

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

# **Autismus a potravinové intolerance**

Bakalářská práce

**Lucie Švarcová**

Školitelka: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D., Genlabs s.r.o.

České Budějovice 2023

## **BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Švarcová L. 2023: Autismus a potravinové intolerance [Autism and food intolerance, Bachelor Thesis, in Czech]-55s., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

### **ANNOTATION**

This work aimed to summarize general knowledge about autism and food intolerances. In the experimental part, genotypes of APOE, lactose, IBS and celiac disease were determined in autistic individuals. These genes have been investigated for possible association with autism.

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

V Českých Budějovicích, 13.4.2023

.....

Lucie Švarcová

## **PODĚKOVÁNÍ**

Zde bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za odborné vedení, poskytnutí literatury a čas, který mi věnovala. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za to, že mě během celého studia podporovali.

# Obsah

1 ÚVOD.....	1
1.1 Poruchy autistického spektra .....	1
1.1.1 Historie .....	1
1.1.2 Aspergerův syndrom .....	2
1.1.3. Autistická porucha.....	2
1.1.4 Rettův syndrom .....	3
1.1.5 Dětská dezintegrační porucha .....	3
1.1.3 Diagnostika.....	4
1.2 POTRAVINOVÉ INTOLERANCE .....	5
1.2.1 Gastrointestinální trakt .....	5
1.2.1 Lepek.....	6
1.2.2 Laktóza .....	9
1.2.3 FODMAP sacharidy .....	11
1.2.4 ApoE.....	13
2 CÍLE PRÁCE .....	14
3 MATERIÁLY A METODY.....	15
3.1 Získání vzorků .....	15
3.2 Izolace DNA .....	15
3.2.1 Izolace z bukalního stěru.....	15
3.2.2 Izolace z plné krve.....	16
3.2.3 Měření koncentrace.....	16
3.3 ApoE .....	16
3.4 Laktózová intolerance.....	20
3.5 IBS .....	23
3.6 Celiakie .....	25
4 VÝSLEDKY.....	26

4.1 ApoE .....	26
4.2 Laktózová intolerance .....	29
4.3. IBS .....	31
4.4 Celiakie .....	32
5 DISKUSE .....	35
6 ZÁVĚR.....	38
7 SEZNAM LITERATURY .....	39
8 PŘÍLOHY .....	52

## ZKRATKY

ADHD – syndrom poruchy pozornosti s hyperaktivitou

APC – antigen prezentující buňky

APOE – apolipoprotein E

AS – Aspergerův syndrom

ASD – autism spectrum disorder, poruchy autistického spektra

DNA – deoxyribonukleová kyselina

GI – gastrointestinální

HFA – vysoce funkční autismus

HLA – lidský leukocytární antigen

IBS – syndrom dráždivého tračníku

IgE – imunoglobulin e

MHC – hlavní histokompatibilní komplex

PAS – porucha autistického spektra

PCR – polymerázová řetězová reakce

PCR-ARMS – amplifikační refrakterní mutační systém

PCR RFLP – restriction fragment length polymorphism



# 1 ÚVOD

Porucha autistického spektra je neurobehaviorální porucha projevující se potížemi se sociální komunikací a omezenými, opakujícími se vzorci pro chování, zájmy a aktivity. Kromě těchto specifických potíží jsou významné u autistů i gastrointestinální poruchy, vyskytující se u 46–84 % z nich. Typickými gastrointestinálními problémy pozorovanými u PAS jsou chronická zácpa, chronický průjem, gastroezofageální reflux, nevolnost a nadýmání. Nedávné epidemiologické studie prokázaly významnou souvislost mezi rizikem PAS a potravinovými intolerancemi významnou souvislost.

V teoretické části této práce shrnuji obecné poznatky o autismu, jeho rozdělení do skupin a možnosti diagnostiky. Dále se věnuji potravinovým intolerancím, konkrétně intoleranci laktózy. Dále jsem se věnovala reakci na lepek (celiakii), metabolismu lipidů (APOE) a syndromu dráždivého tračníku.

Cílem experimentální části bylo nejen zvládnutí správné laboratorní práce v genetické laboratoři, ale i otestování polymorfismů C/T13910 a G/A 22018 *MCM6* genu, isoformu genu *APOE*, polymorfismu rs4263839 genu *TNF SF15* a rizikových haplotypů pro celiakii u vybraných autistických pacientů. Výsledky pro jednotlivé genotypy byly porovnány s daty pro evropskou populaci získanými s databáze Ensembl (Cunningham et al., 2022).

## 1.1 Poruchy autistického spektra

Porucha autistického spektra patří mezi neurovývojové poruchy známé především pro nedostatky v sociální komunikaci, kontaktu a přítomnosti omezených zájmů a opakujícím se chováním (Hodges et al., 2020).

### 1.1.1 Historie

Poprvé použil termín autismus v roce 1908 švýcarský psychiatr Eugen BLEULER u pacientů se schizofrenií. Slovo autismus bylo odvozeno od řeckého slova „autós“, v překladu „já“. V roce 1943 pak Leo Kanner použil toto slovo pro popis jazykových poruch a sociální izolace u dětí bez schizofrenie (Sharma et al, 2018).



V roce 1944 Hans Asperger identifikoval děti se sociální izolací a jazykovými problémy, což vedlo k diagnóze nové poruchy známé jako Aspergerův syndrom (Asperger, 1944, Sharma et al., 2018). Aspergerův syndrom patří mezi pervazivní vývojové poruchy, které negativně mění motorickou, emoční, kognitivní a řečovou úroveň dítěte. V roce 1994 bylo popsáno celkem pět pervazivních vývojových poruch: Aspergerův syndrom, autistická porucha, Rettův syndrom, nespecifikovaná pervazivní porucha a dětská dezintegrační porucha (Sharma et al., 2018).

### **1.1.2 Aspergerův syndrom**

Prevalence Aspergerova syndromu (AS) je 0,147 % v české populaci. Častěji jím trpí muži, až devětkrát častěji než ženy (Thorová, 2006). Diagnostika tohoto syndromu je poměrně složitá, jelikož není jednoduché určit hranice mezi Aspergerovým syndromem a vysoce funkčním autismem (HFA). Přesto jsou mezi nimi určité rozdíly (Klin et al., 2000). Pacienti s AS mají vyšší IQ skóre než pacienti s HFA. Lidé s PAS (porucha autistického spektra) a s IQ menším 70 by neměli být zařazováni do AS. Jejich řečové schopnosti bývají formálně správné. Vyznačují se ovšem drobnými zvláštnostmi, jako je egocentrický komunikační styl (vedou dlouhé monology na různá témata, zajímají se pouze o sebe samé), složité navazování vzájemné konverzace či přecitlivělá reakce na informace získané od ostatních (Hrdlička, 2020). V sociální oblasti se AS od HFA opět liší. Děti s AS jsou sociálně izolované. Důvodem ovšem není jejich nezájem o kontakt, ale výrazná odlišnost, která často brání navázání přátelství či partnerství. Jejich stereotypní zájmy bývají propracovanější a často mezi ně patří shromažďování informací o nějakém problému například technické vlastnosti, typy a vývoj lokomotiv (Attwood, 2005). Dalším specifikem u AS je motorická neobratnost. Pacienti s AS bývají diagnostikováni v porovnání s ostatními PAS v pozdějším věku. Normální průměrný věk diagnostiky se pohybuje kolem pátého roku života. U AS se pohybuje kolem 11. roku života a může se stát, že jsou lidé diagnostikováni až v dospělosti (Hrdlička, 2020).

### **1.1.3. Autistická porucha**

Autistickou poruchu (AP) rozdělujeme na dětský a atypický autismus. Dětský autismus je nejzávažnější z pervazivních vývojových poruch. Prevalence této poruchy je 0,147 % v české populaci (Thorová, 2006). Objevuje se až pětkrát častěji u chlapců než u dívek. AP se vyznačuje specifickými abnormalitami, které mají neurobiologický podklad. U zhruba poloviny pacientů byly popsány abnormální EEG nálezy, dále abnormality mozkové kůry (např. zmenšený parietální a frontální lalok, mikrogyrie, makrogyrie), mozečkové

abnormality, abnormality hippocampu, amygdaly a *corpus callosum*. Najdou se však i pacienti s AP bez těchto abnormalit. Pokud se podíváme na typické vlastnosti autismu, patří mezi ně nezáměr o jakýkoli sociální kontakt, porucha fantazie, opožděný vývoj řeči, obsedantní chování v oblasti neměnnosti života, stereotypní chování a stereotypní motorické pohyby. Díky dlouhodobým sledováním víme, že zhruba dvě třetiny autistů zůstanou i v dospělosti handicapováni a jsou závislí na pomoci z vnějšku. Ovšem jsou i takoví, kteří jsou relativně schopni normálního života. Těchto jedinců bývá kolem 20 % a řadí se do skupiny označované jako vysoce funkční autisté (Hort, 2008).

### 1.1.4 Rettův syndrom

Rettův syndrom byl poprvé popsán v roce 1965. Na rozdíl od předchozích poruch v tomto případě je postiženo více dívek než chlapců. Jeho prevalence není tak vysoká, bývá u 0,0098 % dívek v české populaci (Thorová, 2006). Jako jediná PAS porucha má genetickou příčinu. Jedná se o mutaci v X vázaném genu methyl-CpG-binding protein 2, který je nezbytný k normální funkci nervových buněk (Kyle et al., 2018). Na začátku onemocnění probíhá u pacientů normální vývoj, postupem času pak dochází ke ztrátě manuálních dovedností, řeči či zpomalení růstu hlavy. U pacientů se objevuje skolióza a výsledkem onemocnění bývá těžké mentální postižení (Hort, 2008).

### 1.1.5 Dětská dezintegrační porucha

Tato porucha se dříve označovala jako Hellerův syndrom a poprvé byla popsána roku 1908. Děti v tomto případě nejprve procházejí normálním vývojem, po kterém dochází k rychlé ztrátě (v řádu několika měsíců) dříve získaných dovedností. Ke zlomu dochází před desátým rokem života. Prognóza není příznivá. Většina pacientů zůstává nenávratně mentálně retardovaná (Hort, 2008).

Tab. 1 Rozdíly mezi jednotlivými pervazivními vývojovými poruchami

Znak	Dětský autismus	Aspergerův syndrom	Rettův syndrom	Jiná dezintegr. porucha	Jiné PDD
Věk při rozpoznání (roky)	0-3	> 3	0,5-2,5	> 2	různé
Pohlaví	M > Ž	M > Ž	Ž	M > Ž	M > Ž
Inteligence	MR - norma	podprůměr - norma	závažnější MR	závažnější MR	MR - norma
Regrese	někdy	ne	ano	ano	většinou ne
Komunikační schopnosti	převážně omezené	dobré	velmi špatné	velmi špatné	různé
Sociální schopnosti	velmi špatné	špatné	závisí na věku	velmi špatné	různé
Omezené zájmy	různé	ano	nevalidní rys	nevalidní rys	různé
Rodinná anamnéza podobných obtíží	málokdy	často	ne	ne	?
Výskyt epilepsie	běžný	ne	velmi častý	běžný	?
Prognóza	různá	většinou dobrá	velmi špatná	velmi špatná	různá

PDD - pervazivní vývojová porucha, M - muži, Ž - ženy, MR - mentální retardace

Obr. 1: Pervazivní vývojové poruchy, zdroj: Mcpartland et al., 2012

### 1.1.3 Diagnostika

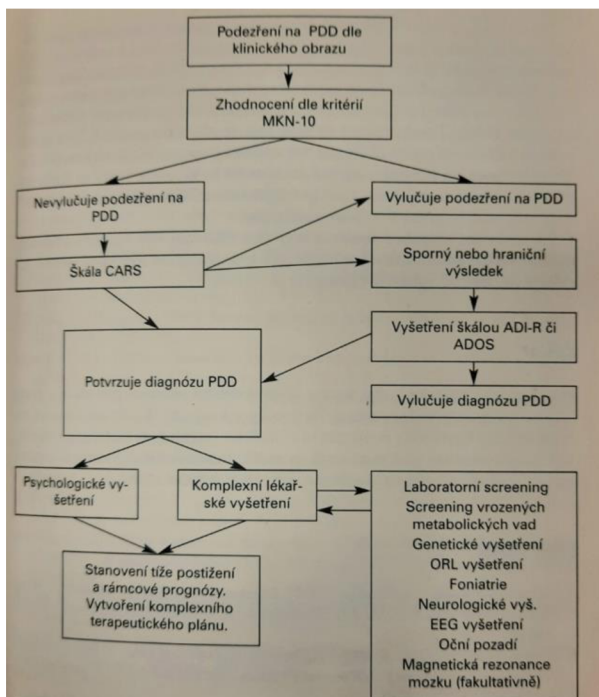
ASD postihuje přibližně 1 z 50 - 100 narozených dětí (Genovese et al., 2020). Nejčastěji bývají diagnostikovány před třetím rokem života (asi 85 %), průměrným diagnostickým věkem jsou pak čtyři roky (Al-dewig et al., 2020). Pro onemocnění tohoto typu neexistují žádné spolehlivé biomarkery, proto musí být diagnóza stanovena pouze na základě chování pacienta (Lord et al., 2018). Diagnostika začíná klinickým zhodnocením, které ovšem nemusí být pro stanovení dostačující, zahrnuje kontakt a odběr anamnézy (nástup příznaků a vývoj). Detailnější pohled umožňují kritéria MKN-10. Jedná se o mezinárodní klasifikaci nemocí, která kodifikuje systém označování a klasifikace lidských onemocnění a poruch (Hrdlička, 2014).

Níže uvedené hodnotící škály popsal pedopsychiatr Hrdlička v roce 2014 v knize Dětský autismus: přehled současných poznatků.

Nejvíce užívaným diagnostickým nástrojem bývá škála CARS (childhood autism rating scale). Tato stupnice byla vypracována na univerzitě v Severní Karolíně. Její vyhodnocení trvá zhruba půl hodiny až hodinu. Zahrnuje celkem 15 oblastí hodnocení (vztah k lidem; imitace; emocionální reakce; motorika; užívání předmětů a hra; adaptace na změny; zrakové reakce; sluchové reakce; čichové, chuťové a hmatové reakce; strach a nervozita; verbální komunikace; neverbální komunikace; úroveň aktivity; úroveň intelektových funkcí; celkový dojem), které jsou hodnoceny stupnicí od 1 do 4. Pokud pacient dosáhne méně než 30 bodů, pak se o autismus nejedná. Dosažení 30-36 bodů je hodnoceno jako lehký až střední autismus. Těžké symptomy se vyskytují od 36 bodů a více. Bohužel má tato škála malou spolehlivost a používá se především jako screening.

Další škálou je ADI-R (autism diagnostic interview – revised), která je vhodná k diagnostice od 18. měsíce života. Rozhovor probíhá mezi speciálně zaškoleným pracovníkem a pečovatelem (nejčastěji matkou). Obsahuje přibližně 111 otázek a trvá kolem tří hodin. Nejprve se věnuje odběru anamnézy a zkoumá důvody znepokojení. Další otázky jsou zaměřené na ranný vývoj dítěte (první projevy poruchy, řeč, motoriku, komunikaci apod.). Otázky 42-69 se věnují sociálnímu vývoji a hře. Zájmy a chování spadají pod otázky 70-85, celkové chování pak pod otázky 86-96. Poslední otázky zjišťují zhoršování stavu a speciální schopnosti. U všech těchto otázkových okruhů je dána minimální hranice pro pozitivitu. Pokud je jedinec pozitivní ve všech čtyřech základních otázkových okruzích, spadá pod diagnózu dětský autismus.

Škála ADOS (autism diagnostic observation schedule) byla původně rozdělena na dva moduly. Pro děti s dobrou schopností komunikovat se používal ADOS a pro děti s nízkou úrovní jazyka PL-ADOS. V současnosti je ADOS rozdělen celkem na čtyři moduly. První z nich se zabývá dětmi, jejichž slovní zásoba zahrnuje méně než 5 slov. Druhý pracuje s dětmi, které užívají jednoduché věty a mají problém s plynulostí řeči. Děti a adolescenti s plynulou řečí patří pod třetí modul. Čtvrtý modul se věnuje adolescentům a dospělým. Celkové vyšetření trvá 30 až 60 minut (Hrdlička et al., 2014).



Obr. 2: Diagnostika PAS, zdroj: Hrdlička et al, 2014

## 1.2 POTRAVINOVÉ INTOLERANCE

Potravinové intolerance jsou definovány jako neimunologické reakce na některé složky potravy. Intolerance může být zaměněna za potravinovou alergii. Ta se od intolerance však liší tím, že se jedná o skutečnou imunitní reakci na potraviny. Potravinová intolerance bývá relativně častá. V dnešní době jí trpí přibližně 15-20 % lidí (Lomer et al., 2015).

### 1.2.1 Gastrointestinální trakt

Gastrointestinální trakt byl v souvislosti s autismem přehlížen až do 90. let 20. století. Před 90. lety se ovšem objevila studie, ta vybrala 15 autistických pacientů a u poloviny zjistila

zažívací problémy s přerušovaným průjmem, což naznačilo větší prevalenci GI problému oproti neautistické populaci (Goodwin et al., 1971). Následovalo mnoho dalších výzkumů s rozdílnými závěry, přičemž prevalence GI symptomů se pohybovala od 20 % do 70 % (Chaidez et al., 2014). V roce 2014 byla provedena metaanalýza, která dospěla k závěru, že děti s PAS mají větší riziko GI symptomů než děti bez PAS. Mezi nejčastější příznaky GI se řadí nadýmání, bolesti břicha, průjem, říhání, příznaky gastro-ezofageálního refluxu (zpětný tok žaludečních šťáv ze žaludku do jícnu) a zácpa (Mcelhanon et al., 2014).

