

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

**Laktózová intolerance: výskyt ve světové populaci a
možnosti její diagnostiky**

Bakalářská práce

Jiřina Weberová

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

České Budějovice 2016

Weberová J., 2016: Laktozová intolerance: výskyt ve světové populaci a možnosti její diagnostiky. [Lactose Intolerance: The Prevalence in the World Population and Possibilities of its Diagnosis. Bc Thesis, in Czech.] - 56 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation

The aim of the theoretical part of this bachelors thesis was to give the summary of current knowledge of the topic 'lactose intolerance'. There are being characterized the cause of lactose intolerance, the global prevalence, possibilities of its diagnosis and of its treatment. The practical part deals with the methodology that I used for the detection of C/T-13910 and G/A-22018 polymorphism. In the genetic laboratory were tested 34 individuals for the lactose intolerance with method RFLP-PCR.

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

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

V Českých Budějovicích, 22. 4. 2016

.....
Jiřina Weberová

Poděkování

Ráda bych na tomto místě poděkovala své vedoucí práce Mgr. Dagmar Bystřické, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a čas, který mi věnovala a za možnost uskutečnění experimentálních pokusů v prostředí genetické laboratoře GENLABS.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat také své rodině a přátelům, kteří mě po celou dobu studia podporovali.

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 TEORETICKÁ ČÁST	2
2. 1 ZÁKLADNÍ PATOFYZIOLOGIE.....	2
2. 1. 1 Laktóza	2
2. 1. 2 Laktáza	4
2. 2 MECHANISMUS LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE.....	7
2. 3 FORMY LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE	8
2. 3. 1 Vrozený deficit (kongenitální laktózová intolerance).....	8
2. 3. 2 Primární deficit laktázy (laktázová non-perzistence, primární laktózová intolerance, Adult-type hypolaktázie)	9
2. 3. 3 Sekundární laktózová intolerance	9
2. 4 POPIS LCT A MCM6 GENU	10
2. 5 EVOLUCE LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE.....	13
2. 6 PREVALENCE LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE	14
2. 7 DIAGNOSTIKA	18
2. 7. 1 Laktózový toleranční test.....	20
2. 7. 2 Expoziční test.....	20
2. 7. 3 Test kyselosti stolice	20
2. 7. 4 Dechový vodíkový test	20
2. 7. 5 Biopsie sliznice tenkého střeva s imunohistochemickým vyšetřením	21
2. 7. 6 Genetický test	21
2. 8 LAKTÓZOVÁ INTOLERANCE VERSUS ALERGIE NA MLÉKO	22
2. 9 KLINICKÉ PROJEVY LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE.....	23
2. 10 LAKTÓZA V POTRAVINÁCH A LÉCÍCH.....	23
2. 11 LÉČBA	25
2. 11. 1 Snížení příjmu laktózy	25
2. 11. 2 Enzymová substituce	25
2. 11. 3 Živé kultury v kysaných výrobcích a jogurtech	26
2. 11. 4 Příjem vápníku	26
2. 11. 5 Suplementace vápníku	26
2. 11. 6 Příjem vitamínu D	26
2. 12 DŮSLEDKY LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE.....	27

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	28
3. 1 CÍL EXPERIMENTÁLNÍ PRÁCE	28
3. 2 PRINCIP VYŠETŘENÍ.....	28
3. 3 METODIKA VYŠETŘENÍ.....	28
3. 3. 1 Izolace genomové DNA	28
3. 3. 2 Měření koncentrace DNA.....	29
3. 3. 3 PCR reakce - optimalizace, příprava, provedení.....	29
3. 3. 4 Kontrola PCR produktu na agarózovém gelu.....	31
3. 3. 5 Přečištění PCR produktu.....	32
3. 3. 6 Restrikční štěpení	32
3. 4 ANALÝZA ZÍSKANÝCH DAT.....	33
3. 5 VÝSLEDKY	36
3. 5. 1 Výsledky zpracované v genetické laboratoři.....	36
3. 5. 2 Výsledky vyšetřených jedinců v příbuzenské souvislosti	37
4 DISKUZE	38
5 ZÁVĚR	40
6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	41
7 PŘÍLOHA	51
<i>Příloha 1: Protokol k izolaci genomové DNA z bukalního stěru.</i>	<i>51</i>
<i>Příloha 2: Protokol k izolaci genomové DNA z plné krve.</i>	<i>52</i>
<i>Příloha 3: Protokol k měření koncentrace nukleových kyselin.....</i>	<i>54</i>
<i>Příloha 4: Protokol ke přípravě gelové elektroforézy.....</i>	<i>55</i>
<i>Příloha 5: Protokol k přečištění PCR produktu.....</i>	<i>56</i>

Seznam použitých zkratk

ATH	adult-type hypolaktázie
CLD	kongenitální laktózová deficiencie
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ELFO	elektroforéza
GI	glykemický index
LCT (LPH)	laktáza-phlorizin hydroláza
LI	laktózová intolerancie
LM	malabsorpce laktózy
LP	laktázová perzistence
MCM6	minichromosome maintenance complex component 6
PCR	polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus restrikčních fragmentů
SNP	single nucleotide polymorphism

1 ÚVOD

Laktáza-phlorizin hydroláza (LCT), více známá jen jako laktáza, je enzym zodpovědný za štěpení laktózy na absorbovatelné monosacharidy glukózu a galaktózu (Ingram *et al.* 2009). LCT deficiencie (hypolaktázie) je způsobena snižující se aktivitou LCT v klcích tenkého střeva, potenciálně vede k malabsorpci laktózy, což může vést k rozvoji klinických příznaků (průjem, nadýmání, plynatost a křeče). Hypolaktázie je celosvětově nejběžnější enzymová deficiencie (Mađdry *et al.* 2010). Přibližně 70 % světové populace má hypolaktazémii, která bývá často diagnostikována a jejíž důsledky mohou vést až k rozvoji osteoporózy v dospělosti (Fojík *et al.* 2013). Laktóza je přirozeně přítomna pouze v savčím mléce a po požití je hydrolyzována enzymem laktázou v tenkém střevě. (Fojík *et al.*, 2013).

Hypolaktázie se vyskytuje ve třech formách - vrozená, primární a sekundární. Primární deficit laktázy je nejčastějším fenotypem. Je to geneticky předem stanovený fyziologický stav děděný autozomálně recesivním způsobem. (Mađdry *et al.* 2010).

S přetrváváním laktázové aktivity v dospělosti jsou spojovány dva genetické polymorfismy (Coelho *et al.* 2005), které se vyskytují zejména v populaci severní Evropy. V jiných etnických skupinách je jejich výskyt odlišný (Fojík *et al.* 2013). Primární deficit laktázy je spojován s polymorfismem C/T-13910 v MCM6 genu, jehož výskyt je popisován po celém světě s výjimkou Afriky. Laktázová non-perzistence byla pozorována u jedinců s 13910CC genotypem, zatímco laktázová perzistence u zbývajících alelických variant (Mađdry *et al.* 2010, Enattah *et al.* 2007). Dalším polymorfismem spojovaným s laktázovou non-perzistencí je G/A-22018. V případě genotypu 22018GG je s 98% pravděpodobností indikována laktázová non-perzistence (Rasinerä *et al.* 2004, Enattah *et al.* 2002, Enattah *et al.* 2007).

Biopsie tenkého střeva je jediný diagnostický přístup, který umožňuje přímé měření LCT činnosti, avšak vzhledem ke své invazivní povaze je těžko akceptován pacienty. Proto je aktivita LCT často odvozena pouze na základě posouzení trávení laktózy pacienta. Laktózový toleranční test se provádí po zátěži laktózou a následným měřením koncentrace glukózy v krvi či měřením expirace vodíku (Mađdry *et al.* 2010). V současné době je k dispozici také genetický test analyzující polymorfismus C/T-13910 i G/A-22018. Jedná se

o spolehlivou metodu vylučující či potvrzující predispozice pro intoleranci laktózy v dospělém věku nazývanou adult-type hypolaktázie (ATH) (Rasinperä *et al.* 2004).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Základní patofyziologie

2.1.1 Laktóza

Laktóza (mléčný cukr), je klíčovou živinou v savčím mléce a hlavním zdrojem sacharidů během novorozeneckého období (Solomons 2002, Mądry *et al.* 2010). Jedná se o disacharid složený z galaktózy a glukózy vázané β -glykosidickou vazbou (Čurda 2006). Laktóza je syntetizována syntetázou laktózy výhradně v mléčné žláze prakticky všech placentárních savců (kromě lachtana) v pozdní fázi těhotenství a při kojení (Solomons 2002, Mądry *et al.* 2010). Laktóza má zajímavé nutriční vlastnosti. Patří k nim relativně nízká sladivost (Tab. I), kalorická hodnota a glykemický index. Je-li laktóza zcela štěpena v tenkém střevě, přispívá tělu stejně jako ostatní sacharidy kalorickou hodnotou 4 kcal/g. Nicméně v mnoha případech není laktóza (částečně či úplně) v tenkém střevě štěpena. Z bakteriální fermentace laktózy v tlustém střevě tělo získá přibližně 2 kcal/g (Schaafsma 2008). Z jednoduchého srovnání glykemického indexu (GI) různých cukrů a sacharidů, obsažených v potravinách (Tab. II), lze dojít k závěru, že GI laktózy je relativně nízký. Z tohoto důvodu má laktóza přínos pro osoby, které mají sklon k hyperglykémii. Laktóza má také prebiotické vlastnosti a zvyšuje absorpci vápníku a hořčíku (Schaafsma 2008). Výhodou laktózy je, že se v trávicím traktu pomalu hydrolyzuje, a tak se energie rovnoměrně uvolňuje v období mezi kojením (Čurda 2006).

Koncentrace laktózy v mléce je nepřímo úměrná obsahu tuku a bílkovin. Lidské mateřské mléko obsahuje nejvyšší koncentraci laktózy u savců (7%) (Tab. III) (Solomons 2002, Mądry *et al.* 2010). Mateřské mléko tedy obsahuje ve 100 g mléka 6,2 až 7,5 g laktózy, zatímco kravské, kozí a ovčí obsahují 4,5 až 5,0 g laktózy (Čurda 2006).

Tab. I: Sladkost některých cukrů (relativní k sacharóze = 1) (Schaafsma 2008).

Sacharóza	1
Glukóza	0,6-0,7
Maltóza	0,4-0,5
Sorbóza	0,4
Xylóza	0,6-0,7
Laktóza	0,2-0,4
Fruktóza	1,3
Galaktóza	0,5-0,7

Tab. II: Glykemický index vybraných cukrů a jídel (Foster-Powell *et al.*2002).

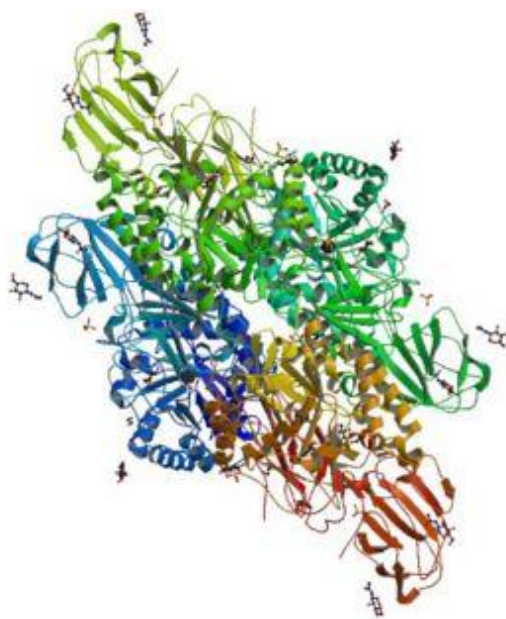
Glukóza	100
Fruktóza	19
Laktóza	46
Sacharóza	68
Vařená rýže	83
Maltóza	105
Pečené brambory	85

Tab. III: Obsah laktózy (%) v mléce vybraných savců (Schaafsma 2007).

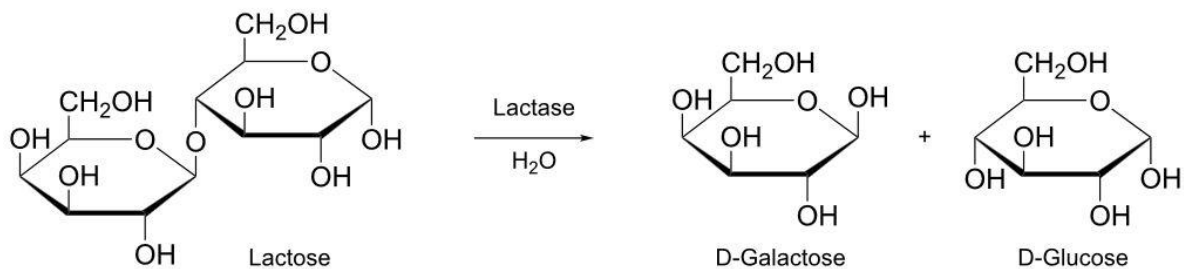
Člověk	7,0
Kůň	6,9
Osel	6,1
Lama	5,6
Zebra	5,3
Prase	5,0
Koza	4,7
Kráva	4,6
Pes	3,8
Myš	3,0
Delfín	1,1
Lachtan	0,1

2. 1. 2 Laktáza

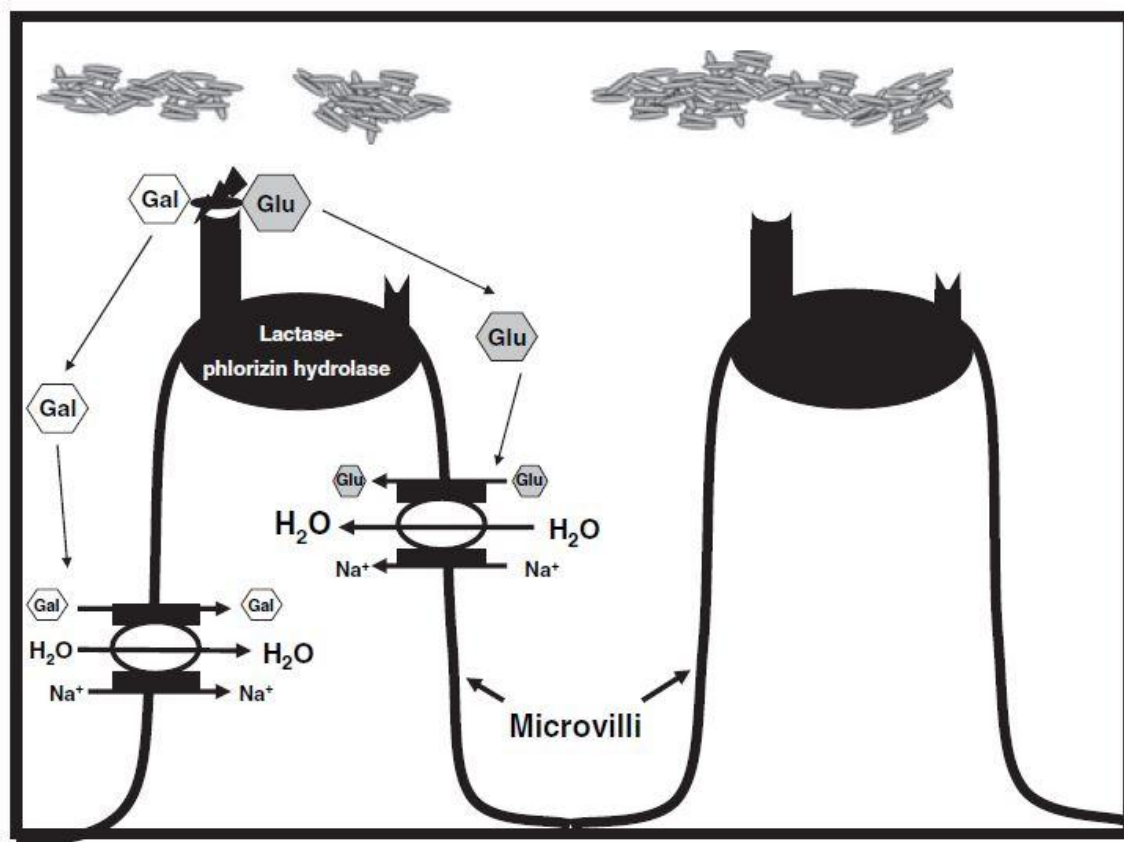
Laktáza-phlorizin hydroláza (LCT), běžně známá jako laktáza, nebo také beta-galaktosidáza (EC 3.2.1.23) (Obr. 1) je zodpovědná za štěpení laktózy na vstřebatelné monosacharidy, glukózu a galaktózu v tenkém střevě (Obr. 2) (Ingram *et al.* 2009). Ty jsou volně absorbovány společně s vodou střevními enterocyty do krevního oběhu (Obr. 3) (Lomer *et al.* 2007, Schultheis *et al.* 2011). Glukóza je využita jako zdroj energie a galaktóza se stává součástí glykolipidů a glykoproteinů (Di Rienzo *et al.* 2013, Fojík *et al.* 2013). Laktáza je přítomna na apikálním povrchu kartáčového lemu enterocytů v tenkém střevě. Nejvyšší exprese genu LCT byla nalezena v polovině jejunu (Misselwitz *et al.* 2014). LCT má dvě aktivní místa, první z nich štěpí laktózu, druhé hydrolyzuje phlorizin (aryl alfa-glukosid) a řadu dalších glykolipidů (Campbell *et al.* 2005, Fojík *et al.* 2013). K hydrolýze obvykle dochází v první části tenkého střeva, které má nízkou koncentraci bakterií, a tak se fermentuje jen malý podíl laktózy (Di Rienzo *et al.* 2013, Lomer *et al.* 2007).



