

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Výskyt laktóзовé intolerance v české populaci

Diplomová práce

Bc. Jiřina Chánová, DiS.

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

České Budějovice 2021

Chánová J., 2021: Výskyt laktóзовé intolerance v české populaci. [The Prevalence of Lactose Intolerance in the Czech Population. Mgr. Thesis, in Czech.] - 89 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION

The aim of this diploma thesis is to summarize the current knowledge on the issue of very common gastrointestinal disorder – lactose intolerance. In the experimental part, the occurrence of genotypic frequencies in the *MCM6* gene was screened. Specifically, prevalence of two single nucleotide polymorphisms C/T-13910 and G/A-22018, which are associated with primary hypolactasia. A further aim of the work was to evaluate the possible association between lactose intolerance and irritable bowel syndrome.

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracoval(a) pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

V Českých Budějovicích, 8. 12. 2021

.....
Bc. Jiřina Chánová, DiS.

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za profesionální vedení mé diplomové práce, odborný dohled, cenné rady a za věnovaný čas. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, která mě po celou dobu studia neskutečně podporuje, zejména mému manželovi Janu Chánovi, který to se mnou neměl vždy úplně jednoduché.

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 1 ÚVOD | 1 |
| 2 LITERÁRNÍ PŘEHLED | 2 |
| 2.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA | 2 |
| 2.1.1 Laktáza | 3 |
| 2.1.2 <i>Laktáza</i> | 3 |
| 2.1.3 <i>Fyziologie a patofyziologie trávení laktózy</i> | 5 |
| 2.2 GENETICKÉ ASPEKTY LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE | 8 |
| 2.3 FORMY LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE | 9 |
| 2.3.1 <i>Kongenitální laktózová intolerance</i> | 10 |
| 2.3.2 <i>Vývojový deficit laktázy</i> | 10 |
| 2.3.3 <i>Primární laktózová intolerance</i> | 11 |
| 2.3.4 <i>Sekundární laktózová intolerance</i> | 11 |
| 2.4 KLINICKÉ PROJEVY LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE | 12 |
| 2.5 PREVALENCE LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE | 13 |
| 2.6 HYPOTÉZY UPŘEDNOSTŇUJÍCÍ PERZISTENCI LAKTÁZY | 15 |
| 2.6.1 <i>Kulturně-historická hypotéza</i> | 15 |
| 2.6.2 <i>Hypotéza asimilace vápníku</i> | 16 |
| 2.6.3 <i>Hypotéza klimatické aridity</i> | 16 |
| 2.6.4 <i>Hypotéza průjmu hladovějících</i> | 17 |
| 2.6.5 <i>Hypotéza rezistence proti malárii</i> | 17 |
| 2.6.6 <i>Hypotéza trávení floridzinu</i> | 17 |
| 2.6.7 <i>Hypotéza galaktózy jako prebiotika</i> | 18 |
| 2.7 DIAGNOSTIKA | 18 |
| 2.7.1 <i>Neinvazivní, nepřímé metody</i> | 19 |
| 2.7.2 <i>Invazivní, přímé metody</i> | 20 |
| 2.7.3 <i>Genetický test</i> | 21 |
| 2.8 LÉČBA | 22 |
| 2.9 KLINICKY OBDOBNÉ STAVY | 23 |
| 2.9.1 <i>Alergie na mléčnou bílkovinu</i> | 23 |
| 2.9.2 <i>Syndrom dráždivého tračníku</i> | 24 |
| 3 CÍLE PRÁCE..... | 26 |
| 4 MATERIÁLY A METODIKA..... | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1 ODBĚR VZORKU A JEHO TRANSPORT DO LABORATOŘE..... | 28 |
| 4.2 IZOLACE DNA..... | 28 |
| 4.2.1 Izolace genomové DNA z bukálního stěru..... | 28 |
| 4.2.2 Izolace genomové DNA z plné krve..... | 29 |
| 4.3 MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA..... | 30 |
| 4.4 ANALÝZA POLYMORFISMŮ V <i>MCM6</i> GENU..... | 30 |
| 4.4.1 PCR-RFLP..... | 30 |
| 4.4.2 Sekvenace..... | 35 |
| 4.4.3 real-time PCR..... | 39 |
| 4.5 ANALÝZA POLYMORFISMU V GENU <i>TNF SF15</i> | 41 |
| 4.5.1 Sekvenace..... | 41 |
| 4.5.2 real-time PCR..... | 47 |
| 5 VÝSLEDKY..... | 49 |
| 5.1 VYHODNOCENÍ PREDISPOZICE PRO LAKTÓZOVOU INTOLERANCI..... | 49 |
| 5.2 VYHODNOCENÍ MOŽNÉ ASOCIACE LAKTÓZOVÉ INTOLERANCE A IBS..... | 54 |
| 6 DISKUSE..... | 60 |
| 7 ZÁVĚR..... | 69 |
| 8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 70 |
| 9 INTERNETOVÉ ZDROJE..... | 86 |
| 10 PŘÍLOHY..... | 87 |
| PŘÍLOHA 1: ŽÁDANKA GENLABS S.R.O.- SAMOPLÁTCI..... | 87 |
| PŘÍLOHA 2: INFORMOVANÝ SOUHLAS S GENETICKÝM VYŠETŘENÍM..... | 88 |

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

| | |
|----------|---|
| BLAST | Basic Local Alignment Search Tool |
| CLD | Congenital Lactase Deficiency |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| GLUT 2 | Glucose Transporter 2 |
| HBT | Hydrogen breath test |
| IBS | Irritable bowel syndrome |
| IgE | Imunoglobulin E |
| IL10 | Interleukin 10 |
| IUPAC | International Union of Pure and Applied Chemistry |
| LCT | Lactase gene |
| LD | Lactase Deficiency |
| LI | Lactose Intolerance |
| LM | Lactose Malabsorption |
| LNP | Lactase Non-Persistence |
| LP | Lactase Persistence |
| LPH | Lactase-Phlorizin Hydrolase |
| MCM6 | Minichromosome Maintenance Complex Component 6 gene |
| NCBI | The National Center for Biotechnology Information |
| PABA | kyselina paraaminobenzoová |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| RFLP | Restriction Fragment Length Polymorphism |
| SCFA | Short Chain Fatty Acids |
| SGA | Studentská grantová agentura |
| SGLUT 1 | Sodium-Glucose Linked Transporter 1 |
| SNP | Single-Nucleotide Polymorphism |
| TL1A | Tumor Necrosis Factor-Like Cytokine 1A |
| TNF SF15 | Tumor Necrosis Factor Superfamily, Member 15 |
| UVB | ultrafialové záření typu B |

1 ÚVOD

Intolerance laktózy je velmi častá gastrointestinální porucha, která je způsobena deficitem enzymu laktázy. Odhaduje se, že postihuje až asi 70% celosvětové populace. Laktáza-phlorizin hydroláza je enzym zodpovědný za štěpení disacharidu laktózy na glukózu a galaktózu v tenkém střevě. Intolerance laktózy byla rozpoznána teprve před 50 lety a v současnosti je definovaná jako nástup abdominálních příznaků jako je bolest břicha, nadýmání a průjem.

Deficit laktázy se vyskytuje ve čtyřech různých formách: vrozený, vývojový, primární a sekundární. Vrozený deficit laktázy je vzácné autosomálně recesivní onemocnění charakterizované nepřítomností nebo sníženou enzymatickou aktivitou už od narození. Vývojový deficit laktázy se objevuje u nedonošených novorozenců, u kterých ještě nebyla střevní laktáza plně vyvinuta. Primární deficit enzymu laktázy je běžný geneticky podmíněný proces, který zahrnuje postupné vymizení laktázové aktivity ve střevech. Poslední, sekundární nedostatek laktázy je přechodným stavem způsobeným různými chorobami, jako jsou infekce, potravinové alergie, celiakie a Crohnova choroba

Perzistence laktázy je spojena s jednonukleotidovými polymorfismy (SNP) v genu *MCM6*, který je promotorem pro gen *LCT* kódující enzym laktázu. V kavkazské populaci je primární hypolaktázie spojena s polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018. Postupné snižování aktivity laktázy je přirozené, zatímco přítomnost mutace ve výše uvedených polymorfismech způsobuje celoživotně normální aktivitu laktázy.

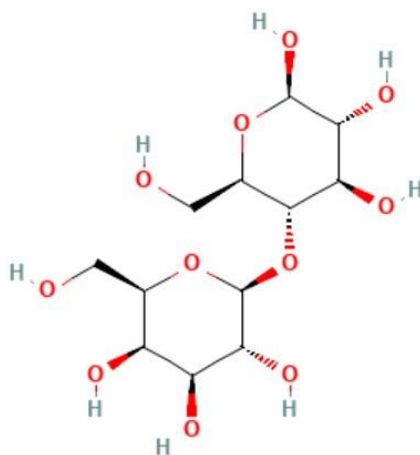
Dostupná diagnostická vyšetření laktózové intolerance zahrnují různá neinvazivní a invazivní vyšetření a genetické testy. Hlavní strategií léčby je odstranění či snížení intenzity symptomů, ale zároveň udržení dostatečného příjmu živin.

Cílem této diplomové práce je v literárním přehledu shrnout doposud známé poznatky o problematice laktózové intolerance. Experimentální část se věnuje detekci mutací v genech *MCM6* (SNP rs4988235 a rs182549 spojenými s primární hypolaktázií) a *TNF SF15* (rs4263839 spojeného s výskytem syndromu dráždivého tračníku) pomocí metod real-time PCR, PCR-RFLP a sekvenace. Mezi cíle experimentální části patří vypracování statistiky výskytu genotypových variant v diagnosticky neselektované české populaci a vyhodnocení možné genetické asociace mezi laktózovou intolerancí a syndromem dráždivého tračníku.

2 LITERÁRNÍ PŘEHLED

2.1 Základní charakteristika

Laktóza, disacharid nacházející se v různých koncentracích v mléce savců, se často nazývá mléčný cukr. Obecný název laktózy dle IUPAC je β -D-galaktopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-D-glukosa (Ouellette a Rawn, 2015). Chemická struktura laktózy je znázorněna na Obr 1.



Obr. 1: Chemická struktura molekuly laktózy, která je tvořena dvěma sacharidy glukózou a galaktózou navzájem spojenými β -1,4 glykosidickou vazbou. (Obrázek převzat z PubChem: beta-Lactose [online].)

Laktóza představuje hlavní sacharid mléka savců. V přírodě se vyskytuje už jen velmi málo dalších zdrojů tohoto disacharidu (Szilagyí a Ishayek, 2018). Syntéza laktózy probíhá v mléčné žláze prostřednictvím aktivované uridindifosfátgalaktózy, která je spojena s glukózou enzymem galaktosyltransferázou. Proces syntézy laktózy je regulován peptidickým hormonem prolaktinem, který se zvyšuje po porodu a snižuje se s klesajícími hladinami progesteronu při odstavování (Brüssow, 2013).

Laktóza je hlavní složkou sušiny v mléce savců a její obsah je nepřímě úměrný tuku a bílkovinám (Mađry *et al.*, 2010). Lidské mléko obsahuje asi 70 g/l (7 %) laktózy, která poskytuje asi 30–40 % kalorií novorozencům. Ve srovnání s ostatními savci má lidské mateřské mléko nejvyšší koncentraci laktózy (Schaafsma, 2008). Pro srovnání, kravské mléko obsahuje asi 46 g/l (4,6 %) a kozí 47 g/l (4,7 %) (Wijesinha-Bettoni a Burlingame, 2013).

Laktóza má velký význam ve fyziologii pro svůj stimulační účinek na nervový systém a pro svůj profylaktický a terapeutický účinek na kardiovaskulární onemocnění. U lidí laktóza podporuje vstřebávání vápníku, manganu a hořčíku a podporuje růst bifidobakterií. Pro bakterie mléčného kvašení je laktóza hlavním energetickým zdrojem mléčného kvašení, které je základem pro výrobu mnoha mléčných potravin. (Dzyadevych a Jaffrezic-Renault, 2014).

K nutričním vlastnostem laktózy patří relativně nízká sladivost, nízká kalorická hodnota a nízký glykemický index (Schaafsma, 2008). Vzhledem ke svým fyzikálně-chemickým vlastnostem a chuti se laktóza používá jako přísada v mnoha potravinách, jako jsou například zpracované maso, margaríny, snídaňové cereálie, instantní a hotová jídla. Stejně tak je používána v doplňcích stravy, či jako plnidlo v léčivech (Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018).

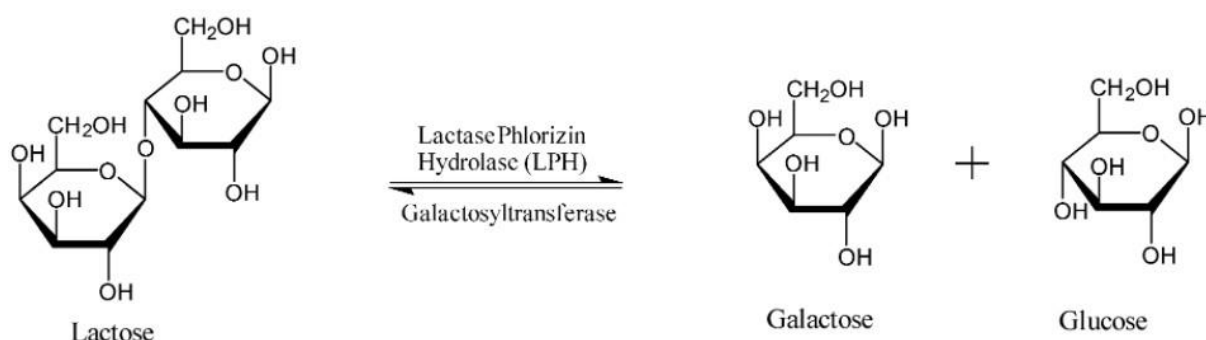
2.1.2 Laktáza

Laktáza (EC 3.2.1.108; 3.2.1.62), také nazývaná laktáza-florizin hydroláza (LPH), je β -D-galaktosidáza nacházející se v apikálním povrchu enterocytů v kartáčovém lemu tenkého střeva s nejvyšší expresí ve střední části jejunu, její výskyt postupně klesá směrem k ileu (Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018; Mądry *et al.*, 2010). Do lumen střeva vyčnívají dvě intraluminální enzymatická místa, která štěpí disacharid laktózu na glukózu a galaktózu. Tyto monosacharidy jsou pak přenášeny skrze sodíkové glukózové transportéry přes střevní kartáčekový lem. Glukóza se využívá převážně pro energii, zatímco galaktóza je využívána pro různé účely. To zahrnuje tvorbu energetických a strukturálních molekul používaných v komunikaci mezi buňkami, imunitních funkcích, stabilizaci epitelu a neurologickém vývoji (Deng *et al.*, 2015; Fassio *et al.*, 2018). Metabolismus galaktózy vyžaduje odbourání prostřednictvím čtyř enzymů Leloirovy dráhy. Tato metabolická dráha existuje u většiny jednobuněčných a mnohobuněčných organismů (Holden *et al.*, 2003). Změny enzymů Leloirovy dráhy vedou ke vzácnému genetickému metabolickému onemocnění galaktosémii (Demibras *et al.*, 2018).