### 1.2.1 Lepek

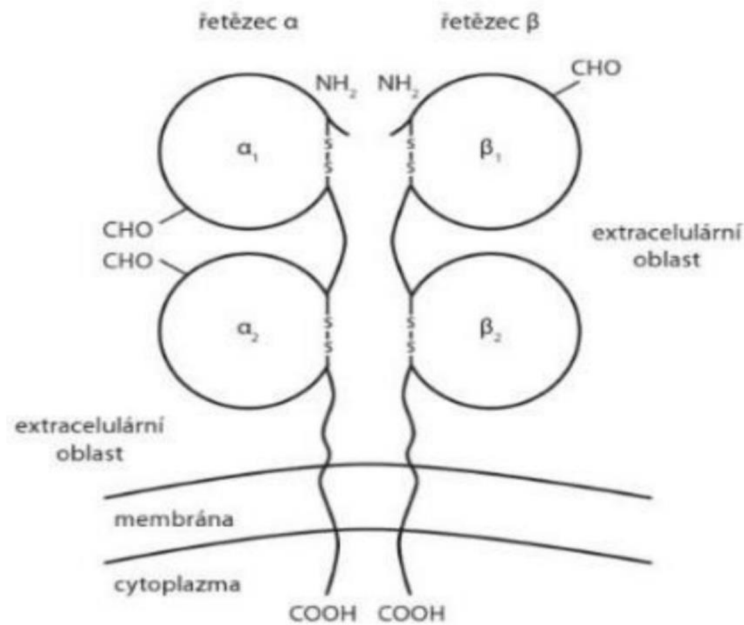
Lepek neboli gluten (latinsky lepidlo) je hlavní zásobní bílkovina nacházející se v pšeničných, ječmenných a žitných zrnech. Skládá se z několika stovek proteinů, především gliadinu a gluteninu. Právě gliadin obsahuje peptidové sekvence, které odolávají žaludečnímu, pankreatickému a střevnímu proteolytickému trávení. Tyto problémy s trávením jsou zapříčiněny vysokým obsahem aminokyselin, prolinu a glutaminu v obilninách (Biesiekierski et al., 2017). Lepek může způsobovat tři typy onemocnění, jedná se o celiakii, alergii na pšenici a neceliakální citlivost na lepek. Alergie na pšenici je zprostředkována protilátkami třídy IgE a je způsobena hlavně proteiny obsaženými v pšenici (Cabrera-Chavéz et al., 2017). V pšenici je obsaženo až 28 alergenů. Příznaky této alergie jsou zvracení, bolest břicha, kopřivka, anafylaxe, respirační a kožní příznaky. Alergie se od ostatních výše zmíněných typů nesnášenlivosti lepku liší tím, že k alergické reakci dojde bezprostředně po požití pšenice (Cabanillas et al., 2020). U neceliakální citlivosti na lepek či na jiné složky obilí se vyskytují opět střevní příznaky (bolest břicha, plyny, průjem) a extraintestinální problémy (únava, bolest hlavy, ekzémy, bolest svalů i kloubů) (Leonard et al., 2017), které se objevují později a to po hodinách či dnech od požití lepku ve stravě. V tomto případě nejsou produkovány protilátky (Cabanillas et al., 2020). Posledním typem onemocnění je celiakie a na tu se v rámci své práce zaměřím.

#### 1.2.1.1. Celiakie

Celiakie je autoimunitní onemocnění způsobené požitím lepku. V normální zdravé populaci se prevalence celiakie pohybuje kolem 1 % a vyskytuje se téměř výhradně u jedinců s genetickou predispozicí. Toto onemocnění postihuje především tenké střevo (Catassi et al., 2022).

Důležitou funkci v patogenezi celiakie má lidský leukocytární antigen (HLA), který je zodpovědný za rozeznávání vlastního od cizorodého. HLA komplex rozdělujeme do tří tříd a v souvislosti s celiakií je důležitá třída druhá. HLA II. třídy zodpovídá za prezentaci

vnějších cizorodých antigenů APC buňkám. HLA alely spojené s celiakií jsou HLA-DQ2 a HLA-DQ8. Tyto receptorové proteiny se nazývají  $\alpha\beta$  heterodimery, jelikož se sestávají z  $\alpha$  a  $\beta$  řetězce a jsou kódovány dvěma lokusy (HLA-DQA1, HLA-DQB1) (Espino et al., 2021). Riziko vzniku celiakie odpovídající typu HLA je zobrazeno v Tabulce č. 1.



Obr. 3: Struktura HLA molekuly II. Třídy, zdroj: Penka et al., 2012.

Celiakie patří mezi tzv. malabsorpční syndromy. Malabsorpce je porucha příjmu a transportu živin či vitamínů střevní sliznicí. Hlavní příčinou je zmenšení povrchu střeva, ke kterému dochází zničením střevních klků vlivem působení lepku. Mezi běžné příznaky patří chronický průjem, bolesti břicha, nafouknuté břicho (distenze), steatorea (nadměrné množství tuku ve stolici), mírné přibírání a hubnutí. V krajních případech, při zanedbané a pozdní diagnostice, může u některých jedinců docházet k podvýživě, anémii či osteoporóze (Glissen et al., 2019).

Pro diagnostiku celiakie existují tři možné diagnostické postupy. Mezi ně patří histologie, genetické testování a sérologické testy. Sérologické testy jsou prováděny pomocí IgA či IgG protilátek proti tkáňové transglutamináze a gliadinu, protilátek proti retikulínu a protilátek proti endomysiu. Když je sérologie pozitivní, je na řadě horní endoskopie a střevní biopsie proximálního duodena. Poslední je genetické testování, kdy se testuje lidský leukocytární antigen HLA. Genetické testování by mělo probíhat u dětí s rizikem CD a s negativní

sérologií, u pacientů s nejistou diagnózou. Dále může být toto testování využito u dětí, které jsou na bezlepkové dietě bez pozitivního sérologického hodnocení (Gallegos et al., 2019).

Jedinou možnou léčbou celiakie je prozatím bezlepková dieta. Ke zlepšení stavu pacienta dochází již během dnů či týdnů po vysazení lepku (Lebwohl et al., 2018). U dětí se střevní sliznice obnovuje rychleji, většinou do dvou let. U dospělých to trvá déle, dva roky až pět let. Požití lepku může kdykoli vrátit příznaky celiakie zpět. Pokud není dodržena bezlepková dieta, může dojít k dalšímu poškozování střev či vzniku rakoviny. Mezi potraviny vyřazené v rámci bezlepkové diety patří typicky chléb, těstoviny a cereálie. Těmi méně typickými jsou například některé polévky, hranolky, koření či pivo (Aljada et al., 2021).

**Tabulka č. 1:** Riziko vzniku celiakie podle genotypu HLA DQ (Megiorni et al., 2012)

HLA alely	riziko
DQ2.5/DQ8	velmi vysoké
DQ2.5	vysoké
DQ8	vysoké
DQ2.2	nízké
DQ X.5	nízké
DQX.X	extrémně nízké

### *1.2.1.2 Celiakie a autismus*

V roce 1969 Goodwin & Goodwin poprvé zaznamenali možné spojení mezi celiakií a PAS. Následovala je řada dalších studií (Croall et al., 2021). V roce 2001 (Jyonouchi et al., 2001) byla publikována práce, která zjistila, že děti s PAS mají zvýšené markery vrozené a adaptivní imunitní reakce (TNF-A, cytokiny, atd.). Nabízela se hypotéza o tom, že environmentální podněty spouštějí imunitní odpověď a tím zhoršují i příznaky PAS.

V jiné studii z roku 2000 bylo zjištěno, že děti s PAS mají hodně protilátek proti DPP-4, trávicímu enzymu zpracovávajícímu gliadin. Gliadin se nejprve štěpí na gliadinomorfin-7, který dále zpracovává již zmíněný DPP-4. Pokud je funkce DPP-4 ovlivněna, začne se v těle hromadit gliadinomorfin-7, což je látka s opioidní aktivitou. A právě nadměrná aktivita opiátů může vést k negativnímu ovlivnění sociálního chování (Pruimboom et al., 2015).

Možným spojením PAS a celiakie je mozeček (cerebellum). Jedná se o část mozku ležící pod týlními laloky. Jeho funkcí je koordinace pohybů, motorika, kontrola očních pohybů a

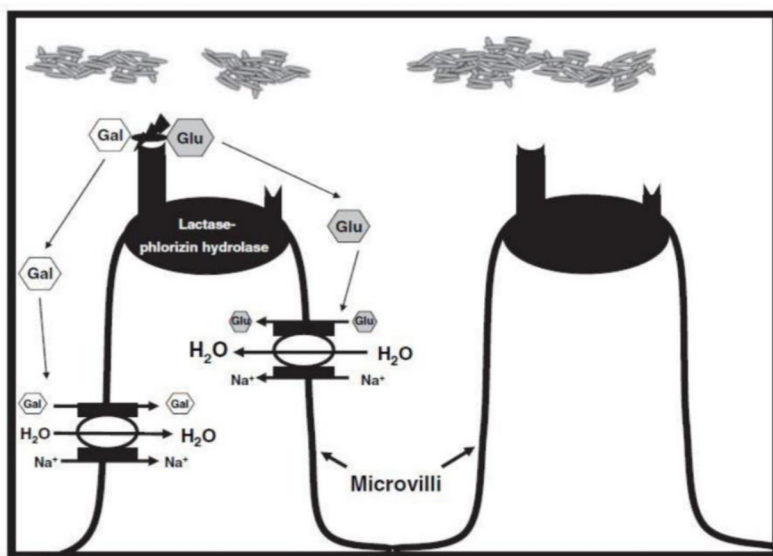
kognitivních funkcí. Principem může být narušení antioxidační obrany v mozečku PAS pacientů. Gliadin může zvýšit oxidační stres v těle a ten zase způsobí zánět v mozku (Gu et al., 2013).

## 1.2.2 Laktóza

Sacharidy patří mezi velmi důležité látky a zásobárny energie všech živých organismů. Laktóza je disacharid skládající se z glukózy a galaktózy. Tyto dva sacharidy spojuje  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) glykosidická vazba. Laktóza se vyskytuje v mléce většiny savců (Krewinkel et al., 2014) a k její produkci dochází v mléčné žláze. Ve střevním lumenu se laktóza rozpadá na monosacharidy glukózu a galaktózu (Klee a Klee, 1970). Hydrolýzu zajišťuje enzym zvaný laktáza (Naim, 2001). Monosacharidy od sebe oddělí a mohou být transportovány přes epiteliální buňky do cytosolu a na potřebné místo. Vysoká aktivita laktázy provází savce pouze v raných fázích života, v dospělosti může dojít k jejímu snížení (Jacob a Manod, 1961). Pod poruchy spojené s laktózou patří intolerance laktózy a galaktosemie. Intoleranci se budu zabývat níže. Galaktosemie je dědičná porucha spočívající v částečné nebo úplné ztrátě funkce jednoho ze tří enzymů zapojených do metabolismu galaktózy. Mezi příznaky této poruchy patří šedý zákal, poškození ledvin, zánět jater, zpomalení růstu a poškození mozku (Adam et al., 2005).

### 1.2.2.1 Laktózová intolerance

Laktózová intolerance je způsobena sníženou hladinou laktázy ve střevě, což má za následek neschopnost trávit laktózu (Deng et al., 2015). Laktóza se poté hromadí v tlustém střevě a fermentuje na kyselinu mléčnou, metan, vodík, oxid uhličitý apod. Důsledkem jsou příznaky jako plynatost, průjem, nevolnost, křeče v břiše a zvracení (Grenov et al., 2016).



Obr. 4: Hydrolýza laktózy v tenkém střevě, zdroj: Lomer et al., 2007



Laktózová intolerance (LI) postihuje zhruba dvě třetiny světové populace (Heyman et al., 2006). Intoleranci můžeme rozdělit do čtyř typů. Prvním typem je primární deficit laktázy neboli dospělá hypolaktázie. Tento typ se objevuje převážně v dospělosti a je způsoben vymizením aktivity laktázy ve střevech (Kuokkanen et al., 2003). Jedná se o autozomálně recesivně dědičné onemocnění, které je způsobeno jednonukletidovým polymorfismem v *MCM6* genu, který kóduje gen laktázy (*LCT*). Byly popsány dva polymorfismy: 13910 (C>T) a 22018 (G>A). Genotyp CC/GG je zodpovědný za postupný pokles aktivity laktázy, který se zhoršuje s věkem. Přítomnost genotypu TT/AA zajišťuje celoživotní aktivitu laktázy a jedinci s CT/GA genotypem jsou více náchylní ke vzniku laktózové intolerance (Tomczonek-Morus et al., 2019).

Vrozený deficit laktázy je druhým typem LI. Jedná se o autozomálně recesivní dědičné onemocnění, u kterého dojde k eliminaci laktázy již od narození (Robayo-Torres et al., 2007). Příznaky se projeví ihned po prvním podání mateřského mléka a jedná se o vodnaté průjemy. V tomto případě musí dojít k rychlé léčbě, protože u novorozenců dochází k dehydrataci a ztrátě elektrolytů. Řešením je úplné odstranění laktózy ze stravy a podávání náhražek mléka (Diekmann et al., 2015).

Třetí typem je získaný nebo sekundární deficit laktázy (Heyman et al., 2006). Sekundární laktózová intolerance vzniká v případě, kdy tenké střevo snižuje produkci laktázy a to převážně po nemoci (např. celiakie, Crohnova choroba, úraz či operace). Po zhojení střevního epitelu může dojít opět k vymizení LI (Amiri et al., 2015).

Čtvrtý typ se jmenuje vývojový deficit laktázy. Nachází se u předčasně narozených dětí. Jelikož k porodu dojde dříve, laktáza se nestihne správně vyvinout (Lasekan et al., 2011).

Pokud jde o diagnostiku intolerance laktózy, používají se čtyři diagnostické přístupy. Mezi ně patří genetický test, dechová zkouška vodíkem, rychlý laktózový test a test tolerance laktózy. Genetickým testem se testují predispozice k toleranci laktózy. Jedná se o již výše zmíněné polymorfismy 13910 a 22018 nacházející se v *MCM6* genu (Catanzaro et al., 2021).

Dechová zkouška vodíkem (HBT) je založená na produkci plynu konkrétně vodíku, vznikajícího během fermentace nestrávené laktózy. Nejprve je změřen vydechovaný vodík nalačno, poté je pacientovi podána dávka 25-50 gramů laktózy a dojde k opakovanému měření. Naměřené hodnoty o minimální velikosti 20 ppm svědčí o hypolaktázii (Misselwitz et al., 2019).

Další metoda (rychlý laktózový test) zahrnuje biopsii sliznice duodena, která je následně inkubována s laktózou na testovací destičce (Kuakkanen et al., 2006). Posledním je test tolerance laktózy. Její trávení zvyšuje glykémii, tudíž nezvýšená glykémie ukazuje na malou absorpci laktózy. Testuje se glykémie nejprve bez a poté po požití 50 g laktózy (Misselwitz et al., 2019).

#### **1.2.2.2 Laktózová intolerance a autismus**

*Laktobacillus spp.* tvoří největší část vaginálních bakterií. Tyto bakterie mohou významně ovlivnit projevy počátečního střevního mikrobiomu a hrají významnou roli ve vývoji centrálního nervového systému (Dicks et al., 2021). U dětí s PAS byla nalezena snížená schopnost trávení pro disacharidázy (laktázy, maltázy, palatinázy), což je spojováno s funkčními abnormalitami GI traktu (Koves et al., 2002). Jedním z důvodů intolerance laktózy u dětí s PAS mohou být vrozené predispozice (enzymové defekty) a získané stavy (zánět střev, nerovnováha střevních mikrobů a negativní účinky antibiotické léčby) (Jolanta et al., 2015).

#### **1.2.3 FODMAP sacharidy**

FODMAP je zkratka, která označuje fermentované oligosacharidy, disacharidy, monosacharidy a polyoly. Tyto sacharidy s krátkými řetězci se kvůli nedostatku či snížené aktivitě hydroláz velmi těžko rozkládají a vstřebávají v tenkém střevě. Monosacharidy, disacharidy a polyoly ve střevním lumenu způsobují absorpci vody (Major et al., 2017). Sacharidy, které se dostanou do tlustého střeva, jsou fermentovány bakteriemi za uvolnění plynů (Ong et al., 2010). Příznaky jsou pak zmírněny FODMAP dietou. Tato dieta probíhá ve třech krocích (omezení, opětované zavedení, personalizace) (Tuck et al., 2017). Oligosacharidy (fruktany, galakto-olisacharidy) jsou obsaženy převážně v luštěninách, cibuli, česneku, ořechách, pšeničných a žitných produktech. K malabsorbci těchto cukrů dochází u každého člověka, jelikož neexistuje žádný lidský enzym, který by byl schopný je štěpit (Rumessen et al., 1998). Pod FODMAP disacharidy patří laktóza. Jídla obsahující tento cukr jsou mléko, jogurt, měkké sýry a smetana. FODMAP monosacharidem je fruktóza, kterou ve vysokém množství obsahují například hrušky, jablka, bobule, med, chřest a lusky (Gearry et al., 2016). Fruktóza patří mezi nejmenší FODMAP sacharidy, díky tomu má vysoké osmotické účinky a schopnost vtáhnout vodu do lumen střeva. To způsobí roztažení střev, které vede k bolesti či nadýmání (Murray et al., 2014). Posledními FODMAP sacharidy jsou polyoly. Mezi nejčastější polyoly patří mannitol a sorbitol.