Obr. 1: Trojrozměrná krystalová struktura lidského enzymu β -galaktosidázy (URL 4).



Obr. 2: Hydrolýza laktózy enzymem laktázou za vzniku glukózy a galaktózy (URL 1).



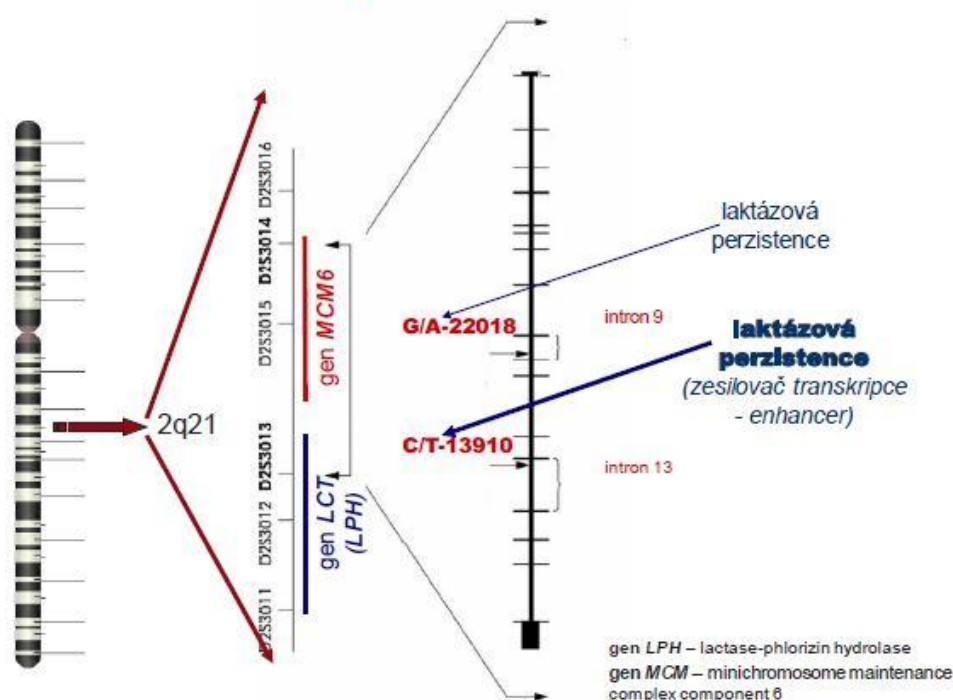
Obr. 3: Hydrolýza laktózy v tenkém střevě (Lomer *et al.* 2007).

Laktáza je rozhodující ve výživě novorozenců savců, jejichž jediným zdrojem živin je mléko a laktóza je hlavní zdrojem sacharidů. Aktivita laktázy se mění v průběhu vývoje jedince (Misselwitz *et al.* 2014). U většiny lidí dosahuje maxima v pozdní fázi těhotenství a zvyšuje se až pětkrát během třetího trimestru (Shulman *et al.* 1995). Poté opět klesá po dobu 2-3 let a dosahuje stabilní nízké úrovně ve věku 5-10 let. Tento proces může pozitivně ovlivnit kojení (Misselwitz *et al.* 2014). Všichni savci, kromě bílých severních Evropanů a několika dalších ras (např. beduínů) začnou ztrácet aktivitu LCT enzymu krátce po

odstavení od kojení (Campbell *et al.* 2010). U většiny savců po odstavení od mateřského mléka klesá aktivita na nedetekovatelné hladiny a pouze u přibližně 30 % celkové světové populace aktivita enzymu laktázy přetrvá do dospělosti (Fojík *et al.* 2013).

Laktáza je kódována genem LCT, který se nachází na chromozomu 2 (2q21) (Obr. 4) (Di Rienzo *et al.* 2013). Enzym je vyráběn z 220 kDa prekurzorového peptidu, který podléhá značné posttranskripční modifikaci během transportu na povrch buňky, kde se vyskytuje jako zralý 150 kDa protein. Luminální faktory rovněž přispívají ke konečné úpravě tohoto proteinu a odštěpení dalších dvou aminokyselin pankreatickým trypsinem produkuje aktivní formu enzymu LCT (Mađry *et al.* 2010).

Lokalizace genů LPH a MCM6



Obr. 4: Lokalizace polymorfismů asociovaných s laktózovou intolerancí (Fojík *et al.* 2013).

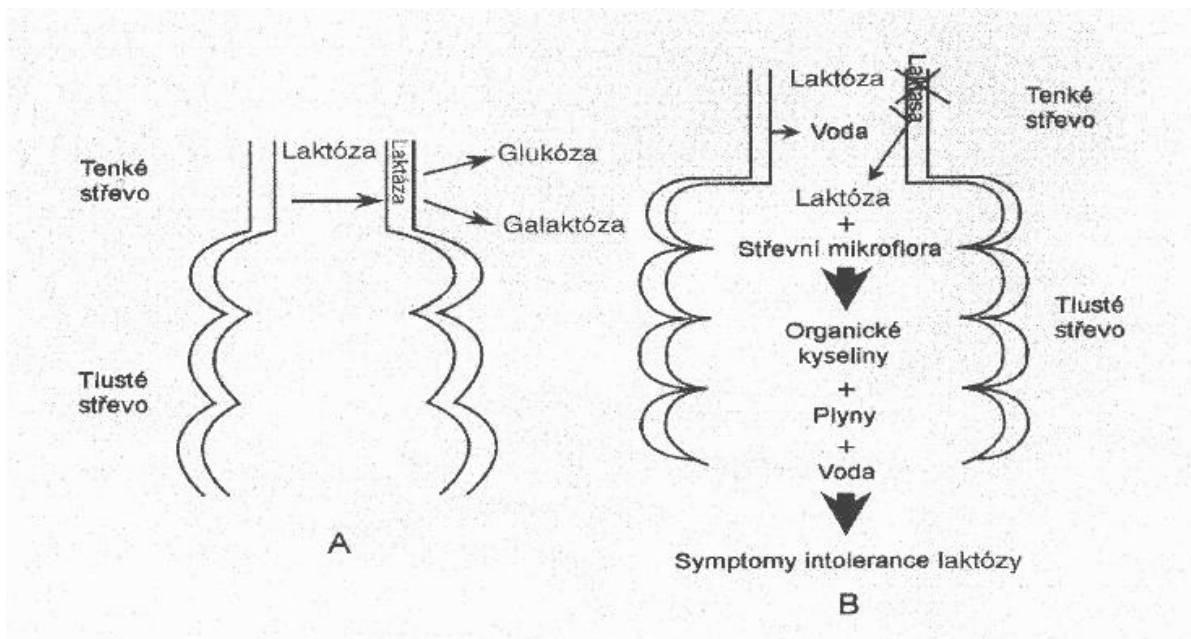
Hypolaktázie neboli nedostatek enzymu laktázy může vést k malabsorpci laktózy, což v kombinaci s klinickými příznaky vede k diagnóze intolerance laktózy. Nesnášenlivost laktózy pak vyžaduje úplné nebo částečné vyloučení mléčných výrobků ze stravy (Mađry *et al.* 2010).

2. 2 Mechanismus laktóзовé intolerance

Nedostatek laktázy (hypolaktázie) je způsoben sníženou aktivitou LCT v klcích tenkého střeva. Je to nejběžnější enzymová deficience u lidí. Laktáze deficientní jedinci nejsou schopni hydrolýzy laktózy po konzumaci výrobků, které obsahují laktózu. Pokud není laktóza strávena a absorbována v tenkém střevě, pak dochází k její fermentaci bakteriemi tlustého střeva za vzniku mastných kyselin s krátkými řetězci a plynů včetně vodíku, oxidu uhličitého a methanu (Obr. 5). Právě tento proces je spojován s laktóзовou intolerancí u vnímavých jedinců a klinicky se projevuje jako nevolnost, bolesti břicha, nadýmání a průjem (Yang *et al.* 2013, Tarabra *et al.* 2010).

Nehydrolyzovaná laktóza v tenkém střevě způsobuje zvýšení osmotického zatížení a spolu s bakteriálními metabolity sehrává důležitou roli v rozvoji klasických příznaků intolerance. Přesný mechanismus zahrnuje osmotické zatížení způsobující zvýšení osmotického gradientu přes střevní stěnu (Vernia *et al.* 2003, Pimentel *et al.* 2006). Gradient potom táhne vodu do dutiny, a to vede k symptomatickému průjmu (Matthews *et al.* 2005, Vesa *et al.* 2000). Je-li laktóza fermentována přítomnými bakteriemi v tlustém střevě, produkují se mastné kyseliny a plyny jako vedlejší produkty fermentace (např. vodík a metan) a ty mohou potenciálně způsobit u pacienta nadýmání a plynatost (Matthews *et al.* 2005, Vesa *et al.* 2000).

Nicméně i přes to je většina jedinců s laktóзовou intolerancí schopna tolerovat malé množství laktózy (jako například v čaji nebo v kávě), někteří mohou dokonce konzumovat větší množství bez jakéhokoli negativního klinického dopadu (Mądry *et al.* 2010). Pouze asi 50 % laktázové aktivity stačí pro efektivní metabolismus laktózy a její využití (Swallow 2003).



Obr. 5: Schematické znázornění pochodů v zažívacím traktu při toleranci laktózy (A) a intoleranci laktózy (B) (Čurda 2006, URL 3).

2. 3 Formy laktózové intolerance

Hypolaktázie se vyskytuje ve třech různých formách, jako vrozená (kongenitální), primární a sekundární (Mądry *et al.* 2010).

2. 3. 1 Vrozený deficit (kongenitální laktózová intolerance)

Jedná se o extrémně vzácné postižení spojené s nedetekovatelnou tvorbou laktázy již od narození (Fojík *et al.* 2013, Čurda 2006, Schaafsma 2008). Charakteristickým klinickým příznakem kongenitální laktózové deficience (CLD) je těžký vodnatý osmotický průjem, následuje dehydratace, acidóza a ztráta hmotnosti (Kuokkanen *et al.* 2005). U novorozence se tyto symptomy vyvíjí velmi časně po první dávce mateřského mléka a v krátkém čase může způsobit jeho neprosívání. Jediná léčba je zcela se vyhnout laktóze od narození po celý život (Swallow 2003, Mądry *et al.* 2010).

Výskyt CLD je udáván 1 : 60 000 jedinců a je jedním z 36 vzácných monogenních poruch s autozomálně recesivním typem dědičnosti (Kuokkanen *et al.* 2005). Celosvětově je popsáno asi jen 40 případů. Již od narození je třeba se vyhnout mléčnému cukru (Fojík *et al.*

2013). Příznaky pak rychle ustoupí a děti mají normální růst a psychomotorický vývoj (Kuokkanen *et al.* 2005).

2. 3 2 Primární deficit laktázy (laktázová non-perzistence, primární laktázová intolerance, Adult-type hypolaktázie)

Přirozený geneticky programovaný pokles množství laktázy o 90 % a více, který začíná od druhého a trvá do pátého roku života, se označuje jako primární deficece laktázy (Enattah *et al.* 2002, Čurda 2006). Tento deficit je nejběžnější a vyskytuje se u 70% celosvětové populace. Deficit se rozvíjí většinou po odstavení od kojení do 5 let věku (Fojík *et al.* 2013).

Jedná se o geneticky determinovaný proces s autozomálně recesivní dědičností (Kuokkanen *et al.* 2003, Vesa *et al.* 2000), který vede k poklesu aktivity laktázy. Adult-type hypolaktázie (ATH) je spojována s C/T-13910 a G/A-22018 polymorfismem po celém světě. Pouze v Africe se vyskytují odlišné polymorfismy (Enattah *et al.* 2002), konkrétně zde byly identifikovány tři jednonukleotidové polymorfismy G/C-14010, T/G-13915 a C/G-13907 (Tishkoff 2007, Enattah *et al.* 2008).

Všichni zdraví novorozenci vykazují odpovídající aktivitu enzymu laktázy, která se snižuje poté, co je dítě odstaveno od mateřského mléka. U většiny dospělých na celém světě není mléko již hlavní složkou stravy, a úpadek laktázové aktivity v dospělosti jednoduše představuje přirozený stav organismu.

Primární hypolaktázie je velmi rozšířená ve světové populaci, ale se značnými rozdíly mezi různými etnickými skupinami. Prevalence je minimální v severoevropských populacích (Finsko, Švédsko, Německo, Rakousko, Švýcarsko, Francie, Velká Británie, Holandsko, Irsko) a zvláště vysoká je v Asii, Africe a Austrálii (Di Rienzo *et al.* 2013).

2. 3. 3 Sekundární laktázová intolerance

K sekundární hypolaktázii dochází v důsledku onemocnění gastrointestinálního traktu, příčinou může být poškození kartáčového lemu tenkého střeva (Mađry *et al.* 2010, Di

Rienzo *et al.* 2013), například po užití některých léků, při tropické a celiakální sprue, Crohnově nemoci, při parazitárních onemocněních, po chirurgickém zákroku zažívacího traktu, infekci virové gastroenteritidy, radioterapii nebo chemoterapii (Mađdry *et al.* 2010, Di Rienzo *et al.* 2013, Āurda 2006).

Po zaléčení či odeznění gastrointestinálního onemocnění sekundární laktózová intolerance ustoupí (Fojík *et al.* 2013). Obvykle se tedy jedná o přechodnou intoleranci (Āurda 2006).

2. 4 Popis LCT a MCM6 genu

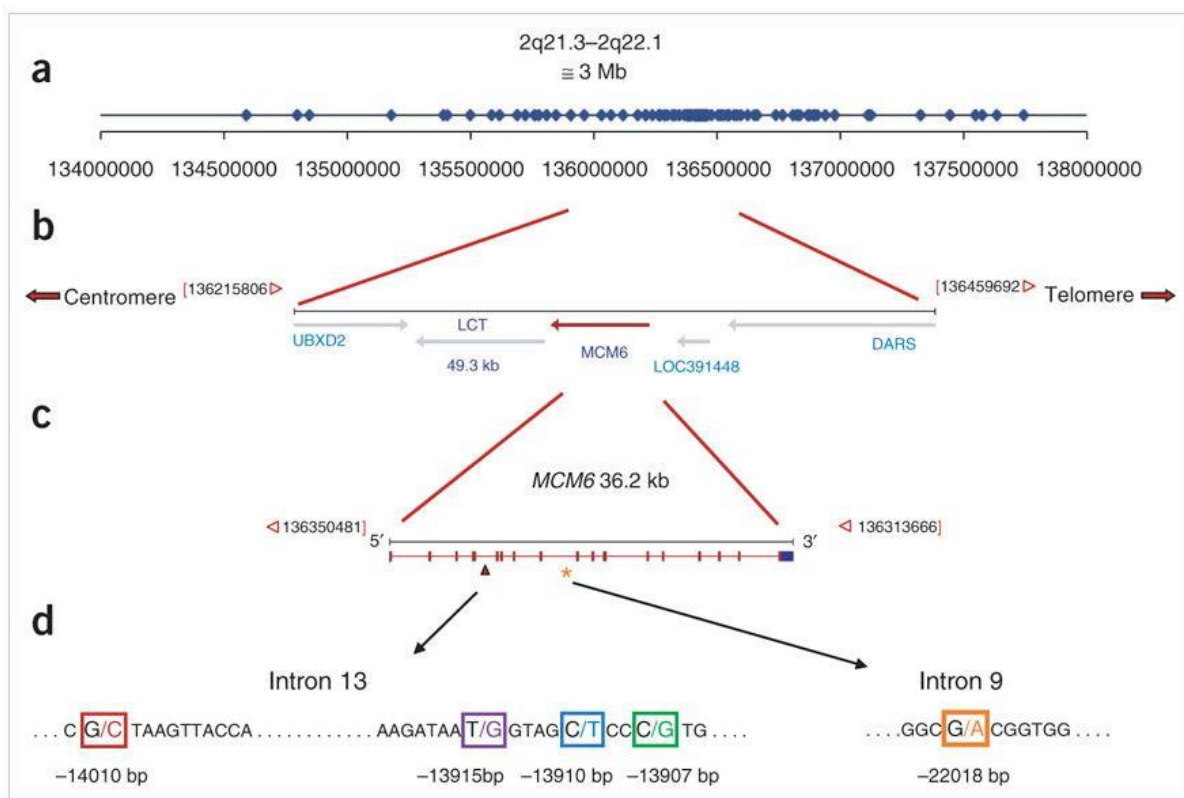
Gen laktázy (LCT) je přibližně 20 kb velký (Mađdry *et al.* 2010) a je lokalizován na chromozómu 2q21 (Enattah *et al.* 2002). Sekvenční analýza LCT genu neodhalila žádnou sekvenční variantu odpovídající nonpersistenci laktázy (Harvey *et al.* 1996). Enattah *et al.* (2002) identifikoval dva polymorfismy v genu MCM6 ležícím v blízkosti genu LCT určující laktázovou persistenci či nonperzistenci. Jedná se o jednonukleotidové polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018.