Enzym laktáza je kódován genem LCT a je produkován jako prekurzorový peptid o velikosti 220 kDa. Po své primární syntéze během transportu na buněčný povrch prochází značnou posttranslační modifikací. Na buněčném povrchu je sice zralým, ale stále neaktivním proteinem o velikosti 150 kDa. Enzym je aktivován až působením pankreatického trypsinu,

který odštěpením dalších dvou aminokyselin vytváří jeho aktivní formu (Zecca *et al.*, 1998; Mądry *et al.*, 2010).

Jak již bylo zmíněno enzym LPH má dvě aktivní místa: první hydrolyzuje laktózu (Obr. 2) a druhé hydrolyzuje floryzin (aryl alfa-glukosid) a také řadu dalších glykolipidů (Campbell *et al.*, 2005). Jeho aktivita se u lidského plodu postupně zvyšuje, zejména od třetího trimestru gestace. Svého maxima dosahuje při narození a poté začíná klesat od prvních měsíců života, a to zejména mezi 3-5 lety. K tomu dochází nižší genovou expresí a tím snížením syntézy enzymu LPH (Wang *et al.*, 1998). Hladiny LPH ve střevech se u většiny savců sníží na přibližně 10 % neonatálních hladin. U malých zvířat, jako jsou myši a krysy, může opětovné podávání potravy obsahující laktózu vést ke zvýšení střevního LPH, to znamená, že enzym je indukovatelný. U lidí však není laktáza indukovatelná (Szilagyi a Ishayek, 2018). Ačkoli je snižování hladin LPH normální stav u většiny savců, někteří lidé si zachovali laktázovou aktivitu po celý život, což vede k laktázové perzistenci (jedinci laktóza tolerantní) (Lomer *et al.*, 2008).

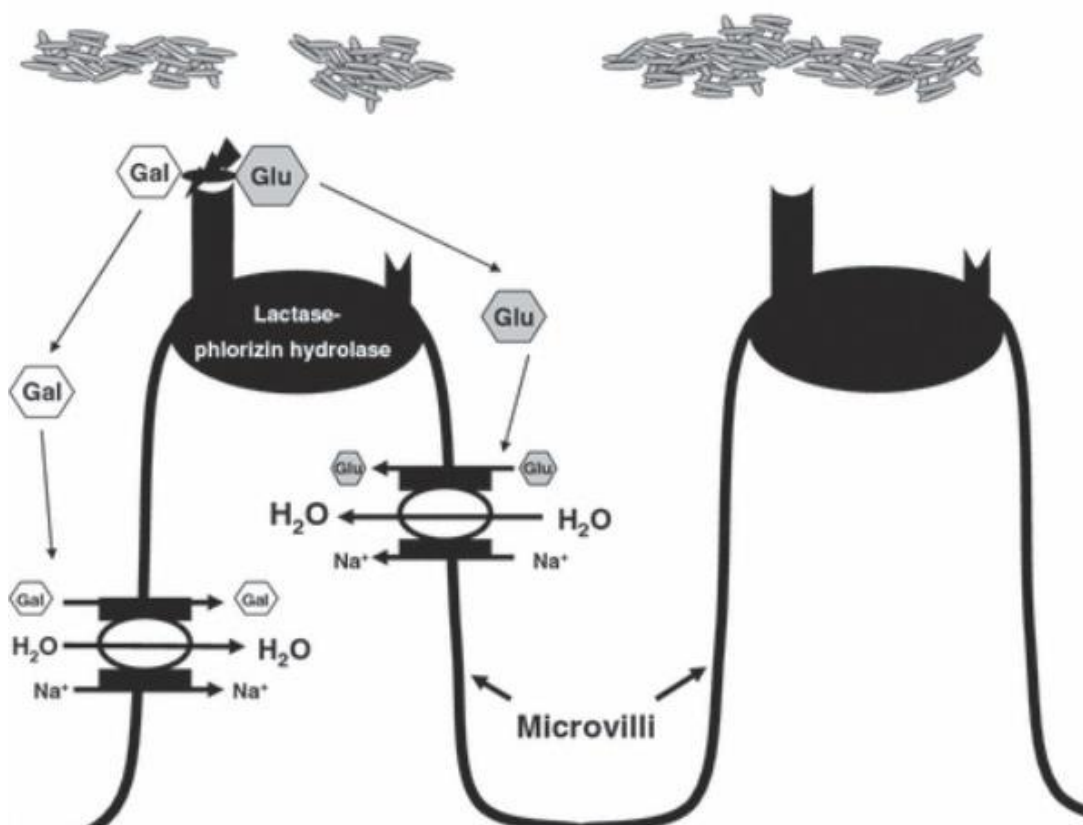


Obr. 2: Enzymatická hydrolýza disacharidu laktózy za působení enzymu LPH a vzniku molekul D-glukózy a D-galaktózy. Zpětná reakce znázorňuje enzymatickou syntézu disacharidu laktózy (Robles a Priefer, 2020).

K optimální aktivitě laktázy dochází v tenkém střevě při pH 6-8. V tlustém střevě mohou bakterie hydrolyzovat laktózu na glukózu a galaktózu díky bakteriální laktáze. Avšak v této části střeva je pH 4, takže aktivita bakteriální laktázy je snížena a dochází i k fermentaci malého množství laktózy (Di Rienzo *et al.*, 2013, Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018).

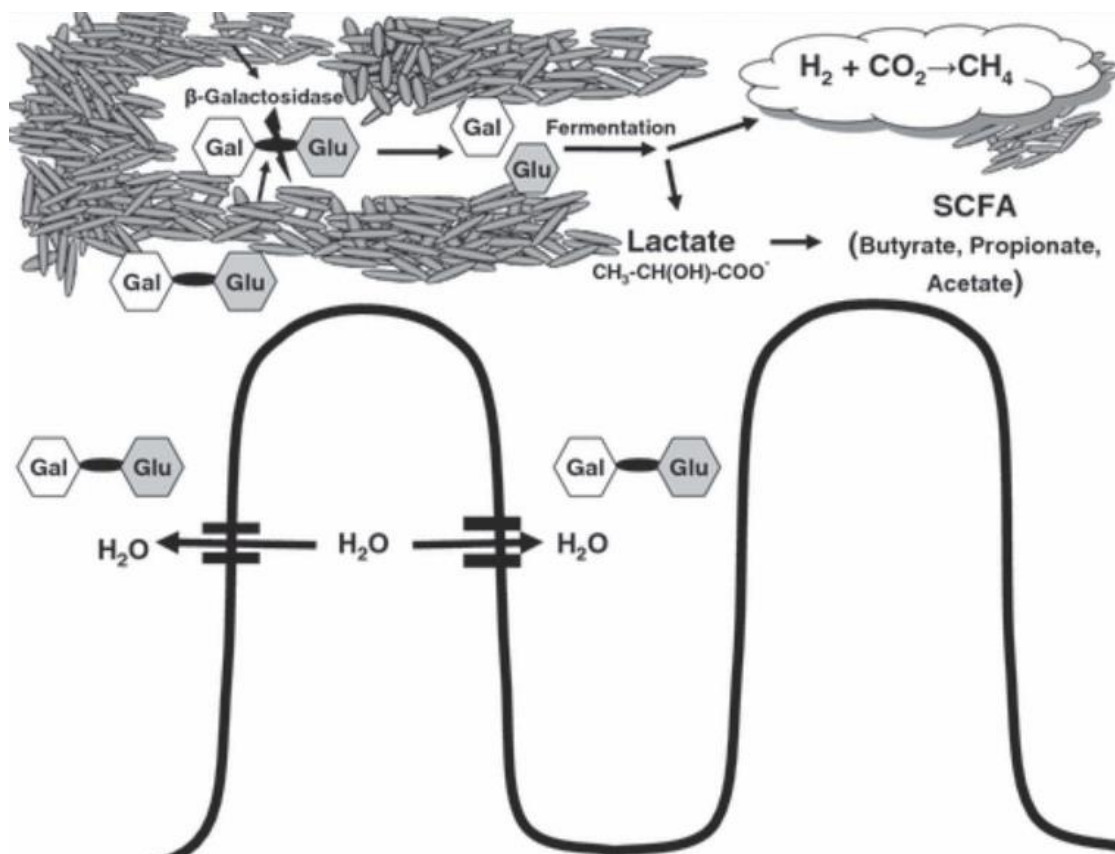
2.1.3 Fyziologie a patofyziologie trávení laktózy

Pro fyziologické využití laktózy v lidském těle musí být nejdříve hydrolyzována ve střevě enzymem laktáza. Jakmile se laktóza dostane do proximálního střeva, rozloží se na glukózu a galaktózu (Obr. 3). Oba monosacharidy jsou absorbovány aktivním transportem zprostředkovaným membránovými proteiny: transportérem SGLUT 1 (Sodium-Glucose Linked Transporter 1), který kotransportuje glukózu nebo galaktózu doprovázenou dvěma ionty Na^+ ze střevního lumen směrem do nitra enterocyty. Monosacharidy se následně šíří do krve buď pasivně, nebo unadněnou difuzí transmembránovým proteinem GLUT 2 (Glucose Transporter 2). Glukóza se používá jako zdroj energie, zatímco galaktóza může být přeměněna na glukózu pro energetické využití galaktokinázou a galaktóza-1Pi-uridylyltransferázou nebo může být použita jako složka glykolipidů a glykoproteinů (Di Rienzo *et al.*, 2013; Lomer *et al.*, 2008; Amiri *et al.*, 2015). Pro efektivní odbourávání laktózy bez příznaků intolerance je zapotřebí pouze 50 % aktivity laktázy (Swallow, 2003).



Obr. 3: Při perzistenci laktázy enzym laktáza-florizin hydroláza v kartáčovém lemu účinně hydrolyzuje laktózu na glukózu (Glu) a galaktózu (Gal). Tyto dva monosacharidy se společně s molekulami vody rychle vstřebávají do krevního řečiště. K hydrolyze typicky dochází v jejunu, které má nízkou koncentraci bakterií a dochází zde jen k malé fermentaci laktózy (Lomer *et al.*, 2008).

K maldigesci laktózy dochází, když se laktóza nevstřebává v tenkém střevě (Obr. 4). Prochází gastrointestinálním traktem až do tlustého střeva, kde vede k příznakům intolerance laktózy (Lomer *et al.*, 2008). Bolesti břicha a nadýmání jsou typicky způsobeny fermentací a hydrolyzou neabsorbované laktózy v tlustém střevě bakteriální mikroflórou, což vede k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFA), vodíku, metanu a oxidu uhličitého, čímž se prodlužuje doba průchodu střevem a určité množství těchto plynů bývá příčinou plynatosti (He *et al.*, 2006). Vzniklé organické kyseliny s krátkým řetězcem, jako je kyselina máselná, octová, propionová, jantarová, mravenčí a mléčná, snižují pH tlustého střeva. Okyselení obsahu tlustého střeva a zvýšená osmotická zátěž způsobená neabsorbovanou laktózou v ileu a tlustém střevě vedou k větší sekreci elektrolytů a tekutin a rychlému průchodu, což vede k řídké stolici a průjmu (Swagerty *et al.*, 2002; Yang *et al.*, 2013; Matthews, 2005).



Obr. 4: Při non-perzistenci laktázy dochází k několika možným reakcím, které jsou podstatou pro běžné symptomy nalezené u jedinců s laktózovou intolerancí. Neabsorbovaná laktóza procházející tlustým střevem má vysokou osmotickou zátěž, která vede ke zvýšenému obsahu vody a elektrolytů ve střevním obsahu. Neabsorbovaná laktóza je hydrolyzována na galaktózu (Gal) a glukózu (Glu) bakteriální β -galaktosidázou přítomnou v bakteriích mléčného kvašení. Tyto monosacharidy jsou pak

využívány pro bakteriální fermentaci střevní mikroflórou. Vznikají mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) s vedlejšími produkty vodíku (H₂) a oxidu uhličitého (CO₂), což způsobuje nadýmání a plynatost. Posledním mechanismem je redukce oxidu uhličitého určitými bakteriálními kmeny na metan (CH₄) (Lomer *et al.*, 2008).

Klasický termín laktózová intolerance (LI) se používá při rozvoji gastrointestinálních symptomů (plynatost, nadýmání, křeče v břiše a bolesti někdy spojené s kašovitým až vodnatým průjmem a příležitostně s nevolností a zvracením) po požití potravin obsahujících laktózu. Maldigesce laktózy u dospělých (LM) je často zaměňována s LI. Tento termín však může být matoucí, protože LI ne vždy následuje po LM (Szilagyi a Ishayek, 2018). Termíny používané k popisu stavu trávení laktózy jsou uvedeny v Tab. I.