Nachází se v surovinách, jako jsou jablka, hrušky, květák, houby, hrách a umělá sladidla (Yao et al., 2014).

### **1.2.3.1 IBS**

IBS neboli syndrom dráždivého tračníku je chronické onemocnění střev, které postihuje 9-23 % populace (Saha et al., 2014). Mezi příznaky tohoto onemocnění se řadí nadýmání, bolest břicha, průjem a zácpa (Occhipinti et al., 2012). Gastrointestinální symptomy tohoto typu nastartují FODMAP sacharidy. Léčbou je dieta s nízkým obsahem FODMAP sacharidů, což vede k snížení příznaků a zlepšení kvality života pacientů (El-Salhy et al., 2012). Negastrointestinálním příznakem může být také únava (Occhipinti et al., 2012). IBS se dělí do tří podtypů. Tyto podtypy se od sebe odlišují převládajícím typem projevů. U podtypu IBS-D převládá průjem. IBS-C se vyznačuje zácpou a IBS-M smíšeným typem (Longo et al., 2017). Se zvýšeným rizikem možného vzniku IBS je spojen gen *TNF SF15* rs4263839 (tumor nekrozní faktor rodiny 15) a jeho polymorfismus rs42638369 (Zucchelli et al., 2011).

### **1.2.3.2 IBS a autismus**

Mnoho studií poukazuje na spojení mezi mozkiem a střevem tzv. osa střevo-mozek. Toto spojení nám naznačuje, že na funkci mozku, náladu a kognici může mít vliv gastrointestinální trakt (LI et al., 2017). Psychiatrické symptomy se u IBS pacientů zvyšují s vyšší frekvencí a závažností GI symptomů (Pinto-Sanches et al., 2015). Kromě toho byly u IBS pacientů zaznamenány změny v mozkových okruzích zapojených do pozornosti, emocí a bolesti. Jak jsem již zmínila IBS je funkční porucha osy mozek-střevo-mikrobiota (Kelly et al., 2015). Právě mikrobiota je velmi důležitá a může se u jedinců měnit v závislosti na průběhu porodu (vaginální porod, císařský řez). Tato souvislost byla u pacientů s PAS zkoumána a mnoho studií poukázalo na to, že císařský řez ve srovnání s vaginálním porodem zvyšuje riziko PAS (Al-Zalabany et al., 2020). U PAS dětí byl prokázán vyšší výskyt *Proteobacteria* a *Bacteroidetes* a nižší zastoupení *Firmicutes* a bifidobakterií (Finegold et al., 2010). Pod *Firmicutes* patří bakterie zvané *Clostridia*, které se nacházely ve větších počtech u autistických pacientů s GI problémy (Song et al., 2004). Další souvislost mezi výskytem *Clostridia* a PAS naznačuje studie, kdy autistickým dětem podali vankomycin, který způsobil útlum autistických symptomů (Finegold et al., 2008). Jiná studie prokázala, že opakované epizody gastroenteritidy jsou způsobeny emocionálními a behaviorálními potížemi v raném věku (Parent et al., 2019).

### 1.2.4 ApoE

Apolipoprotein E je protein vázající lipidy, který funguje jako transportní protein pro lipidy mezi různými orgány či buňkami. ApoE je produkován v různých orgánech včetně jater, mozku, tukovými tkáněmi a stěnami tepen. Tento protein je hlavní součástí lipoproteinů, mezi které se řadí chylomikrony, lipoproteiny s velmi nízkou hustotou (VLDL), lipoproteiny s vysokou hustotou (HDL) (Getz et al., 2009). U lidí má APOE tři hlavní izoformy, těmi jsou APOE2, APOE3 a APOE4. Tyto izoformy vycházejí z alelických variant APOE  $\epsilon$ 4,  $\epsilon$ 3 a  $\epsilon$ 2 (Huebbe et al., 2017). Každá izoforma se liší v pozici aminokyselin 112 a 158, kde může být cystein nebo arginin. APOE2 má dva cysteinové zbytky 112 a 158. APOE3 má cysteinový zbytek 158 nahrazený argininem. Zatímco APOE4 zahrnuje dva argininové zbytky (Butterfield et al., 2020). APOE zajišťuje metabolickou koordinaci mezi neurony a astrocyty. Astrocyty vypouštějí APOE v podobě částic podobných HDL, které přenášejí cholesterol, fosfolipidy, hydrofobní vitamíny a antioxidanty do neuronů (Lindner et al., 2022).

#### 1.2.4.1 ApoE a autismus

O možném spojení PAS a APOE se začalo uvažovat poté, co některé ze studií našly podobné mechanismy v průběhu vývoje PAS a Alzheimerovy choroby. Je známo, že APOE4 primárně souvisí a zvyšuje riziko AD (Folmsbee et al., 2016). Dvě nezávislé genetické studie potvrdily, že APOE je spojena s PAS. Šlo o studii týmu Guinco z roku 2009 a týmu Hu z roku 2018, které potvrdily, že je hypermetylace genu *APOE* významně spojena s PAS. Výsledky byly hodnoceny ROC (receiver operating characteristic) křivkami, díky kterým lze hypermetylaci APOE používat jako možný potenciální biomarker pro diagnostiku PAS (Hu et al, 2018). Alely APOE predisponující k PAS jsou především  $\epsilon$ 4 a  $\epsilon$ 2 (Guinco et al., 2009).

## 2 CÍLE PRÁCE

- Vypracování literární rešerše na dané téma
- Zvládnutí základní laboratorní praxe (izolace DNA, PCR RFLP, PCR ARMS, REAL-TIME PCR).
- Zpracování výsledků u vybraných pacientů s diagnózou PAS a jejich porovnání se zdravou populací.

## 3 MATERIÁLY A METODY

Praktická část této bakalářské práce byla provedena v genetické laboratoři GENLABS s.r.o., Celkem bylo hodnoceno 30 pacientů s PAS, jejichž diagnózy poskytlo spolupracující poradenské centrum E.L.A. consulting (viz. Příloha 3).

### 3.1 Získání vzorků

Vzorky pacientů získané v laboratoři GENLABS byly buď bukální stěry (86,66%) nebo plná krev (13,33%). Krev byla odebrána na specializovaných pracovištích. Bukální stěry byly provedeny pomocí speciální odběrové sady (Isohelix SKa Buccal Swab, Isohelix) za asistence rodičů pacientů podle návodu výrobce. Po přijetí vzorku do laboratoře byla izolována DNA.

### 3.2 Izolace DNA

#### 3.2.1 Izolace z bukálního stěru

Pro izolaci DNA byl použit kit GeneAll ExGene™ Clinic SV mini od GeneAll Biotechnology dle doporučení výrobce. Reagencie, které jsou součástí kitu, jsou uvedeny v Tabulce č. 2. Nejprve jsem do zkumavky k vatovému tamponu přidala 25 µl proteinázy K (20mg/ml) a 300 µl BL pufru. Vzorky jsem důkladně promíchala pomocí vortexu, krátce stočila a následně nechala 20 minut inkubovat při teplotě 56 °C. Po inkubaci jsem vzorky opět stočila, aby došlo k odstranění kapek z vnitřní strany víčka. V dalším kroku jsem dodala 300 µl 100% etanolu, se kterým se vzorky vortexovaly v pulzech a stočily. Veškerý supernatant jsem přenesla na kolonku. Kolonky se zkumavkami jsem nechala centrifugovat 1 minutu při 6000 x g a poté sběrné zkumavky nahradila novými. Na kolonku jsem napipetovala 600 µl BW pufru, opět jsem nechala centrifugovat při stejných otáčkách a poté vyměnila zkumavku. K dalšímu promytí jsem použila 700 µl TW pufru. Znovu jsem centrifugovala, ale tentokrát jsem neodstranila zkumavku, nýbrž vylila supernatant. Další centrifugaci jsem nastavila na nejvyšší otáčky, aby došlo k úplnému zbavení promývacího pufru. Promytou kolonku jsem umístila do 1,5 ml mikrozkušavky s víčkem a přímo na střed

kolonky jsem napipetovala 50  $\mu$ l AE pufru. Následovala 5 minutová inkubace a centrifugace při nejvyšších otáčkách 1 minutu. Vzorek získaný centrifugací jsem znovu napipetovala na kolonku, opět inkubovala a centrifugovala při nejvyšších otáčkách. Získaný supernatant obsahoval DNA.

**Tabulka č. 2:** Reagenty použité pro izolaci z bukalního stěru a periferní krve

Reagenty	Objem ( $\mu$ l)
proteináza K	20
BL pufr	200
100% ethanol	200
BW pufr	600
TW pufr	700
AE pufr	50

### 3.2.2 Izolace z plné krve

Do 1,5 ml zkumavky jsem napipetovala 200  $\mu$ l krve. V dalších krocích byly využity reagenty kitu GeneAll ExGene<sup>TM</sup> Clinic SV mini. Objemy použitých reagentů jsou zobrazeny v Tabulce č. 2. Krok promývání BW pufrům jsem provedla dvakrát.

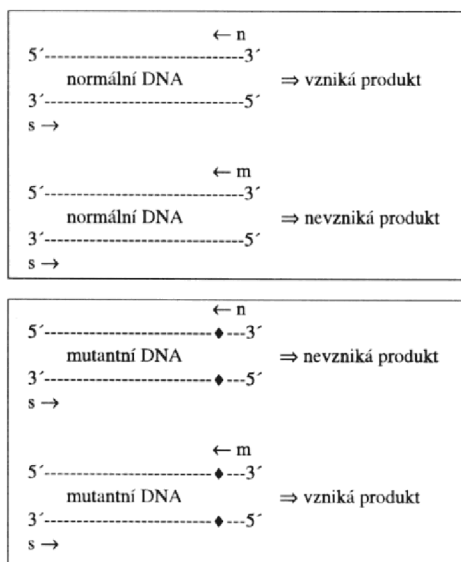
### 3.2.3 Měření koncentrace

Po provedení izolace DNA jsem změřila její koncentraci. Nejprve jsem si připravila pracovní roztok Qubit<sup>TM</sup> Working Solution. Pro každý vzorek jsem napipetovala 198  $\mu$ l kvantifikačního roztoku (Quantitation Solution AccuGreen<sup>TM</sup>, Biotum) a 2  $\mu$ l vyizolované DNA. Vzorek jsem opět vortexovala, centrifugovala a nakonec nechala krátce inkubovat. Koncentrace DNA je nakonec změřena na fluorometru (Qubit 2.0 Fluorometer, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific).

## 3.3 ApoE

Pro diagnostiku genu *APOE* byla aplikována metoda PCR ARMS. Tato metoda se používá k detekci jakékoli mutace zahrnující změny jedné báze nebo malé delece. Využívá alelově specifické oligonukleotidy jako primery. Tento test probíhá ve dvou komplementárních

reakcích s jedním společným primerem pro obě reakce a dvěma různými primery pro mutovanou a nemutovanou alelu. V první reakci máme ARMS primer specifický pro normální sekvenci DNA a nemůže se tedy amplifikovat mutantní DNA v daném lokusu. Naopak druhá reakce obsahuje specifický primer pro mutovanou sekvenci a neamplifikuje normální sekvenci. Princip PCR ARMS je uveden na Obr. 5.



Obr. 5: Princip PCR ARMS, zdroj: Zima, 2007.

Pro amplifikaci jsem použila kit 2xPCRBIO Taq Mix Red od firmy PCR Biosystems. Tento kit je navržený pro rychlou, vysoce specifickou a citlivou PCR. Složení reakčního mixu A a mixu B je uvedeno v Tabulkách č. 3 a 4. V Tabulce č. 5 jsou zapsány sekvence použitých primerů.

**Tabulka č. 3:** Reakční mix A pro 1 reakci

Reagencie (A)	Množství (μl)
H <sub>2</sub> O	8,5
2XPCRBIO Taq Mix Red	12,5
DMSO 100%	1,25
Primer Arg 112 (20 pmol)	0,4
Primer Arg 158 (20 pmol)	0,8
Primer Common (20 pmol)	0,8



**Tabulka č. 4:** Reakční mix B pro 1 reakci

Reagencie (B)	Množství (μl)
H <sub>2</sub> O	8,5
2XPCRBIO Taq Mix Red	12,5
DMSO 100%	1,25
Primer Cys 112 (20 pmol)	0,4
Primer Cys 158 (20 pmol)	0,8
Primer Common (20pmol)	0,8

**Tabulka č. 5:** Sekvence použitých primerů (Zende,2013)

primery	sekvence	Velikost PCR produktu (bp)
Cys158	ATGCCGATGACCTGCAGAATT	588
Arg158	ATGCCGATGACCTGCAGAATC	588
Cys112	CGCGGACATGGAGGACGTTT	451
Arg112	CGCGGACATGGAGGACGTTC	451
Common	G TTCAGTGATTGTCGCTGGGCA	-

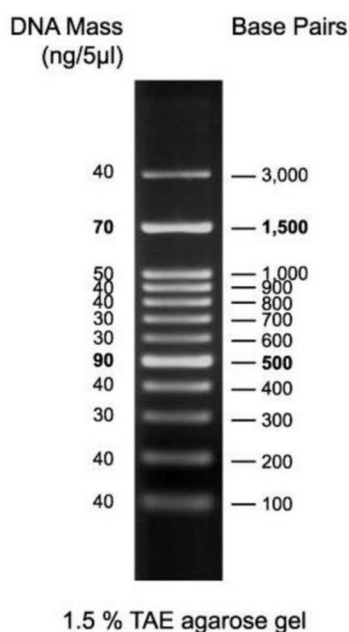
Příprava reakční směsi probíhala v laminárním boxu na chladícím stojánku. Zvlášť byl připraven reakční mix A a reakční mix B vždy pro požadovaný počet reakcí. Pro každý vzorek jsem použila dvě zkumavky (A a B). Mix A obsahoval primer Arg 112 (20 pmol), Arg 158 (20 pmol) a Common primer (20 pmol). Zatímco mix B obsahoval primer Cys 112 (20 pmol), Cys 158 (20 pmol) a Common primer (20 pmol). Reakční mixy jsem rozpipetovala do mikrozkušavek po 23 μl, následně jsem do každé zkumavky přidala 2 μl DNA mimo laminární box. Mikrozkušavky s negativní kontrolou jsem doplnila vodou ještě v laminárním boxu. Vzorky jsem poté zvortexovala, stočila na minicentrifuze a dala do thermocyklieru.

U PCR dochází ke třem krokům. Denurací dochází k rozvolnění dsDNA, je tudíž důležitá vysoká teplota. Během anealingu klesne teplota, aby mohly dosednout primery, následuje extenze, kdy se syntetizují nová vlákna. PCR profil je uveden v Tabulce č. 6.

**Tabulka č. 6:** PCR profil pro PCR ARMS a gen ApoE.

PCR profil	Cykly	Čas	Teplota (°C)
Počáteční denaturace		4 min.	95
Denaturace		45 s.	94
Anealing	35 cyklů	45 s.	66
Extenze		45 s.	72
Finální extenze		5 min.	72

Po PCR jsem provedla gelovou elektroforézu, která mi PCR produkty rozdělila podle velikosti. Pro gelovou separaci jsem připravila 4% agarózový gel. K jeho zhotovení jsem rozpustila 4×0,5 g agarózové tablety (FastGene Agarose Tablets, Nippon Genetics) v 50 ml TBE pufru (Thermo Scientific) a směs zahřívala v mikrovlnné troubě. Do tekutého gelu jsem přidala 5,5 µl fluorescenční barvičky (EliDNA<sup>TH</sup> PS Green). Směs jsem nalila do elektroforetické podložky. Ztuhlý gel jsem vložila do elektroforetické vany (Mupid One Electrophoresis Systém) s 1x TBE pufrem. Do připravených jamek jsem napipetovala 5 µl markeru 100 bp DNA Ladder H3RTU, který jsem použila na stanovení velikosti PCR produktů. Dále jsem napipetovala 15 µl PCR produktu a spustila jsem elektroforézu na zhruba 20 minut při 135 V. Během elektroforézy dochází k separaci molekul DNA podle velikosti.



Obr. 6: Hmotnostní marker (DNA ladder) 100bp DNA Ladder H3RTU, zdroj: 100bp DNA Ladder (Molecular Weight Marker), 2020

Na základě velikosti PCR produktů pak určíme genotyp *ApoE* genu. Velikosti produktů pro jednotlivé izotypy se nachází v Tabulce č. 7.

**Tabulka č. 7:** Hodnoty pro vyhodnocení genotypu ApoE.

ApoE	E3/E2	E4/E2	E4/E3	E4/E4	E3/E3	E2/E2
MIX A	451	451	451	451	451	-
MIX A	-	588	588	588	-	-
MIX B	451	451	-	-	-	451
MIX B	588	588	588	-	588	588

### 3.4 Laktózová intolerance

U Laktózové intolerance jsem testovala polymorfismy C/T-13910 a G/A 22018. Polymorfismy jsem detekovala pomocí RFLP-PCR. Tato metoda se skládá ze dvou kroků. Prvním krokem si pomocí dvojice primerů amplifikujeme konkrétní úsek DNA. V druhém kroku RFLP dojde k restrikci produktů pomocí restrikčních endonukleáz v místě se specifickou nukleotidovou sekvencí.



