců v %.	10
Tabulka 2. Pojmy související s LI a maldigescí laktózy.	15
Tabulka 3. Složení master mixu pro polymorfismus C/T-13910 a jednu reakci.	36
Tabulka 4. Složení master mixu pro polymorfismus G/A-22018 a jednu reakci.	37
Tabulka 5. PCR reakční profily pro oba polymorfismy.	37
Tabulka 6: Distribuční schéma souprav IgG4 Nutritional MX1, MX2, MX3 a 20 LineBlot, pozice protilátek odpovídající jednotlivým potravinám.	44
Tabulka 7 Kvantitativní vyhodnocení potravinových intolerancí.	46
Tabulka 8. Vzor pro vyhodnocení potravinových intolerancí v závislosti na intenzitě reakce.	47
Tabulka 9. Zastoupení testovaných žen a mužů na predispozici k laktózové intoleranci.	48
Tabulka 10. Počty vyšetřených jedinců na laktózovou intoleranci v jednotlivých věkových kategoriích.	48
Tabulka 11. Přehled genotypů a fenotypů pro polymorfismy SNP C/T-13910 a G/A-22018.	49
Tabulka 12. Zastoupení testovaných jedinců a jejich genotypů.	50
Tabulka 13. Zastoupení testovaných jedinců a jejich genotypů v závislosti na pohlaví.	51
Tabulka 14. Zastoupení testovaných žen a mužů na intoleranci kravského mléka a kaseinu.	52
Tabulka 15. Počty vyšetřených jedinců na intoleranci kravského mléka a kaseinu v závislosti na věku a pohlaví.	53
Tabulka 16. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kravského mléka.	53
Tabulka 17. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kravského mléka v závislosti na pohlaví.	54
Tabulka 18. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kaseinu.	55
Tabulka 19. Výsledky u jedinců testovaných na intoleranci kaseinu v závislosti na pohlaví.	56
Tabulka 20. souběžný výskyt intolerance kravského mléka a kaseinu.	57
Tabulka 21. Počet testovaných jedinců, jejich pohlaví a věk.	57
Tabulka 22. Souběžný výskyt laktózové intolerance a alergie bílkoviny kravského mléka.	58

13 Seznam zkratek

A – adenin

ABMK – alergie na bílkovinu kravského mléka

BCIP – 5-bromo-4-chloro-3-indolyl fosfát

bp – base pair – pár bází

BSA – bovine serum albumin – hovězí sérový albumin

C – cytosin

DMSO – dimethylsulfoxid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

dsDNA – double-stranded (dvouvláknová) deoxyribonukleová kyselina

G – guanin

Hin6 I – restriční endonukleáza izolována z bakterie *Hemophilus influenzae*

HinI – restriční endonukleáza izolována z bakterie *Hemophilus influenzae*

IBS – irritable bowel syndrome – syndrom dráždivého tračníku

IgA – imunoglobulin A

IgE – imunoglobulin E

IgG – imunoglobulin G

IgG4 – imunoglobulin G₄

IgM – imunoglobulin M

K3EDTA – tři draselné ionty navázané na kyselině ethylendiamintetraoctové

kb – kilobáze

LCT – gen pro laktázu

LI – laktázová intolerance

LIC – laboratorní informační číslo

LNP – laktázová non–perzistence

LP – laktázová perzistence

MCM6 – gen minichromosome maintenance complex component 6

mRNA – messenger RNA –mediátorová ribonukleová kyselina

NBT – nitroblue tetrazolium – nitrotetrazoliová modř

NK – nukleová kyselina

PBS – phosphate buffered saline – fosfátový pufr

PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR-RFLP – polymerázová řetězová reakce– restriction fragment lenght polymorphism
– polymorfismus délky restrikčních fragmentů

ppm – parts per milion

RFLP – restriction fragment lenght polymorphism – polymorfismus délky restrikčních
fragmentů

RNA – ribonukleová kyselina

rpm – revolutions per minute – otáčky za minutu

SNP – single nucleotid polymorphism – jednonukleotidový polymorfismus

T – thymin

TBS – tris-buffered saline – pufr