Tab. I: Termíny používané k popisu stavu trávení laktózy (Misselwitz *et al.*, 2013; Szilagyi a Ishayek, 2018; Fassio *et al.*, 2018).

| Termín | Definice |
|---------------------------------|---|
| Laktázová perzistence (LP) | Vrozená tolerance laktózy podmíněná dominantní dědičností, obvykle spojená s vysokou produkcí enzymu laktázy v dospělosti. |
| Laktázová non-perzistence (LNP) | Intolerance laktózy podmíněná recesivní dědičností, spojená s celkovým poklesem enzymu laktázy v dospělosti. |
| Laktázová deficiencie (LD) | Snížení enzymu laktázy z jakékoli příčiny, ať už genetické (LNP) nebo jakýchkoli sekundárních příčin, jako je onemocnění nebo poranění sliznice tenkého střeva. |
| Maldigesce laktózy (LM) | Porucha trávení (digesce), nejčastěji vyvolána chybním trávicího enzymu laktázy. |
| Malabsorbce laktózy | Porucha vstřebávání (absorpce) živin ve střevní sliznici v důsledku špatného trávení laktózy, protože laktóza nemůže být absorbována v nestrávené formě. |
| Laktázová intolerance (LI) | GIT symptomy vyplývající z požití laktózy, včetně plynatosti, nadýmání, křečí, průjmu a vzácně zvracení. LI se může objevit bez LM. |

Podle stupně aktivity laktázy lze stanovit dva typy stavů: alaktázie (úplná absence aktivity laktázy) a hypolaktázie (velmi nízká aktivita laktázy ve sliznici jejunu). Laktázová

intolerance závisí nejen na expresi laktázy, ale také na požití dávce laktózy, střevní flóře, gastrointestinální motilitě a na citlivosti gastrointestinálního traktu na produkty trávení laktózy (Deng *et al.*, 2015).

2.2 Genetické aspekty laktózové intolerance

Gen, který kóduje laktázu, se nachází na dlouhém raménku chromozomu 2 v pozici 21 (2q21) a obsahuje 17 exonů. V publikaci Enhattah *et al.* v roce 2002 byly sekvenovány dva možné polymorfismy (SNP), spojené s perzistencí laktázy v dospělosti. Tyto polymorfismy byly nalezeny v genu zvaném *MCM6* nacházejícího se poblíž genu laktázy. Tento gen se přímo nepodílí na syntéze laktázy, ale překrývá promotorovou oblast genu laktázy. Jedná se konkrétně o SNP rs4988235 a rs182549 (Enattah *et al.*, 2008; Magiera *et al.*, 2014).

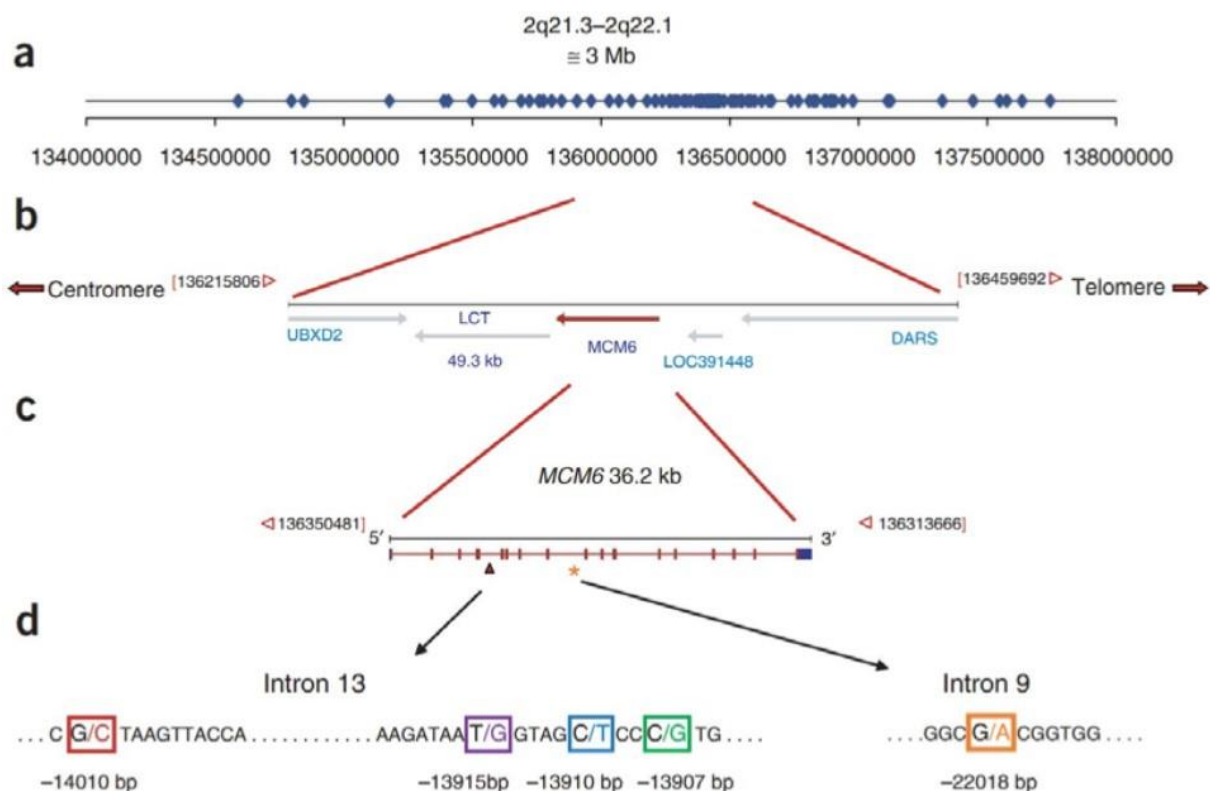
Polymorfismus C/T-13910 (rs4988235) je nejčastější SNP spojený s non-perzistencí a perzistencí laktázy. Tento polymorfismus se objevuje ve variantách CC, CT nebo TT (Mattar *et al.*, 2008). Bylo prokázáno, že je homozygotní wild-type varianta CC vynikající prediktor poklesu střevní laktázy, a je tedy spojena s laktázovou non-perzistencí. Genotyp TT je ukazatelem celoživotní perzistence aktivity laktázy. Přítomnost heterozygotního genotypu CT je charakterizována přítomností středních úrovní exprese laktázy, které jsou ale obvykle dostatečné pro trávení laktózy (Fassio *et al.*, 2018). Druhý polymorfismus G/A-22018 (rs182549) se může objevovat ve variantě GG (guanin/guanin), ta je spojena s non-perzistencí, zatímco genotypy GA (guanin/adenin) a AA (adenin/adenin) jsou spojovány s přetrváním aktivity enzymu (Jasielska a Grzybowska-Chlebowczyk, 2019; Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018).

Jedinci heterozygotní pro kterýkoli SNP mají střední aktivitu laktázy a mohou být náchylnější k intoleranci laktózy v době stresu nebo gastrointestinální infekce (Matthews, 2005). U jedinců s homozygotní perzistencí laktázy (genotypy TT a AA) se může příležitostně také rozvinout intolerance laktózy (tzv. sekundární deficit laktázy). Dospělí homozygoti s non-perzistencí (CC a GG) mají v dospělosti prakticky nedetekovatelné hladiny střevní laktázy (Lomer *et al.*, 2008; Fassio *et al.*, 2018; Itan *et al.*, 2010).

Ačkoli lze tyto polymorfismy použít jako indikátory perzistence laktázy v evropské populaci, nelze je aplikovat globálně, protože v africké populaci byly ve stejné chromozomální oblasti identifikovány další polymorfismy (Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018). Polymorfismy

nalezené v populacích Afriky a Středního východu jsou T/G-13915 (rs41380347; Saudská Arábie), G/C-14010, C/G-13907 (rs145946881, rs41525747; africké kmeny) a T/G-14009 (rs869051967; Etiopie) (Tishkoff *et al.*, 2007; Anguita-Ruiz *et al.*, 2020; Deng *et al.*, 2015; Ranciaro *et al.*, 2014). Zprostředkování laktázové perzistence v dospělosti několika polymorfismy v různých populacích naznačuje, že se perzistence laktázy během lidské evoluce vyvíjela v různých oblastech světa nezávisle (Deng *et al.*, 2015).

Na obrázku 5 jsou vyobrazeny dosud známé jednonukleotidové polymorfismy spojené s laktázovou non-perzistencí.



Obr. 5: Genová mapa laktázy (*LCT*) a minichromozomu 6 (*MCM6*) s vyznačeným umístěním jednonukleotidových polymorfismů (SNP). a: Souhrn 123 SNP zahrnutých do genotypové studie; b: mapa oblasti genu *LCT* a *MCM6*; c: mapa genu *MCM6*; d: umístění SNP asociovaných s perzistencí laktázy v intronech 9 a 13 genu *MCM6* v africké a evropské populaci (Tishkoff *et al.*, 2007).

2.3 Formy laktázové intolerance

Laktázovou intoleranci rozdělujeme v závislosti na jejím původu do čtyř kategorií: vrozený deficit laktázy (kongenitální LI), vývojový deficit laktázy, primární deficit laktázy (LNP, primární LI), sekundární deficit laktázy (sekundární LI) (Szilagyí a Ishayek, 2018).

2.3.1 Kongenitální laktózová intolerance

Vrozený nedostatek enzymu laktázy (CLD) je závažná gastrointestinální porucha kojenců s incidencí 1:60 000. Tento typ intolerance laktózy je metabolickou poruchou způsobenou autozomálně recesivním typem dědičnosti. CLD je charakterizována úplnou absencí nebo významným snížením enzymu s normální histologií v tenkém střevě (Kuokkanen *et al.*, 2006). Jde o celoživotní poruchu charakterizovanou celkovým neprospíváním od prvního kontaktu s mateřským mlékem (Swallow, 2003). V těchto případech novorozenci nejsou schopni trávit laktózu a klinické příznaky se rychle rozvíjejí se začátkem kojení. Často se vyskytuje těžký vodnatý osmotický průjem, acidóza a hyperkalcémie (Fassio *et al.*, 2018; Heyman *et al.*, 2006).

Vrozený nedostatek laktázy je extrémně vzácný, bylo hlášeno pouze asi 40 případů (Swallow, 2003), přičemž naprostá většina z nich (Fazeli *et al.*, 2015; Uchida *et al.*, 2012) pocházelo z Finska (Torniainen *et al.*, 2009). Jedinou léčbou je úplné vyloučení laktózy od narození (Lomer *et al.*, 2008). V minulosti byly následky CLD fatální, ale v dnešní době včasnou diagnózou a zajištěním adekvátní bezlaktózové diety lze smrti novorozence předejít (Kuokkanen *et al.*, 2006).

2.3.2 Vývojový deficit laktázy

Druhou formu maldigesce laktózy představuje situace, kdy v důsledku předčasného porodu (28-32 týden těhotenství) u nedonošených novorozenců nemusí být střevní laktáza ještě plně vyvinuta (Szilagyi a Ishayek, 2018). Aktivita enzymu v plodu se zvyšuje až od 34. týdne a dosahuje maxima při narození donošeného dítěte. Nedonošenci však mohou tento nedostatek vydržet díky bakteriálnímu metabolismu v tlustém střevě. Se snížením pH v tlustém střevě je zvýhodněna kolonizace jinými mikrobiálními kmeny, jako je *Bifidobacterium* nebo *Lactobacillus*, čímž napomáhají novorozenecké výživě a zabraňují průjmu a podvýživě (Heyman *et al.*, 2006; Francavilla *et al.*, 2012). Někteří autoři uvádějí, že do pěti dnů po narození nedonošence je enzym plně dostupný (Weaver *et al.*, 1986; Szilagyi a Ishayek, 2018).

2.3.3 Primární laktózová intolerance

Primární deficit laktázy (laktázová non-perzistence, LNP) je výsledkem postupného a trvalého poklesu enzymatické aktivity laktázy. Hladiny enzymů se postupně snižují od věku 2–5 let v závislosti na etnickém původu (Heyman *et al.*, 2006; Tan *et al.*, 2018). V populacích s vysokou prevalencí hypolaktázie se porucha běžně objevuje kolem dvou let věku. U ostatních populací s nižší prevalencí se první příznaky mohou objevit až mezi 11. a 14. rokem. U kavkazských jedinců (prevalence 25 %) aktivita laktázy obvykle pokračuje alespoň do věku 20 let (Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018).

Jde o geneticky předurčený fyziologický stav s autosomálně recesivní dědičností, který má za následek již zmíněný pokles aktivity laktázy po odstavení od kojení. Dospělý typ hypolaktázie je spojován v evropské populaci s SNP C/T-13910 a G/A-22018, v populacích Afriky a Středního východu jsou to SNP T/G-13915, G/C-14010, C/G-13907 a T/G-14009 (Tishkoff *et al.*, 2007; Deng *et al.*, 2015; Ranciaro *et al.*, 2014; Enattah *et al.*, 2002). Všichni zdraví novorozenci normálně vykazují adekvátní expresi *LCT* genu, která se po odstavení dítěte od mateřského mléka snižuje. U většiny dospělých po celém světě již mléko není hlavní složkou potravy a pokles aktivity laktázy v dospělosti tedy představuje evoluční adaptaci (Rasinpera *et al.*, 2006).

Primárním laktózovou intolerancí je velice rozšířená. Přibližně 70 % světové populace má tento typ intolerance, ačkoli existuje velká geografická variabilita s velkými rozdíly mezi geografickými oblastmi a etnickými skupinami. Odhaduje se, že více než 90 % asijské populace a 60–70 % Afroameričanů trpí intolerancí laktózy. U Evropanů a populací s evropskými předky, prevalence LNP výrazně klesá a dosahuje 5 % v zemích jako např. Švýcarsko a Dánsko (Matthews, 2005; Berni Canani *et al.*, 2016).