Obr. 7: Princip PCR RFLP, zdroj: Retama, 2008

Pro analýzu polymorfismu C/T-13910 a G/A-22018 jsem využila MyTaq™ Red DNA Polymerase (Bioline). Master mixy pro požadovaný počet reakcí jsem namíchala do 1,5 ml zkumavek, v Tabulce č. 8 je uvedeno složení reakčního mixu pro 1 reakci.

**Tabulka č. 8:** Master mix pro polymorfismus C/T-13910 a G/A-22018

reagencie	Objem (48μl)
H <sub>2</sub> O	34,3
10x My Taq Red reakční pufr	10
My Taq polymeráza 5U/ μl	0,2
DMSO 100%	2,5
Forward primer – LAC 13910 C/T (20 pmol), LAC 22018 G/A (20 pmol)	0,5
Reverse primer - LAC 13910 C/T (20 pmol), LAC 22018 G/A (20 pmol)	0,5

**Tabulka č. 9:** Sekvence použitých primerů (Coelho et al, 2005 a Mattar et al, 2008)

primery	sekvence
LAC 13910 C/T forward	5'-GCT GGC AAT ACA GAT AAG ATA ATG GA-3'
LAC 13910 C/T reverse	5'-CTG CTT TGG TTG AAG CGA AGA T -3
LAC 22018 G/A forward	5'-CTC AGT GAT CCT CCC ACC TC -3'
LAC 22018 G/A reverse	5'-CCC CTA CCC TAT CAG TAA AGG C -3'

Master mix jsem po vortexování a stočení rozpipetovala po 48 μl do popsány mikrozkušavek. Do každé zkumavky jsem přidala 2 μl DNA. Jako pozitivní kontrolu jsem použila vzorky se známým genotypem: heterozygota, wild type vzorek. Dále jsem pro kontrolu možné kontaminace použila negativní kontrolu, ke které jsem místo DNA přidala deionizovanou vodu. Sekvence primerů a reakční protokoly jsem přebrala z odborných publikací konkrétně z publikace Mattar et al. (2008) a Coelho et al. (2005). Vzorky jsem nakonec umístila do gradientového PCR termocycleru (MultiGene, Labnet). Průběh PCR je uveden v Tabulce č. 10.

**Tabulka č. 10:** PCR profil pro polymorfismus C/T-13910 a G/A-22018

PCR profil	Cykly	Teplota (°C) - C/T 13910	Čas (min) -C/T 13910	Teplota (°C) -G/A 22018	Čas (min) -G/A 22018
Počáteční denaturace	1 cyklus	95	5	95	5
denaturace	35 cyklů	95	1	95	1
annealing		57,4	1	60,3	1
elongace		72	1	72	1
Finální elongace	1 cyklus	72	5	72	5

Po ukončení PCR jsem PCR produkt zkontrolovala pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu. Výsledkem amplifikační reakce byly produkt o velikosti 201 bp pro polymorfismus C/T 13910 a o velikosti 271 bp pro polymorfismus G/A 22018.

Dalším krokem PCR-RFLP, je restrikční štěpení pomocí endonukleáz. Míchání restrikční reakce probíhalo na vychlazeném stojánku. K 45 µl PCR produktu pro C/T 13910 jsem přidala 10U restrikční enzymu HinfI (NE BioLabs) a k PCR produktu pro G/A 22018 10U Hin6I (Thermoscientific) a 5 µl 10x příslušného restrikčního pufru – CutSmart™ buffer (C/T 13910) a Tango buffer (G/A 22018). Vzorčky byly inkubovány v miniinkubátoru (Mini Incubator, Labnet) alespoň jednu hodinu při teplotě 37°C.

Oblast restrikčního štěpení HinfI:

5'...G ↓ A N T C...3'

3'...C T N A ↑ G...5'

Oblast restrikčního štěpení Hin6I:

5'...G ↓ C G C...3'

3'...C G C ↑ G...5'

Zobrazení restrikčního štěpení jsem provedla pomocí gelové elektroforézy.

Možné výsledky restrikčního štěpení a genotypy pro polymorfismus C/T-13910 jsou zobrazeny v Tabulce č. 11.

**Tabulka č. 11:** Restrikční štěpení PCR produktu restriktázou HinfI pro polymorfismus C/T-13910

	Délky restrikčních fragmentů	Genotyp
Laktázová persistence	177 bp + 24 bp	T/T
heterozygot	201bp + 177 bp + 24 bp	C/T
Laktázová non-persistence	201 bp	C/C

Možné výsledky restrikčního štěpení a genotypy pro polymorfismus G/A-22018 jsou uvedeny v Tabulce č. 12.

**Tabulka č. 12:** Restrikční štěpení PCR produktu restriktázou Hin6I pro polymorfismus G/A-22018

	Délky restrikčních fragmentů	Genotyp
Laktázová persistence	271 bp	A/A
heterozygot	271 bp + 196 bp + 75bp	G/A
Laktázová non-persistence	196 bp + 75bp	G/G

### 3.5 IBS

SNP rs 4263839 v genu TNF SF15 spojený s výskytem IBS jsem vyšetřila pomocí metody real-time PCR s analýzou křivek tání. Real-time PCR probíhá ve speciálním cycleru, který zaznamenává množství DNA a to v průběhu každého cyklu. V tomto případě byl použit LightCycler 2.0 firmy Roche Diagnostics. Reakce byla připravena v chladícím stojánku v laminárním boxu. PCR master mix jsem namíchala podle Tabulky č. 13. Reakční profil je uveden v Tabulce č. 14.

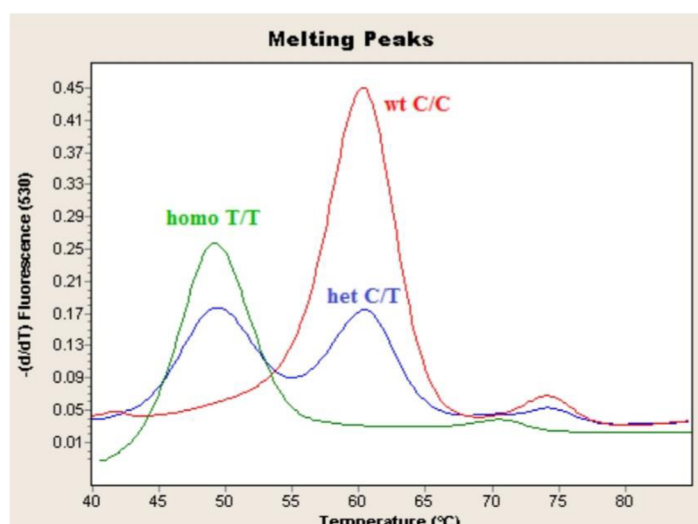
**Tabulka č. 13:** Master mix pro TNF SF15 (rs4263839)

Reagencie	Objem (μl)
H <sub>2</sub> O	10,4-14,4
Reagent mix LightSNiP (TIB MOLBIOL)	1
LightCycler FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics)	2
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,6
DNA	1-5

**Tabulka č. 14:** Reakční profil pro IBS pro LightSNiP assay

	Denaturace	Amplifikace			Tání			Chlazení
Cykly	1	45			1			1
Teplota (°C)	95	95	60	72	95	40	85	40
Trvání	10 min	10 s	10 s	15 s	20 s	20 s	0 s	30 s
Teplotní skok (°C/s)	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	0.2	20.0
Akviziční mód	-	-	jednoduchý	-	-	-	kontinuální	-

Detekce a analýza se odehrávala ve fluorescenčním kanálu FAM (530nm). Výsledkem je křivka tání, která diskriminuje sondy pro jednotlivé polymorfismy na základě odlišné na teploty tání ( $T_M$ , melting temperature). Příklad analýzy křivky tání je zobrazen na obrázku 8.



Obr. 8: Příklad analýzy křivky tání na přístroji LightCycler 2.0 v kanálech FAM: wt CC – wild type odpovídá genotyp u CC, het C/T – odpovídá heterozygotnímu genotypu CT, homo T/T – odpovídá mutovanému homozygotního genotypu TT

## 3.6 Celiakie

Pro zjištění rizikových HLA alel byla použita metoda real-time PCR a kit EliGene Coeliac 3.0 RT CE IVD (Elisabeth Pharmacon) dle doporučení výrobce. Kit EliGene Coeliac 3.0 RT dokáže detekovat alely HLA-DQ2.5 (DQA1\*05, DQB1\*02), HLA-DQ2.2 (DQA1\*02) a HLA-DQ8 (DQA1\*03, DQB1\*03:02). Tento kit obsahuje tři předmíchané master mixy (CELI-DQ2.5, CELI-DQ2.2, CELI-DQ8) a pro každý jeden vzorek jsou připraveny tři reakce. Před prvním použitím se do každého master mixu napipetují 3 µl Eliblockeru. Master mixy jsem rozpipetovala po 18 µl a k nim jsem přidala 2 µl DNA. Spolu s vzorky jsem testovala i pozitivní a negativní kontrolu. Pozitivní kontroly jsou součástí kitu. Negativní kontrolu jsem doplnila deionizovanou vodou. Real-time PCR poté probíhá v LightCycleru 2.0.

**Tabulka č. 15:** PCR profil pro celiakii

Fáze	Počet cyklů	Teplota (°C)	Čas	Akviziční mód
denaturace	1	95	3 min	Žádný
cyklovací	40	95	15 s	Žádný
		61	40 s	jednotlivý



## 4 VÝSLEDKY

V rámci práce bylo otestováno 30 pacientů s poruchou autistického spektra. Diagnózy pacientů jsem měla k dispozici od E.L.A. consulting s.r.o. (viz. Příloha). Ve výsledcích jsem srovnávala autistické pacienty se zdravou evropskou populací. Populační genetiku evropské pro IBS, APOE a laktózovou intoleranci jsem použila ze stránky Ensembl (Cunningham et al., 2022). Data pro populační genetiku celiakie jsem získala v laboratoři GENLABS, kde bylo testováno 537 nedagnostikovaných jedinců. Výsledky jsem zpracovala v Excel 2010.

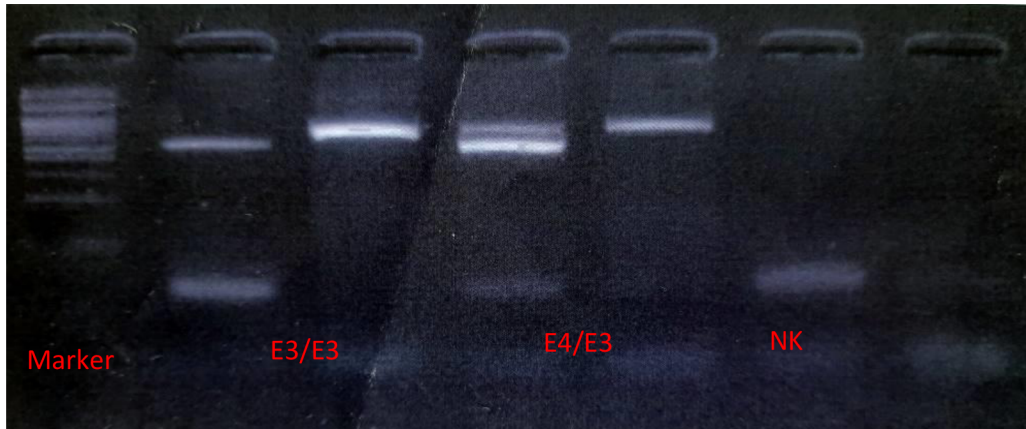
Průměrný věk autistických pacientů se pohyboval kolem 6 let. Nejmladší testovaný autista měl 1 rok a nejstarší 12 let. Zastoupení pohlaví v testovaném souboru je uvedeno v Tabulce č. 16. Nejčastější diagnózou byl dětský autismus (36,66 %) a ADHD (76,66 %), v některých případech se tyto dvě diagnózy překrývaly. Dále se u diagnostikovaných pacientů objevovalo poškození či regres po Hexa (36,66 %) a MMR (40 %).

**Tabulka č. 16:** Zastoupení pohlaví u vyšetřovaných autistických pacientů

Pohlaví	Počet
Žena	3 (10%)
Muž	26 (90%)

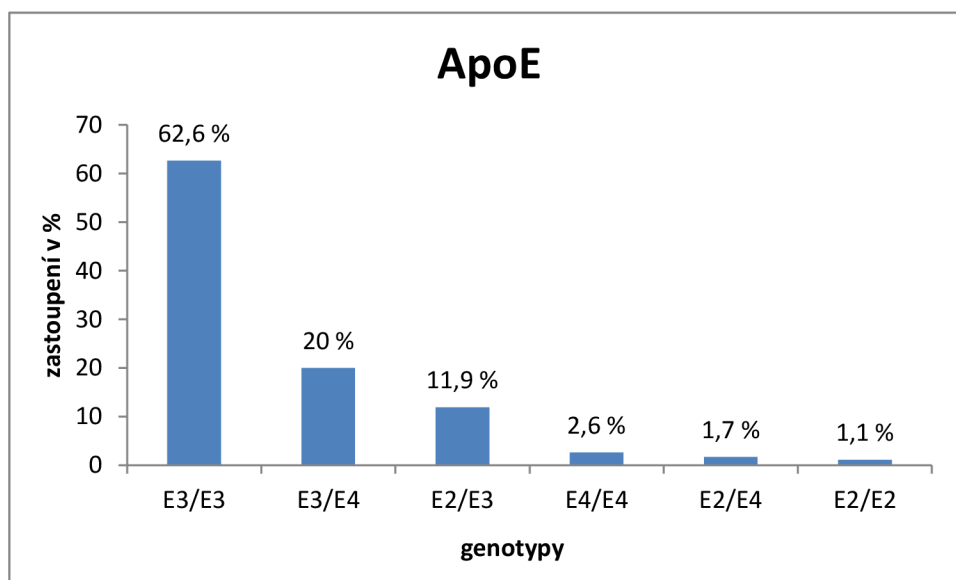
### 4.1 ApoE

Na obrázku 9 je příklad gelu s výsledky PCR ARMS vyšetřující isoformy *APOE* genu. Konkrétně jde o genotyp E3/E3 genotyp E4/E3.



Obr. 9: Příklad fotografie elektroforetického gelu, kontrola PCR produktu. První jamka obsahuje hmotnostní marker (100 bp DNA LADDER H3RTU). V dalších jamkách se nachází PCR produkty o velikosti 451 bp a 588 bp. Vzorek 1 (mix A: Arg112 pozitivní, Arg158 negativní, mix B: Cys112 negativní, Cys158 pozitivní) odpovídá genotypu E3/E3. Vzorek 2 (mix A: Arg112 pozitivní, Arg158 pozitivní, mix B: Cys112 negativní, Cys158 pozitivní) odpovídá genotypu E4/E3. Poslední jamka NK představuje negativní kontrolu.

Podle Guinco a jeho týmu jsou alely související s PAS  $\epsilon 4$  a  $\epsilon 2$ . Na Obr. 10 můžeme vidět zastoupení jednotlivých isoform u evropské populace (Ensembl).

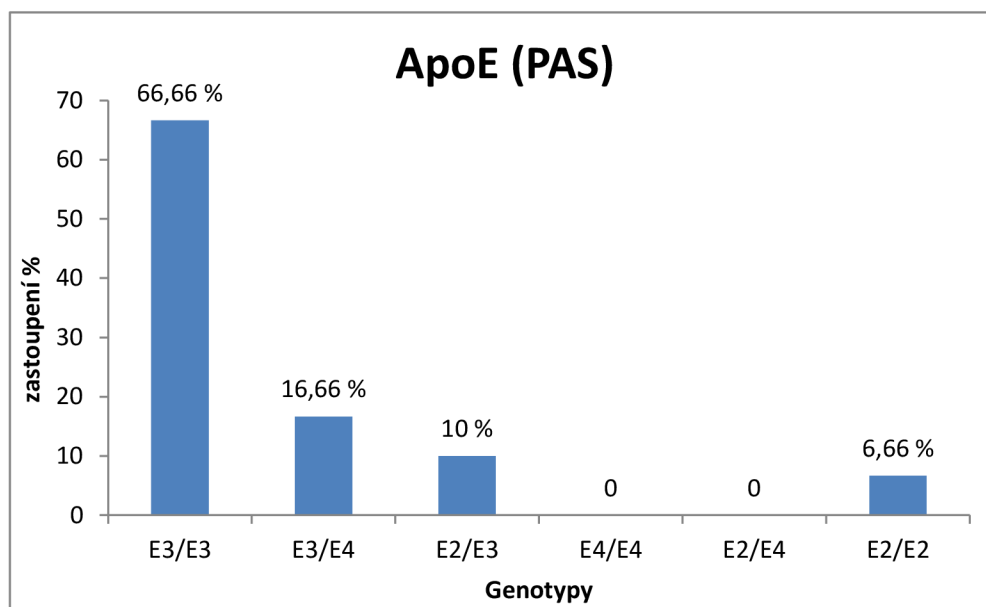


Obr. 10: Grafické znázornění zastoupení genotypů genu APOE u evropské populace (populační genetika z Ensembl)

Obr. 10 nám ukazuje, že nejčastěji bývá v populaci zastoupena varianta E3/E3, čili neriziková forma. Mírné riziko je zastoupeno ve 35 %. Největší riziko má pouze 2,6 % populace. V Tabulce č. 17 můžeme vidět výsledky genotypizace u APOE u vybraných pacientů.