Gen MCM6 zřejmě mimo jiné řídí i transkripci LCT genu na úrovni promotoru (URL 8). Gen je složen ze 17 exonů (Olds and Sibley 2003), přičemž obsahuje dvě polymorfnní místa důležitá pro regulaci exprese LCT genu lokalizované v intronech 13 (C/T-13910) a 9 (G/A-22018) MCM6 genu, které leží přibližně 14 kb a 22 kb od 5' konce LCT genu (Obr. 6) (Enattah *et al.* 2002).

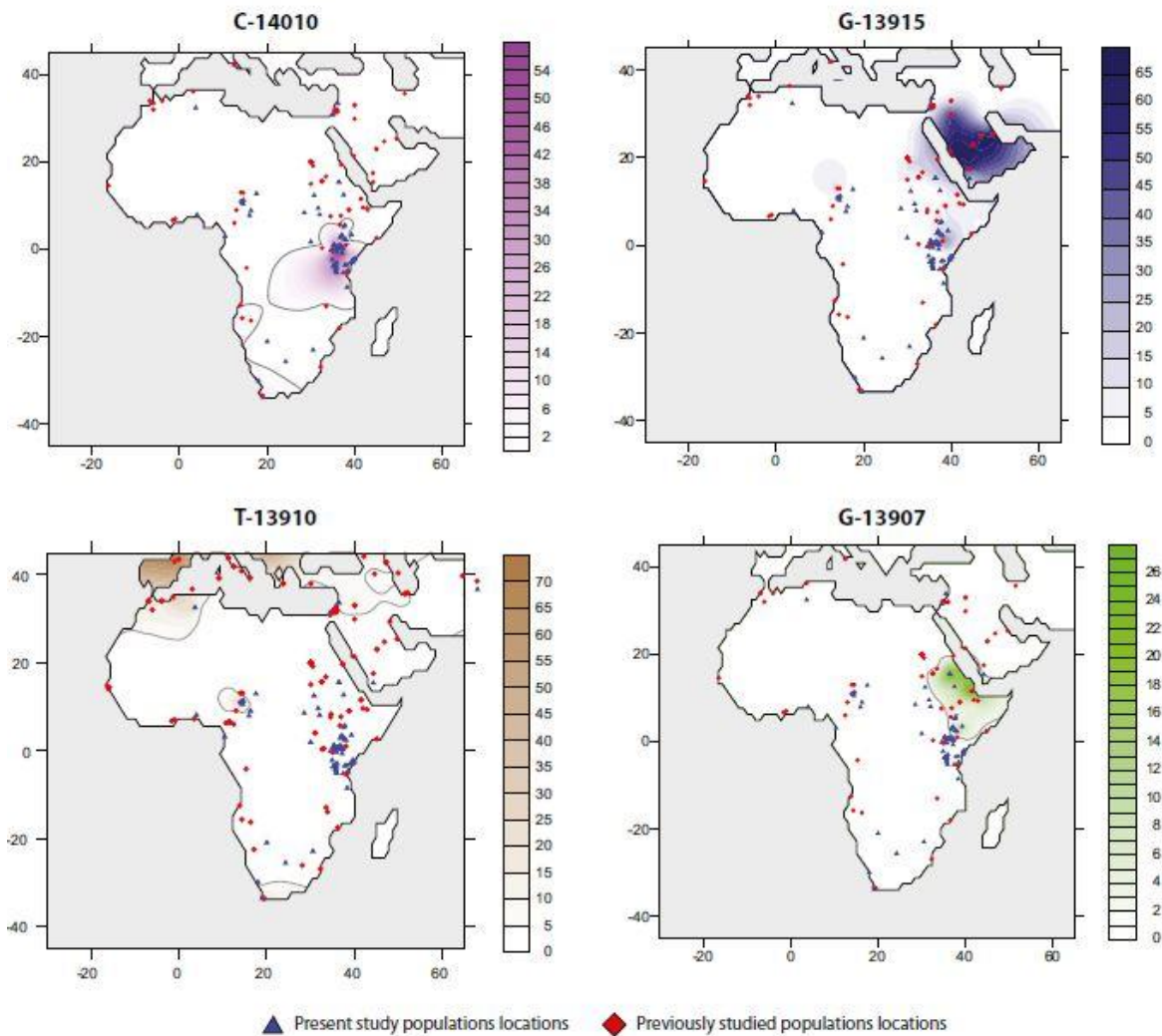
Funkční studie ukázaly, že klíčovou variantou regulace LP exprese v dospělých je spíše polymorfismus T-13910 (Ranciaro *et al.* 2014). Tato varianta ale není přítomna ve většině afrických a blízkovýchodních populacích (Ranciaro *et al.* 2014, Mulcare *et al.* 2004, Coelho *et al.* 2005). Zde byly identifikovány tři jiné jednonukleotidové polymorfismy: G/C-14010, T/G-13915 a C/G-13907 (Tishkoff 2007, Enattah *et al.* 2008), které se nachází v sekvenční blízkosti do 100 bp polymorfismu C/T-13910. Tyto varianty jsou asociovány s LP rysem hlavně u pasteveckých obyvatel z Afriky a Arabského poloostrova (Obr. 7) (Ranciaro *et al.* 2014, Bersaglieri *et al.* 2004).

Genotyp 13910CC se vyznačuje laktázovou non-perzistencí, jedinci s tímto genotypem mají téměř nezjistitelné koncentrace střevní laktázy (Di Stefano *et al.* 2009, Corella *et al.* 2011). Genotyp 13910TT vykazuje laktázovou perzistenci a heterozygotní genotyp 13910CT nese znaky laktázové non-perzistence (Di Stefano *et al.* 2009, Tishkoff *et al.* 2007, Enattah *et al.* 2002, Swallow 2003).

V případě polymorfismu G/A-22018 genotyp 22018GG vykazuje v 98% případech laktázovou non-perzistenci. Nicméně, bylo prokázáno, že jeho vliv na LCT promotorovou aktivitu je minimální (Rasinerä *et al.* 2011, Grand *et al.* 2003).



Obr. 6: Mapa genových lokusů LCT a MCM6 genu a lokalizace genotypovaných SNPs (a) Distribuce 123 SNP zahrnutých v analýze genotypu. (b) Mapa oblasti genu LCT a MCM6. (c) Mapa genu MCM6. (d) Lokalizace SNP polymorfismů asociovaných s laktázovou perzistencí uvnitř intronů 9 a 13 MCM6 genu u afrických a evropských populací (URL 6, Tishkoff *et al.* 2007).



Obr. 7: Výskyt polymorfismů G/C-14010, T/G-13915, C/G-13907 a C/T-13910 v Africe (Ranciaro *et al.* 2014).

Na Obr. 7 je vyznačen výskyt jednotlivých polymorfismů na africkém kontinentu. Výskyt alely C-14010 je popisován především v Tanzánii, alela G-13915 byla identifikována na Arabském poloostrově a alelu G-13907 je možné nalézt v oblasti Etiopie a Súdánu.

2. 5 Evoluce laktóзовé intolerance

Laktázová non-perzistence je přirozený stav organismu zatímco laktázová non-perzistence je považována za evoluční adaptaci. Biologická evoluce laktázové perzistence je propojená s kulturním vývojem mlékárenství (Leonardi *et al.* 2012). Mlékárenské kultury byly založeny před téměř 10 000 lety na Středním východě a souvisí s domestikací ovcí, koz a skotu. V některých světových populacích, právě v důsledku chování skotu a konzumace mléčných produktů, došlo ke změně genové informace a vyvinula se přetrvávající exprese laktázy ve střevních buňkách (Enattah *et al.* 2008). Existují tři hlavní hypotézy evoluce LP (Holden and Mace 1997).

První hypotéza: V regionech, kde mléko nebylo běžně konzumováno, měli dospělí zřejmě nízkou schopnost trávit laktózu. Proto se předpokládá, že LP v dospělosti je adaptace na tisíce let pastevectví a spotřebu mléka. Jedná se o koevoluční teorii, ve které je vybraný genetický rys ovlivněn kulturním prostředím. Podle této hypotézy je schopnost trávit laktózu selektivní výhodou u dospělých pasteveckých obyvatel. Jedinci s LP mají nutriční přínos z laktózy v mléce, který jedincům s ATH chybí. Jedinci s ATH také po konzumaci mléka trpí příznaky intolerance laktózy, tj. bolestmi břicha, nadýmáním a průjmy (Holden and Mace 1997).

Zbylé dvě hypotézy odkazují přímo na konzumaci čerstvého mléka. Mléko se často zpracovává do mléčných výrobků, jako je sýr a jogurt, se sníženým obsahem laktózy. Pití čerstvého mléka s vysokým obsahem laktózy představuje dvě konkrétní selektivní výhody. V oblastech s vyšší zeměpisnou šířkou, kde je sluneční svit omezený, jsou lidé ohroženi nedostatkem vitamínu D a křivicí. Mléčný cukr obsažený v čerstvém mléce je zdrojem vitamínu D a podporuje absorpci vápníku, který je také přítomen v mléce (Holden and Mace 1997).

Třetí hypotéza navíc uvádí, že ve vysoce vyprahlých oblastech obsah vody v čerstvém mléce zvyšuje šance na přežití LP jedinců oproti netolerantním kočovným pastevcům. Ti jsou postiženi průjmy a ztrátami vody. Tato hypotéza je podporována vysokými frekvencemi dospělých s LP pozorovanými v pasteveckých skupinách v pouštních oblastech například na Středním východě a v severní Africe (Holden and Mace 1997).

2. 6 Prevalence laktózové intolerance

Intolerance laktózy je běžná gastrointestinální porucha, popisovaná po celém světě. Její výskyt je velmi variabilní (Obr. 8, Obr. 9) v závislosti na etnickém původu a pohybuje se v rozmezí od 5 % v severozápadní Evropě po téměř 100 % v některých asijských populacích (Solomons 2002, Swallow 2003, Itan *et al.* 2010).

Pohlaví nemá na výskyt ATH vliv (Vesa *et al.* 2000), ženy však mají větší sklon ke klinickým projevům intolerance laktózy (Čurda 2006). U černochů a Asiatů se hypolaktázie obvykle projevuje v raném dětství, zatímco v bílých populacích se objevuje později v dětství nebo během dospívání. Intolerance laktózy není běžná u malých bílých dětí (Vesa *et al.* 2000), ale pokud přítomna je, tak se většinou projeví do 20. roku života (Čurda 2006).

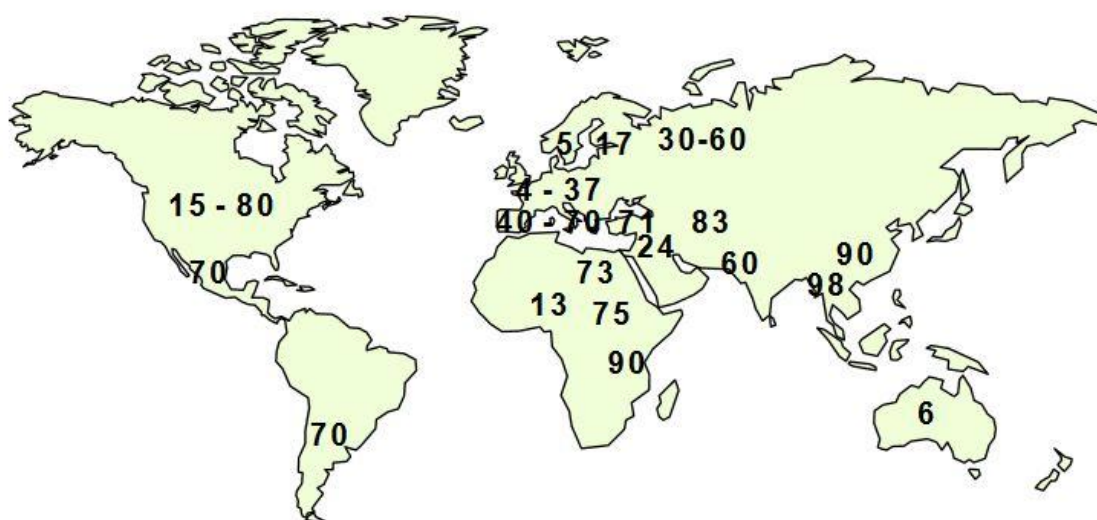
Výskyt ATH v Evropě se zvyšuje směrem k jihu a východu a dosahuje 70 % v jižní Itálii a Turecku. Prevalence ATH je nízká v západoevropské bělošské populaci, přičemž ve skandinávských zemích je nejnižší (1-5 %), ve střední Evropě se uvádí 10-20 % (někdy až 50 %), směrem na jih její výskyt narůstá. Například v Řecku u dětí ve věku od 5-12 let je to 46-70 %, u dospělých pak 75-80 % (Alm 1982).

U dospělé bílé populace severní Ameriky a Austrálie se prevalence primární laktózové intolerance pohybuje od 5 do 17%. V Jižní Americe, Africe a Asii je prevalence až 50%, v některých zemích Asie dosahuje ale až 100% (Alm 1982).

U osob smíšeného etnického původu je popisován nižší výskyt intolerance než u rodné etnické skupiny. Číňané a Japonci ztrácejí aktivitu laktázy během 3 - 4 let po odstavení od kojení, Židé a Asiaté ji ztrácejí v tomto období jen v 60-70%. (Matthews *et al.* 2005, Fojík *et al.* 2013).

Nízký výskyt intolerance je dáván do souvislosti s tradicí chovu zvířat produkujících mléko, kdy jedinci s perzistencí laktázy mají určitou nutriční výhodu. V rozvojových zemích přispívá k deficienci laktázy navíc celkový nízký příjem bílkovin (Alm 1982).

Spodní regulace střevní laktázové aktivity se liší v závislosti na etnickém původu, nejčastěji se začíná objevovat kolem 5-6 let (Matthews *et al.* 2005). Rozdíly v časování spodní regulace mohou být značné. U většiny thajských dětí bylo prokázáno, že jsou hypolaktázní ve věku dvou let. V černošské populaci byly dokumentovány projevy ATH od jednoho do osmi let, zatímco v bílé populaci jsou popisovány nízké hladiny laktázy zřídka u dětí mladších pěti let (Mađry *et al.* 2010).