2.3.4 Sekundární laktózová intolerance

V tomto případě mají postižení jedinci normální enzymatickou aktivitu. K poklesu laktázy dochází v důsledku klinických stavů postihujících střevní trakt, které poškozují kartáčový lem v tenkém střevě. Obvykle je reverzibilní, když je základní onemocnění vyřešeno, lze produkty obsahující laktózu často normálně konzumovat. Vývoj závisí na závažnosti a trvání poškození sliznice. Je doprovázena snížením aktivity všech disacharidáz, i když nejvíce je postižena laktáza (Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018). Mezi

klinické stavy vedoucí k sekundární hypolaktázii patří: těžká podvýživa, celiakie, zánětlivá onemocnění střev (Crohnova choroba, ulcerózní kolitida), bakteriální nebo virová enteritida (např. rotavirová) a parazitární onemocnění (např. giardiáza, kryptosporidióza), některé farmakologické léčby (kanamycin, neomycin, polymycin, tetracyklin, kolchicin a další chemoterapeutika) a některé pooperační stavy (Lomer *et al.*, 2008; Heyman *et al.*, 2006; Saavedra a Perman, 1989).

2.4 Klinické projevy laktóзовé intolerance

Lidé s intolerancí laktózy pociťují typické příznaky, které zahrnují bolesti břicha, otoky, plynatost, průjem, zvracení, v některých případech také zácpu, anorexii a hubnutí. Auricchio *et al.* byli první, kteří popsali tyto příznaky v článku publikovaném v roce 1963 (Lomer *et al.*, 2008; Auricchio *et al.*, 1963; Deng *et al.*, 2015; Vesa *et al.*, 2000).

Plyny produkované bakteriální fermentací jsou zodpovědné za zvýšení intraluminálního tlaku a ovlivňují také čas potřebný pro průchod potravy střevem. K nadýmání a otoku dochází, když se začne produkovat plyn poté, co se nestrávená laktóza dostane do kontaktu s bakteriemi tlustého střeva a je jimi strávena (Zhu *et al.*, 2013). Průjem se objevuje v důsledku okyselení tlustého střeva a produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem, které zvyšují osmotickou zátěž zahrnující sekreci elektrolytů a tekutin a jejich rychlé vypuzení se stolicí. Stolice je často objemná, vodnatá a pěnivá (He *et al.*, 2006; Misselwitz *et al.*, 2013).

Příznaky obvykle začínají kolem jedné hodiny po požití laktózy, poté co její množství překročí hydrolytickou kapacitu enzymu laktázy (Jansson-Knodedll *et al.*, 2020). Příznaky ustávají krátce po vypuzení plynatosti a tekuté stolice. Široká variabilita závažnosti symptomů, které lze pozorovat u stejných i různých jedinců, závisí na množství a frekvenci požití laktózy a na schopnosti ji trávit. Symptomy závisí také na schopnosti střevních bakterií fermentovat laktózu (Auricchio a Pitchumoni, 1994). V mnoha jiných případech tlusté střevo reabsorbuje část produktů bakteriální hydrolýzy a fermentace a nevyvolává příznaky, což vede k asymptomatickému průběhu (Deng *et al.*, 2015). Mezi další faktory, ovlivňující variabilitu a intenzitu projevů, patří: obsah tuku v potravinách s laktózou, vyprazdňování žaludku (zpomaluje se s vyšším obsahem lipidů), doba průchodu střevem, kapacita vstřebávání vody a subjektivní citlivost pacientů na bolest (Laxminarayan *et al.*, 2015).

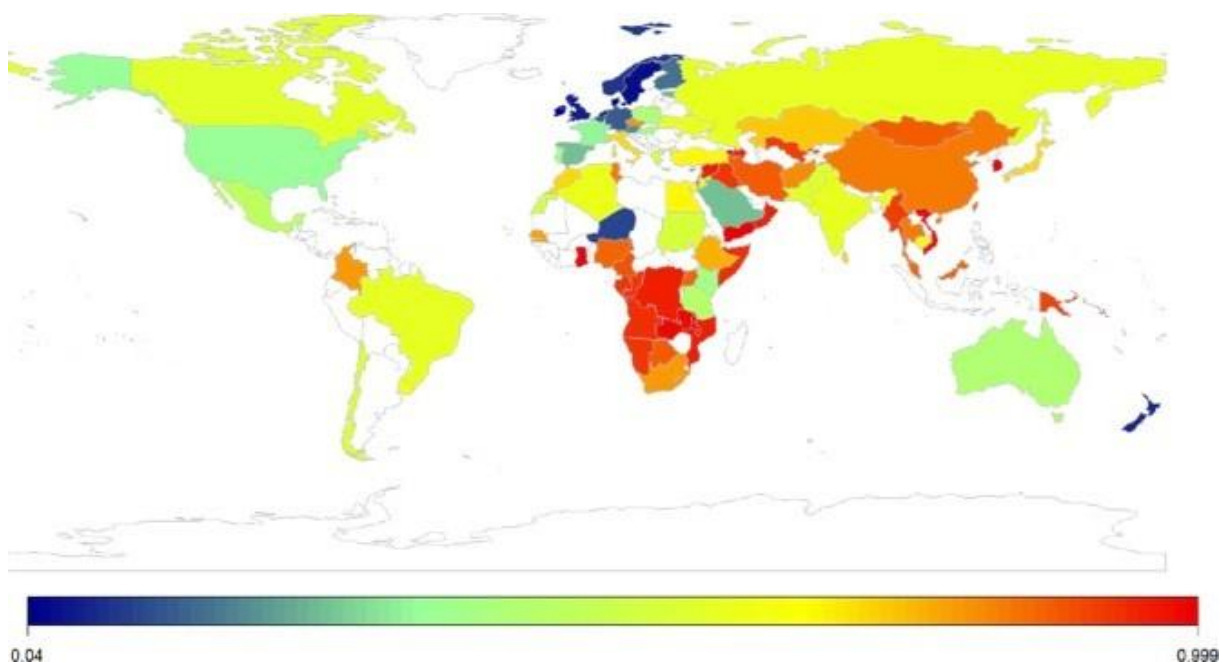
Neexistuje jednotný názor na minimální dávku laktózy vedoucí k příznakům intolerance. Požití 50 g laktózy vyvolává symptomy u 80-100 % pacientů s hypolaktázií, ačkoli ti, kteří jsou považováni za extrémně intolerantní, mohou vykazovat symptomy už po požití pouze 3 g laktózy (odpovídá 60-70 ml kravského mléka). Většina pacientů s primární hypolaktázií snese 10-12 g laktózy (odpovídá 200-250 ml mléka) bez výraznějších příznaků (Deng *et al.*, 2015).

Jako symptomy laktózové intolerance byly popsány i nestřevní příznaky jako bolest hlavy, zhoršení paměti, bolesti pohybového aparátu, poruchy srdečního rytmu, suchost sliznic, deprese, vředy na sliznici dutiny ústní a další alergické reakce (Matthews, 2005; Treudler *et al.*, 2002). Příčinou mohou být toxické účinky produktů špatného trávení laktózy či bakteriální fermentace, které mění buněčné signály. V těchto případech je důležité zvážit skutečný vliv samotné intolerance spolu s vlivem dalších faktorů (Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018) jako je např. složení mikrobiomu. Podobnost symptomů laktózové intolerance a jiných GIT obtíží může komplikovat správné určení diagnózy (Tag *et al.*, 2008). Až 20 % pacientů s intolerancí laktózy může vykazovat i alergii na mléčnou bílkovinu (Matthews, 2005; Phillips, 1999).

Někdy je laktózová intolerance spojována s úzkostí a stresem, protože pacienti mohou být nepřizpůsobiví vůči jakýmkoli dietním faktorům, které jim způsobují nepohodlí. Kromě toho může mnoho lidí s intolerancí laktózy trpět efektem „nocebo“. Tito lidé očekávají, že léčebný postup zhorší jejich zdravotní stav a ten se v důsledku tohoto očekávání skutečně zhorší, pravděpodobně vlivem faktorů prostředí nebo v souvislosti s jinými poruchami trávení s velmi podobnými příznaky (Zheng *et al.*, 2015; Gugatschka *et al.*, 2005).

2.5 Prevalence laktózové intolerance

Laktázová non-perzistence patří mezi běžné GIT poruchy popisované po celém světě. V současné době je přibližně 35 % světové dospělé populace perzistentních na laktázu (Ingram *et al.*, 2009; Itan *et al.*, 2010; Liebert *et al.*, 2017). Existuje ale velká geografická variabilita s rozdíly mezi etnickými skupinami, a dokonce i subpopulacemi (Obr. 6).



Obr. 6: Mapa rozšíření laktáza non-perzistentních genotypů. Oblasti označené zelenou a modrou barvou (severní Evropa, západní Afrika, Saúdská Arábie a jihozápadní Írán) vykazují nejvyšší frekvence LP, zatímco oblasti označené oranžovou a červenou barvou ukazují oblasti, ve kterých převažuje laktáza non-perzistentní obyvatelstvo (Misselwitz *et al.*, 2019).

Přibližně 90-97 % populace severní Evropy je perzistentních vůči laktáze, přičemž ve střední Evropě výskyt klesá na 44-84 % a v jižní a jihovýchodní Evropě na 11-64 % (Ingram *et al.*, 2009; Itan *et al.*, 2010). Například ve Španělsku jsou globální procenta podobná jako ve zbytku Evropy, ačkoli někteří autoři uvádějí 13-15% odchylku v Barceloně a 32,5% v Galicii (Koukkanen *et al.*, 2006; Matthews, 2005; Berni Canani *et al.*, 2016). Relativně vysoké frekvence LP jsou pozorovány u některých populací severozápadního indického subkontinentu, zatímco nižší frekvence se nacházejí v jižní a východní Indii (Gallego Romero *et al.*, 2011; Swallow a Hollox, 2000). LP je poměrně vzácná v populacích východní a jihovýchodní Asie, stejně jako u domorodých populací z Austrálie, Oceánie a Ameriky. Protože však současnou americkou populaci za posledních 500 let tvoří převážně přistěhovalci, je prevalence LP určena původem příchozí populace. Přibližně 75 % Američanů severoevropského původu jsou LP, zatímco Američané mexického původu jsou LP ve 27 %. Afrokaribští předkové mají méně než 20 % LP a domorodí Američané přibližně 1 % LP (Anguita-Ruiz *et al.*, 2020; Swallow a Hollox, 2000).

V Africe a na Středním východě je prevalence LP poněkud složitější. Rozšíření LP v těchto populacích vysvětluje lépe než geografické umístění etnická příslušnost a strategie obživy (Holden a Mace, 1997; Mulcare *et al.*, 2004; Tishkoff *et al.*, 2007).

Vysoké frekvence LP jsou pozorovány v mlékárenských oblastech v Africe a na Blízkém východu nebo v pasteveckých populacích, zatímco nižší frekvence se nacházejí v nemléčných zemědělských populacích a populacích lovců a sběračů (Holden a Mace, 1997). Například 70 % beduínů (arabských nomádských pastevců) v Jordánsku jsou LP, zatímco jen 20 % jejich sousedních arabských subpopulací jsou LP (Swallow, 2003). Tento vysoký rozdíl frekvencí LP v sousedních populacích je s největší pravděpodobností způsoben kombinací rozdílů v obživě, odlišném původu populací a v omezeném toku genů mezi populacemi v důsledku jazykových či jiných kulturních bariér (Walker a Thomas, 2019).

V České republice by se měla prevalence laktázové perzistence pohybovat kolem 70 % (Swallow, 2003; Hubáček *et al.*, 2017).

2.6 Hypotézy upřednostňující perzistenci laktázy

Existuje několik hypotéz vysvětlujících geografickou rozmanitost laktázové perzistence mezi populacemi. K nalezení správné hypotézy pro danou oblast může vést vysvětlení složitých procesů evoluce laktázové perzistence, jehož výsledkem je selekčně výhodná mutace v nejméně pěti SNP v různých populacích (Anguita-Ruiz *et al.*, 2020; Beja-Pereira *et al.*, 2003; Walker a Thomas, 2019).

2.6.1 Kulturně-historická hypotéza

Jedná se o koevoluční teorii, ve které je vybraný genetický rys ovlivněn kulturním prostředím. Kulturně-historická hypotéza byla navržena nezávisle dvěma vědci na počátku 70. let, kteří předpokládali, že laktázová perzistence (LP) je adaptací na tisíce let pastevectví a spotřebu mléka (McCracken, 1971; Simoons, 1969). Tato hypotéza samozřejmě předpokládá, že vývoj mlékárenství byl na prvním místě a genetická odpověď ve formě selekčně výhodné bodové mutace pak následovala (Simoons, 1970). V roce 2007 Joachim Burger *et al.* (2007) zkoumali DNA z kostí raných farmářů ve střední Evropě a zjistili, že evropská alela T v SNP C/T-13910 buď chyběla, nebo byla přítomna jen ve velmi nízkých frekvencích. Tato data v drtivé většině podporují kulturně-historický model původu

LP v Evropě a podobné analýzy naznačují stejný scénář v Africe (Salque *et al.*, 2013; Schlebusch *et al.*, 2013) a jižní Asii. (Gallego Romero *et al.*, 2011). Jedinci s LP mohou získat až o 30 % více kalorií trávením laktózy a přístup k dalším prospěšným živinám mléka, jako jsou tuky, bílkoviny, vitamíny a minerály. Další výhodou je absence klinických příznaků laktázové non-perzistence jako je průjem, křeče a plynatost (Brüssow, 2013).

2.6.2 Hypotéza asimilace vápníku

Rozšíření LP v Evropě souvisí se zeměpisnou šířkou. Flatz a Rotthauwe (1973) si všimli tohoto vztahu a navrhli hypotézu asimilace vápníku, podle níž mléko poskytuje důležitý zdroj vápníku a v menší míře vitamínu D obyvatelům severní Evropy. Vitamin D (konkrétně vitamin D3, cholekalciferol) se může vytvářet v kůži vystavením UVB záření. Ve vyšších zeměpisných šířkách jsou dopadající hladiny UVB často příliš nízké pro dostatečnou produkci vitamínu D (Jablonski a Chaplin, 2010) a bez adekvátního zdroje potravy může vést tento nedostatek ke křivici (Cordain *et al.*, 2012). Mléko by v této situaci u obyvatel severní Evropy doplňovalo vitamin D a poskytovalo jim vápník. Vysoké hladiny LP jsou však pozorovány ve skupinách Afriky a Blízkého východu, kde jsou hladiny UVB vysoké, což vede k dostatečné biosyntéze vitamínu D. Hypotéza asimilace vápníku tak může vysvětlit některé distribuce LP pozorované v severní Evropě, ale je nepravděpodobné, že by byla relevantní v nižších zeměpisných šířkách (Jablonski a Chaplin, 2010; Holden a Mace, 2009).