**Tabulka č. 17:** Přehled genotypizace u APOE u PAS

genotyp	zastoupení
E3/E3	20 (66,66%)
E3/E4	5 (16,66%)
E2/E3	3 (10%)
E4/E4	0
E2/E4	0
E2/E2	2 (6,66%)

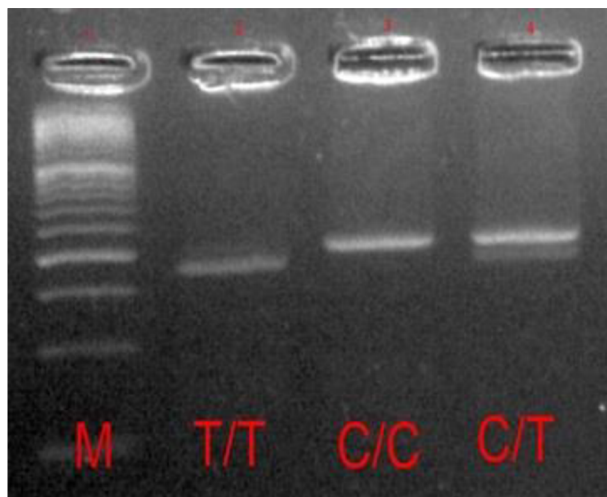


Obr. 11: Grafické znázornění zastoupení (v %) genotypů genu APOE u autistických pacientů

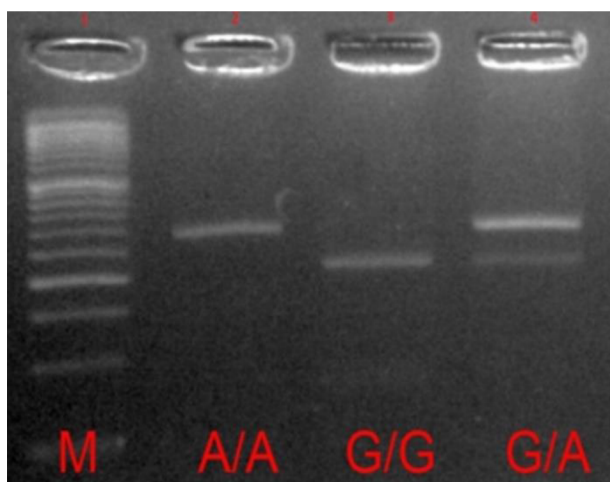
V souboru autistických pacientů má v největší zastoupení neriziková forma E3/E3 (67 %). Méně rizikové formy se vyskytují ve 33 % pacientů.

## 4.2 Laktózová intolerance

PCR produkty jsou vizualizovány na 4% agarózovém gelu. Výsledkem amplifikační reakce je PCR produkt o velikosti 201 bp pro polymorfismus C/T 13910 a PCR produkt o velikosti 271 bp pro polymorfismus G/A 22018. Možné výsledky restričního štěpení pro oba polymorfismy můžeme vidět na obrázcích 12 a 13.

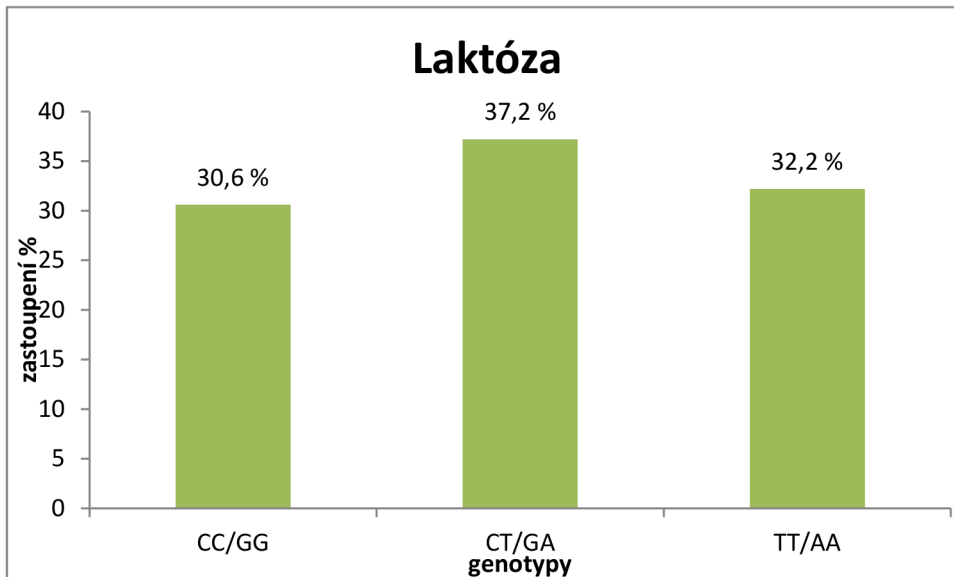


Obr. 12: Příklad výsledku restričního štěpení na 4% agarózovém gelu. V první jamce se nachází hmotnostní marker. Následuje PCR produkt o velikosti 177 bp a 24 bp, který odpovídá genotypu T/T. Ve třetí jamce je produkt o velikosti 201 bp, který odpovídá genotypu C/C. V poslední jamce je PCR produkt o velikosti 201 bp, 177 bp a 24 bp, který odpovídá genotypu C/T. Proužek velikosti 24 bp je špatně viditelný.



Obr. 13: Příklad výsledku restričního štěpení na 4% agarózovém gelu. V první jamce se nachází hmotnostní marker. Následuje PCR produkt o velikosti 271 bp, který odpovídá genotypu A/A. Ve třetí jamce je produkt o velikosti 196 bp a 75 bp, který odpovídá genotypu G/G. V poslední jamce je PCR produkt o velikosti 271 bp, 196 bp a 75 bp, který odpovídá genotypu G/A. Proužek velikosti 75 bp je špatně viditelný.

V genu MCM6 byl prokázán výskyt polymorfismu 13910 C/T a 22018 G/A, související s intolerancí laktózy. Jsou tři možné výsledky genetického testu. Genotyp CC/GG je typický pro intoleranci laktózy neboli neschopnost trávit laktózu. Jedinci s genotypem CT/GA mají vrozenou jen částečnou intoleranci laktózy. Jedinci schopní trávit laktózu mají genotyp TT/AA.

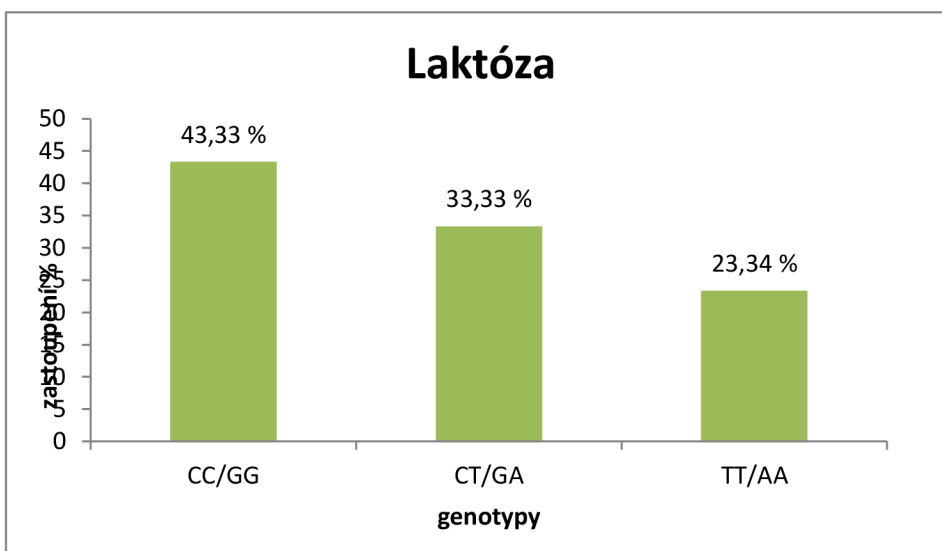


Obr. 14: Grafické zobrazení zastoupení polymorfismu C/T-13910 a G/A 22018 u evropské populace (populační genetika z Ensembl).

Heterozygotní genotyp CT/GA se vyskytuje u 37,2 % evropské populace. U 30,6 % se pak objevuje wild type genotyp CC/GG a u 32,2 % homozygotní genotyp TT/AA, který je spojován s celoživotní laktózovou perzistencí. Poměry zastoupení genotypů laktózové intolerance u PAS pacientů můžeme vidět v Tabulce č. 18.

**Tabulka č. 18:** Zastoupení jednotlivých genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí u PAS pacientů

genotypy	zastoupení
CC/GG	13 (43,33%)
CT/GA	10 (33,33%)
TT/AA	7 (23,34%)

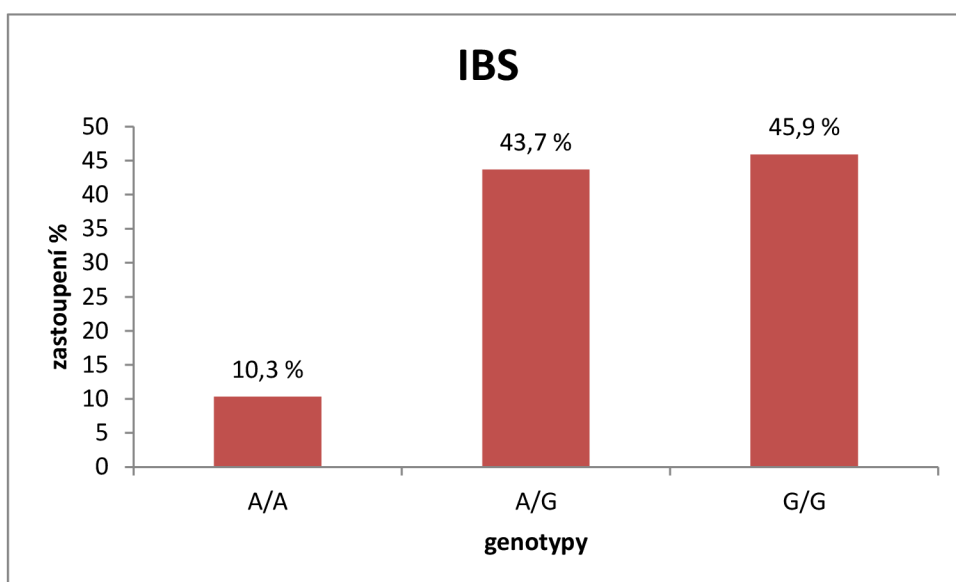


Obr. 15: Grafické zobrazení zastoupení polymorfismu C/T-13910 a G/A22018 u PAS pacientů

Na tomto grafu můžeme jasně vidět, že klesl počet tolerantních lidí o 9% a naopak počet plně intolerantních vzrostl o 13%. Pacienti s PAS mají problém s trávením laktózy mnohem častěji, než je uváděno pro evropskou populaci.

### 4.3. IBS

U onemocnění dráždivého tračníku vyšetřuje polymorfismus v genu TNF SF15 A/G (rs 4263839). Alela G je zodpovědná za nežádoucí imunitní odpověď spojenou s rizikem IBS. Přítomnost genotypu AA nezpůsobuje žádné nežádoucí reakce. Možné riziko IBS je spojené s genotypem AG a genotypem GG.

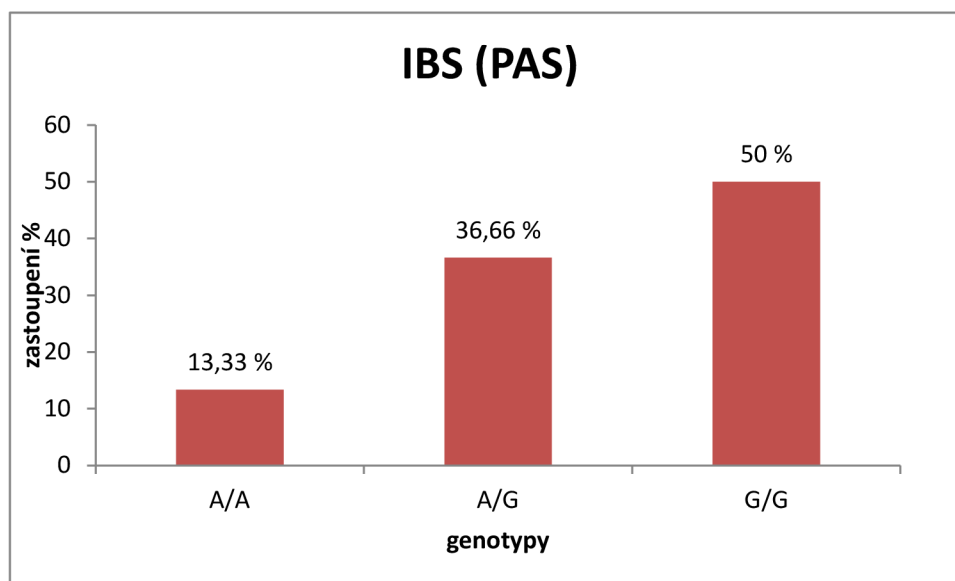


Obr. 16: Grafické znázornění zastoupení genotypů pro rozvoj syndromu dráždivého tračníku (rs4263839 A/G) u evropské populace (populační genetika z Ensembl)

Z grafu na Obr. 16 je patrné poměrně vysoké riziko onemocnění IBS v evropské populaci (46 %). Nižší riziko vzniku a heterozygotní genotyp GA je zastoupen u 44 % populace. Pouze 10 % populace má velmi malé riziko onemocnění IBS. Četnost výskytu genotypů IBS u PAS pacientů najdeme v Tabulce č. 19.

**Tabulka č. 19:** Zastoupení genotypů spojených s rizikem vzniku IBS u pacientů s PAS.

genotypy	zastoupení
A/A	4 (13,33%)
A/G	11 (36,66%)
G/G	15 (50%)

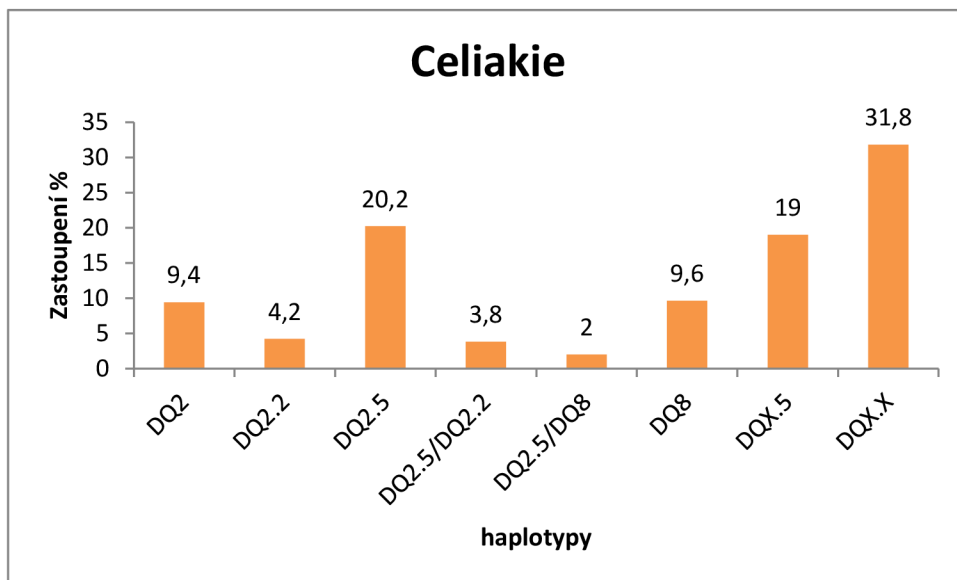


Obr. 17: Grafické znázornění zastoupení genotypů pro rozvoj syndromu dráždivého tračníku rs4263839 A/G u PAS pacientů.

V testovaném souboru je vyšší počet pacientů s rizikem pro IBS (50%), počet heterozygotních genotypů G/A klesl na 37% a nerizikový genotyp A/A naopak vzrostl o 5%.

## 4.4 Celiakie

Rizikovými haplotypy u celiakie jsou HLA-DQ2 a HLA-DQ8. U evropské populace s diagnostikovanou celiakií se vyskytují v procentuálním zastoupení HLADQ2 u 95% a HLADQ8 u 8%. Za velmi vysoké riziko celiakie zodpovídá haplotyp DQ2.5/DQ8, za vysoké riziko haplotypy DQ2.5 a DQ8. S nízkým rizikem je spojován haplotyp DQ2.2 a DQX.5. Genotyp DQX.X není považován za rizikový.