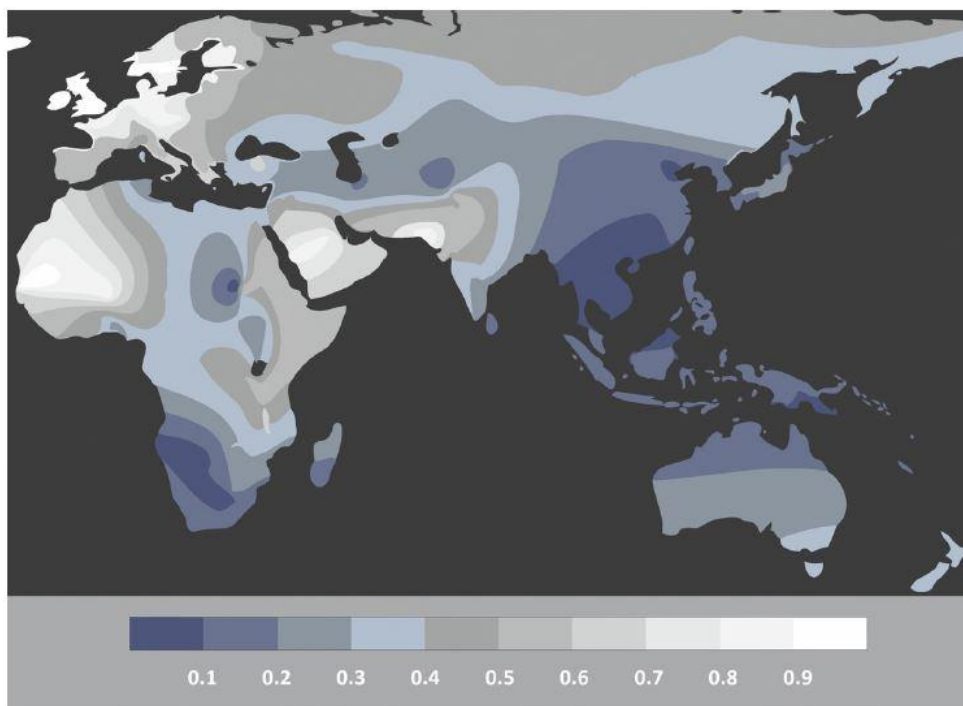
Obr. 8: Výskyt deficiencie laktázy v různých částech světa, čísla určují procentuální zasoupení laktázové intolerance v jednotlivých regionech (URL 3).

Pokud shrneme poznatky o prevalenci laktázové perzistence, její výskyt je výrazně ovlivněn geograficky, a to jak uvnitř tak i mezi jednotlivými kontinenty (Obr. 10, Obr. 11). Obecně se vyskytuje ve vysokých frekvencích v evropských populacích, kdy nizozemské a švédské studie zaznamenaly i frekvence 100 % a 99 % (Mulcare *et al.* 2004). Perzistence laktázy se vyskytuje s frekvencí 77 % u evropských Američanů, 13 % a 14 % u afrických Američanů, a 0 % u východních Asijských (Bersaglieri *et al.* 2004).

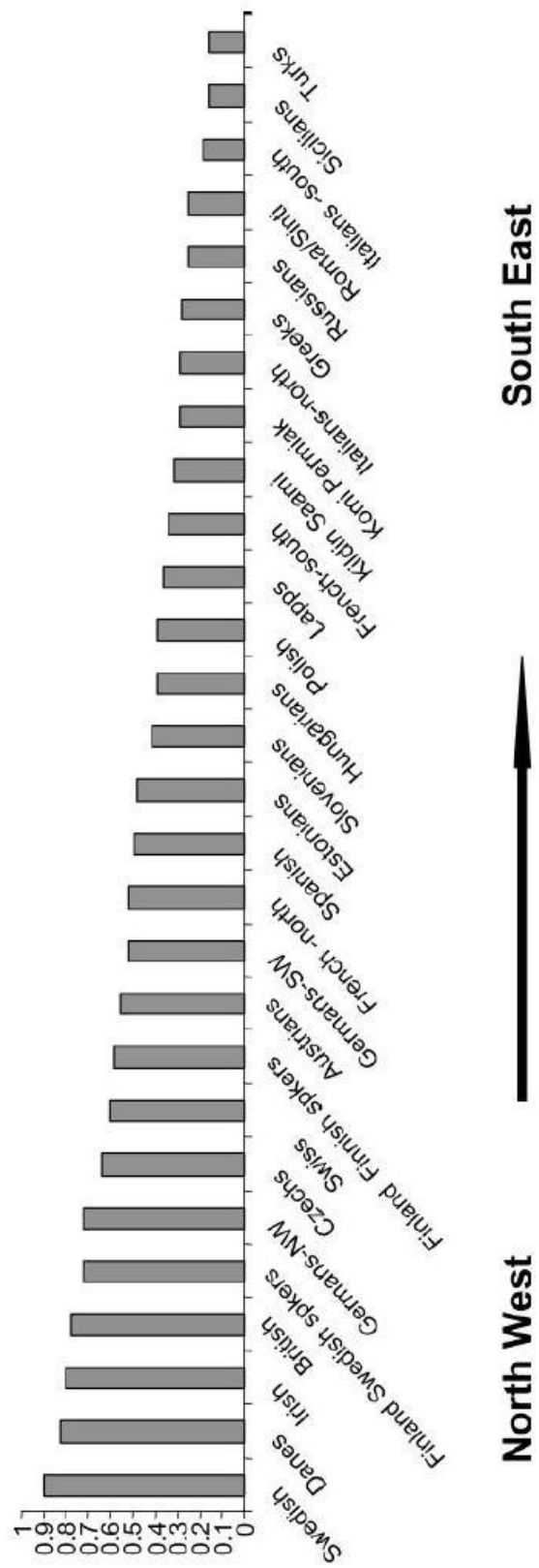
Prevalence of adult primary lactase deficiency (percentage of adult population)^a

France	30–40
Germany	15–20
Russia	20–30
Finland	15–20
Sweden	<5
Greece	70–80
Ethiopia	80–90
Nigeria	80–90
Nomadic Fulani	<10
Sudan	60–65
China	90–100
Japan	95–100
India	60–65
Jordan	20–25
Israel	70–80
Israel, Jemenites	40–50
North America, Whites	10–15
North America, Blacks	65–70
North America, Indians	85–90
Mexico	50–60
Uruguay	60–65
South America, Indians	90–100
Greenland eskimos	85–90
Australia, Aborigines	80–85

Obr. 9: Výskyt primární laktózy deficiencie (procenta jsou uvedena pro dospělou populaci) (Schaafsma 2008).



Obr. 10: Frekvence laktázové perzistence ve světě (Itan et al. 2010, Leonardi *et al.* 2012).



Obr. 11: Evropské populace v pořadí podle sestupující frekvence laktázové perzistence (Swallow 2003).

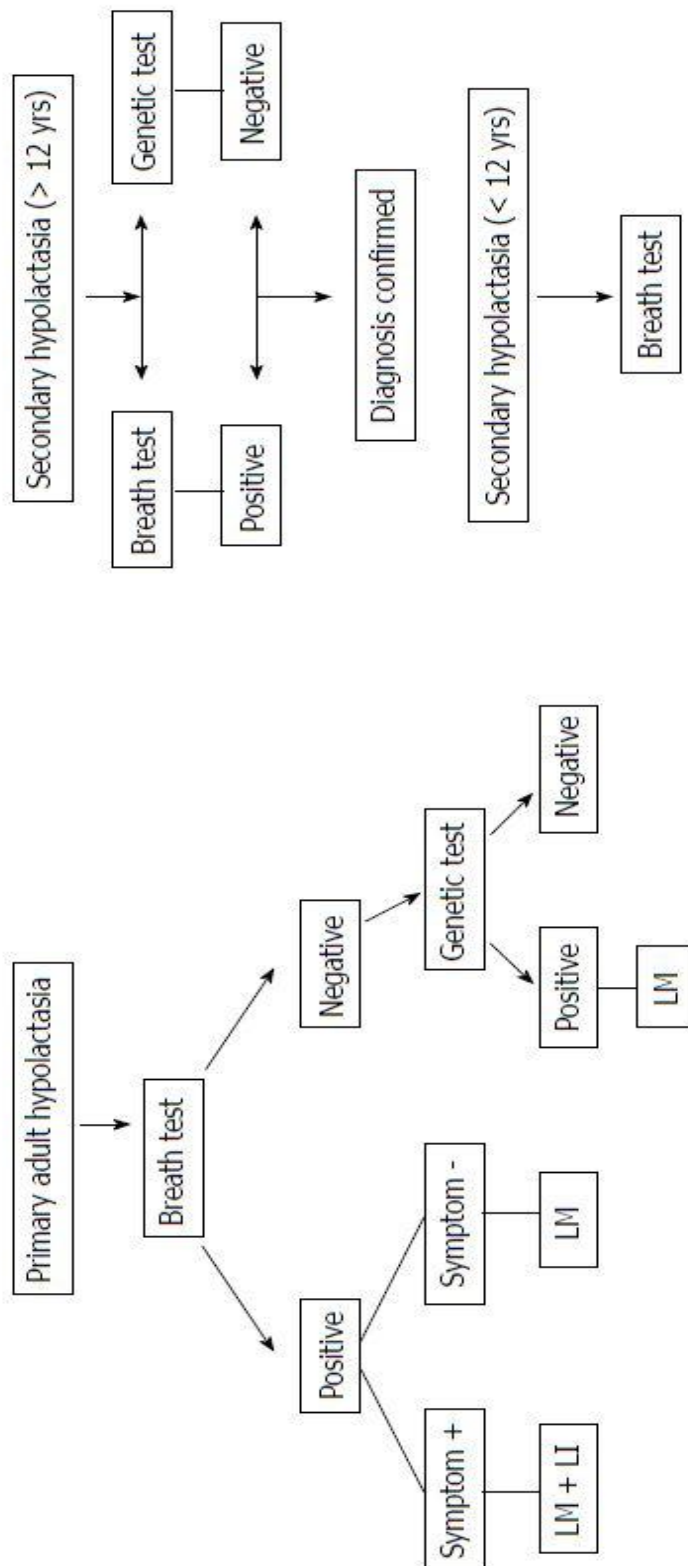
2. 7 Diagnostika

Diagnostika laktóзовé intolerance je poměrně jednoduchá a nabízí nám mnoho možností (Newcomer *et al.* 1975). K diagnostice hypolaktázie mohou být použity následující testy: laktóзовý toleranční test, expoziční test, test kyselosti stolice, dechový vodíkový test, biopsie sliznice tenkého střeva a genetický test (Weiskirchen *et al.* 2007).

Na obrázku 12 je znázorněn diagnostický algoritmus doporučený pro určení laktóзовé intolerance a laktóзовé malabsorpce v případě primární hypolaktázie a sekundární hypolaktázie.

Při podezření na primární deficit laktázy lékaři nejdříve provádějí dechový test. U jedinců s pozitivním výsledkem diagnostikují podle klinických symptomů laktóзовou intoleranci nebo laktóзовou malabsorpci. U jedinců s negativním výsledkem dechového testu se dále provádí genetický test, podle kterého určují vrozenou laktóзовou intoleranci.

Postup vyšetřování sekundární hypolaktázie se liší u věkových skupin do 12 let a nad 12 let věku. U jedinců mladších 12 let se předpokládá, že aktivita laktázy částečně přetrvává a provádí se tedy jen dechový test. Při jeho pozitivitě je diagnóza sekundární hypolaktázie potvrzena. U starších 12 let je potřeba provést jak dechový, tak i genetický test. Při současné pozitivitě dechového testu a negativitě genetického testu je diagnostikována sekundární hypolaktázie.



Obr. 12: Diagnostický algoritmus doporučený pro určení laktózové malabsorpce a intolerance (Usai-Satta *et al.* 2012). LI = laktózová intolerance, LM = malabsorpce laktózy.

2. 7. 1 Laktózový toleranční test

Při laktózovém tolerančním testu se měří hladina cukru v krvi po vypití roztoku obsahujícího vysoké množství laktózy (URL 9). Hladina glukózy v krvi se měří každých 30 minut po dobu dvou hodin (URL 10). Pokud hladina glukózy nestoupá, znamená to, že tělo špatně tráví laktózu (URL 9). Před testem by se nemělo jíst ani pít. Falešně negativní výsledky se mohou vyskytnout u pacientů s diabetem a se syndromem bakteriálního přerůstání a u pacientů s poruchou glukózové tolerance (Misselwitz *et al.* 2014). Laktózový toleranční test má citlivost 75 % a specifitu 96 % (Fojík *et al.* 2013). Tento test se neprovádí u kojenců (URL 10).

2. 7. 2 Expoziční test

Expoziční test spočívá v podání jednoho litru mléka, který obsahuje 50 g laktózy (Fojík *et al.* 2013). Při rozvoji gastrointestinálních příznaků jako je průjem, nadýmání, křeče a bolesti břicha, kručení v břiše nebo nevolnost do 4 hodin po požití je ve většině případů diagnostikována laktózová intolerance (Misselwitz *et al.* 2014).

2. 7. 3 Test kyselosti stolice

Zejména u kojenců a dětí, které nemohou podstoupit jiné testy, lze použít test kyselosti stolice. Nestrávená laktóza kvasí v tlustém střevě a vytváří zde krátké mastné kyseliny, které jsou následně detekovány ve vzorku stolice, pH stolice klesá pod 6 (URL 9, Martini and Savaiano 1988).

2. 7. 4 Dechový vodíkový test

Dechový vodíkový test je založen na fermentaci nestrávené laktózy střevní flórou. Ta produkuje vodík, oxid uhličitý a metan. Tyto plyny jsou absorbovány a vylučovány do plic (Mattar *et al.* 2012). Test je velice jednoduchý a neinvazivní (Castiglione *et al.* 2008). Po vypití testovacího roztoku, kdy je přijímáno množství laktózy 2 g na kg váhy (maximálně 25 g laktózy), se měří množství vodíku v dechu po dobu tří hodin v 30 minutových intervalech. Přesto, že je test široce používán, jeho spolehlivost závisí na aktivitě

bakteriální flóry (Mattar *et al.* 2012). U dechového vodíkového testu je popisováno až 20 % jak falešně pozitivních, tak falešně negativních výsledků. Falešně pozitivní výsledky se objevují při kouření a nedostatečném hladovění před vyšetřením. Falešně negativní výsledek je přítomen po nedávném užití antibiotik, střevní dysmikrobii a u pacientů s plicními poruchami. (Fojík *et al.* 2013). Tento test se neprovádí u kojenců a dětí, protože může způsobit těžké průjemy (URL 10).

2. 7. 5 Biopsie sliznice tenkého střeva s imunohistochemickým vyšetřením

Tato diagnostická metoda dokáže stanovit aktivitu disacharidáz ve sliznici tenkého střeva. Bioptický vzorek se ale musí odebrat při endoskopickém vyšetření, tedy při gastrokopii nebo enteroskopii. V důsledku své invazivní povahy je biopsie těžko přijímána pacienty (Swallow 2003). Aktivita se stanovuje ve stupnici normální aktivita, lehký, střední a těžký deficit. Výhodou je odlišení sekundárních příčin deficitu laktázy spojeným s jiným postižením sliznice, nejčastěji asociovaným s celiakií (Fojík *et al.* 2013, Swallow 2003).

2. 7. 6 Genetický test

Genetický test se provádí na základě detekce polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018 zejména v bělošských populacích. Primární intolerance laktózy je spojována mimo Evropu také s jinými polymorfismy G/C-14010, T/G-13915 a C/G-13907 (Mądry *et al.* 2010, Rasinperä *et al.* 2004, Enattah *et al.* 2002, Enattah *et al.* 2007). Genetický test poskytuje přesný kvalitativní výsledek a ve srovnání s ostatními testy je jednoduchý, neinvazivní a nevyvolává příznaky intolerance laktózy (Mattar *et al.* 2012).

2. 8 Laktózová intolerance versus alergie na mléko

Intolerance laktózy je často zaměňována za alergii na mléko. Alergie je vyvolána mléčnými bílkovinami, kdy lze prokázat zapojení imunitního systému (Madsen 1997). Jedná se o alergii především na bílkovinu kasein (Docena *et al.* 1996, Lam *et al.* 2008). U dětí se výskyt alergie na mléko odhaduje na 2 až 6 %, vznik alergie na mléko v dospělosti je velmi řídký a pohybuje se v rozmezí 0,1 až 0,5 % (Docena *et al.* 1996). Potravinová intolerance se projevuje obtížemi zdánlivě alergického typu, ale bez prokázaného zapojení imunitního systému (Madsen 1997).

Základní rozdíly mezi laktózovou intolerancí a alergií na mléčné bílkoviny shrnuje následující tabulka (Tab. IV).

Tab. IV: Srovnání intolerance laktózy a alergie na mléko (Čurda 2006, URL 3).