2.6.3 Hypotéza klimatické aridity

Hypotéza aridity klimatu předpokládá, že čerstvé mléko poskytuje zdroj tekutiny, což by bylo zvláště výhodné v suchých oblastech nebo v období sucha. Jedinci s LNP by trpěli špatným trávením a průjmem, což by zhoršovalo dehydrataci s potenciálně fatálními následky. Tato hypotéza může vysvětlit rozšíření LP ve vyprahlých oblastech Afriky a Středního východu. V Evropě je hypotéza aridity klimatu méně relevantní, protože velké sucho je vzácné, přesto mléko může poskytnout tekutinu a možná životně důležitou přechodnou potravu během občasných neúrod (Cook a Al-Torki, 1975; Cook, 1978).

2.6.4 Hypotéza průjmu hladovějících

V populacích, které jsou závislé jak na mlékárenství, tak na zemědělství, může být běžná neúroda. Za takových okolností jsou mléko a mléčné výrobky důležité záložní potraviny. Při neúrodě zemědělských plodin by se nejdříve spotřebovaly mléčné produkty s nízkým obsahem laktózy a potraviny s vyšším obsahem laktózy by byly konzumovány později. Potraviny s vysokým obsahem laktózy by prospěly ale jen podvyživeným jedincům s LP. Konzumace těchto mléčných produktů podvyživenými jedinci s LNP mohla být katastrofální. To by vedlo k epizodickým, ale velmi vysokým selekčním tlakům na LP a LNP jedince (Ingram *et al.*, 2009; Sverrisdóttir *et al.*, 2014).

2.6.5 Hypotéza rezistence proti malárii

Další hypotéza se zabývá předpokladem, že vysoký obsah riboflavinu a obsah kyseliny paraaminobenzoové (PABA) v mléce by mohl působit jako ochrana před malárií způsobenou parazitickým prvokem *Plasmodium falciparum*. (Cordain *et al.*, 2012; Beja-Pereira *et al.*, 2003). Fulbové jsou kočovní pastevci pijící mléko, kteří se nacházejí po celé západní a střední Africe. Toto etnikum má prevalenci LP 68 % (Swallow, 2003) a vyznačuje se nižšími incidencemi malarické infekce než sousední nepastoralistické skupiny (Berezky *et al.*, 2006). LP a nižší výskyt malárie však v západní Africe korelují, přičemž dosud nebyla zjištěna žádná přesvědčivá příčina (Beja-Pereira *et al.*, 2003).

2.6.6 Hypotéza trávení floridzinu

Enzym LPH štěpí nejen laktózu, ale i hydrolyzuje floridzin a řadu dalších rostlinných glykosidů. Floridzin je glukosid, který se nachází ve stoncích, kořenech a kůře rostlin z čeledi růžovitých (*Rosaceae*). Tato rozsáhlá čeleď zahrnuje ovocné stromy jako jsou jabloně, třešně a hrušně. Tato flora roste jak v severní Evropě, tak i v Africe, kde jsou hladiny LP vysoké. Například obyvatelé Tanzanie (etnická skupina Hadzové) nemají žádnou historii chovu nebo pastevectví, a přesto je 47 % perzistentních vůči laktóze na základě výsledků testů tolerance laktózy měřících hladinu glukózy v krvi (Ranciaro *et al.*, 2014). Genetické výzkumy nenalezly žádnou z pěti známých variant LNP, což naznačuje možnost, že v Tanzanii mohou existovat dosud neznámé varianty LNP. Jelikož se floridzin používá v tradiční medicíně k léčbě malárie

a dalších infekčních onemocnění, je možné, že LP pozorovaná u Hadzů je spíše reakcí na žádoucí metabolizaci floridzinu, než samotné laktózy (Németh, 2003; Ranciaro *et al.*, 2014).

2.6.7 Hypotéza galaktózy jako prebiotika

V rané evoluci hrály oligosacharidy obsažené v mléce pravděpodobně hlavní roli v antimikrobiální ochraně. Kolostrum, které má velmi vysoký obsah mléčných oligosacharidů, si zachovalo část této rané funkce tím, že poskytuje imunitu novorozencům (Miller a McVeagh, 1999). Po štěpení laktóza poskytuje tělu glukózu, která se rychle vstřebává, a galaktózu. Většina galaktózy je také absorbována v tenkém střevě a transportována do jater za účelem přeměny na glukózu či skladování ve formě glykogenu. Část galaktózy přechází do tlustého střeva, kde může vyživovat určité střevní bakterie, případně působit jako prospěšné prebiotikum. (Cederlund *et al.*, 2013; Gibson *et al.*, 2017; Wahlqvist, 2015). Nedávné studie ukázaly, že oligosacharidy, poskytující galaktózu, přidané do umělého mléka působily u novorozenců jako prebiotika tím, že stimulovaly růst bifidobakterií a zvýšily střevní metabolickou aktivitu mikrobiomu (Knol *et al.*, 2005). To může podpořit roli galaktózy jako prebiotika. S rostoucí hustotou populace v neolitu a následným nárůstem infekčních onemocnění mohla schopnost štěpit laktózu do dospělosti nejen poskytnout další životně důležité nutriční hodnoty, ale také hrát celoživotní prebiotickou roli při udržování zdravého střevního mikrobiomu (Miller a McVeagh, 1999).

2.7 Diagnostika

Při správném diagnostickém postupu lze určit typ a stupeň intolerance laktózy a doporučit nejlepší možnou terapii. Důležitá je také klinická anamnéza a fyzické vyšetření pacientů s podezřením na intoleranci laktózy. Přítomnost symptomů, jako jsou bolesti břicha, průjem, nevolnost, plynatost a nadýmání, jsou příznaky intolerance sacharidů, i když mají nespecifický charakter. Mezi další faktory, které je třeba vzít v úvahu, patří: osobní a rodinná anamnéza; doba, která uplynula mezi požitím a nástupem symptomů; matrice, ve které byla laktóza požitá (mléko, fermentované mléčné výrobky, léčiva); věk nástupu apod. (Usai-Satta *et al.*, 2012).

Diagnostické metody lze rozdělit na invazivní nebo neinvazivní a přímé nebo nepřímé podle toho, zda zahrnují střevní biopsii či nikoli.

2.7.1 Neinvazivní, nepřímé metody

2.7.1.1 Supresivní a provokační test

Supresivní a provokační test spočívá ve striktním vyloučení laktózy ze stravy na dva týdny a poté je znovu zavedena. Pokud klinické příznaky zmizí s bezlaktózovou dietou a znovu se objeví po jejím ukončení, naznačuje to, že osoba je intolerantní. Nevýhodou je, že tento test neumožňuje diagnostiku asymptomatických jedinců trpících malabsorpcí. Supresivní a provokační test je téměř stejně efektivní metodou pro vyhodnocení laktóзовé intolerance jako vodíkový test s nižšími náklady na diagnostiku (Castiglione *et al.*, 2008).

2.7.1.2 Dechový vodíkový test

Dechový vodíkový test je nejběžnější, protože je to jednoduchý, praktický a rychlý způsob stanovení intolerance laktózy. Má specificitu mezi 89 % a 100 % a senzitivitu mezi 69 % a 100 % (Castiglione *et al.*, 2008). Test je založen na bakteriální fermentaci nehydrolyzované laktózy a následné produkci methanu (CH₄), oxidu uhličitého (CO₂) a vodíku (H₂). Vodík se šíří střevní stěnou do krevního řečiště a dostává se do plicních alveol, kde je následně vydechován. Vodík lze detekovat a kvantifikovat plynovou chromatografií (Mattar *et al.*, 2012). Test spočívá v podání 2g laktózy na kg váhy (maximálně však 45 g laktózy rozpuštěné ve 250 ml vody). Po vypití roztoku se kvantifikuje množství vodíku, methanu a oxidu uhličitého každých 30 minut po dobu 3 hodin a získané hodnoty se porovnají. Nárůst H₂ o více než 20 ppm je považován za pozitivní; 10-20 ppm se považuje za neprůkaznou hodnotu (Yang *et al.*, 2013). Tyto referenční hodnoty mohou být upraveny v závislosti na naměřených hodnotách CO₂ a methanu. Falešně negativní výsledky se mohou objevit, pokud pacienti užívali antibiotika alespoň jeden měsíc před vyšetřením, nebo pokud konzumovali laxativa, probiotika, prokinetika nebo elektrolytové roztoky pro přípravu kolonoskopie a z důvodu hyperventilace (pláč) nebo fyzické zátěže. Falešně pozitivní se mohou objevit při příjmu nevstřebatelných sacharidů předchozí den, tabáku (před a během testu) nebo hypoventilaci (spánek) (Castiglione *et al.*, 2008; Rezaie *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2013).

2.7.1.3 Test kyselosti stolice

Měření pH stolice a redukčních látek je užitečné pouze v případě, že jedinec neomezeně požívá laktózu. Tento test je nespecifický a má nízkou citlivost. U intolerantních osob je stolice po příjmu disacharidu kyselá. Toto snížení pH je způsobeno přítomností těkavých mastných kyselin v důsledku bakteriálního trávení neabsorbovaných sacharidů. Pokud je pH pod 5,5, pak je to indikátor malabsorpce laktózy. Test kyselosti stolice ztrácí diagnostickou hodnotu u kojenců. Ti jsou krmeni převážně mateřským mlékem, a v důsledku toho dochází k relativnímu nedostatku enzymu laktázy ve vztahu k vysokému množství laktózy v mléce. Normální pH stolice kojenců je tedy přirozeně nižší než u zbytku populace. Tento test je méně citlivý než předchozí, protože střevní bakterie dokážou zcela strávit nevstřebané sacharidy (Furnari *et al.*, 2013; Szilagyi a Ishayek, 2018).

2.7.1.4 Laktózový toleranční test

Glukóza se stanovuje v krevní plazmě před a po požití 50 gramů laktózy. Glykémie se měří každých 30 minut po dobu dvou hodin. Hladiny glukózy nad 20 mg/dl ukazují na toleranci laktózy. Falešně pozitivní výsledky se mohou vyskytnout až u 30 % pacientů v důsledku rychlé reakce na inzulín. Falešně negativní výsledky se mohou objevit u diabetických pacientů. Test má specificitu 77-96 % a senzitivitu 76-94 %, ale není dostatečně citlivý. Používá se hlavně u dospělých pacientů a jen výjimečně u dětí. Přestože se jedná o jednoduchý a levný test, má tendenci vytvářet matoucí výsledky a je pro pacienta nepohodlný, proto je více preferován dechový vodíkový test (Marton *et al.*, 2012; Misselwitz *et al.*, 2013).

2.7.2 Invazivní, přímé metody

2.7.2.1 Test enzymatické aktivity

Před enzymatickým vyšetřením vzorku musí být provedena biopsie sliznice jejunu. Za pozitivní výsledek testu se považuje, když je aktivita laktázy nižší než 10 U/g. Tento test může poskytnout falešně negativní výsledky, protože laktáza má velmi nepravidelné rozmístění na sliznici a nemusí nutně představovat, co se děje v celém střevě. V porovnání s ostatními neinvazivními testy má tento test nižší citlivost a vyžaduje specializované přístupy.

V současné době je test enzymatické aktivity používán jen zřídka kvůli jeho invazivitě a vysoké ceně (Troelsen, 2005; Swallow, 2003). Tento test dokáže prokázat jak primární, tak i sekundární typ laktóзовé intolerance (Misselwitz *et al.*, 2019).

2.7.2.2 Rychlý test duodenální biopsie (Rychlý test laktóзовé intolerance)

Tento test je založen na kolorimetrické reakci ve vzorku tkáně odebrané z duodena a inkubované s laktózou po dobu 20 minut. U lidí s normální enzymatickou aktivitou vzorek změni barvu. Reakce byla provedena ve dvou krocích: 15minutová laktázová reakce, po které následuje 5minutová signální reakce, ve které se uvolněná glukóza měří glukózaoxidáza/peroxidázovou reakcí. U pacientů s těžkou duodenální hypolaktázií či alaktázií je senzitivita 95 % a specificita 100 %. Test duodenální biopsie má vysokou korelaci s genetickými testy (Catanzaro *et al.*, 2021; Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018).

2.7.3 Genetický test

Genetický test může být užitečný pro odlišení primární hypolaktázie od sekundární a pro diagnostiku predispozice pacientů (kteří nemusí být nutně nemocní) k rozvoji primární laktóзовé intolerance. Identifikuje různé polymorfismy genu *MCM6*. V Evropě a u bělošských populací to jsou SNP C/T-13910 a G/A-22018. To ale neplatí pro arabské a africké populace, kde jsou přítomny mutace v jiných SNP (Tishkoff *et al.*, 2007; Ingram *et al.*, 2007). Genetický test je proveden pomocí primer-specifické PCR amplifikace DNA, extrahované ze vzorku slin či periferní krve, v oblasti výskytu polymorfismů zodpovídajících za laktóзовou intoleranci. Genetická analýza má až 100 % specificitu a 93 % senzitivitu. Tento typ testu umožňuje rychlou, definitivní a v případě primárního vzorku slin neinvazivní diagnostiku. Nevýhodou genetického vyšetření je potřeba specializovaných laboratoří a její vyšší cena (Enattah *et al.*, 2002; Mattar *et al.*, 2012).

2.8 Léčba

Hlavní strategií léčby intolerance laktózy je odstranění nebo alespoň snížení intenzity příznaků a zároveň zajištění dostatečného příjmu živin. Léčba závisí na závažnosti intolerance a věku pacienta. Existují čtyři obecné zásady pro léčbu intolerance laktózy: snížení nebo vyloučení příjmu laktózy, nahrazení laktózy alternativními živinami, podávání enzymatických náhražek laktázy a suplementace vápníku a vitamínu D. Dalším důležitým bodem léčby je také edukace pacienta (Suchy *et al.*, 2010).