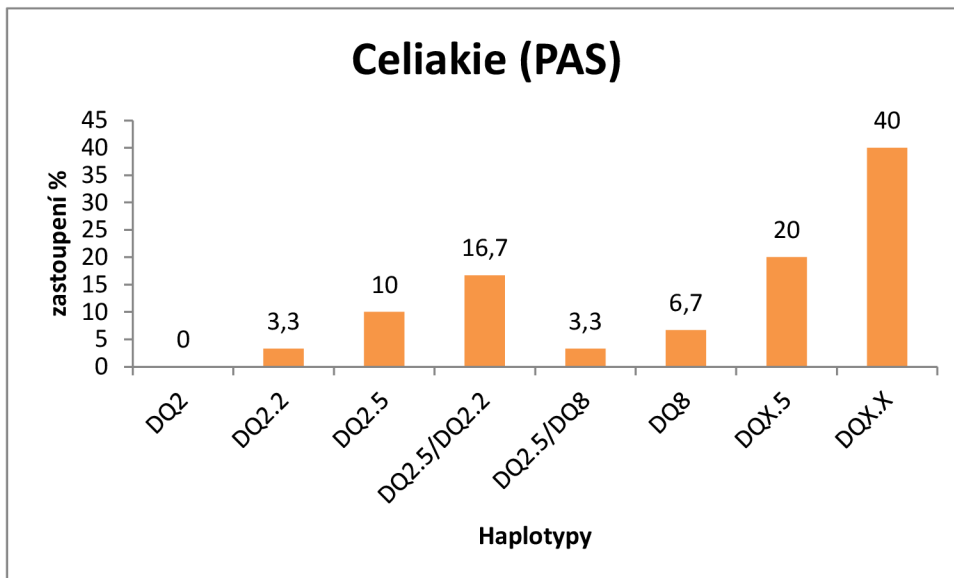
Obr. 18: Grafické znázornění haplotypů asociovaných s celiakií u nediodagnostikované populace (537 vzorků laboratoře GENLABS).

Nediodagnostikovaná populace podle obrázku 17 má riziko vzniku celiakie v polovině případů. Velmi vysoké riziko pro celiakii mají 2% populace a další rizikové haplotypy asociované s mírným až vysokým rizikem celiakie jsou přítomny téměř u 70% populace. Zastoupení jednotlivých haplotypů asociovaných s celiakií u PAS pacientů je uvedeno v Tabulce č. 19.

**Tabulka č. 19:** Přehled zastoupených haplotypů asociovaných s celiakií u PAS

haplotyp	zastoupení
DQ2	0
DQ2.2	1 (3,33%)
DQ2.5	3 (10%)
DQ2.5/DQ2.2	5 (16,7%)
DQ2.5/DQ8	1 (3,3%)
DQ8	2 (6,7%)
DQX.5	6 (20%)
DQX.X	12 (40%)





Obr. 19: Grafické znázornění haplotypů asociovaných s celiakií u PAS

Obrázek 19 ukazuje zastoupení jednotlivých haplotypů asociovaných s celiakií u autistických pacientů. Celkem 40 % autistů je na základě výsledků genetického testu bez rizika celiakie. Možné riziko pro vznik celiakie se vyskytuje u 60 % pacientů s PAS. Velmi vysoké riziko mají pouze 3% pacientů.

## 5 DISKUSE

Porucha autistického spektra patří mezi neurovývojové poruchy ovlivňující sociální komunikaci a interakci a je spojena s opakujícím se chováním. PAS neboli také pervazivní vývojovou poruchu rozdělujeme do pěti podtypů: Aspergerův syndrom, autistická porucha, Rettův syndrom, nespecifikovaná pervazivní porucha a dětská dezintegrační porucha. Nástroj, který ulehčuje diagnostiku PAS, se nazývá diagnostický a statistický manuál duševních poruch (DSM). Další možnosti diagnostiky jsou hodnotící škály, mezi které patří ADI-R, CARS a ADOS. Nejčastější diagnózou u testovaných PAS pacientů byl dětský autismus a ADHD, dále pak poškození po vakcinaci (MMR, HEXA).

GI symptomy se u dětí s PAS běžně vyskytují a způsobují jim značné problémy. Přesné souvislosti mezi GI a autismem nejsou bohužel dosud známy, avšak existuje mnoho hypotéz. Jedna z nich je spojována s mikrobiomem. Děti s PAS vykazují změny ve složení střevní mikroflóry. Mohou mít ve střevě například zvýšené množství kvasinek *Canida*, které uvolňují větší množství toxinů (Li et al., 2020). Prevalence GI symptomů u pacientů s PAS se pohybuje mezi 23-70 %. Toto velké rozpětí GI problémů může být způsobeno různým počtem sledovaných symptomů, různou definicí příznaků, nedostatky v metodologii nebo věkem či dalšími kritérii (Chaidez et al., 2014). Mezi GI symptomy patří bolest střev, zácpa a průjem (Adam et al., 2006), které také odpovídají klasickým projevům spojeným s potravinovou alergií či intolerancí. (Assa'ad et al., 2006). Potravinová intolerance se vyznačuje abnormální reakcí na některou potravinu (Craig, 2018). Tyto reakce mohou způsobovat toxicitu v organismu a vést až k zánětlivému procesu v mozku.

V rámci své bakalářské práce jsem se věnovala genu APOE, laktóзовé intoleranci, IBS a celiakii. Vybrané genotypy jsem hodnotila u 30 autistických pacientů.

Celiakie je imunitně zprostředkované onemocnění střev způsobené lepkem u pacientů s genetickou predispozicí (Ludvigsson et al., 2012). Celiakie je spojena s haplotypy lidského leukocytárního antigenu třídy II podílející se na imunitní odpovědi. S velkým rizikem vzniku CD jsou spojeny především haplotypy DQ2 a DQ8 (Kneepkens et al., 2012). Nedostatečné trávení lepku vede ke zvýšené produkci glutenových protilátek a již existuje mnoho hypotéz, které se zaměřují na jeho negativní vliv na CNS. Například nestrávený lepek může negativně ovlivnit mozeček, který má na starosti motoriku, koordinaci pohybů atd. Hodnocení 537 jedinců pro riziko celiakie prokázalo, že 70 % neautistické populace nese alespoň nějaké

riziko vzniku celiakie. Velmi vysoké riziko (DQ2.5/DQ8) pak měli pouze dvě procenta jedinců.

Predispozice pro celiakii byly zjištěny pomocí metody real-time PCR uvedené v metodice. Vyhodnocení výsledků pacientů s PAS pro riziko celiakie přineslo následující výsledky: 60 % autistů má alespoň nějaké riziko vzniku celiakie. Nejvyšší riziko bylo nalezeno u 3 % PAS pacientů. Z těchto výsledků jasně vyplývá, že vrozené riziko celiakie se u normální populace a autistických pacientů významně neliší, u autistů je dokonce nižší. Možným vysvětlením by mohl být velký rozdíl v počtu pacientů PAS (30) a kontrol bez PAS (537). Tento nepoměr mohl ovlivnit výsledky.

Laktózovou intoleranci můžeme označovat jako syndrom se střevními příznaky vyvolanými konzumací potravin obsahující laktózu, zapříčiněný nedostatečnou aktivitou laktázy v tenkém střevě (Berni et al., 2016). S hypolaktázií dospělého typu je spojen zejména polymorfismus v genu *MCM6* 13910C/T (rs4988235) a 22018 (rs182549). Jedinci s genotypem CC/GG neumí trávit laktózu, aktivita laktázy přirozeně klesá a objevují se symptomy jako plynatost, průjem a bolesti břicha (Enattah et al., 2002). Heterozygotní genotyp CT/GA je spojen s částečnou intolerancí laktózy, která se ve většině případů neprojeví, jelikož k 50 % aktivitě laktázy a tedy dostatečnému trávení laktózy stačí přítomnost pouze jedné alely T. U PAS pacientů byl pozorován problém s trávením disacharidázy, který může vznikat po zánětu střev či jako vrozená predispozice. Populační genetika z Ensembl (Cunningham et al, 2022), kterou jsem v rámci výsledků též zpracovala do své práce, ukázala, že částečnou nebo úplnou neschopností trávit laktózu trpí 68 % evropské populace. Kolem 30 % pak trpí úplnou intolerancí laktózy, kterou nedokáže štěpit. Genetický test pro laktózovou intoleranci byl proveden pomocí metody PCR-RFLP. U 77 % autistů byla prokázána intolerance laktózy, přičemž úplná intolerance se vyskytovala u 43,3 %. I přes malý testovaný soubor, je patrné, že autisté trpí neschopností trávit laktózu více, než je běžné v normální populaci. Z tohoto důvodu by mezi laktózovou intolerancí a autismem mohla existovat nějaká souvislost.

Syndrom dráždivého tračníku patří mezi nejrozšířenější chronické gastrointestinální onemocnění (Chey et al., 2015), vyvolané konzumací tzv. FODMAP sacharidů. Jedná se o vysoce fermentované oligo-, di-, monosacharidy a polyoly. Příkladem je fruktóza, laktóza, cukerné alkoholy, fruktany a galaktany (Bellini et al., 2020). Mnoho studií ukazuje na spojení mozku a střeva. V souvislosti s tím byly u IBS pacientů pozorovány změny v části

mozku, které souvisí s emocemi. S IBS je spojený polymorfismus TNF SF 15 G/A (rs4263839) a riziko IBS je asociované s alelou G. V normální populaci se toto riziko vyskytuje u 90 % jedinců. Vyšetření polymorfismu rs423839 asociovaného s IBS bylo provedeno metodou real-time PCR. Rizikové genotypy byly v testovaném souboru nalezeny u 87 % pacientů. Genotyp GG asociovaný s rizikem IBS se vyskytoval v 50 %. Procentuální zastoupení u pacientů s PAS a v normální populaci se příliš neliší,

Apolipoprotein E (APOE) funguje jako hlavní přenašeč cholesterolu v mozku, který ovlivňuje růst neuronů, synaptogenezi a vznik neurozánětu. Je součástí lipoproteinů VLDL a HDL. Alely asociované s autismem jsou  $\epsilon 4$  a  $\epsilon 2$ . V normální neautistické populaci se vyskytuje 25 % jedinců s možným rizikem a jen 3 % s vysokým rizikem pro PAS. Pacienti s PAS byli otestováni pomocí metody PCR ARMS. Rizikové alely APOE byly u pacientů s PAS detekovány v 17 % případů a rizikovou isoformu E4/E4 nenesl ani jeden z nich. Výskyt rizikových alel nebyl v testované skupině autistů nijak vyšší než v normální populaci.

I přes neprůkaznost zpracovaných výsledků, která může být ovlivněna malým souborem pacientů, je diagnostika gastrointestinálních poruch u PAS pacientů velice žádoucí. Včasná diagnostika a nasazení správné diety může autistům nejen ulevit od GI problémů, ale i autistických symptomů (např. agrese). Nejčastěji používanou dietou bývá GFCF dieta, tedy eliminace lepku a kaseinu. Porucha trávení těchto složek způsobuje vznik toxického gliadinomorfínu a kazomorfínu a jejich vysoká hladina působí toxicky na nervový systém. V souvislosti s autismem je nejvíce popisována celiakie. Další vhodnou dietou může být FODMAP dieta. Vhodné stravovací návyky a eliminační diety by měly být u autistů zavedeny v co nejnižším věku, kdy organismus není na lepek a kaseinu tolik závislý a je možné stravu snadno změnit. Po nasazení některé z diet se může zdát, že se projevy autismu zvýšily (dochází totiž k abstinčním příznakům, které po nějaké době odezní a situaci se výrazně zlepší). Ke špatným stravovacím návykům u PAS může přispívat porucha funkce motoriky. Špatná komunikační schopnost zase zhoršuje možnosti diagnostiky.

## 6 ZÁVĚR

V rámci teoretické části bakalářské práce byly shrnuty současné poznatky o Poruchách autistického spektra a vybraných potravinových intolerancích. Uvedena je zde zejména základní charakteristika, typy a diagnostika PAS, poznatky o spojení gastrointestinálních problému s autismem a informace o vybraných potravinových intolerancích (IBS, APOE, celiakie, laktózová intolerance).

V současné době je stále jasnější, že GI problémy jsou u pacientů s PAS zcela běžné. V mnoha případech ovšem nejsou správně diagnostikovány, díky nedostatečné komunikaci s postiženými PAS pacienty. Při diagnostice je třeba nasadit diety, které jsou u autistů problémové, vzhledem k jejich averzi k jídlu. Pokud se povede u autistů nasadit dietu, například bezlepkovou, dochází k výraznému zlepšení jak GI problémů, tak i autistických symptomů.

Hlavním cílem experimentální části bylo praktické zvládnutí laboratorních metod vedoucích ke zjištění genových variant asociovaných s rozvojem laktózové intolerance, celiakie, IBS a izotypů genu APOE. Použitými metodami byly PCR ARMS (APOE), PCR RFLP (laktózová intolerance) a real-time PCR (IBS a celiakie).

Experimentální část probíhala v laboratoři GENLABS v Českých Budějovicích. Vyšetřovanými polymorfismy byly pro IBS rs 4263839 A/G v genu TNF SF15, pro laktózovou intoleranci C/T 13910 a G/A 22018 v genu MCM6, rizikové haplotypy HLA DQ2.5, HLA DQ2.2, HLA DQ8, HLA DQX.5 a HLA DQX.x pro celiakii a isotypy genu APOE: ApoE3, ApoE4 a ApoE2. Následovalo vyhodnocení výsledků a zpracování získaných dat, která nám ukázala zastoupení jednotlivých genotypů u pacientů s PAS.

## 7 SEZNAM LITERATURY

ADAM, Ana C., Marta RUBIO-TEXEIRA a Julio POLAINA. Lactose: The Milk Sugar from a Biotechnological Perspective. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2005, **44**(7-8), 553-557 [cit. 2023-03-14]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408690490931411

ADAMS, J. B., C. E. HOLLOWAY, F. GEORGE a D. QUIG. Analyses of Toxic Metals and Essential Minerals in the Hair of Arizona Children with Autism and Associated Conditions, and Their Mothers. *Biological Trace Element Research* [online]. 2006, **110**(3), 193-210 [cit. 2023-04-07]. ISSN 0163-4984. Dostupné z: doi:10.1385/BTER:110:3:193

AL-DEWIK, Nader Izzeddin. Risk factors diagnosis prognosis and treatment of autism. *Frontiers in Bioscience* [online]. 2020, **25**(9), 1682-1717 [cit. 2023-03-03]. ISSN 10939946. Dostupné z: doi:10.2741/4873

ALJADA, Bara, Ahmed ZOHNI a Wael EL-MATARY. The Gluten-Free Diet for Celiac Disease and Beyond. *Nutrients* [online]. 2021, **13**(11) [cit. 2023-03-10]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13113993

AL-ZALABANI, Abdulmohsen H., Amani H. AL-JABREE a Zeidan A. ZEIDAN. Is cesarean section delivery associated with autism spectrum disorder?. *Neurosciences* [online]. 2020, **24**(1), 11-15 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1658-3183. Dostupné z: doi:10.17712/nsj.2019.1.20180303

AMIRI, Mahdi, Lena DIEKMANN, Maren VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE a Hassan NAIM. The Diverse Forms of Lactose Intolerance and the Putative Linkage to Several Cancers. *Nutrients* [online]. 2015, **7**(9), 7209-7230 [cit. 2023-03-16]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu7095332

ASSA'AD, Amal H. Gastrointestinal Food Allergy and Intolerance. *Pediatric Annals* [online]. 2006, **35**(10), 718-726 [cit. 2023-04-07]. ISSN 0090-4481. Dostupné z: doi:10.3928/0090-4481-20061001-07

ASPERGER, Hans. Die „Autistischen psychopathen“ im Kindesalter. *Archiv für psychiatrie und nervenkrankheiten*, 1944, 117.1: 76-136.

ATTWOOD, Tony. *Aspergerův syndrom: porucha sociálních vztahů a komunikace*. Praha: Portál, 2005. Speciální pedagogika (Portál). ISBN 80-7178-979-8.