	Intolerance laktózy	Alergie na mléko
Podstata zdravotních obtíží	Enzymová deficience	Imunologická reakce
Příčina	Laktóza	Mléčné bílkoviny
Příznaky	Nadýmání, průjem, bolesti břicha	Ekzémy, nevolnost, průjem, kolika, dýchací potíže, anafylaktický šok
Výskyt	Častý - především u dospělých	Nízký - téměř výhradně u malých dětí
Závislost na rasové příslušnosti	Vysoká	Nízká
Dietní opatření	Omezení laktózy	Náhrada mléka speciální výživou; hydrolyzáty mléčných bílkovin
Prognóza	Trvalá porucha s výjimkou sekundární deficience	Po 5. roce věku se obvykle příznaky zmírní nebo vymizí
Prevence	Kojení	Neexistuje
Technologie pro zpracování mléka	Hydrolýza nebo chromatografické odstranění laktózy	Hydrolýza mléčných bílkovin, náhrada sójovou bílkovinou

2. 9 Klinické projevy laktóзовé intolerance

Laktóзовá a z toho vyplývající potravinová intolerance způsobuje širokou škálu střevních a systemických symptomů (Matthews *et al.*, 2005, Campbell *et al.* 2010). Intolerance laktóзы je definována výskytem klinických příznaků, jako jsou osmotický průjem, nadýmání, křeče a bolesti břicha, kručení v břiše, nevolnost, bolest hlavy (Alm 1982). Podobnost příznaků laktóзовé intolerance s jinými gastrointestinálními potížemi může komplikovat správnou diagnózu (Tag *et al.* 2008).

Příznaky jsou u jednotlivců prezentovány s individuální intenzitou (Mattar *et al.* 2008), proto i výsledky řady výzkumů nejsou jednoznačné. Ne každý jedinec s vrozenou laktóзовou intolerancí plně vykazuje její příznaky, jsou zde patrné vlivy dalších nutričních a genetických faktorů (Lomer *et al.* 2008). Příznaky intolerance laktóзы se objevují od 30 min do 2 hodin po příjmu většího množství laktóзы, než jaké je tolerováno. Většina dospělých s laktázovou deficiencí má určitou zbytkovou aktivitu laktáзы a toleruje 250 ml mléka denně (Martini and Savaiano 1988).

Intolerance laktóзы nepředstavuje velké zdravotní riziko, pro postiženého jedince však může být dosti obtěžující svými klinickými příznaky. Nerozštěpená laktóза zvyšuje osmotický tlak, ten je vyrovnáván větším množstvím vody ve střevním obsahu, urychluje se průchod tenkým střevem, což dále zhoršuje vstřebávání laktóзы. Pokud se laktóза dostane do tlustého střeva, je anaerobně zkvašována přítomnou mikroflórou na vodík, metan, oxid uhličitý a krátké mastné kyseliny (octová, propionová, máselná), které snižují pH stolice pod 6 (Martini and Savaiano 1988).

2. 10 Laktóза v potravinách a lécích

Laktóза se přirozeně vyskytuje v potravě pouze v savčím mléce a mléčných výrobcích (Lomer *et al.* 2008, Vonk *et al.* 2012). Laktóза není snadno fermentovatelná kvasinkami a v důsledku toho nevede k nežádoucí produkci oxidu uhličitého a alkoholu, proto bývá používána jako přísada do potravinářských a mlékárenských výrobků (Tab. V) (Lomer *et al.* 2008).

Laktóza však nemusí být obsažena jen v mlékárenských výrobcích, ale používá se i při výrobě cukrovinek, pekárenských a masných výrobků. Využívá se přitom její nízké sladivosti tam, kde by sacharóza vedla k příliš sladké chuti, protože laktóza má ve srovnání se sacharózou asi třetinovou sladivost (Lomer *et al.* 2008, Almon *et al.* 2009, Vesa *et al.* 2000). Dále se podílí na tvorbě textury, barvě potravin a váže vodu, například v chlebu nebo ve zpracovaném masu (Lomer *et al.* 2008).

Citliví jedinci mohou mít obtíže i při užití řady léků, kde se laktóza používá jako tabletovací prostředek (Čurda 2006).

Tab. V: Obsah laktózy v některých mlékárenských výrobcích (Čurda 2006).

Výrobek	Obsah laktózy (g/100g)	Velikost porce	Obsah laktózy v porci (g)
Plnotučné mléko	4,7	250 g	11,8
Odstředěné mléko	4,9	250 g	12,3
Šlehačka	3,1	15 g	0,5
Smetana do kávy	3,8	15 g	0,6
Jogurt	4,1	150 g	6,2
Jogurt ovocný	3,0	150 g	4,5
Kefír	3,8	200 g	7,6
Zmrzlina	6,0	50-100 g	3-6
Cottage	2,2	100 g	2,2
Tvaroh měkký	3,5	100 g	3,5
Tvrdý sýr	0,0	50-100 g	0,0
Máslo	0,7	10 g	0,007
Sušené plnotučné mléko	38		
Sušené odstředěné mléko	52		
Zahuštěné slazené mléko	11		
Sušená syrovátka	74		

2. 11 Léčba

Laktózovou intoleranci nemůžeme považovat za onemocnění, její přítomnost ale způsobuje pacientům obtíže, které lze ovlivnit jednoduchými dietními opatřeními. Lékaři se zaměřují na čtyři oblasti: snížení příjmu laktózy, náhradu potravin obsahujících laktózu alternativními zdroji při zachování dostatečného příjmu energie a bílkovin, substituci enzymů a na dostatečný přísun vápníku a vitamínu D (Fojík *et al.* 2013). Během léčby příznaků ATH je třeba rozlišovat mezi primárním a sekundárním deficitem laktázy. U sekundární formy je nutná dočasná laktózová dieta, dokud se jedinec kompletně nezbaví příčinného patologického stavu (Usai-Satta *et al.* 2012).

2. 11. 1 Snížení příjmu laktózy

Pokud se má být snížen příjem laktózy, je nutné, aby pacienti byli poučeni o dietních opatřeních a o obsahu laktózy v běžných potravinách. Zdaleka nejvyšší koncentrace laktózy v potravinách se nachází v sušeném mléce (52,9 g/100 g), v kravském mléce (4,7g/100 ml) a pak ve zmrzlině (smetana). Tvaroh, kysané výrobky a tvarohové jogurty obsahují jen malé množství laktózy a záleží tedy na velikosti dávky, která bude přijata. Tvrdé a měkké sýry a máslo již obsahují jen minimální množství laktózy, a to díky zrání sýrů a zpracování másla (Martini and Savaiano 1988, Fojík *et al.* 2013). Úplné vyloučení mléka a mléčných výrobků ze stravy, může mít vážné nutriční nevýhody, jedná se o snížení příjmu vápníku a vitamínů, proto se nedoporučuje (Lee and Krasinski 1998, Usai-Satta *et al.* 2012).

2. 11. 2 Enzymová substituce

Principem enzymové substituce je umělé dodání laktázy do organismu. Komerčně dostupné přípravky s obsahem laktázy jsou poměrně drahé. Jsou vyráběny z nelidských zdrojů, z bakteriální či kvasinkové beta galaktosidázy (Di Rienzo *et al.* 2013). Tyto doplňky se užívají současně s potravou obsahující laktózu a vedou ke zmírnění příznaků. Nicméně, nejsou schopny zcela hydrolyzovat všechnu laktózu a výsledky jsou variabilní. Dokonce jsou dnes k dispozici i mléka s již hydrolyzovanou laktózou (Fojík *et al.* 2013, Di Rienzo *et al.* 2013).

2. 11. 3 Živé kultury v kysaných výrobcích a jogurtech

Živé kultury produkují bakteriální beta-galaktosidázu, která hydrolyzuje laktózu. Proto jogurty a kysané výrobky mohou být dobrou alternativou nahrazující mléko (Guarner *et al.* 2005). V průběhu mléčného kvašení je obsah laktózy snížen z 25-50 % na přibližně 4 %. 18 g laktózy v jogurtu má za následek významně méně symptomů intolerance (Brown-Easters *et al.* 2012). Nicméně některé (trvanlivé) jogurty jsou obohacovány laktózou pro zlepšení chuti, pak se obsahem laktózy rovnají mléku (Fojík *et al.* 2013).

2. 11. 4 Příjem vápníku

Omezení příjmu mléka a mléčných výrobků může vést ke sníženému příjmu vápníku, což následně vede ke zvýšenému riziku osteoporózy a fraktur kostí (Bronner and Pansu 1998, Misselwitz *et al.* 2014). Denní potřeba vápníku je 800 mg/den, u těhotných a kojících 1800 mg/den (URL 7, Bronner and Pansu 1998). Dostatečný příjem vápníku lze docílit i jinými potravinami. Alternativním zdrojem vápníku mohou být cereálie, luštěniny, zelenina a mák (URL 7).

2. 11. 5 Suplementace vápníku

Většina medikamentů nebo doplňků stravy určených k substituci vápníku obsahuje v jedné dávce 500-600 mg Ca a to ve formě uhličitanu vápenatého jako jeho nejdostupnější formy. Ten by se měl užívat nalačno, nejlépe večer. Pokud stav vyžaduje vyšší substituci kolem 1000 mg/d, pak se medikament užívá ve dvou porcích. Pokud podáváme vápník, tak vždy v kombinaci s vitamínem D (Harvey *et al.* 1996). Vitamín D se významně podílí na absorpci a udržování homeostázy vápníku v těle (Gordon *et al.* 2004).

2. 11. 6 Příjem vitamínu D

Nově je normální hladina vitamínu D stanovena na hodnotu 70 nmol/l. V našich zeměpisných šířkách se od října do května potýkáme s nedostatkem slunečního svitu. V kůži se normálně vytváří 85-90 % celkové potřeby vitamínu D pro organismus. Proto při běžné expozici slunečního svitu je tvorba vitamínu D v kůži nedostatečná. Jen malá část vitamínu

D je přijímána potravou. V dnešní době je vitamínem D fortifikováno hlavně mléko a mléčné výrobky. Také proto pacienti s laktózovou intolerancí mohou trpět deficitem vitamínu D. Je vhodné u nich změřit hladinu vitamínu D a dle potřeby ji substituovat. Vysokým rizikem deficitu vápníku a vitamínu D jsou postiženi hlavně pacienti se sekundárním laktózovým deficitem. Jsou to pacienti s celiakií, Crohnovou chorobou a ulcerózní kolitidou (Gordon *et al.* 2004).

2. 12 Důsledky laktózové intolerance

Laktózová intolerance má vliv na příjem vápníku a tím i na zdraví kostí (Tolonen *et al.* 2010, Laaksonen *et al.* 2009). Laktóza podporuje absorpci vápníku a osifikaci osteoidu. Při požití laktózy u lidí s intolerancí dochází ke snížení vstřebávání vápníku z tenkého střeva jak redukcí absorpční rychlosti (zředění), tak zrychlenou pasáží (osmotický průjem). Proto se laktózová intolerance se považuje za významný rizikový faktor pro osteoporózu (Fojtík *et al.* 2009). Při nižší konzumaci mléčných produktů se také zvyšuje riziko fraktur kostí (Misselwitz *et al.* 2014).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. 1 Cíl experimentální práce

Cílem experimentální části této práce bylo zvládnutí izolačních metod DNA z periferní krve a bukalního stěru. Dále end-point PCR, která zahrnovala optimalizaci, přípravu a provedení PCR reakce a gelovou elektroforézu. Následně také přečištění PCR produktu, restriční štěpení PCR produktu, analýzu získaných dat a zpracování výsledků.

3. 2 Princip vyšetření

Pro detekci polymorfismů spojovaných s laktózovou intolerancí byly použity dvě molekulárně-genetické metody: polymerázová řetězová reakce (PCR) a polymorfismus restričních fragmentů (RFLP), označované zkratkou RFLP-PCR. Princip metody spočívá v amplifikaci specifického cílového místa genomu pomocí alelově specifické PCR. Získaný PCR produkt je dále štěpen pomocí restriční endonukleázy v místě se specifickou nukleotidovou sekvencí. Vzniklé fragmenty o jasně definované délce jsou následně detekovány a vizualizovány pomocí agarózové gelové elektroforézy a příslušného detekčního systému.

3. 3 Metodika vyšetření

3. 3. 1 Izolace genomové DNA

Pro získání genomové DNA byly použity dva typy primárních vzorků, bukalní stěr nebo nesražená periferní krev. Volba izolační metody závisela na typu primárního vzorku. Pro izolaci DNA byly použity komerční kity a izolace byla provedena dle přiložených instrukcí od výrobce. Volba primárního vzorku není nijak zásadní vzhledem k výsledné koncentraci a kvalitě DNA. Protokoly pro izolaci DNA z bukalního stěru a z plné periferní krve jsou uvedeny v přílohách (Příloha 1 a Příloha 2).

3. 3. 2 Měření koncentrace DNA

Koncentrace nukleových kyselin byla měřena pomocí fluorometru Qubit[®]2.0 dle pracovního protokolu přiloženého jako Příloha 3.

3. 3. 3 PCR reakce - optimalizace, příprava, provedení

PCR reakce byla připravována v laminárním boxu (ESCO PCR Cabinet) dekontaminovaném UV-zářením. Pro analýzu vybraných polymorfismů byla použita MyTaq[™] Red DNA Polymerase (Bioline) dle doporučení výrobce a následných optimalizačních kroků. Metoda byla optimalizována vzhledem k množství polymerázy, primerů a DNA a také vzhledem k reakčním teplotám a časům v rámci amplifikační reakce. Master mix pro jednotlivé PCR reakce byl připravován v chladícím stojánku.

Pro analýzu polymorfismu C/T-13910 byly použity primery LAC 13910 C/T_for, LAC 13910 C/T_rev, pro analýzu polymorfismu G/A-22018 primery LAC 22018 G/A_for a LAC 22018 G/A_rev.

Sekvence primerů:

LAC 13910 C/T_for: 5'-GCT GGC AAT ACA GAT AAG ATA ATG GA-3'

LAC 13910 C/T_rev: 5'-CTG CTT TGG TTG AAG CGA AGA T -3'

LAC 22018 G/A_for: 5'-CTC AGT GAT CCT CCC ACC TC -3'

LAC 22018 G/A_rev: 5'-CCC CTA CCC TAT CAG TAA AGG C -3'

* for = forward, rev = reverse

Master mix pro PCR reakci byl pipetován v následujících poměrech (Tab. VI, Tab. VII a Tab. VIII).

Tab. VI: Složení master mixu pro jednu reakci pro polymorfismus C/T-13910.

H ₂ O	34,3 µl
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10 µl
MyTaq Polymerase (5U/µl)	0,2 µl
DMSO (100 %)	2,5 µl
Primery for + rev (20 pmol)	0,5 µl + 0,5 µl
Celkem	48 µl
DNA	2 µl

Tab. VII: Složení master mixu pro jednu reakci pro polymorfismus G/A-22018 před optimalizací.

H ₂ O	30,1 µl
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10 µl
MyTaq Polymerase (5U/µl)	0,4 µl
DMSO (100 %)	2,5 µl
Primery for + rev (20 pmol)	2,5 µl + 2,5 µl
Celkem	48 µl
DNA	2 µl

Tab. VIII: Složení master mixu pro jednu reakci pro polymorfismus G/A-22018 po optimalizaci.

H ₂ O	34,3 µl
5x MyTaq Red Reaction Buffer	10 µl
MyTaq Polymerase (5U/µl)	0,2 µl
DMSO (100 %)	2,5 µl
Primery for + rev (20 pmol)	0,5 µl + 0,5 µl
Celkem	48 µl
DNA	2 µl

Směs pro PCR reakci byla následně rozpipetována po 48 µl do každé zkumavky (řádně popsané) a k ní byla přidána izolovaná DNA testovaných vzorků. V rámci každé analýzy byly vždy použity pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA se známým genotypem a jako negativní kontrola (kontrola možné kontaminace) pak reakční směs bez přidané DNA. Po krátkém vortexování a stočení byly

vzorky vloženy do termocycleru (MultiGene, Labnet International, Inc.). V termocycleru byl zvolen příslušný reakční program (Tab. IX).

Mimo optimalizaci reakčního protokolu byla PCR reakce zoptimalizována zejména v případě polymorfismu G/A-22018, kdy bylo upraveno množství MyTaq polymerázy a primerů forward i reverse (Tab VII a Tab. VIII).

Tab. IX: Finální reakční protokol pro detekci polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018.