Nejlepší způsob, jak snížit laktózu ve stravě a zachovat potřebu živin, jako je vápník, představuje konzumace mléčných výrobků bez laktózy. Nedostatek vápníku může způsobit osteoporózu, proto je důležité udržovat jeho přiměřený příjem. Existují studie ukazující, že hypolaktázie a špatné trávení laktózy nemění absorpci vápníku (Griessen *et al.*, 1989; Enattah *et al.*, 2004). Naproti tomu jiné studie tvrdí, že absorpce vápníku je významně snížena u intolerantních jedinců, když vyloučí laktózu ze své stravy, protože disacharid stimuluje její absorpci ve střevě (Griessen *et al.*, 1989; Enattah *et al.*, 2004).

V posledních letech nabízí potravinářský průmysl širokou škálu vysoce kvalitních produktů s nízkým obsahem laktózy, či dokonce bezlaktózových produktů, které nahrazují normální mléko a zároveň obsahují stejný podíl živin jako potraviny s laktózou. Cílem je, aby se intolerantní člověk nemusel vzdát konzumace mléčných výrobků. Rostlinné nápoje (sójové, kokosové, rýžové, mandlové...) jsou také běžně dostupné a jsou prodávány jako náhražky mléka s přidanými cukry a dalšími nutrienty, jako je vitamín D a vápník obohacující jejich nutriční hodnotu (Santos *et al.*, 2019; Mäkinen *et al.*, 2015).

Lidé, kteří nekonzumují mléko a mléčné výrobky, potřebují dietní alternativy některých živin, jako je vápník a vitamín D. Mezi další zdroje vápníku kromě mléčných výrobků patří luštěniny nebo zelenina. Důležité jsou také potraviny živočišného původu, včetně ryb a mořských plodů. Vitamin D lze získat konzumací tučných ryb (např. losos), vajec, jater a dalších potravin (Santos *et al.*, 2019; Gordon *et al.*, 2004).

Sedmdesát až osmdesát procent pacientů má pozitivní odezvu na bezlaktózovou dietu. V jiných případech může být přetrvávání symptomů způsobeno jinou základní příčinou, jako je například syndrom dráždivého tračníku (Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018). Jak již bylo zmíněno, naprostá většina intolerantních jedinců snese až 100–200 ml mléka, což odpovídá dávce asi 5–10 g laktózy, rozložené do celého dne. Stojí za zmínku, že plnotučné mléko je

ve srovnání s odstředěnými nebo polotučnými mléčnými výrobky lépe tolerováno, protože tuky mohou zpomalit vyprazdňování žaludku (Deng *et al.*, 2015).

Po počátečním období vyloučení laktózy (nejméně na čtyři týdny) se někdy doporučuje zařadit do stravy její malé množství proto, aby se ověřila tolerance a adaptace střevní flóry (Usai-Satta *et al.*, 2012). Po tomto období bezlaktózové diety a vymizení příznaků je často dobře tolerováno až 240 ml mléka (12 g laktózy) za den (Suarez *et al.*, 1996). Navíc opětovné zavedení laktózy může pomoci snížit příznaky intolerance laktózy, což naznačuje, že může dojít k adaptaci mikroflóry tlustého střeva, kdy se laktóza chová jako prebiotikum (Forsgård, 2019; Hertzler a Savaiano, 1996; Briet *et al.*, 1997; Lomer *et al.*, 2007).

U sekundárního deficitu laktázy je nejdůležitější strategií odstranění původní patologie. Aktivita laktázy se postupně obnoví během týdnů nebo měsíců, jakmile bude odstraněno poškození střevní sliznice (Lomer *et al.*, 2008; Heyman *et al.*, 2006).

2.9 Klinicky obdobné stavy

2.9.1 Alergie na mléčnou bílkovinu

Potravinová alergie je abnormální reakce na určitý typ potravin nebo některé její složky při požití, vdechnutí nebo jiném druhu kontaktu, která vede k souboru klinických projevů způsobených imunologickými mechanismy, zprostředkovanými nebo nezprostředkovanými imunoglobulinem IgE (El-Agamy, 2007).

Alergie na mléčnou bílkovinu je jednou z hlavních potravinových alergií a postihuje většinou kojence, přičemž může přetrvávat i do dospělosti a může být velmi závažná. Je způsobena interakcí jedné nebo více mléčných bílkovin a jednoho nebo více imunitních mechanismů, což má za následek okamžitou IgE zprostředkovanou reakci. Kravské mléko obsahuje více než 20 proteinů, které mohou způsobit alergické reakce, hlavními alergeny jsou kasein a syrovátkový protein (El-Agamy, 2007; Manuyakorn a Tanpowpong, 2019).

Alergičtí jedinci mají obvykle reakce na téměř všechny druhy živočišného mléka, a to díky přítomnosti některé z těchto bílkovin v mléce různých druhů savců (Wal, 2004; Vojdani *et al.*, 2018). Příznaky alergie na mléčnou bílkovinu se mohou projevit okamžitě či pouze několik hodin po konzumaci mléka nebo kojenecké výživy (El-Agamy, 2007). V 50 až 75 % případů se projevují v gastrointestinálním traktu a obvykle zahrnují bolesti

břicha, zvracení a průjem. V 50 % případů byly zjištěny obtíže dýchacích cest jako rýma, kýchání, kašel nebo sípání. 10 až 30 % lidí má kožní příznaky, jako je svědění, edém, vyrážka nebo kopřivka. Jedním z nejzávažnějších projevů alergie na mléčnou bílkovinu je anafylaktický šok, který byl pozorována u 12 % případů (El-Agamy, 2007; Sicherer a Sampson, 2010).

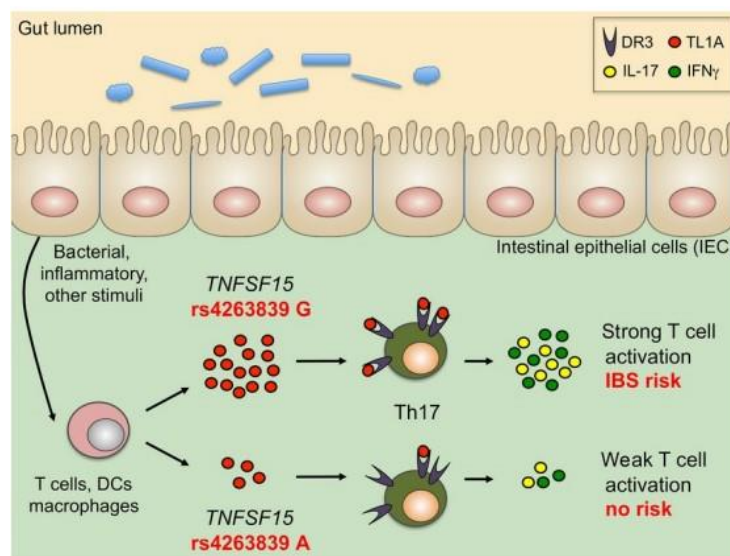
V dětském věku je prevalence od 4 do 6 % (Silva *et al.*, 2020). Jedinou dostupnou léčbou alergie na mléčnou bílkovinu je vyloučení mléka ze stravy (Manuyakorn a Tanpowpong, 2019).

2.9.2 Syndrom dráždivého tračníku

Syndrom dráždivého tračníku (*Irritable Bowel Syndrom*, IBS) je běžná gastrointestinální porucha heterogenní etiologie, která postihuje až 10% celosvětové populace (Camilleri a Katzka, 2012; Zucchelli *et al.*, 2011). Až 70 % pacientů s diagnózou syndromu dráždivého tračníku hlásí příznaky, které souvisí se špatně vstřebanými fermentovatelnými uhlohydráty, např. laktózou (Zheng *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2014). IBS má hodně podobné klinické příznaky jako laktózová intolerance. Vyznačuje se především opakující se bolestí břicha, nadýmáním, zácpou a/nebo průjmem. Podle kritérií ROME IV je rozdělena do čtyř podtypů: IBS s převládajícím průjmem (IBS-D), IBS s převládající zácpou (IBS-C), IBS se střídavým průjmem a zácpou (IBS-M) a nepodtypová IBS (IBS-U) (Zhu *et al.*, 2019; Zucchelli *et al.*, 2011; Longstreth *et al.*, 2006).

Genetické faktory mohou zvyšovat predispozici syndromu dráždivého tračníku. Výsledky analýzy jednonukleotidových polymorfismů (SNP) u pacientů s IBS dlouho nepřinášely konzistentní výsledky. Zhu *et al.* (2019) vyhodnotili na základě metaanalýzy deset relevantních genů spojených se zvýšeným rizikem IBS. Podle výsledků této studie bylo potvrzeno, že polymorfismy rs4263839 a rs6478108 v genu *TNF SF15* jsou spojeny se zvýšeným rizikem IBS, zatímco SNP rs1800896 v genu *IL10* je spojen se sníženým rizikem IBS (Zhu *et al.*, 2019). Nejvýznamnější souvislost mezi rozvojem IBS a genetickým stanovením SNP byla popsána u polymorfismu rs4263839 (A>G) *TNF SF15* (Zhu *et al.*, 2019). Tento SNP se nachází na chromozomu 9q32 a kromě asociace s IBS je také spojován s rizikem Crohnovy choroby (Zucchelli *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2019;

Czogalla *et al.*, 2015). Základem asociace polymorfismu rs4263839 s IBS je hypotetický mechanismus, který znázorňuje Obr. 7 (Henström, 2018).



Obr. 7: Gen *TNF SF15* kóduje ligand 1A, který je podobný tumor necrosis factoru (TL1A), ten je exprimován imunitními buňkami a zesiluje imunitní reakci ve střevě sliznice, což může vést k rozvoji IBS (Henström, 2018).

Alpers uvedl, že 45 % pacientů s IBS má intoleranci laktózy, ale pouze 30 % spojovalo své příznaky s mlékem a mléčnými výrobky. Při vyloučení mléka a mléčných produktů ze stravy se symptomy zlepšily pouze u 52 % pacientů (Alpers, 2006; Varjú *et al.*, 2019). Je zajímavé, že někteří pacienti s IBS bez maldigesce laktózy popisují příznaky intolerance laktózy. Kromě toho studie ukázaly, že u IBS pacientů i bezlaktózové mléko způsobuje stejné příznaky jako laktóza u lidí s diagnostikovanou intolerancí laktózy. To může znamenat, že základním stavem je IBS (Bernardes-Silva *et al.*, 2007; Vesa *et al.*, 1998; Suarez a Levitt, 1996). Porozumění vztahu mezi laktózovou intolerancí a syndromem dráždivého tračníku by mohlo být přínosem pro stanovení definitivní diagnózy a mohlo by to vést k racionálním léčebným a dietologickým postupům (Spiller, 2021).

3 CÍLE PRÁCE

- i. Praktické zvládnutí základních laboratorních metod jako je izolace DNA, příprava a optimalizace PCR, restrikční štěpení, gelová elektroforéza, metoda PCR-RFLP, real-time PCR, sekvenace PCR produktu, analýza získaných dat.
- ii. Zjištění genových variant v *MCM6* genu, asociovaných s predispozicí pro laktózovou intoleranci, a v genu *TNF SF15*, spojeného s výskytem syndromu dráždivého tračníku.
- iii. Statistické zpracování výsledků zjišťujících predispozici pro laktózovou intoleranci klientů vyšetřených v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. během let 2014 až 2021.
- iv. Vyhodnocení možné genetické asociace mezi laktózovou intolerancí a syndromem dráždivého tračníku.

4 MATERIÁLY A METODIKA

Praktická část diplomové práce byla realizována v genetické laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích pod vedením Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. Metoda sekvenování byla provedena externí firmou SEQme s.r.o.

Soubor pro statistické zpracování výsledků se skládal z 1989 vzorků získaných od klientů genetické laboratoře GENLABS s.r.o., kteří byli na základě žádanky a informovaného souhlasu testováni k zjištění predispozice pro laktózovou intoleranci v letech 2014 až 2021.

V rámci SGA projektu byly nasbírány a vyšetřeny vzorky od 20 dobrovolníků ve věku 1-14 let, kteří vykazují dlouhodobé gastrointestinální obtíže a problémy s trávením laktózy. Většina (17) dobrovolníků byla vybrána ve spolupráci s dětskou gastroenterologií Nemocnice Písek, a.s. Pro doplnění zkoumané skupiny dětských pacientů byly vybráni další 3 dětská dobrovolníci, kteří byli klienty genetické laboratoře GENLABS a byly u nich popsány dlouhodobé gastrointestinální potíže. Každý účastník a jeho zákonný zástupce byl seznámen s účastí v projektu a podepsal souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením.

Genetická predispozice pro laktózovou intoleranci se v laboratoři rutinně vyšetřuje metodou PCR-RFLP. Stanovují se genotypy dvou polymorfismů (C/T-13910 a G/A-22018), které jsou spojovány s laktózovou intolerancí v evropské populaci. Kombinované genotypy, pro jeden polymorfismus homozygotní a pro druhý heterozygotní, byly vyšetřeny další metodou Sangerova sekvenování v externí laboratoři SEQme s.r.o. Vzhledem k tomu, že tyto kombinované genotypy nejsou v odborné literatuře téměř popisovány, sekvenační analýza byla zvolena jako metoda konfirmační.

V rámci SGA projektu pro stanovení možné genetické asociace mezi laktózovou intolerancí a syndromem dráždivého tračníku byla pro laktózovou intoleranci použita metoda real-time PCR s využitím fluorescenčně značených sond (alelická diskriminace). Ke stanovení SNP rs4263839 v genu *TNF SF15* spojeného s výskytem syndromu dráždivého tračníku byla zvolena metoda sekvenace. Pro vyšetřování SNP rs4263839 v běžné praxi byla zavedena metoda real-time PCR s následnou analýzou křivek tání.