BELLINI, Massimo, Sara TONARELLI, Attila NAGY, et al. Low FODMAP Diet: Evidence, Doubts, and Hopes. *Nutrients* [online]. 2020, **12**(1) [cit. 2023-04-07]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu12010148

BERNI CANANI, Roberto, Vincenza PEZZELLA, Antonio AMOROSO, Tommaso COZZOLINO, Carmen DI SCALA a Annalisa PASSARIELLO. Diagnosing and Treating Intolerance to Carbohydrates in Children. *Nutrients* [online]. 2016, **8**(3) [cit. 2023-04-07]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu8030157

BIESIEKERSKI, Jessica R. What is gluten?. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2017, **32**, 78-81 [cit. 2023-03-07]. ISSN 08159319. Dostupné z: doi:10.1111/jgh.13703

BUTTERFIELD, D. Allan a Mark P. MATTSON. Apolipoprotein E and oxidative stress in brain with relevance to Alzheimer's disease. *Neurobiology of Disease* [online]. 2020, **138** [cit. 2023-03-30]. ISSN 09699961. Dostupné z: doi:10.1016/j.nbd.2020.104795

CABANILLAS, Beatriz. Gluten-related disorders: Celiac disease, wheat allergy, and nonceliac gluten sensitivity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 2020, **60**(15), 2606-2621 [cit. 2023-03-07]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2019.1651689

CABRERA-CHÁVEZ, Francisco, Gimena DEZAR, Anna ISLAS-ZAMORANO, Jesús ESPINOZA-ALDERETE, Marcela VERGARA-JIMÉNEZ, Dalia MAGAÑA-ORDORICA a Noé ONTIVEROS. Prevalence of Self-Reported Gluten Sensitivity and Adherence to a Gluten-Free Diet in Argentinian Adult Population. *Nutrients* [online]. 2017, **9**(1) [cit. 2023-04-05]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu9010081

CATANZARO, Roberto, Morena SCIUTO a Francesco MAROTTA. Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Nutrition Research* [online]. 2021, **89**, 23-34 [cit. 2023-03-16]. ISSN 02715317. Dostupné z: doi:10.1016/j.nutres.2021.02.003

CATASSI, Carlo, Elena F VERDU, Julio Cesar BAI a Elena LIONETTI. Coeliac disease. *The Lancet* [online]. 2022, **399**(10344), 2413-2426 [cit. 2023-03-07]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(22)00794-2

CHEY, William D., Jacob KURLANDER a Shanti ESWARAN. Irritable Bowel Syndrome. *JAMA* [online]. 2015, **313**(9) [cit. 2023-04-07]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2015.0954

COELHO, M., LUISELLI, D., BERTORELLE, G., LOPES, A. I., SEIXAS, S., DESTROBISOL, G., ROCHA, J., 2005. Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Human Genetics*. 117(4), 329-339. DOI: 10.1007/s00439-005-1322-z

CRAIG, J. M. Food intolerance in dogs and cats. *Journal of Small Animal Practice* [online]. 2018 [cit. 2023-04-07]. ISSN 0022-4510. Dostupné z: doi:10.1111/jsap.12959

CROALL, Iain D., Nigel HOGGARD a Marios HADJIVASSILIOU. Gluten and Autism Spectrum Disorder. *Nutrients* [online]. 2021, **13**(2) [cit. 2023-03-10]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu13020572

CUNNINGHAM, Fiona, James E ALLEN, Jamie ALLEN, et al. Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research* [online]. 2022, **50**(D1), D988-D995 [cit. 2023-04-13]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkab1049

DENG, Yanyong, Benjamin MISSELWITZ, Ning DAI a Mark FOX. Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients* [online]. 2015, **7**(9), 8020-8035 [cit. 2023-03-14]. ISSN 2072-6643. Dostupné z: doi:10.3390/nu7095380

DICKS, Leon M. T., Diron HURN a Demi HERMANUS. Gut Bacteria and Neuropsychiatric Disorders. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(12) [cit. 2023-03-30]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9122583

DIEKMANN, Lena, Katrin PFEIFFER a Hassan Y NAIM. Congenital lactose intolerance is triggered by severe mutations on both alleles of the lactase gene. *BMC Gastroenterology* [online]. 2015, **15**(1) [cit. 2023-03-16]. ISSN 1471-230X. Dostupné z: doi:10.1186/s12876-015-0261-y



EL-SALHY, Magdy. Diet and effects of diet management on quality of life and symptoms in patients with irritable bowel syndrome. *Molecular Medicine Reports* [online]. 2012 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1791-2997. Dostupné z: doi:10.3892/mmr.2012.843

ENATTAH, Nabil Sabri, Timo SAHI, Erkki SAVILAHTI, Joseph D. TERWILLIGER, Leena PELTONEN a Irma JÄRVELÄ. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature Genetics* [online]. 2002, **30**(2), 233-237 [cit. 2023-04-07]. ISSN 1061-4036. Dostupné z: doi:10.1038/ng826

ESPINO, Laura a Concepción NÚÑEZ. The HLA complex and coeliac disease. In: *Immunopathology of Celiac Disease* [online]. Elsevier, 2021, 2021, s. 47-83 [cit. 2023-03-08]. International Review of Cell and Molecular Biology. ISBN 9780323853118. Dostupné z: doi:10.1016/bs.ircmb.2020.09.009

FINEGOLD, Sydney M. Therapy and epidemiology of autism–clostridial spores as key elements. *Medical Hypotheses* [online]. 2008, **70**(3), 508-511 [cit. 2023-03-30]. ISSN 03069877. Dostupné z: doi:10.1016/j.mehy.2007.07.019

FINEGOLD, Sydney M., Scot E. DOWD, Viktoria GONTCHAROVA, et al. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* [online]. 2010, **16**(4), 444-453 [cit. 2023-03-30]. ISSN 10759964. Dostupné z: doi:10.1016/j.anaerobe.2010.06.008

FOLMSBEE, Stephen Sai, Douglas R. WILCOX, Koen TYBERGHEIN, Pieter DE BLESER, Warren G. TOURTELLOTTE, Jolanda VAN HENGEL, Frans VAN ROY a Cara J. GOTTARDI. AT-catenin in restricted brain cell types and its potential connection to autism. *Journal of Molecular Psychiatry* [online]. 2016, **4**(1) [cit. 2023-04-04]. ISSN 2049-9256. Dostupné z: doi:10.1186/s40303-016-0017-9

GALLEGOS, Cara a Rachel MERKEL. Current Evidence in the Diagnosis and Treatment of Children With Celiac Disease. *Gastroenterology Nursing* [online]. 2019, **42**(1), 41-48 [cit. 2023-03-10]. ISSN 1042-895X. Dostupné z: doi:10.1097/SGA.0000000000000365

GEARRY, Richard, Paula SKIDMORE, Leigh O'BRIEN, Tim WILKINSON a Wathsala NANAYAKKARA. Efficacy of the low FODMAP diet for treating irritable bowel syndrome: the evidence to date. *Clinical and Experimental Gastroenterology* [online]. [cit. 2023-03-28]. ISSN 1178-7023. Dostupné z: doi:10.2147/CEG.S86798

GENOVESE, Ann a Merlin G. BUTLER. Clinical Assessment, Genetics, and Treatment Approaches in Autism Spectrum Disorder (ASD). *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(13) [cit. 2023-02-08]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21134726

GETZ, Godfrey S. a Catherine A. REARDON. Apoprotein E as a lipid transport and signaling protein in the blood, liver, and artery wall. *Journal of Lipid Research* [online]. 2009, **50**, S156-S161 [cit. 2023-03-28]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.R800058-JLRGLISSEN BROWN, Jeremy R. a Prashant SINGH. Coeliac disease. *Paediatrics and International Child Health* [online]. 2019, **39**(1), 23-31 [cit. 2023-03-08]. ISSN 2046-9047. Dostupné z: doi:10.1080/20469047.2018.1504431

GIUNCO, Carina Tatiana, Adriana B. DE OLIVEIRA, Andréa B. CARVALHO-SALLES, Dorotéia S.R. SOUZA, Ana Elizabete SILVA, Simone Secco DA ROCHA a Agnes C. FETT-CONTE. Association between APOE polymorphisms and predisposition for autism. *Psychiatric Genetics* [online]. 2009, **19**(6) [cit. 2023-04-03]. ISSN 0955-8829. Dostupné z: doi:10.1097/YPG.0b013e3283328e41

GOODWIN, Mary Stewart, T. Campbell GOODWIN a Murray A. COWEN. Malabsorption and cerebral dysfunction: A multivariate and comparative study of autistic children. *Journal of Autism and Childhood Schizophrenia* [online]. 1971, **1**(1), 48-62 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0021-9185. Dostupné z: doi:10.1007/BF01537742

GRENOV, Benedikte, André BRIEND, Per T. SANGILD, Thomas THYMANN, Maren H. RYTTER, Anne-Louise HOTHER, Christian MØLGAARD a Kim F. MICHAELSEN. Undernourished Children and Milk Lactose. *Food and Nutrition Bulletin* [online]. 2016, **37**(1), 85-99 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0379-5721. Dostupné z: doi:10.1177/0379572116629024

GU, Feng, Ved CHAUHAN a Abha CHAUHAN. Impaired synthesis and antioxidant defense of glutathione in the cerebellum of autistic subjects: Alterations in the activities and protein expression of glutathione-related enzymes. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2013, **65**, 488-496 [cit. 2023-03-10]. ISSN 08915849. Dostupné z: doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.021

HEYMAN, Melvin B. Lactose Intolerance in Infants, Children, and Adolescents. *Pediatrics* [online]. 2006, **118**(3), 1279-1286 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2006-1721

HODGES, Holly, Casey FEALKO a Neelkamal SOARES. Autism spectrum disorder: definition, epidemiology, causes, and clinical evaluation. *Translational Pediatrics* [online]. 2020, **9**(S1), S55-S65 [cit. 2023-02-07]. ISSN 22244336. Dostupné z: doi:10.21037/tp.2019.09.09

HOFFMANN-SOMMERGRUBER, et al. EAACI Food Allergy and Anaphylaxis Guidelines: diagnosis and management of food allergy. *Allergy* [online]. 2014, **69**(8), 1008-1025 [cit. 2023-02-21]. ISSN 01054538. Dostupné z: doi:10.1111/all.12429

HORT, Vladimír. *Dětská a adolescentní psychiatrie*. Vyd. 2. Praha: Portál, 2008. ISBN isbn978-80-7367-404-5.

HRDLIČKA, Michal a Vladimír KOMÁREK, ed. *Dětský autismus: přehled současných poznatků*. 2., dopl. vyd. Praha: Portál, 2014. ISBN 978-80-262-0686-6.

HRDLIČKA, Michal. *Mýty a fakta o autismu*. Praha: Portál, 2020. ISBN isbn978-80-262-1648-3.

HU, Zhenyu, Yong YANG, Yuanzhi ZHAO, et al. APOE hypermethylation is associated with autism spectrum disorder in a Chinese population. *Experimental and Therapeutic Medicine* [online]. 2018 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1792-0981. Dostupné z: doi:10.3892/etm.2018.6069

HUEBBE, Patricia a Gerald RIMBACH. Evolution of human apolipoprotein E (APOE) isoforms: Gene structure, protein function and interaction with dietary factors. *Ageing Research Reviews* [online]. 2017, **37**, 146-161 [cit. 2023-03-29]. ISSN 15681637. Dostupné z: doi:10.1016/j.arr.2017.06.002

CHAIDEZ, Virginia, Robin L. HANSEN a Irva HERTZ-PICCIOTTO. Gastrointestinal Problems in Children with Autism, Developmental Delays or Typical Development. *Journal of Autism and Developmental Disorders* [online]. 2014, **44**(5), 1117-1127 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0162-3257. Dostupné z: doi:10.1007/s10803-013-1973-x

IOANNOU, Maria S., Jesse JACKSON, Shu-Hsien SHEU, et al. Neuron-Astrocyte Metabolic Coupling Protects against Activity-Induced Fatty Acid Toxicity. *Cell* [online]. 2019, **177**(6), 1522-1535.e14 [cit. 2023-03-30]. ISSN 00928674. Dostupné z: doi:10.1016/j.cell.2019.04.001

JACOB, François a Jacques MONOD. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1961, **3**(3), 318-356 [cit. 2023-03-14]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/S0022-2836(61)80072-7

JOLANTA WASILEWSKA, Jolanta a Mark KLUKOWSKI. Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks – a possible new overlap syndrome. *Pediatric Health, Medicine and Therapeutics* [online]. [cit. 2023-03-31]. ISSN 1179-9927. Dostupné z: doi:10.2147/PHMT.S85717

JYONOUCHI, Harumi, Sining SUN a Hoa LE. Proinflammatory and regulatory cytokine production associated with innate and adaptive immune responses in children with autism spectrum disorders and developmental regression. *Journal of Neuroimmunology* [online]. 2001, **120**(1-2), 170-179 [cit. 2023-04-10]. ISSN 01655728. Dostupné z: doi:10.1016/S0165-5728(01)00421-0

KANNER, Leo a kol. Autistické poruchy afektivního kontaktu. *Nervózní dítě*, 1943, 2.3: 217-250.

KELLY, John R., Paul J. KENNEDY, John F. CRYAN, Timothy G. DINAN, Gerard CLARKE a Niall P. HYLAND. Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. 2015, **9** [cit. 2023-03-30]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2015.00392

KLEE, Werner A. a Claude B. KLEE. The role of  $\alpha$ -lactalbumin in lactose synthetase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [online]. 1970, **39**(5), 833-841 [cit. 2023-03-14]. ISSN 0006291X. Dostupné z: doi:10.1016/0006-291X(70)90398-0

KNEEPKENS, C. M. Frank a B. Mary E. VON BLOMBERG. Clinical practice. *European Journal of Pediatrics* [online]. 2012, **171**(7), 1011-1021 [cit. 2023-04-07]. ISSN 0340-6199. Dostupné z: doi:10.1007/s00431-012-1714-8

Klin A., Volkmar F.R., Sparrow S.S. Asperger syndrome. New York: Guilford Press, 2000: 489

KREWINKEL, Manuel, Maria GOSCH, Eva RENTSCHLER a Lutz FISCHER. Epilactose production by 2 cellobiose 2-epimerases in natural milk. *Journal of Dairy Science* [online]. 2014, **97**(1), 155-161 [cit. 2023-03-14]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2013-7389

KÖVES, K, M KAUSZ, D RESER a K HORVÁTH. What may be the anatomical basis that secretin can improve the mental functions in autism?. *Regulatory Peptides* [online]. 2002, **109**(1-3), 167-172 [cit. 2023-03-31]. ISSN 01670115. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-0115(02)00200-8

KUOKKANEN, M., M. MYLLYNIEMI, M. VAUHKONEN, et al. A biopsy-based quick test in the diagnosis of duodenal hypolactasia in upper gastrointestinal endoscopy. *Endoscopy* [online]. 2006, **38**(7), 708-712 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0013-726X. Dostupné z: doi:10.1055/s-2006-925354

KUOKKANEN, M. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* [online]. **52**(5), 647-652 [cit. 2023-03-14]. ISSN 00175749. Dostupné z: doi:10.1136/gut.52.5.647

KUSHAK, Rafail I., Gregory Y. LAUWERS, Harland S. WINTER a Timothy M. BUIE. Intestinal disaccharidase activity in patients with autism. *Autism* [online]. 2011, **15**(3), 285-294 [cit. 2023-03-30]. ISSN 1362-3613. Dostupné z: doi:10.1177/1362361310369142

KYLE, Stephanie M., Neeti VASHI a Monica J. JUSTICE. Rett syndrome: a neurological disorder with metabolic components. *Open Biology* [online]. 2018, **8**(2) [cit. 2023-03-02]. ISSN 2046-2441. Dostupné z: doi:10.1098/rsob.170216

LANFRANCO, Maria Fe, Christi Anne NG a G. William REBECK. ApoE Lipidation as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(17) [cit. 2023-04-07]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21176336

LASEKAN, John B., Joan JACOBS, Keith S. REISINGER, Michael B. MONTALTO, Mary P. FRANTZ a Mark M. BLATTER. Lactose-Free Milk Protein-Based Infant Formula: Impact on Growth and Gastrointestinal Tolerance in Infants. *Clinical Pediatrics* [online]. 2011, **50**(4), 330-337 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0009-9228. Dostupné z: doi:10.1177/0009922810390511

LEBWOHL, Benjamin, David S SANDERS a Peter H R GREEN. Coeliac disease. *The Lancet* [online]. 2018, **391**(10115), 70-81 [cit. 2023-03-10]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(17)31796-8

LEONARD, Maureen M., Anna SAPONE, Carlo CATASSI a Alessio FASANO. Celiac Disease and Nonceliac Gluten Sensitivity. *JAMA* [online]. 2017, **318**(7) [cit. 2023-04-05]. ISSN 0098-7484. Dostupné z: doi:10.1001/jama.2017.9730

LI, Qinrui, Ying HAN, Angel Belle C. DY a Randi J. HAGERMAN. The Gut Microbiota and Autism Spectrum Disorders. *Frontiers in Cellular Neuroscience* [online]. 2017, **11** [cit. 2023-03-29]. ISSN 1662-5102. Dostupné z: doi:10.3389/fncel.2017.00120

LI, Chunyan, Yang LIU, Hui FANG, Yu CHEN, Jiao WENG, Mengyao ZHAI, Ting XIAO a Xiaoyan KE. Study on Aberrant Eating Behaviors, Food Intolerance, and Stereotyped Behaviors in Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in Psychiatry* [online]. 2020, **11** [cit. 2023-04-07]. ISSN 1664-0640. Dostupné z: doi:10.3389/fpsyt.2020.493695

LINDNER, Karina, Katharina BECKENBAUER, Larissa C. VAN EK, et al. Isoform- and cell-state-specific lipidation of ApoE in astrocytes. *Cell Reports* [online]. 2022, **38**(9) [cit. 2023-03-30]. ISSN 22111247. Dostupné z: doi:10.1016/j.celrep.2022.110435

LOMER, M. C. E. Review article: the aetiology, diagnosis, mechanisms and clinical evidence for food intolerance. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2015, **41**(3), 262-275 [cit. 2023-04-10]. ISSN 02692813. Dostupné z: doi:10.1111/apt.13041

LONGO, Dan L., Alexander C. FORD, Brian E. LACY a Nicholas J. TALLEY. Irritable Bowel Syndrome. *New England Journal of Medicine* [online]. 2017, **376**(26), 2566-2578 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJMra1607547

LORD, Catherine, Mayada ELSABBAGH, Gillian BAIRD a Jeremy VEENSTRA-VANDERWEELE. Autism spectrum disorder. *The Lancet* [online]. 2018, **392**(10146), 508-520 [cit. 2023-02-08]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(18)31129-2

LUDVIGSSON, Jonas F, Daniel A LEFFLER, Julio C BAI, et al. The Oslo definitions for coeliac disease and related terms. *Gut* [online]. 2012, **62**(1), 43-52 [cit. 2023-04-07]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2011-301346

MAJOR, Giles, Sue PRITCHARD, Kathryn MURRAY, Jan Paul ALAPPADAN, Caroline L. HOAD, Luca MARCIANI, Penny GOWLAND a Robin SPILLER. Colon Hypersensitivity to Distension, Rather Than Excessive Gas Production, Produces Carbohydrate-Related Symptoms in Individuals With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* [online]. 2017, **152**(1), 124-133.e2 [cit. 2023-03-18]. ISSN 00165085. Dostupné z: doi:10.1053/j.gastro.2016.09.062

MATTAR, R.; MONTEIRO, M.; VILLARES, C. A.; DOS SANTOS, A. F.; CARRILHO, F. J. (2008): Single nucleotide polymorphism C/T(-13910), located upstream of the lactase gene, associated with adult-type hypolactasia: validation for clinical practice. *Clinical biochemistry*, 41(7-8), 628–630. doi:10.1016/j.clinbiochem.2008.01.006.