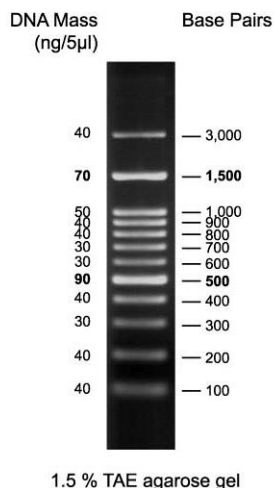
PCR protokol		C/T-13910	G/A-22018	C/T-13910	G/A -22018
Denaturace		5 min.	5 min.	95 °C	95 °C
Denaturace		45 s	60 s	95 °C	95 °C
Anealing	35 cyklů	45 s	60 s	57,9 °C	60,1 °C
Extenze		45 s	60 s	72 °C	72 °C
Extenze		5 min.	5 min.	72 °C	72 °C

3. 3. 4 Kontrola PCR produktu na agarózovém gelu

Pro kontrolu PCR produktu byl použit 4 % agarózový gel dle protokolu v Příloze 4. Po nanesení vzorků byla spuštěna elektroforéza (100 - 135 V na 10-15 min.).

Průběh elektroforézy bylo možné sledovat pomocí speciálního iluminátoru (MupidTMLED Illuminator). Po proběhnutí elektroforézy byl gel zdokumentován pomocí detekčního systému FastGene® GelPic LED Box, fotografie gelu byla přenesena do počítače.

Výsledkem amplifikační reakce byl produkt o velikosti 201 bp pro polymorfismus C/T-13910 a 271 bp pro polymorfismus G/A-22018.



Obr. 13: Použitý marker: 100 bp DNA Ladder H3 RTU (URL 5).

3. 3. 5 Přečištění PCR produktu

Přečištění a zakoncentrování PCR produktu bylo prováděno alkoholovým srážením přes noc. Tímto krokem byl získán zakoncentrovaný a přečištěný PCR produkt o požadovaném objemu 10 µl (viz Příloha 5).

3. 3. 6 Restrikční štěpení

Míchání restrikční reakce bylo provedeno v předem vychlazeném stojánku. K přečištěnému PCR produktu byl přidán restrikční enzym *Hinf*I (NE BioLabs) a *Hin*6I (ThermoScientific) a příslušný restrikční pufr v poměru, který znázorňuje tabulka X.. Inkubace probíhala 1 hodinu v termostatu (TDB 120, BioSan) při teplotě 37°C.

Oblasti restrikčního štěpení:

*Hinf*I

5' ... G ↓ A N T C ... 3'

3' ... C T N A ↑ G ... 5'

*Hin*6I

5' ... G ↓ C G C ... 3'

3' ... C G C ↑ G ... 5'

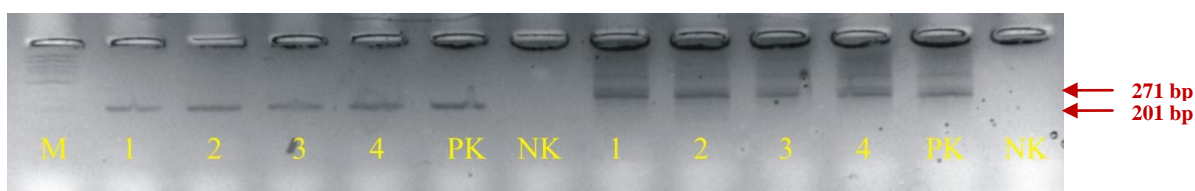
Tab. X: Mix pro restriční štěpení pro jednu reakci do 12 μ l.

Polymorfismus	Přečištěný PCR produkt	Restriční enzym	Restriční pufr
C/T-13910	10 μ l	1 μ l HinfI (10 U)	1,2 μ l 10x NBE buffer
G/A-22018	10 μ l	1 μ l Hin6I (10 U)	1,2 μ l 10x Tango buffer

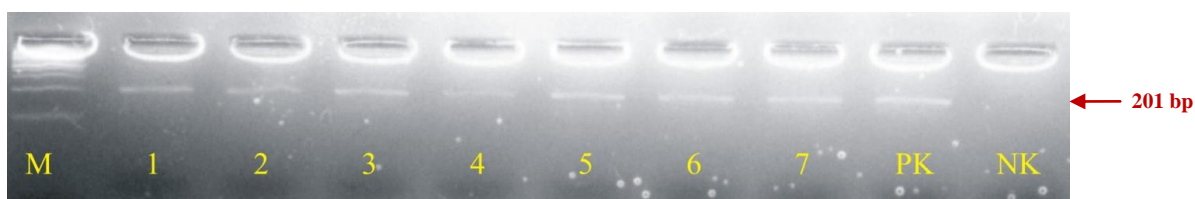
Po inkubaci byla provedena kontrola restričního štěpení na 4 % agarózovém gelu (100-135 V po dobu 10-15 minut). Ke vzorkům byly přidány 2 μ l vkladací barvy DNA Loading Buffer Blue, která umožňuje díky svému složení nanést analyzovaný produkt na gel a sledovat jeho pohyb v elektrickém poli.

3. 4 Analýza získaných dat

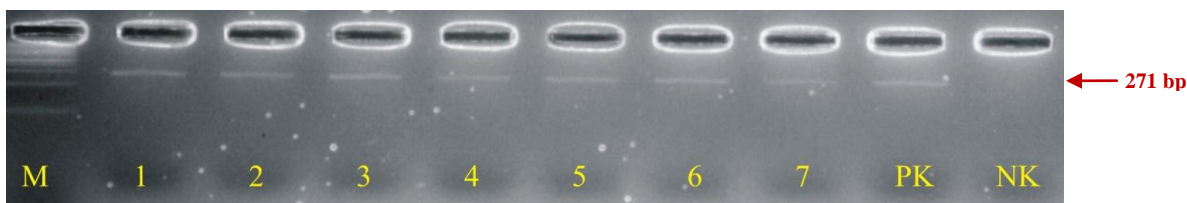
Během amplifikační reakce vznikl PCR produkt o velikosti 201 bp pro polymorfismus C/T-13910 (Obr. 14 a Obr. 15), a o velikosti 271 bp v případě polymorfismu G/A- 22018 (Obr. 14 a Obr. 16).



Obr. 14: Kontrola PCR produktu před optimalizací PCR reakce na 4 % agarózovém gelu. M - marker; PK - pozitivní kontrola; NK - negativní kontrola; čísla 1-4 vlevo představují PCR produkty pro polymorfismus C/T-13910 (201 bp); čísla 1-4 vpravo představují PCR produkty pro polymorfismus G/A-22018 (271 bp).



Obr. 15: Kontrola PCR produktu po optimalizaci pro polymorfismus C/T-13910 na 4 % agarózovém gelu. M - marker; PK - pozitivní kontrola; NK - negativní kontrola; čísla 1-7 představují PCR produkty (velikost 201 bp).

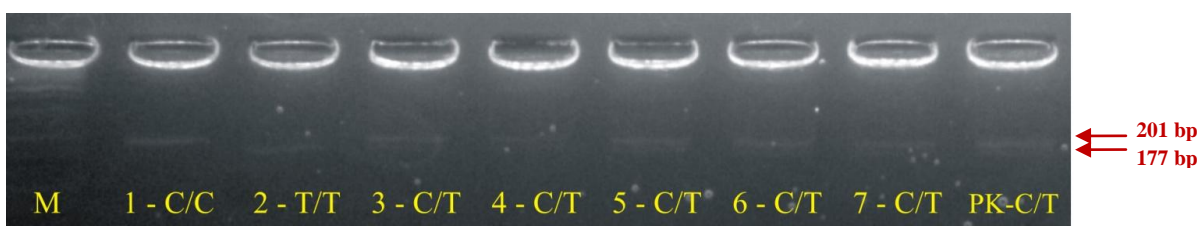


Obr. 16: Kontrola PCR produktu po optimalizaci pro polymorfismus G/A-22018 na 4 % agarózovém gelu. M - marker; PK - pozitivní kontrola (271 bp); NK - negativní kontrola; čísla 1-7 představují PCR produkty (271 bp).

Možné výsledky restričního štěpení a příslušné genotypy pro polymorfismus C/T-13910 jsou uvedeny v tabulce XI. Výsledky restričního štěpení jsou názorně vidět na fotografii gelu (Obr. 17).

Tab. XI: Restriční štěpení PCR produktu (původní velikost 201bp) restriktázou HinfI pro polymorfismus C/T-13910.

	Délky restričních fragmentů	Genotyp
Laktázová perzistence	177 bp + 24 bp	T/T
Heterozygot	201 bp + 177 bp + 24 bp	C/T
Laktázová non-perzistence	201 bp	C/C

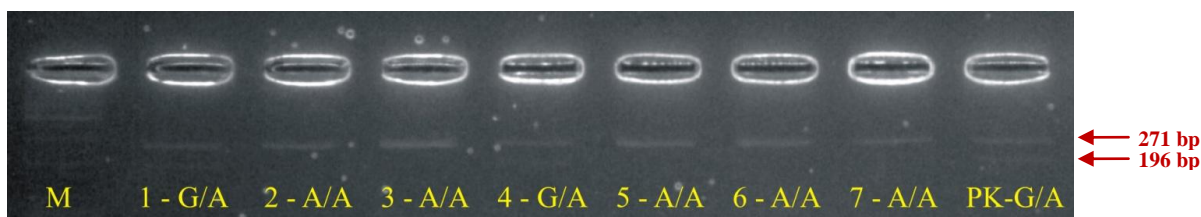


Obr.17: Výsledky restričního štěpení u polymorfismu C/T-13910, 4 % agarózový gel. M - hmotnostní marker; PK - pozitivní kontrola; čísla 1-7 představují jednotlivé vzorky, pomocí písmen jsou uvedeny výsledné genotypy odpovídající délce restričních fragmentů..

Možné výsledky restričního štěpení a příslušné genotypy pro polymorfismus G/A-22018 jsou uvedeny v tabulce XII. Výsledky restričního štěpení jsou názorně vidět na fotografii gelu (Obr. 18).

Tab. XII: Restrikční štěpení PCR produktu restriktázou Hin6I (původní velikost 271 bp) pro polymorfismus G/A-22018.

	Délky restrikčních fragmentů	Genotyp
Laktázová perzistence	271 bp	A/A
Heterozygot	271 bp + 196 bp + 75 bp	G/A
Laktázová non-perzistence	196 bp + 75 bp	G/G



Obr.18: Výsledky restrikčního štěpení u polymorfismu G/A-22018, 4 % agarózový gel. M - hmotnostní marker; PK - pozitivní kontrola; čísla 1-7 představují jednotlivé vzorky, pomocí písmen jsou uvedeny výsledné genotypy odpovídající délce restrikčních fragmentů.

K vizualizaci restrikčních fragmentů byl použit 4 % agarózový gel, hmotnostní marker (10 bp DNA Ladder H3 RTU) a vkladací barva (DNA Loading Buffer Blue). Fragmenty 24 bp a 75 bp byly těžko detekovatelné vzhledem k jejich velikostem.

3. 5 Výsledky

3. 5. 1 Výsledky zpracované v genetické laboratoři

V genetické laboratoři GENLABS bylo vyšetřeno celkem 34 jedinců na laktózovou intoleranci a polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018 metodou RFLP PCR. Tabulka XIII znázorňuje výsledky vyšetření pro polymorfismus C/T-13910. V Tabulce XIV jsou zobrazeny výsledky vyšetření pro druhý polymorfismus spojený s laktózovou intolerancí G/A-22018. V tabulce XV je znázorněna četnost jednotlivých genotypů.

Tab. XIII: Výsledky vyšetření pro polymorfismus C/T-13910.

Výsledek	Genotyp	Počet jedinců
Laktázová perzistence	T/T	4
Heterozygot	C/T	22
Laktázová non-perzistence	C/C	8

Tab. XIV : Výsledky vyšetření pro polymorfismus G/A-22018.

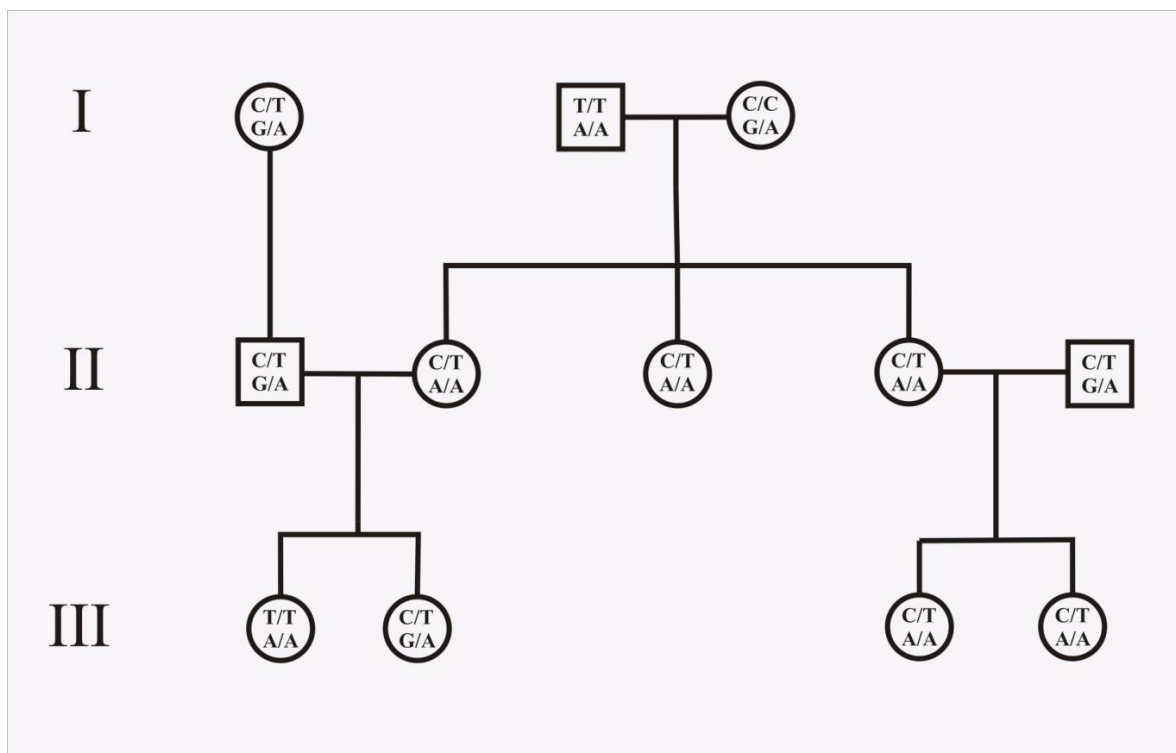
Výsledek	Genotyp	Počet jedinců
Laktázová perzistence	A/A	9
Heterozygot	G/A	18
Laktázová non-perzistence	G/G	7

Tab. XV: Výsledky vyšetřovaných jedinců pro oba polymorfismy (C/T-13910 a G/A-22018) současně.

G/A-22018 C/T-13910	AA	GA	GG
	TT	4	0
CT	5	17	0
CC	0	1	7

3. 5. 2 Výsledky vyšetřených jedinců v příbuzenské souvislosti

V rámci experimentální práce byly vyšetřeny 3 generace jedné rodiny. Výsledky vyšetření jsou zobrazeny na následujícím obrázku (Obr. 19).



Obr. 19: Rodokmen příbuzných jedinců v I, II a III generaci a výsledky vyšetření laktózní intolerance pro polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018.

4 DISKUZE

Existuje poměrně hodně způsobů jak určit a diagnostikovat laktózovou intoleranci. Nejspolehlivějším způsobem jak zachytit přímo aktivitu disacharidáz je biopsie sliznice tenkého střeva. Tento test má ale velké zápory, zejména v jeho invazivitě. Dalším záporem může být nepřesnost výsledku vyšetření způsobená odebráním bioptické tkáně s rozdílnou aktivitou enzymů. K tomu může dojít, při odebrání tkáně z úseku tenkého střeva, který není zrovna podrážděný či poškozený. Výhodou tohoto přístupu je rozlišení sekundárních příčin intolerance laktózy.

Nejpřesnějším testem tedy zůstává genetický test detekující polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018 v bělošské populaci. Ve srovnání s ostatními testy je genetický test jednoduchý, neinvazivní, pohodlnější a nevyvolává příznaky intolerance laktózy. Je možné, že existují ještě jiné polymorfnní varianty genů ovlivňující diagnostickou přesnost laktózové intolerance zejména v neevropských populacích. Vyloučena není ani možnost existence dalších polymorfnních míst v genomu, které se na této potravinové intoleranci také podílí a ještě nebyly detekovány a popsány. Je jen otázkou času, kdy vědci vytvoří multiplex, který by snadno testoval všechny známé polymorfismy spojované s laktózovou intolerancí.

Dalšími možnými přístupy pro testování intolerance jsou: expoziční test, laktózový toleranční test, dechový vodíkový test a test kyselosti stolice. Kromě testu kyselosti stolice můžou všechny tyto testy vyvolat příznaky intolerance laktózy a tím jsou nevhodné pro kojence a malé děti.