4.1 Odběr vzorku a jeho transport do laboratoře

Primárním vzorkem pro vyšetření predispozice k laktóзовé intoleranci byl bukální stěr a periferní krev. Odběrové sady pro bukální stěr (*Isohelix SKa Buccal Swab*) byly klientům předány osobně nebo zaslány poštou, k této sadě byl přiložen návod pro odběr vzorku, žádanka na genetické vyšetření a informovaný souhlas s molekulárně-genetickým vyšetřením. V případě primárního vzorku periferní krve byla klientovi krev odebrána v Biochemické laboratoři EUC Kliniky v Českých Budějovicích. Vzorky byly do laboratoře odeslány či transportovány ihned po jejich odběru. Vzorek periferní krve i bukální stěr byly ihned po přijetí laboratoři zpracovány, aby nedošlo k jejich znehodnocení.

4.2 Izolace DNA

Izolace genomové DNA byla prováděna ze stěru bukální sliznice či ze vzorku periferní krve. Volba primárního vzorku nebyla pro vyšetření predispozice k laktóзовé intoleranci zásadní.

4.2.1 Izolace genomové DNA z bukálního stěru

Izolace DNA z bukálního stěru byla provedena pomocí izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini dle doporučení výrobce. Odchytky od výrobcem doporučeného protokolu byly v objemech použitých reagentů. Použité reagenty a jejich objem jsou uvedeny v tabulce č. II.

Tab. II: Reagenty kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini použité pro izolaci jednoho vzorku bukálního stěru.

| Reagenty | Objem (μl) |
|--------------|------------|
| Proteinasa K | 40 |
| BL buffer | 400 |
| 100% ethanol | 400 |
| BW buffer | 600 |
| TW buffer | 700 |
| AE buffer | 50 |

Od výrobce bylo doporučeno přidání 200 µl elučního AE pufru, ale z důvodu získání vyšší koncentrace izolované DNA bylo přidáno jen 50 µl. V elučním kroku byla prodloužená také inkubace při pokojové teplotě na 5 minut, místo doporučené 1 minuty. Eluční krok byl opakován napipetováním eluátu zpět na kolonku, aby byla získána co nejvyšší koncentrace DNA. Po izolaci bylo provedeno fluorometrické měření koncentrace DNA. Zkumavka s izolátem byla řádně označena a skladována v mrazícím boxu při teplotě -20 °C.

4.2.2 Izolace genomové DNA z plné krve

Izolace DNA ze vzorku periferní krve byla provedena pomocí izolačního kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini dle doporučení výrobce. Odchytky od výrobcem doporučeného protokolu byly v objemech použitých reagentů. Použité reagenty a jejich objem jsou uvedeny v Tabulce č. III.

Tab. III: Reagenty kitu GeneAll ExGene™ Clinic SV mini použité pro izolaci jednoho vzorku periferní krve.

| Reagenty | Objem (µl) |
|-----------------|-------------------|
| Proteinasa K | 20 |
| BL buffer | 200 |
| 100% ethanol | 200 |
| BW buffer | 600 |
| TW buffer | 700 |
| AE buffer | 50 |

Od výrobce bylo doporučeno přidání 200 µl elučního AE pufru, ale z důvodu získání vyšší koncentrace izolované DNA bylo přidáno jen 50 µl. V elučním kroku byla prodloužená také inkubace při pokojové teplotě na 5 minut, místo doporučené 1 minuty. Eluční krok byl opakován napipetováním eluátu zpět na kolonku, aby bylo dosaženo co nejvyšší koncentrace izolované DNA. Po izolaci bylo provedeno fluorometrické měření koncentrace DNA. Zkumavka s izolátem byla řádně označena a skladována v mrazícím boxu při teplotě -20 °C

4.3 Měření koncentrace DNA

Koncentrace genomové DNA byla u všech vzorků měřena fluorometricky na přístroji Qubit Fluorometr 2.0 (*ThermoFischer Scientific*). K měření byl použit kit Qubit™ dsDNA HS Assay (*Invitrogen*). Nejdříve byly všechny reagenty vytemperovány na pokojovou teplotu. Pro každý vzorek a každou standardu byl připraven pracovní roztok (Qubit™ Working Solution). Pro každý vzorek bylo smícháno 199 μl Qubit™ dsDNA BR buffer a 1 μl Qubit™ dsDNA BR reagent. Pracovní roztok byl zvortexován a stočen pomocí stolní centrifugy (Microspin FV-2400; *Biosan*). Do označených 0,5 ml mikrozkušavek (Qubit™ Assay Tubes) bylo napipetováno vždy 190 μl pracovního roztoku a 10 μl příslušné standardy (St I a St II) nebo 195 μl pracovního roztoku a 5 μl izolátu DNA. Mikrozkušavky byly krátce zvortexovány a stočeny a před měřením byly vzorky 2 minuty inkubovány při pokojové teplotě. Po inkubaci byla změřena koncentrace DNA a pomocí vzorků obsahujících standardy byl fluorometr zkalibrován. Následně mohla být změřena a zapsána koncentrace všech vzorků DNA.

4.4 Analýza polymorfismů v *MCM6* genu

4.4.1 PCR-RFLP

4.4.1.1 PCR

Pro analýzu polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018 byla použita MyTaq™ DNA polymerase od firmy Bioline. Příprava reakce probíhala v dekontaminovaném laminárním boxu (ESCO PCR Cabinet) v chladícím stojánku. Reakční mix byl připraven v následujících poměrech (Tab. IV, Tab V). Pro větší výtěžnost reakce byl použit navíc dimethylsulfoxid (DMSO). Master mix byl připraven do zkumavky o objemu 1,5 ml. Po krátkém vortexování a stočení byla reakční směs rozpipetována po 48 μl do řádně popsanych 0,2 ml zkumavek, do kterých se dále přidala DNA testovaných vzorků. V rámci každé analýzy byly souběžně analyzovány pozitivní a negativní kontroly reakce. U pozitivní kontroly byl použit vzorek DNA se známým genotypem a u negativní kontroly byla místo vzorku přidána deionizovaná voda pro kontrolu možné kontaminace.

Tab. IV: Složení reakčního mixu na jednu reakci pro polymorfismus C/T-13910.

| Reagenty | Objem (μl) |
|-------------------------------|-------------------|
| deionizovaná H ₂ O | 34,3 |
| 5x MyTaq Red Reaction Buffer | 10 |
| MyTaq Polymerase (5U/μl) | 0,2 |
| DMSO (100%) | 2,5 |
| LAC 13910 C/T_for (20 pmol) | 0,5 |
| LAC 13910 C/T_rev (20 pmol) | 0,5 |
| Celkem | 48 |
| DNA | 2 |

Tab. V: Složení reakčního mixu na jednu reakci pro polymorfismus G/A-22018.

| Reagenty | Objem (μl) |
|-------------------------------|-------------------|
| deionizovaná H ₂ O | 34,3 |
| 5x MyTaq Red Reaction Buffer | 10 |
| MyTaq Polymerase (5U/μl) | 0,2 |
| DMSO (100%) | 2,5 |
| LAC 22018 G/A_for (20 pmol) | 0,5 |
| LAC 22018 G/A_rev (20 pmol) | 0,5 |
| Celkem | 48 |
| DNA | 2 |

Sekvence primerů a reakční protokoly byly převzaty z odborných publikací a již dříve byly reakce upraveny a optimalizovány pro potřeby laboratoře. Konkrétně pro polymorfismus C/T-13910 byla reakce navržena z publikace Mattar *et al.* (2008) a pro polymorfismus G/A-22018 z publikace Coelho *et al.* (2005). Použité primery a jejich sekvence jsou uvedeny v tabulce č. VI.

Tab. VI: Sekvence primerů použitých pro PCR.

| Označení primeru | Sekvence |
|-------------------|--|
| 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' |

Po krátkém zvortexování a stočení v minicentrifuze (*Microspin FV-2400; BioSan*) byly vzorky umístěny do gradientového PCR termocycleru (*MultiGene, Labnet*). Průběh PCR reakce je uveden v tabulce VII.

Tab. VII: Reakční protokol pro detekci polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018.

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

4.4.1.2 Kontrola PCR produktů na agarózovém gelu

Po skončení amplifikace byly PCR produkty zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy na 4 % agarózovém gelu. Gel byl připraven z 50 ml 1x TBE pufru (*Thermo Scientific*) a 2g agarózy v tabletách (čtyři 0,5g tablety, *FastGene Agarose Tablets, Nippon Genetics*). Pro vizualizaci bylo do gelu přidáno 15 µl fluorescenční barvy Midori Green Advanced DNA Stain (*Nippon Genetics*). Ztuhlý gel byl přenesen do elektroforetické vany (*Mupid® One Electrophoresis System*) a byl zalit roztokem 1x TBE pufrém. Na gel bylo naneseno 5 µl PCR produktu a 4 µl hmotnostního markeru *FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU (Nippon Genetics)*, který umožnil přibližné stanovení délky PCR fragmentů. Elektroforéza probíhala 10-15 minut při 135 V. Gel byl poté přenesen na detekční systém (*FastGene® GelPic LED Box*) a byly odečteny výsledky amplifikace. Výsledkem amplifikační reakce byly produkty o velikosti 201 bp pro polymorfismus C/T-13910 a o velikosti 271 bp pro polymorfismus G/A-22018.

4.4.1.3 Restrikční štěpení

Ke štěpení byly použity specifické restrikční endonukleázy izolované z bakterie druhu *Haemophilus Influenzae*. Míchání reakce bylo provedeno v předem vychlazeném stojánku. K PCR produktu odpovídajícímu polymorfismu C/T-13910 byl přidán restrikční enzym *HinfI* (*NE BioLabs*) a k PCR produktu odpovídajícímu polymorfismu G/A-22018 enzym *Hin6I* (*ThermoScientific*). Dále byl přidán příslušný restrikční pufr v poměrech uvedených v tabulce VIII. Po krátké centrifugaci a stočení byly vzorky inkubovány po dobu alespoň 60 minut v miniinkubátoru (*Mini Incubator, Labnet*) při teplotě 37 °C.

| HinfI | Hin6I |
|------------------|-----------------|
| 5'...G↓ANTC...3' | 5'...G↓CGC...3' |
| 3'...CTNA↑G...5' | 3'...CGC↑G...5' |

Obr. 8: Oblasti restrikčního štěpení u použitých enzymů.

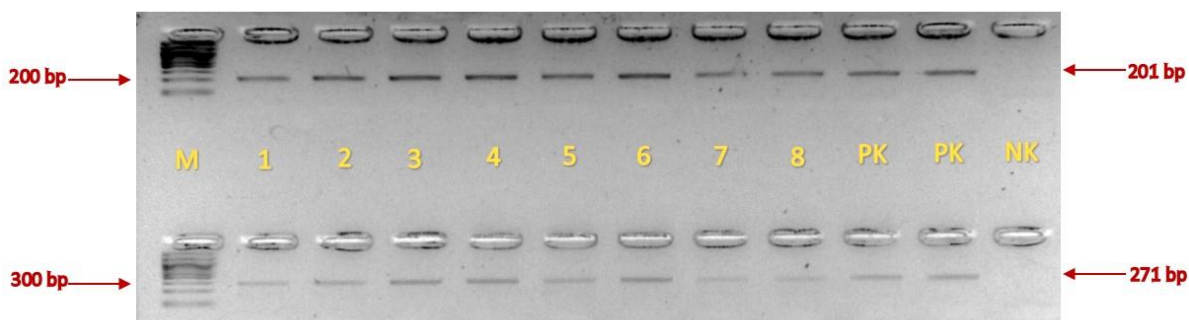
Tab. VIII: Složení jedné reakce pro restrikční štěpení.

| Polymorfismus | PCR produkt (μl) | Restrikční enzym | Restrikční pufr |
|----------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------|
| C/T-13910 | 45 | 1 μl <i>HinfI</i> (10 U) | 5 μl 10x CutSmart™ buffer |
| G/A-22018 | 45 | 1 μl <i>Hin6I</i> (10 U) | 5 μl 10x Tango buffer |

Po inkubaci byla provedena vizualizace fragmentů restrikčního štěpení pomocí gelové elektroforézy na 4% agarózovém gelu při 135 V po dobu 10-15 minut, jejíž postup je podrobně uveden v kapitole 4.4.1.2.

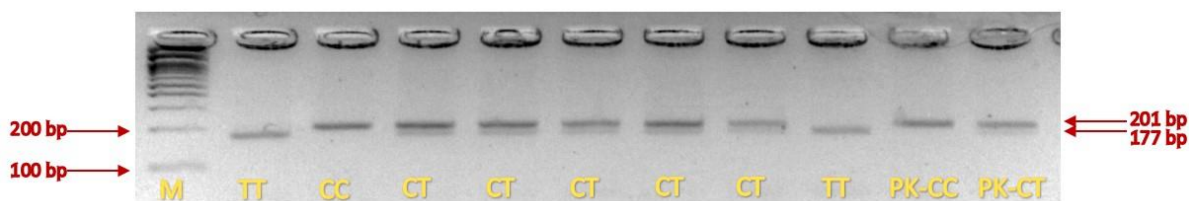
4.4.1.4 Analýza dat

Výsledkem amplifikační reakce byl PCR produkt o velikosti 201 bp pro polymorfismus C/T-13910, a PCR produkt o velikosti 271 bp pro polymorfismus G/A-22018. Výsledek amplifikační reakce pro oba analyzované polymorfismy je znázorněn na obrázku 9.



Obr. 9: Vizualizace PCR produktů na 4% agarózovém gelu. V první řadě jsou na gelu vizualizovány PCR produkty pro polymorfismus C/T-13910 o velikosti 201 bp. Ve druhé řadě jsou vizualizovány PCR produkty pro polymorfismus G/A-22018 o velikosti 271 bp odpovídající stejným vzorkům ve stejném pořadí. M – hmotnostní marker (FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU; *Nippon Genetics*), 1-8 – PCR produkty (201 bp pro C/T-13910, 271 bp pro G/A-22018), PK – pozitivní kontroly, NK – negativní kontrola.