MCELHANON, Barbara O., Courtney MCCRACKEN, Saul KARPEN a William G. SHARP. Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder: A Meta-analysis. *Pediatrics* [online]. 2014, **133**(5), 872-883 [cit. 2023-03-31]. ISSN 0031-4005. Dostupné z: doi:10.1542/peds.2013-3995

MCPARTLAND, James a Fred R. VOLKMAR. Autism and related disorders. In: *Neurobiology of Psychiatric Disorders* [online]. Elsevier, 2012, 2012, s. 407-418 [cit. 2023-03-03]. Handbook of Clinical Neurology. ISBN 9780444520029. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-444-52002-9.00023-1

MEGIORNI, Francesca; PIZZUTI, Antonio. 2012, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of biomedical science*, 19.1: 1-5.

MISSELWITZ, Benjamin, Matthias BUTTER, Kristin VERBEKE a Mark R FOX. Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut* [online]. 2019, **68**(11), 2080-2091 [cit. 2023-03-16]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2019-318404

MURRAY, Kathryn, Victoria WILKINSON-SMITH, Caroline HOAD, et al. Differential Effects of FODMAPs (Fermentable Oligo-, Di-, Mono-Saccharides and Polyols) on Small and Large Intestinal Contents in Healthy Subjects Shown by MRI. *American Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, **109**(1), 110-119 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0002-9270. Dostupné z: doi:10.1038/ajg.2013.386

Naim HY. Molecular and cellular aspects and regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. [online]. 2001 [cit. 2023-03-14]. Dostupné z: [10,14670/HH-16,553](https://doi.org/10.14670/HH-16,553)

OCCHIPINTI, Kaitlin a James SMITH. Irritable Bowel Syndrome: A Review and Update. *Clinics in Colon and Rectal Surgery* [online]. 2012, **25**(01), 046-052 [cit. 2023-03-28]. ISSN 1531-0043. Dostupné z: doi:10.1055/s-0032-1301759

ONG, Derrick K, Shaylyn B MITCHELL, Jacqueline S BARRETT, et al. Manipulation of dietary short chain carbohydrates alters the pattern of gas production and genesis of symptoms in irritable bowel syndrome. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2010, **25**(8), 1366-1373 [cit. 2023-03-18]. ISSN 08159319. Dostupné z: doi:10.1111/j.1440-1746.2010.06370.x

PARENT, Carine, Irina POKHVISNEVA, H el ene GAUDREAU, Michael J. MEANEY a Patricia P. SILVEIRA. Association Between Repeated Episodes of Gastroenteritis and Mental Health Problems in Childhood and Adolescence. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* [online]. 2019, **58**(11), 1115-1123 [cit. 2023-03-30]. ISSN 08908567. Dostupné z: doi:10.1016/j.jaac.2019.01.007

PINTO-SANCHEZ, Maria Ines, Alexander C FORD, Christian A AVILA, Elena F VERDU, Stephen M COLLINS, David MORGAN, Paul MOAYYEDI a Premysl BERCIK. Anxiety and Depression Increase in a Stepwise Manner in Parallel With Multiple FGIDs and Symptom Severity and Frequency. *American Journal of Gastroenterology* [online]. 2015, **110**(7), 1038-1048 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0002-9270. Dostupné z: doi:10.1038/ajg.2015.128

PRUIMBOOM, Leo a Karin DE PUNDER. The opioid effects of gluten exorphins: asymptomatic celiac disease. *Journal of Health, Population and Nutrition* [online]. 2015, **33**(1) [cit. 2023-03-10]. ISSN 2072-1315. Dostupné z: doi:10.1186/s41043-015-0032-y



ROBAYO-TORRES, Claudia C. a Buford L. NICHOLS. Molecular Differentiation of Congenital Lactase Deficiency from Adult-Type Hypolactasia. *Nutrition Reviews* [online]. 2007, **65**(2), 95-98 [cit. 2023-03-16]. ISSN 00296643. Dostupné z: doi:10.1111/j.1753-4887.2007.tb00286.x

RUMESSEN, Jüri J a Eivind GUDMAND-HOYER. Fructans of chicory: intestinal transport and fermentation of different chain lengths and relation to fructose and sorbitol malabsorption. *The American Journal of Clinical Nutrition* [online]. 1998, **68**(2), 357-364 [cit. 2023-03-28]. ISSN 00029165. Dostupné z: doi:10.1093/ajcn/68.2.357

SAHA, Lekha. Irritable bowel syndrome: Pathogenesis, diagnosis, treatment, and evidence-based medicine. *World Journal of Gastroenterology* [online]. 2014, **20**(22) [cit. 2023-03-28]. ISSN 1007-9327. Dostupné z: doi:10.3748/wjg.v20.i22.6759

SHARMA, Samata R., Xenia GONDA a Frank I. TARAZI. Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2018, **190**, 91-104 [cit. 2023-02-07]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2018.05.007

SONG, Yuli, Chengxu LIU a Sydney M. FINEGOLD. Real-Time PCR Quantitation of Clostridia in Feces of Autistic Children. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2004, **70**(11), 6459-6465 [cit. 2023-03-30]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004

THOROVÁ, Kateřina. Poruchy autistického spektra. 1. Praha: Portál, 2006. ISBN 80-7367-091-7

TOMCZONEK-MORUŚ, J, A WOJTASIK, K ZEMAN, B SMOLARZ a L BAŁ-ROMANISZYN. 13910C>T and 22018G>A LCT gene polymorphisms in diagnosing hypolactasia in children. *United European Gastroenterology Journal* [online]. 2019, **7**(2), 210-216 [cit. 2023-03-16]. ISSN 2050-6406. Dostupné z: doi:10.1177/2050640618814136

TUCK, Caroline a Jacqueline BARRETT. Re-challenging FODMAPs: the low FODMAP diet phase two. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* [online]. 2017, **32**, 11-15 [cit. 2023-03-18]. ISSN 08159319. Dostupné z: doi:10.1111/jgh.13687

WOODBURY-SMITH, Marc R. a Fred R. VOLKMAR. Asperger syndrome. *European Child & Adolescent Psychiatry* [online]. 2009, **18**(1), 2-11 [cit. 2023-02-28]. ISSN 1018-8827. Dostupné z: doi:10.1007/s00787-008-0701-0

YAO, C. K., H.-L. TAN, D. R. VAN LANGENBERG, J. S. BARRETT, R. ROSE, K. LIELS, P. R. GIBSON a J. G. MUIR. Dietary sorbitol and mannitol: food content and distinct absorption patterns between healthy individuals and patients with irritable bowel syndrome. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* [online]. 2014, **27**, 263-275 [cit. 2023-03-28]. ISSN 09523871. Dostupné z: doi:10.1111/jhn.12144

ZENDE, P. D., 2013. Apolipoprotein E Gene Polymorphism And Its Effect On Plasma Lipids In Arteriosclerosis. *Journal of clinical and diagnostic research* [online]. [cit. 2020-03-30]. DOI: 10.7860/JCDR/2013/6195.3455. ISSN 2249782X

ZUCHELLI, M., M. CAMILLERI, A. NIXON ANDREASSON, et al. Association of TNFSF15 polymorphism with irritable bowel syndrome. *Gut* [online]. 2011, **60**(12), 1671-1677 [cit. 2023-03-28]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gut.2011.241877

## SEZNAM OBRÁZKŮ

LOMER M. C. E., PARKES G. C., SANDERSON J. D. (2008): Review article: lactose intolerance in clinical practise - myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther*, 27, 93- 103. ISSN: 1365-2036.


PENKA, Miroslav a Eva SLAVÍČKOVÁ, 2012. Hematologie a transfuzní lékařství. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-3460-6.

RETAMA, 2008. Princip RFLP. [online]. Dostupné z WWW: [https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymorfismus\\_d%C3%A9lky\\_restrik%C4%8Dn%C3%ADch\\_fragment%C5%AF#/media/File:RFLP\\_mapping.svg](https://cs.wikipedia.org/wiki/Polymorfismus_d%C3%A9lky_restrik%C4%8Dn%C3%ADch_fragment%C5%AF#/media/File:RFLP_mapping.svg)

ZIMA, Tomáš, 2007. Laboratorní diagnostika. Druhé, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-372-3

# 8 PŘÍLOHY

## Příloha 1: souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením

	GENLABS s.r.o. Lipová 1789/9 370 05 České Budějovice 2	SOUHLAS S GENETICKÝM LABORATORNÍM VYŠETŘENÍM Číslo stránky: 1 Počet stránek: 2 Vypracoval: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.
	Molekulárně genetická laboratoř Odbornost 816	

### Souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením

Jméno a příjmení vyšetřované/ho:.....

Rodné číslo:.....

Jméno a příjmení zákonného zástupce:.....

Vztah k vyšetřované osobě:.....

#### A. Účel genetického laboratorního vyšetření

- Ověření/potvrzení diagnózy nemoci a/nebo vývojové vady:.....
- Zjištění predispozice pro nemoc a/nebo vývojovou vadu:.....
- Zjištění přenašečství pro nemoc a/nebo vývojovou vadu:.....
- K optimalizaci léčby:.....

#### Alternativy navrhovaného genetického vyšetření (jejich vhodnost, přínos a rizika):

.....

#### B. PROHLÁŠENÍ VYŠETŘOVANÉ OSOBY

**B. 1. Za výše uvedeným účelem souhlasím s odběrem dále uvedeného vzorku z mého těla a s provedením těchto vyšetření:**

##### Cytogenetická vyšetření:

- Karyotyp (analýza chromosomů)
- Jiné.....

##### Molekulárně genetická vyšetření:

- Vyšetření pro chorobu:.....
- Jiné.....

##### Jiná vyšetření:

- .....

##### Ze vzorku:

- Žilní krev     sliny     tkáň: kůže, sval
- Jiné.....

##### B. 2. Souhlas vyšetřované osoby/zákonného zástupce:

Potvrzuji, že mi bylo poskytnuto poradenství ke genetickému laboratornímu vyšetření za účelem jak uvedeno shora a že jsem poskytnuté informace porozuměl/a. Lékařem mi bylo sděleno a vysvětleno následující:

- Účel, povaha, předpokládaný přínos genetického laboratorního vyšetření
- Možný dopad výsledků genetického vyšetření na mé zdraví, na zdraví mých potomků (budoucích generací) a zdraví geneticky příbuzných osob
- Rizika neočekávaných nálezů, což jsou nálezy, které nejsou účelem genetického laboratorního vyšetření, přesto je analýza genetické informace zjistí. Neočekávané nálezy lze rozdělit na skupinu nálezů, které mohou mít pro pacienta a osoby s ním geneticky příbuzné závažný dopad (např. zvýšená náchylnost k nádorovým onemocněním nebo nepotvrzení otcovství). Druhou skupinou jsou nálezy, které se odlišují nálezů běžných, ale jejich konkrétní dopad na současný a/nebo budoucí zdravotní stav pacienta a geneticky příbuzné osoby nelze na základě současných znalostí stanovit.

	GENLABS s.r.o. Lipová 1789/9 370 05 České Budějovice 2	<b>SOUHLAS S GENETICKÝM LABORATORNÍM VYŠETŘENÍM</b> Číslo stránky: 2 Počet stránek: 2 Vypracoval: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.
	Molekulárně genetická laboratoř Odbornost 816	

Měl/a jsem možnost vše si řádně, v klidu a v dostatečně poskytnutém čase zvážit, měl/a jsem možnost se lékařem zeptat na vše, co jsem považoval/a za pro mne podstatné a potřebné vědět a probrat s ním vše, čemu jsem nerozuměl/a. Na ty to mé dotazy jsem dostal/a jasnou a srozumitelnou odpověď.

### B. 3. Rozhodl/a jsem, že se vzorkem bude po ukončení testování naloženo takto:

#### Souhlas se skladováním

Pokud to bude možné a/nebo účelné, bude můj vzorek skladován pro další vyšetření provedená k mému prospěchu a prospěchu mých příbuzných. Před genetickým vyšetřením, které by se provádělo za jinými účely než uvedeno v části A., budu řádně poučen/a a toto vyšetření bude vždy provedeno až s novým informovaným souhlasem. Vzorek bude skladován u poskytovatele zdravotních služeb uvedeného v záhlaví nebo v laboratoři spolupracujícího poskytovatele a to nejvýše po dobu 50 let.

- Jestliže bude vzorek mého biologického materiálu dále skladován, **souhlasím/nesouhlasím** s jeho využitím ke kontrole kvality DNA diagnostiky (vzorek je použit jako kontrola pro vyšetření jiného pacienta).
- **Souhlasím/nesouhlasím\*** s anonymním využitím skladovaného biologického materiálu v lékařském výzkumu dědičných onemocnění.
- **Souhlasím/nesouhlasím\*** s tím, že mohu být znovu kontaktován/a, na adrese uvedené ve zdravotnické dokumentaci, za účelem souhlasu s využitím mého skladovaného biologického materiálu v konkrétním výzkumném projektu.

#### Nesouhlas se skladováním

Můj vzorek bude po provedení genetického laboratorního vyšetření zlikvidován max. po 15 měsících od data doručení do laboratoře s tím rizikem, že nebude již možné v budoucnosti výsledek vyšetření v případě potřeby znovu ověřit a že zlikvidování vzorku může vést ke zhoršení dostupnosti diagnostiky u rodinných příslušníků. Dále jsem si vědom, že pro další genetické testování bude nutný nový odběr materiálu.

### B. 4. Dále si přeji následující:

- Abych s výsledky genetického laboratorního vyšetření : **byl(a) / nebyl(a) seznámen(a)\***
- Abych s výsledky neočekávaných nálezů **byl(a)/nebyl(a) seznámen(a) \***
- Aby o **výsledcích vyšetření a/nebo neočekávaných nálezech\*** byly informovány následující osoby:  
.....
- **Souhlasím/ nesouhlasím\*** s využitím výsledků genetického laboratorního vyšetření a relevantních informací o mém zdravotním stavu, včetně fotodokumentace, k vědeckým a výukovým účelům za podmínky, že tyto údaje budou prezentovány a publikovány pouze v anonymní formě.

**Na základě tohoto poučení prohlašuji, že souhlasím s odběrem příslušného vzorku z mého těla a s provedením výše popsaného genetického laboratorního vyšetření s podmínkami uvedenými výše.**  
 Jsem si vědom/a, že svůj souhlas mohu kdykoliv písemně odvolat.

Podpis vyšetřované osoby (zákonného zástupce).....

V ..... Dne.....

Jméno lékaře:.....

Podpis: .....

\* vybranou variantu označte

.....  
 GENLABS s.r.o., Genetická laboratoř GENLABS; Lipová 1789/9, 370 05 České Budějovice 2,  
 IČ: 018 53 805, spol. vedená u Městského soudu v Praze, odd. C, vl. 212629

Příloha 2: diagnózy autistických pacientů

LIČ	Diagnóza
33/21	F-84,F-90, těžká forma ADHD, regres po HEXA, MMR, gastro-entherokolitida, zonulin 2865
139/20	těžká forma autismu, ADHD, ADD, poškození po vakcinaci MMR
149/21	dětský autismus, ADHD, málem umřel po Hexa, další regres po MMR
165/21	dětský autismus, ADHD, regres po HEXA a MMR
191/21	dětský autismus, ADHD, neočkován, NGS
324/21	Dětský autismus, ADHD, histamin, nemluví
543/20	dětský autismus, ADHD, regres po HEXA a MMR, po fekální transplantaci
603/20	F-90, F-84, ADHD, ADD, poškození HEXA, MMR, vady řeči, mentální omezení
686/20	těžká forma autismu, ADHD, ADD, poškození po vakcinaci HEXA MMR, paraziti
691/20	dětský autismus, ADHD, ADD, poškození HEXA, MMR
205/21	dětský autismus, ADHD, doočkován v roce 2021, těžký regres
633/21	dětský autismus, F-90, F-84, ADHD, nemluví
844/21	dětský autismus, těžká forma autismu, ADHD, regres po HEXA a MMR, nemluví
1022/21	dětský autismus, ADHD, po HEXA a MMR regres
1080/21	PAS, ADHD, dysfázie, SPD (sensory processing disorder)
23/22	PAS, velké zažívací potíže, zpožděný vývoj, fekální transplantace
65/22	PAS, zpožděný vývoj
131/22	podezření na PAS a ADHD
205/22	PAS, ADHD, alergie
455/22	dětský autismus, ADHD
172/21	porucha SPD, dysfázie, vady řeči
195/21	ADD, met. syndrom, regres a poškození po HEXA a MMR
270/21	ADD, ADHD, poškození z HEXA, mentální retardace
404/21	ADHD, dysfázie, vady řeči
679/21	mentální retardace, ADHD, nemluví, gastrointestinální potíže
775/21	F-90, regres po MMR, genitopatelní syndrom, mentální retardace
505/22	dítě je příliš malinké, ztráta rovnováhy, nechutenství, velká podrážděnost,

	encefalitický pláč, vysoká cholinesteráza
547/22	R620, F-89, ADHD, oligofrenie, agresivita, nižší intelekt, dysfázie, IAG
554/22	ADHD, těžká mentální retardace, SIBO-disbióza, gastro-imuno abnormality, IAG
79/23	diagnóza nebyla poskytnuta