K tomu, aby se zábránilo nepříznivým důsledkům laktózové intolerance, je třeba upravit stravu tak, aby tělo dokázalo přijmout všechny důležité látky a nedocházelo k nepříjemným klinickým projevům laktózové intolerance. Existuje několik možností jak toho docílit. Nejlepším způsobem by bylo přijímat laktózu v mléčných výrobcích v přijatelných dávkách, po kterých nedojde k projevům intolerance a podle toho uzpůsobit případnou suplementaci vápníku a vitamínu D. Nicméně v případě velké citlivosti na laktózu je potřeba se vyhnout všem produktům, které ji obsahují a zcela spoléhnout na náhradní zdroje živin.

Prevalence této běžné gastrointestinální poruchy může být zásadně ovlivněna možnostmi jejího testování, jak polymorfismů C/T-1910 a G/A-22018, tak i dalších nově

objevených variantních genů. Na světě jsou ale také místa, kde se současně objevené polymorfismy spojené s laktózovou intolerancí nevyskytují, lze tedy předpokládat, že ještě dosud nebyly objeveny všechny.

V rámci experimentální části této práce bylo vyšetřeno celkově 34 jedinců metodou RFLP-PCR. Vyšetření bylo provedeno pro polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018.

Ve většině případů byl zachycen heterozygotní genotyp CT v pozici 13910 (Tab. XIII) a GA v pozici 22018 (Tab. XIV), který může vést k rozvoji laktózové intolerance. Heterozygotní jedinci nemusí mít problémy s trávením laktózy, ale při větším dlouhodobém stresu, či nemoci mohou mít tendenci netolerovat laktózu.

Genotyp asociovaný s laktózovou perzistencí TT/AA (variantní homozygot) byl zachycen pouze ve 4 případech (Tab. XV). U tohoto genotypu je zachována činnost enzymu laktázy i v dospělosti a mléčný cukr je plně tolerován. Naopak jedinci s genotypem CC/GG (původní homozygotní genotyp), u kterých není laktáza ve střevním epitelu v dospělosti téměř zjištělná, byly zachyceni také v poměrně malém počtu sedmi jedinců. Zcela vyjimečně byly zachyceny netradiční kombinované genotypy CT/AA a CC/GA.

Z celkových 34 jedinců vyšetřených v laboratoři pocházelo 12 jedinců z jedné rodiny (Obr.19), kdy byly testovány celkem tři generace. Právě v rámci této rodiny byly zachyceny netradiční genotypy CT/AA a CC/GA.

Příslušníci této rodiny neměli žádné problémy s trávením laktózy ani ve větších dávkách. Jedinec s genotypem CC/GA také nikdy nezpozoroval žádný z projevů laktózové intolerance po požití mléka a jiných potravin obsahujících laktózu. To, že přetrvává aktivita laktázy ve střevě, může být způsobeno neobvykle dlouhou dobou kojení jedince v mládí. V první a třetí generaci byli zachyceni jedinci s laktázovou perzistencí (TT/AA). Heterozygotní genotyp měli v této rodině jen 4 lidé.

Nejčastěji v této rodině byl identifikován kombinovaný genotyp CT/AA. O tomto genotypu je známo jen to, že je vzácný. Podle Coelho *et al.* 2005 polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018 vznikaly ve fylogenetické sekvenci C-G → C-A → T-A. Malý výskyt tohoto meziproductového genotypu potom znamená, že -22018 G→A mutace se objevila jen krátce před -13910 C→T mutací. Je důležité poznamenat, že příležitostný výskyt genotypu C-A může vést k nesprávné identifikaci laktázové perzistence na základě identifikace genotypu -22018AA (Coelho *et al.* 2005, Swallow 2003).

5 ZÁVĚR

Závěrem lze tedy říci, že zvyšující se povědomí o možnostech a způsobech diagnostiky laktóзовé intolerance vede k zpřesnění a ucelení statistik týkajících se jejího skutečného výskytu v celosvětové populaci. Při včasné diagnóze lze předejít zejména potenciálnímu deficitu důležitých látek, bez kterých může docházet k závažným problémům či jiným onemocněním, ale také k eliminaci všech nepříznivých klinických příznaků provázejících tuto potravinovou intoleranci.

V této práci jsem se snažila poskytnout přehled o problematice laktóзовé intolerance. Zabývala jsem se především obecnou definicí, příčinami, prevalencí, diagnostickými možnostmi a způsoby léčby.

V experimentální části jsem se věnovala metodice používané k detekci polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018. V genetické laboratoři bylo vyšetřeno metodou RFLP PCR 34 jedinců na přítomnost těchto dvou zásadních polymorfismů spojovaných s laktóзовou intolerancí. Při vyšetřování tří generací jedné rodiny jsem zachytila zajímavé genotypy se vzácným výskytem. Popis těchto genotypů by mohl být předmětem dalšího zkoumání.

6 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

1. ALM L. (1982): Effect of Fermentation on Lactose, Glucose, and Galactose Content in Milk and Suitability of Fermented Milk Products for Lactose Intolerant Individuals. *J Dairy Sci*, **65**, 346-352. ISSN: 0022-0302.
2. ALMON R., ÁLVAREZ-LEON E. E., ENGFELDT P., SERRA-MAJEM L. *et al.* (2010): Associations between lactose persistence and the metabolic syndrome in a cross-sectional study in the Canary Islands. *Eur J Nutr*, **49**, 141-146. ISSN: 1436-6207.
3. BERSAGLIERI T., SABETI P. C., PATTERSON N., VANDERPOLOEG T., SCHAFFNER, S F. *et al.* (2004): Genetic signatures of strong recent positive selection at the lactase gene. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 1111-1120. ISSN: 0002-9297.
4. BRONNER F., PANSU D. (1999): Nutritional Aspects of Calcium Absorption. *The Journal of Nutrition*, **129** (1), 9-12. ISSN: 0022-3166.
5. BROWN-ESTERS O., MC NAMARA P., SAVAIANO D. (2012): Dietary and biological factors influencing lactose intolerance. *International Dairy Journal*, **22**, 98-103. ISSN: 0958-6946.
6. CAMPBELL A. K., WAUD J. P., MATTHEWS S. B. (2005): The molecular basis of lactose intolerance. *Sci. Prog.*, **88** (3), 157-202. ISSN: 0036-8504.
7. CAMPBELL A. K., MATTHEWS S. B., VASSEL N., COX C. D., NASEEM R., CHAICHI J., HOLLAND I. B., GREEN J., WANN K. T. (2010): Bacterial metabolic 'toxins': A new mechanism for lactose and food intolerance, and irritable bowel syndrome. *Toxicology*, **278**, 268-276. ISSN: 0300-483X.
8. CASTIGLIONE F., DI GIROLAMO E. CIACCI C., CAPORASO N., PASQUALE L. *et al.* (2008): Lactose malabsorption: Clinical or breath test diagnosis? *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Matabolism*, **3**, e316-e320. ISSN: 1751-4991.

9. COELHO M., LUISELLI D., BERTOLELLE G., LOPES A. I. *et al.* (2005): Microsatellite variation and evolution of human lactose persistence. *Hum Genet*, **117**, 329-339. ISSN: 0340-6717.
10. CORELLA D., ARREGUI M., COLTELL O., PORTOLÉS O., *et al.* (2011): Association of the LCT-13910 C>T polymorphism with obesity and its modulation by dairy products in a Mediterranean population. *Obesity J*, **19** (8), 1707-1714. ISSN: 0307-0565.
11. ČURDA L. (2006): Mléčné výrobky a intolerance laktózy. *Potravinářská revue*, **4**, 19-22. ISSN: 1801-9102.
12. DI RIENZO T., D'ANGELO G., D'AVERSA F., CAMPANALE M. C., CESARIO V., MONTALTO M., GASBARRINI A., OJETTI V. (2013): Lactose intolerance: from diagnosis to correct management. *European review for Medical and Pharmacological Sciences*, **17** (2), 18-25. ISSN: 1128-3602.
13. DI STEFANO M., VENETO G., MALSERVISI S., CECCHETTI L., MINGUZZI L., STROCCHI A., CORRAZZA G. R. (2002): Lactose malabsorption and intolerance and peak bone mass. *Gastroenterology*, **122**, 1793-1799. ISSN: 0016-5085.
14. DI STEFANO M., TERULLA V., TANA P., MAZZOCCHI S., ROMERO E., CORAZZA G. R. (2009): Genetic test for lactase non-persistence and hydrogen breath test: Is genotype better than phenotype to diagnose malabsorption? *Digestive and Liver Disease*. **41**, 474-479. ISSN: 1590-8658.
15. DOCENA G. H., FERNANDEZ R., CHIRDO F. G., FOSSATI C. A. (1996): Identification of casein as the major allergenic and antigenic protein of cow's milk. *Allergy*, **51**, 412-416. ISSN: 0105-4538.
16. ENATTAH N. S., JENSEN T. G. K., NIELSEN M., LEWINSKI R., KUOKKANEN M. *et al.* (2008): Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. *The American Journal of Human Genetics*, **82**, 57-72. ISSN: 0002-9297.

17. ENATTAH N. S., TRUDEAU A., PIMENOFF V., MAIURI L., AURICCHIO S., GRECO L. *et al.* (2007): Evidence of still-ongoing convergence evolution of the lactase persistence T-13910 alleles in humans. *The American Journal of Human Genetics*, **81**, 615-625. ISSN: 0002-9297.
18. ENATTAH N.S., SAHI T., SAVILAHTI E., TERWILLIGER J.D., PELTONEN L., JARVELA I. (2002): Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat. Genet.*, **30**, 233-237. ISSN: 1061-4036.
19. FOJÍK P., FALT P., URBAN O., NOVOSAD P., RICHTEROVÁ L., BÓDAY A. (2013): Laktózová intolerance. *Practicus*, **5**, 7-12. ISSN: 1213-8711.
20. FOJTÍK P., URBAN O., FALT P., NOVOSAD P. (2009): Výživa a sekundární osteoporóza. *Interní medicína pro praxi*, **11** (12), 561-568. ISSN: 1212-7299.
21. FOSTER-POWELL K., HOLT S. H. A., BRAND-MILLER J. C. (2002): International table of glycemic index and glycemic load values: 2002. *Am J Clin Nutr*, **76**, 5-56. ISSN: 0002-9165.
22. GORDON C. M., DEPETER K. C., FELDMAN H. A., GRACE E., EMANS J. (2004): Prevalence of Vitamin D Deficiency Among Healthy Adolescents. *Arch Pediatr Adolesc Med.*, **158**, 531-537. ISSN: 1072-4710.
23. GRAND R. J., MONTGOMERY R. K., CHITKARA D. K., HIRSCHHORN J. N. (2003): Changing genes; losing lactase. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **52** (5), 617-619. ISSN: 2224-6509.
24. GUARNER F., PERDIGON G., CORTIER G., SALMINEN S., KOLETZKO B., MORELLI L. (2005): Should yoghurt cultures be considered probiotic? *British Journal of Nutrition*, **93**, 783-786. ISSN: 1475-2662.
25. HARVEY C. B., WANG Y., DARMOUL D., PHILLIPS A., MANTEI N., SWALLOW D. M. (1996): Characterisation of a human homologue of a yeast cell division cycle gene,

- MCM6, located adjacent to the 5' end of the lactase gene on chromosome 2q21. *Federation of European Biochemical Societies*, **398**, 135-140. ISSN: 1742-464X.
26. HOLDEN C., MACE R. (1997): Phylogenetic Analysis of Evolution of Lactose Digestion in Adults. *Human Biology*, **69** (5), 605-628. ISSN: 0018-7143.
27. INGRAM C. J. E., MULCARE CH. A., ITAN Y., THOMAS M. G., SWALLOW D. M. (2009): Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactose persistence. *Hum Genet*, **124**, 579-591. ISSN: 0340-6717.
28. KUCHAY R. A. H., THAPA B. R., MAHMOOD A., MAHMOOD S. (2011): Effect of C/T - 13910 *cis*-acting regulatory variant on expression and activity of lactase in Indian children and its implication for early genetic screening of adult-type hypolactasia. *Clinica Chimica Acta*, **412**, 1924-1930. ISSN: 0009-8981.
29. KUOKKANEN M., ENATTAH N. S., OKSANEN A., SAVILAHTI E. *et al.* (2003): Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **52**, 647-652. ISSN: 2224-6509.
30. KUOKKANEN M., KOKKONEN J., ENATTAH N. S., YLISAUKKKO-OJA T. *et al.* (2005): Mutations in the translated region of the lactose gene (LCT) underlie congenital lactose deficiency. *Am J Hum Genet*, **78**, 339-344. ISSN: 0002-9297.
31. LAAKSONEN M. M. L., IMPIVAARA O., SIEVÄNEN H., VIKARI J. S. A., LEHTIMÄKI T. J. *et al.* (2009): Associations of genetic lactase non-persistence and sex with bone loss in young adulthood. *Bone*, **44**, 1003-1009. ISSN: 8756-3282.
32. LAM H-Y., VAN HOFFEN E., MICHELSEN A., GUIKERS K., VAN DER TAS C. H. W., BRUIJNZEEL-KOOMEN C. H. F. M., KNULST A. C. (2008): Cow's milk allergy is rare but severe: both casein and whey proteins are involved. *Clinical and Experimental Allergy*, **38**, 995-1002. ISSN: 0954-7894.

33. LEE MING-FEN, KRASINSKI S. D. (1998): Human Adult-Onset Lactase Decline: An Update. *Nutrition Reviews*, **56** (1), 1-8. ISSN: 0029-6643.
34. LEONARDI M., GERBAULT P., THOMAS M. G., BURGER J. (2012): The evolution of lactase persistence in Europe. A synthesis of archaeological and genetic evidence. *International Dairy Journal*, **22**, 88-97. ISSN: 0958-6946.
35. 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.
36. MADSEN CH. (1997): Prevalence of food allergy/intolerance in Europe. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **4**, 163-167. ISSN: 1382-6689.
37. MARTINI M. C., SAVAIANO D. A. (1988): Reduced intolerance symptoms from lactose consumed during a meal. *Am J Clin Nutr*, **47**, 57-60. ISSN: 0002-9165.
38. MATTAR R., DO SOCORRO MONTEIRO M., VILLARES A., DOS DANTOS 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**, 628-630. ISSN: 0009-9120.
39. MATTAR R., DE CAMPOS MAZO D. F., CARRILHO F. J. (2012): Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clin Exp Gastroenterol*, **5**, 113-121. ISSN: 1178-7023.
40. MATTHEWS S. B., WAUD J. P., ROBERTS A. G., CAMPBELL A. K. (2005): Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad. Med. J.*, **81**, 167-173. ISSN: 0022-3859.
41. MAŁDY E., FIDLER E., WALKOWIAK J. (2010): Lactose intolerance - current state of knowledge. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, **9** (3), 343-350. ISSN: 1644-0730.

42. MISSELWITZ B., POHL D., FRÜHAUF H., FRIED M., VAVRICKA S. R., FOX M. (2013): Lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis diagnosis and treatment. *United European Gastroenterology Journal*. **1** (3), 151-159. ISSN: 2050-6406.
43. MULCARE CH. A., WEALE M. E., JONES A. L., CONNELL B. *et al.* (2004): The T allele of single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C - 13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *Am. J. Hum. Genet.*, **74**, 1102-1110. ISSN: 0002-9297.
44. NEWCOMER A. D., MCGILL D. M., THOMAS P. J., HOFMANN A. F. (1975): Prospective comparison of indirect methods for detecting lactase deficiency. *The New Journal of Medicine*, **293**, 1232. ISSN: 0028-4793.
45. OBINU D. A., ENATTAH N. S., PEDRONI A., PETONEN L., *et al.* (2010): Prevalence of lactose persistence and the performance of a non-invasive genetic test in adult Sardinian patients. *e-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, **5**, e1-e5. ISSN: 1751-4991.
46. OLDS L. C., SIBLEY E. (2003): Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element. *Human Molecular Genetic*, **12** (18), 2333-2340. ISSN: 0964-6906.
47. PIMENTEL M., LIN H.C., ENAYATI P., BURG VAN DEN B., LEE H.R., CHEN J.H., PARK S., KONG Y., CONKLIN J. (2006). Methane, a gas produced by enteric bacteria, slows intestinal transit and augments small intestinal contractile activity. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **290**, 1089-1095. ISSN: 0193-1857.
48. RANCIARO A., CAMPBELL M. C., HIRBO J. B., KO W., FROMENT A. *et al.* (2014): Genetic origins of lactase persistence and the spread of pastoralism in Africa. *The American Journal of Human Genetics*, **94**: **4**(3), 496-510. ISSN: 0002-9297.
49. RASINPERÄ H., SAVILAHTI E., ENATTAH N. S., *et al.* (2004): A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, **53**, 1571-1576. ISSN: 2224-6509.

50. SCHAAFSMA G. (2008): Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, **18**, 458-465. ISSN: 0958-6946.
51. SCHULTHEIS P. J., BOWLING B. V. (2011): Analysis of a SNP linked to lactase persistence. *The International Union of Biochemistry and Molecular Biology*, **39** (2), 133-140. Dostupné z: doi: 10.1002/bmb.20456.
52. SHULMAN R. J., FESTE A., OU C. (1995): Absorption of lactose, glucose polymers, or combination in premature infants. *The Journal of Pediatrics*, **127** (4), 626-631. ISSN: 0022-3476.
53. SOLOMONS N. W. (2002): Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. *European Journal of Clinical Nutrition*, **56** (4), S50-S55. ISSN: 0954-3007.
54. SWALLOW D. M. (2003): Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu. Rev. Genet.*, **37**, 197-219. ISSN: 0066-4197.
55. TAG C. G., OBERKANINS CH., KRIEGSHÄUSER G., INGRAM C. J. E., SWALLOW D. M. (2008): Evaluation of a novel reverse-hybridization StripAssay for typing DNA variants useful in diagnosis of adult-type hypolactasia. *Clinica Chimica Acta*, **392**, 58-62. ISSN: 0009-8981.
56. TALABRA E., PAZIENZA P., BORGHESIO E., ACTIS G. C. *et al.* (2010): LCT-13910C>T polymorphism-associated lactose malabsorption and risk for colorectal cancer in Italy. *Digestive and Liver Disease*, **42**, 741-743. ISSN: 1590-8658.
57. TISHKOFF S. A., REED F. A., RANCIARO A., VOIGHT B. F., BABBITT C. C., SILVERMAN J. S., POWELL K., MORTENSEN H. M., HIRBO J. B., OSMAN M., IBRAHIM M., OMAR S. A., LEMA G., NYAMBO T. B., GHORI J., BUMPSTEAD S., PRITCHARD J. K., WRAY G. A., DELONKAS P. (2007): Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nat. Genet.* **39** (1), 31-40. ISSN: 1061-4036.

58. TOLONEN S., LAAKSONEN M., MIKKILÄ V., SIEVÄNEN H., MONONEN N. *et al.* (2011): Lactose gene C/T-13910 polymorphism, calcium intake, and pQCT bone traits in Finnish adults. *Calcif Tissue Int*, **88**, 153-161. ISSN: 0171-967X.
59. USAI-SATTA P., SCARPA M., OPPIA F., CABRAS F. (2012): Lactose malabsorption and intolerance: What should be the best clinical management? *World Journal of Gastrointestinal Pharmacology an Therapeutics*, **3**(3), 29-33. ISSN: 2150-5349.
60. VERNIA P., CAMILLO M.D., MARINARO V., CAPRILLI R. (2003): Effect of predominant methanogenic flora on the outcome of lactose breath test in irritable bowel syndrome patients. *Eur. J. Clin. Nutr.* **57**, 1116-1119. ISSN: 0954-3007.
61. VESA T. H., MARTEAU P., KORPELA R. (2000): Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*, **19** (2), 165S-175S. ISSN: 0731-5724.
62. VONK R. J., RECKMAN G. A. R., HRMSEN H. J. M., PRIEBE M. G.: Probiotics. Probiotics and lactose intolerance. *INTECH*, 2012. 149-160. ISBN 978-953-51-0776-7.
63. WEISKIRCHEN R., TAG C. G., MENGSTEAB S., GRESSNER A. M. *et al.* (2007): Pitfalls in LightCycler diagnosis of the single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene that is associated with adult-type hypolactasia. *Clinica Chimica Acta*, **384**, 93-98. ISSN: 0009-8981.
64. YANG J., DENG Y., CHU H., CONG Y., ZHAO J. *et al.* (2013): Prevalence and presentation of lactose intolerance and effects on dairy product intake in healthy subjects and patients with irritable bowel syndrome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, **11** (3), 262-268. ISSN: 1542-3565.

Internetové zdroje

URL 1: ITAN Y., JONES B. L., INGRAM C. J. E., SWALLOW D. M., THOMAS M. G.: A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC Evolutionary*

Biology [online]. © 2010. ISSN 1471-2148.. [vid. 2016-01-15]. Dostupné z: <http://bmcevolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2148-10-36>.

URL 2: Lactose hydrolysis. In: *Wikiskripta* [online]. © 2008. ISSN: 1804-6517. Last modified on 12. 5. 2013 [vid. 2016-03-06]. Dostupné z: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Lactose_hydrolysis.svg.

URL 3: VALIO Ltd R&D, TUURE T.: Lactose intolerance: from the origin to treatment. In *Valio Ltd* [online]. © 2007. Last modified on 16. 5. 2007 [vid. 2016-03-10]. Dostupné z: http://lactose.ru/present/4Tuula_Tuure.pdf.

URL 4: Crystal structure of human beta-galactosidase mutant I51T in complex with Galactose. In RCSB PDB [online]. © 2014. ISSN: 1804-6517. Last modified on 23. 4. 2014 [vid. 2016-03-06]. Dostupné z: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3WF3>.

URL 5: 100bp DNA Ladder H3 RTU (Ready-to-Use). In: *GeneDirex* [online]. Last modified on 29. 8. 2011 [vid. 2016-02-29]. Dostupné z: <http://www.genedirex.com/?p=457>.

URL 6: Map of the LCT and MCM6 gene region and location of genotyped SNPs. In: *Nature Genetics* [online]. © 2006. ISSN: 1061-4036. Last modified on 10. 12. 2006 [vid. 2016-04-08]. Dostupné z: http://www.nature.com/ng/journal/v39/n1/fig_tab/ng1946_F1.html.

URL 7: Minerální látky v potravě. In: *Wikiskripta* [online]. © 2010. ISSN: 1804-6517. Last modified on 14. 3. 2016 [vid. 2016-03-08]. Dostupné z: http://www.wikiskripta.eu/index.php/Miner%C3%A1ln%C3%AD_1%C3%A1tky_v_potrav%C4%9B.

URL 8: MCM6. In: *Wikipedia* [online]. © 2015. Last modified on 23. 11. 2015 [vid. 2016-03-11]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/MCM6>

URL 9: Lactose intolerance: Tests and Diagnosis. In Mayo Foundation for Medical Education and Research [online]. © 1998 - 2016. Last modified on 30. 3. 2016 [vid. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://www.mayoclinic.org/diseases-conditions/lactose-intolerance/basics/tests-diagnosis/con-20027906>.

URL 10: Lactose intolerance - Exams and Tests. In WebMD [online]. © 1995 - 2015. Last modified on 21. 7. 2014 [vid. 2016-04-08]. Dostupné z: <http://www.webmd.com/digestive-disorders/tc/lactose-intolerance-exams-and-tests>.

7 PŘÍLOHA

Příloha 1: Protokol k izolaci genomové DNA z bukálního stěru.

Izolace genomové DNA z bukálního stěru (DNA Isohelix DNA Isolation kit: (DDK-3/DDK-50)

Použité zkratky:

RT - pokojová teplota

PK - Proteináza K

CT - Capture buffer

TE - Re-hydration buffer TE

Reagencie:

Lysis buffer (LS) - skladovat při RT

Proteinase K - skladovat při -20 °C

Capture buffer (CT) - skladovat při RT

Re-hydration buffer (TE) - skladovat RT

Přístroje:

termostat - Dry Block Thermostat, TDB 120, BioSan

centrifuga - Centrifuge 5415 R, Eppendorf

Pracovní postup:

- do zkumavky s tamponem s bukálním stěrem bylo napipetováno 500 µl LS
- bylo přidáno 20 µl PK
- zkumavka byla krátce vortexována a zcentrifugována
- vzorek byl inkubován hodinu při 60 °C
- po inkubaci byl vzorek krátce zvortexován a zcentrifugován
- vzorek byl následně přepipetován do nové 1,5 ml mikrozkušavky
- poté bylo přidáno 500 µl CT a vzorek byl krátce vortexován
- zkumavka byla zcentrifugována při 13 tis. ot/min 7 min
- supernatant byl opatrně odstraněn

- k peletě DNA bylo přidáno 50 μ l TE
- vzorek inkubován po dobu 10 min při RT
- poté byl vzorek krátce vortexován a zcentrifugován při 13 tis. ot/min po dobu 2 min
- supernatant byl odebrán do nové 1,5 ml zkumavky (finální izolát)
- byla změřena koncentrace DNA a vzorek byl v řádně popsané zkumavce uložen do mrazicího boxu při -20 °C.

Příloha 2: Protokol k izolaci genomové DNA z plné krve.

Izolace genomové DNA z plné krve (Genomic DNA Mini Kit)

Použité zkratky:

RT - pokojová teplota

Reagencie:

96 % ethanol - zásobní roztok se skladuje při RT.

GT Buffer - skladuje se při RT.

W1 Buffer - skladuje se při RT.

Wash Buffer - dle návodu výrobce se ke koncentrátu Wash Buffer přidá 100 ml 96 % etanolu, skladuje se při RT.

Elution Buffer - skladuje se při RT, před každým použitím vytemperovat požadovaný objem na 60 °C.

RBC Lysis Buffer - skladuje se při RT.

Spotřební materiál:

GD Column – kolonky, jsou součástí kitu, skladují se při RT.

2 ml Collection Tube – sběrné zkumavky bez víčka, jsou součástí kitu, skladují se při RT

1,5 ml mikrozkušavky – nejsou součástí kitu, skladují se při RT

Přístroje:

termostat - Dry Block Thermostat, TDB 120, BioSan

centrifuga - Centrifuge 5415 R, Eppendorf

Pracovní postup:

- 300 µl plné krve bylo napipetováno do označené 1,5 ml mikrozkušavky
- bylo přidáno 900 µl RBC Lysis Buffer, vzorek promíchán převrácením v ruce
- inkubace 10 min. při RT
- vzorek byl centrifugován 5 min. při 5698 ot/min, poté byl odstraněn supernatant
- bylo přidáno 100 µl RBC Lysis Buffer a peleta byla resuspendována
- bylo přidáno 200 µl GB Buffer, zvortexováno a krátce stočeno
- inkubace 10 – 15 min. v termostatu při 60 °C, lyzát byl projasněný
- během inkubace zkumavka převrácena každé 3 min.
- přidáno 200 µl 96 % etanolu, vortexováno 10 s, a krátce centrifugováno
- obsah mikrozkušavky (lyzát) byl přepipetován na kolonku (GD Column), která byla vložena do čisté sběrné zkumavky (2 ml Collection Tube)
- kolonka se sběrnou zkumavkou centrifugována při 13 tis. ot/min po dobu 5 min.
- kolonka byla přendána do nové sběrné zkumavky a použitou sběrnou zkumavku s tekutinou vyhodit
- na kolonku bylo napipetováno 400 µl W1 Buffer
- kolonka se sběrnou zkumavkou centrifugována při 13 tis. ot/min / 30 s
- ze sběrné zkumavky byla vylita tekutina a kolonku do ní vrácena
- na kolonku bylo přidáno 600 µl Wash Buffer
- kolonka se sběrnou zkumavkou centrifugována při 13 tis. ot/min / 30 s
- ze sběrné zkumavky byla vylita tekutina a kolonku do ní vrácena
- „suchá“ kolonka se sběrnou zkumavkou zcentrifugována při 13 tis. ot/min po dobu 3 min
- „suchá“ kolonka byla přesunuta do připravené čisté 1,5 ml mikrozkušavky řádně označené štítkem
- přímo na filtr kolonky bylo přidáno 100 µl Elution Buffer (vytemperovaného na 60 °C)
- inkubace nejméně 3 min. při RT
- kolonka s označenou 1,5 ml mikrozkušavkou zcentrifugována při 13 tis. ot/min po dobu 30 s
- byla změřena koncentrace DNA a vzorek byl uložen do mrazícího boxu při -20 °C

Příloha 3: Protokol k měření koncentrace nukleových kyselin.

Měření koncentrace nukleových kyselin pomocí Qubit™ Assays.

Použité zkratky:

RT - pokojová teplota

NK - nukleová kyselina

St I - Qubit™ dsAssays BR Standard #1

St II - Qubit™ dsAssays BR Standard #2

Reagencie:

Qubit™ dsAssays BR reagent (Component A) - skladuje se při RT.

Qubit™ dsAssays BR buffer (Component B) - skladuje se při RT.

Qubit™ dsAssays BR Standard #1 (Component C) - skladuje se v lednici ($\leq 4^{\circ}\text{C}$).

Qubit™ dsAssays BR Standard #2 (Component D) - skladuje se v lednici ($\leq 4^{\circ}\text{C}$).

Mikrozkumavky:

Qubit™ Assays tubes - 0,5 ml PCR mikrozkumavky, skladují se při RT.

Přístroje:

fluorometr - Qubit® 2.0 Fluorometer

Pracovní postup:

- pro každý vzorek i každou standardu byl připraven pracovní roztok (Qubit™ Working Solution)
- na každý vzorek bylo vždy napipetováno 199 μl Qubit™ dsDNA BR buffer a 1 μl Qubit™ dsDNA BR reagent do pracovní 1,5 ml plastové mikrozkumavky
- pracovní roztok byl vortexován a krátce stočen na stolní centrifuze
- do označených 0,5 ml mikrozkumavek (Qubit™ Assay tubes) bylo napipetováno vždy 190 μl pracovního roztoku a přidáno 10 μl příslušné standardy (St I a St II) nebo 10 μl vzorku
- mikrozkumavky byly krátce zvortexovány a stočeny
- před měřením byly vzorky inkubovány 2 minuty při RT
- po inkubaci byla změřena koncentrace DNA na flourometru Qubit™ 2.0

Příloha 4: Protokol ke přípravě gelové elektroforézy.

Příprava gelové elektroforézy

Použité zkratky:

RT - pokojová teplota

TBE - Tris/Borate/EDTA

Reagencie:

Crystal 10xTBE Buffer - prášek, skladuje se při RT

10x TBE - roztok připravený z Crystal 10xTBE Buffer dle doporučení výrobce, skladuje se při RT

Pracovní roztok 1x TBE - skladuje se při RT

Agarózové tablety (1 tableta = 0,5 g agarózy) - skladuje se při RT

Midori Green Advanced DNA Stain - skladuje se v lednici, ve tmě

Přístroje:

elektroforetická aparatura - Mupid-One, Advance

Postup:

- příslušný počet agarózových tablet byl vložen do plastové kádinky o celkovém objemu min. 100 ml (1% gel = 1 tableta/50 ml, 2% gel = 2 tablety/50 ml, 3% gel = 3 tablety/50 ml atd.)
- k tabletám bylo přidáno 50 ml 1x TBE pufru
- kádinka s rozpuštěnými tabletami byla vložena do mikrovlnné trouby
- kádinka byla zahřívána minimálně nadvakrát na maximální ohřev cca 3 min
- do tekutého gelu bylo přidáno 6 μ l barvičky Midori Green Advanced DNA Stain
- gel byl promíchán a vlit do připravené elektroforetické podložky, po vlití byly vloženy hřebeny
- gel byl ponechán ztuhnout ve tmě po dobu 10-15 min
- z tuhého gelu byly vyndány hřebeny a gel byl vložen do elektroforetické vany s 1xTBE pufrem

Příloha 5: Protokol k přečištění PCR produktu.

Přečištění PCR produktu

Použité zkratky:

RT - pokojová teplota

Reagencie:

96 % ethanol - zásobní roztok se skladuje při RT.

70 % ethanol - skladuje se v lednici

voda - Aqua pro Iniectione (Ardeapharma a. s.)

Přístroje:

centrifuga - Centrifuge 5415 R, Eppendorf

Postup:

- k PCR produktu bylo přidáno 250 μ l 96 % ethanolu
- vzorek byl inkubován při pokojové teplotě přes noc
- následně byl vzorek centrifugován 20 min při 13 tis. ot./min a RT
- ethanol byl opatrně slit a k peletě bylo přidáno 100 μ l 70 % ethanolu
- vzorek byl 5 minut centrifugován při 13 tis. ot./min
- všechno 70 % ethanol bylo opatrně odstraněn za neporušení pelety
- peleta DNA byla následně sušena po dobu asi 5 minut
- k peletě bylo přidáno 10 μ l vody
- po cca 10 minutách se peleta rozpustila