Důsledkem restričního štěpení PCR produktu restriktázou *HinfI* došlo v přítomnosti mutované alely T ke štěpení na dva fragmenty o velikosti 177 bp a 24 bp. U homozygotního (wild type) genotypu CC ke štěpení nedochází, u tohoto genotypu tedy zůstává zachována velikost produktu 201 bp. V přítomnosti obou alel u heterozygotního genotypu CT vznikají tři fragmenty o velikosti 201 bp, 177 bp a 24 bp. Nejkratší fragmenty 24 bp nejsou vizualizovány vzhledem k jejich délce. Výsledky restričního štěpení u polymorfismu C/T-13910 jsou zobrazeny na obrázku 10.

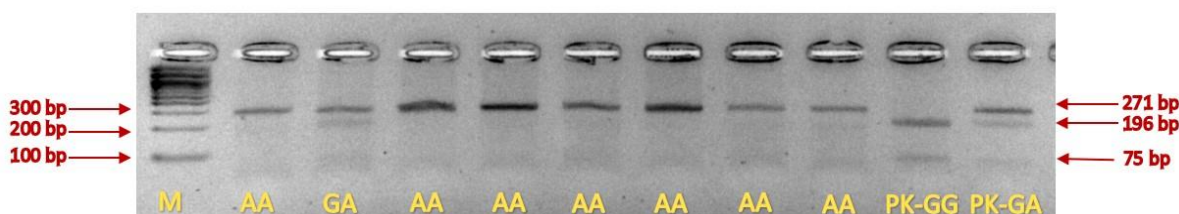


Obr. 10: Vizualizace restričních fragmentů u polymorfismu C/T-13910 na 4% agarózovém gelu. Pod jednotlivými jamkami jsou označeny výsledné genotypy odečtené na základě velikostí výsledných fragmentů. M – hmotnostní marker (FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU; *Nippon Genetics*), PK – pozitivní kontroly.

V případě polymorfismu G/A-22018 byl PCR produkt štěpen restriktázou *Hin6I*, která štěpí PCR produkt pouze v přítomnosti wild type alely G. U homozygotního stavu GG tedy dochází k úplnému rozštěpení PCR produktu na fragmenty o velikosti 196 bp a 75 bp. U heterozygotního stavu v přítomnosti obou alel (GA) vznikají tři fragmenty o velikostech

271 bp, 196 bp a 75 bp. U mutovaného homozygota s genotypem AA nedochází k restričnímu štěpení a je detekován fragment 271 bp odpovídající velikosti neštěpeného PCR produktu. Fragment o velikosti 75 bp je na fotce gelu opět hůře viditelný zejména u heterozygotů.

Výsledky restričního štěpení u polymorfismu G/A-22018 jsou zobrazeny na obrázku 11.



Obr. 11: Vizualizace restričních fragmentů u polymorfismu G/A-22018 na 4% agarózovém gelu. Pod jednotlivými jamkami jsou označeny výsledné genotypy odečtené na základě velikostí výsledných fragmentů. M – hmotnostní marker (FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU; *Nippon Genetics*), PK – pozitivní kontroly.

4.4.2 Sekvenace

Sekvenační analýza byla použita jako konfirmační metoda u kombinovaných genotypů polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018. Vzorky byly připraveny v laboratoři GENLABS, ale byly vyšetřeny metodou Sangerova sekvenování v externí laboratoři SEQme s.r.o.

4.4.2.1 PCR

PCR reakce probíhala pro oba polymorfismy dle stejného protokolu jako u metody PCR-RFLP (viz. kapitola 4.4.1.1 PCR). Kvalita amplifikační reakce byla zkontrolována pomocí gelové elektroforézy. Výsledkem amplifikační reakce byly produkty o velikosti 201 bp pro polymorfismus C/T-13910 a o velikosti 271 bp pro polymorfismus G/A-22018.

Výsledek PCR amplifikace byl vyhodnocen stejně jako u metody PCR-RFLP. Vizualizace PCR produktů na 4% agarózovém gelu je znázorněna na obrázku 9 v kapitole 4.4.1.4 Analýza dat.

4.4.2.2 Přečištění PCR produktu

PCR produkty byly po amplifikaci přečištěny pomocí ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup dle doporučení výrobce. K PCR produktu byl přidán ExoSAP-IT™ v poměru 5:2, dle kvality PCR produktu a množství PCR produktu potřebného k sekvenační reakci. Směs se poté inkubovala v PCR cycleru (*MultiGene, Labnet*) 15 minut při 37°C. Při této teplotě došlo k enzymatickému přečištění PCR produktu, degradaci kratších fragmentů, nespotřebovaných nukleotidů a primerů. V druhé fázi byla směs inkubována 15 minut při 80 °C, a to kvůli inaktivaci enzymů ExoSAP-IT™.

4.4.2.3 Příprava vzorku na sekvenaci

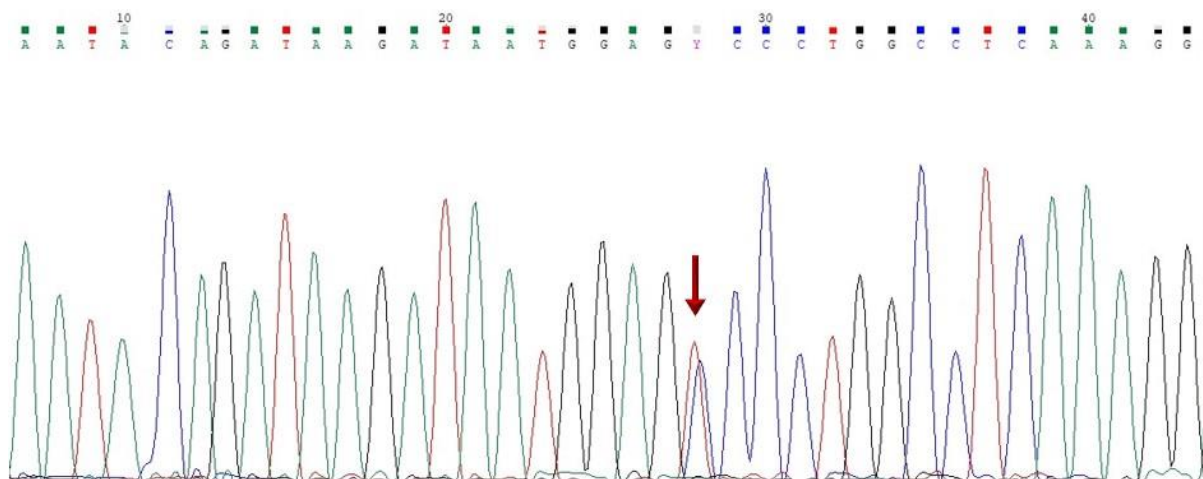
Enzymaticky přečištěné PCR produkty byly dále připraveny pro sekvenaci dle požadavků externí sekvenační firmy SEQme s.r.o. Pro analýzu byl použit 20 pmol forward a/nebo reverse primer stejný jako při PCR amplifikaci. Objemy reagentů použitých pro přípravu jednoho vzorku k sekvenační analýze jsou uvedeny v tabulce IX, výsledný objem odeslaný k sekvenaci byl 10 µl.

Tab. IX: Složení 1 vzorku pro sekvenační analýzu.

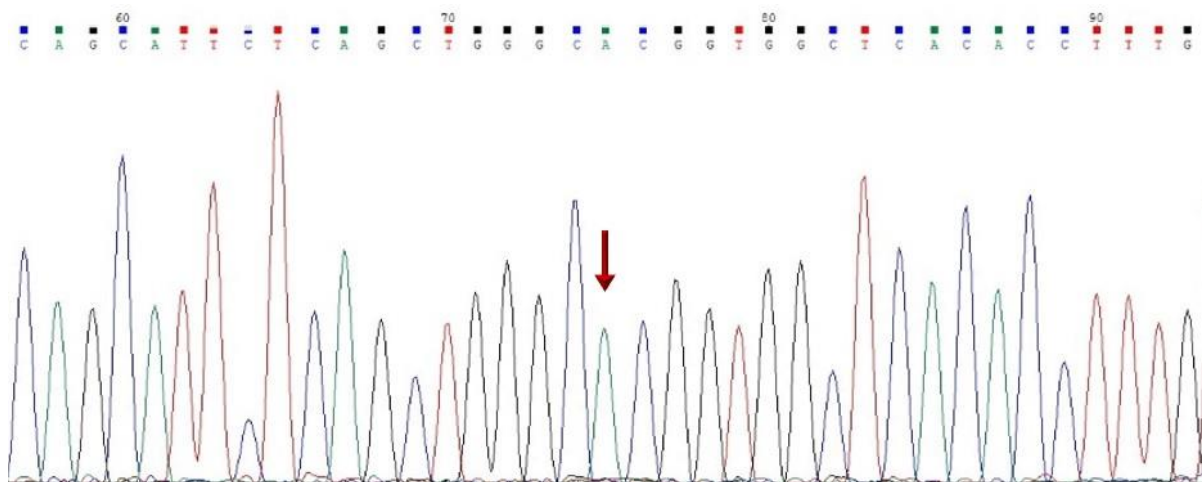
| Reagenty | Objem (µl) |
|-------------------------------------|------------|
| PCR produkt | 1-5 |
| Forward či reverse primer (20 pmol) | 0,5 |
| Deionizovaná H ₂ O | 4,5-8,5 |

4.4.2.4 Analýza dat

Po přečištění PCR produktů byly vzorky odeslány na sekvenační analýzu externí firmě SEQme s.r.o. Výsledné sekvence byly zpracovány a vyhodnoceny ve freewarovém programu Chromas. Příklady interpretace sekvenační analýzy jsou znázorněny na obrázcích 12 a 13.



Obr. 12: Část sekvence vyšetřovaného genu *MCM6* pro polymorfismus C/T-13910. Šipkou je označen analyzovaný genový polymorfismus. Výsledným genotypem je heterozygot CT.



Obr. 13: Část sekvence vyšetřovaného genu *MCM6* pro polymorfismus G/A-22018. Šipkou je označen analyzovaný genový polymorfismus. Výsledným genotypem je mutovaný homozygot AA.

Poté, co byly výsledné sekvence upraveny a zkontrolovány v programu Chromas, byly vloženy do vyhledávacího nástroje BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Tento nástroj umožňuje porovnání sekvence vzorku s referenční genovou databází NCBI a upozorňuje na případné neshody. Příklad spárování vzorku s databází je vyobrazen na obrázcích 14 a 15.

Homo sapiens isolate ANGH71 MCM6 gene, intron
 Sequence ID: **KU661752.1** Length: 579 Number of Matches: 1
 Range 1: 147 to 284

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | Frame |
|---------------|--|--------------|-----------|-----------|-------|
| 246 bits(133) | 3e-61() | 136/138(99%) | 0/138(0%) | Plus/Plus | |
| Query 1 | GCTGGCAATACAGATAAGATAATGGAGYCCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCCTCCTTAGGT | 60 | | | |
| Sbjct 147 | GCTGGCAATACAGATAAGATAATGTAGCCCTGGCCTCAAAGGAACTCTCCTCCTTAGGT | 206 | | | |
| Query 61 | TGCATTTGTATAATGTTTGTATTTTATAGATTGTTCTTTGAGCCCTGCATTCCACGAGGATA | 120 | | | |
| Sbjct 207 | TGCATTTGTATAATGTTTGTATTTTATAGATTGTTCTTTGAGCCCTGCATTCCACGAGGATA | 266 | | | |
| Query 121 | GGTCAGTGGGTATTAACG | 138 | | | |
| Sbjct 267 | GGTCAGTGGGTATTAACG | 284 | | | |

Obr. 14: Příklad porovnání sekvence testovaného vzorku s databází NCBI BLAST. Řádek označený Query odpovídá sekvenci analyzovaného vzorku, řádek označený Sbjct odpovídá referenční sekvenci. Zeleně je znázorněna sekvence primeru a červeně tučně jsou označeny neshody s referenční sekvencí. V prvním případě jde o neshodu v oblasti primeru, která vznikla z důvodu účelové záměny jednoho nukleotidu T za nukleotid G. Tato úprava byla provedena za účelem odstranění dalšího možného, ale nežádoucího restrikčního místa. Druhá neshoda je v místě polymorfismu C/T-13910 a je značena písmenem Y, což dle IUPAC codes znamená přítomnost nukleotidů C i T. V tomto případě jde tedy o heterozygotní genotyp CT.

Homo sapiens minichromosome maintenance complex component 6 (MCM6), RefSeqGene on chromosome 2
 Sequence ID: **NG_008958.1** Length: 43816 Number of Matches: 1
 Range 1: 22184 to 22320

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | Frame |
|---------------|---|--------------|-----------|-----------|-------|
| 248 bits(134) | 8e-62() | 136/137(99%) | 0/137(0%) | Plus/Plus | |
| Query 1 | CCCCTACCCTATCAGTAAAGGCCCTATAAGTTACCATTAAAAAGATGTCCTTAAAAACAGC | 60 | | | |
| Sbjct 22184 | CCCCTACCCTATCAGTAAAGGCCCTATAAGTTACCATTAAAAAGATGTCCTTAAAAACAGC | 22243 | | | |
| Query 61 | ATTCTCAGCTGGGCACGGTGGCTCACACCTTTGTCCCAGTACTTTGGGAAGCCGAGGTGG | 120 | | | |
| Sbjct 22244 | ATTCTCAGCTGGGCACGGTGGCTCACACCTTTGTCCCAGTACTTTGGGAAGCCGAGGTGG | 22303 | | | |
| Query 121 | GTGGATCACCTGAGGTC | 137 | | | |
| Sbjct 22304 | GTGGATCACCTGAGGTC | 22320 | | | |

Obr. 15: Příklad porovnání sekvence testovaného vzorku s databází NCBI BLAST. Řádek označený Query odpovídá sekvenci analyzovaného vzorku, řádek označený Sbjct odpovídá referenční sekvenci. Zeleně je znázorněna sekvence primeru a červeně tučně je označen polymorfismus G/A-22018. V tomto případě jde o mutovaného homozygota AA.

4.4.3 real-time PCR

4.4.3.1 PCR

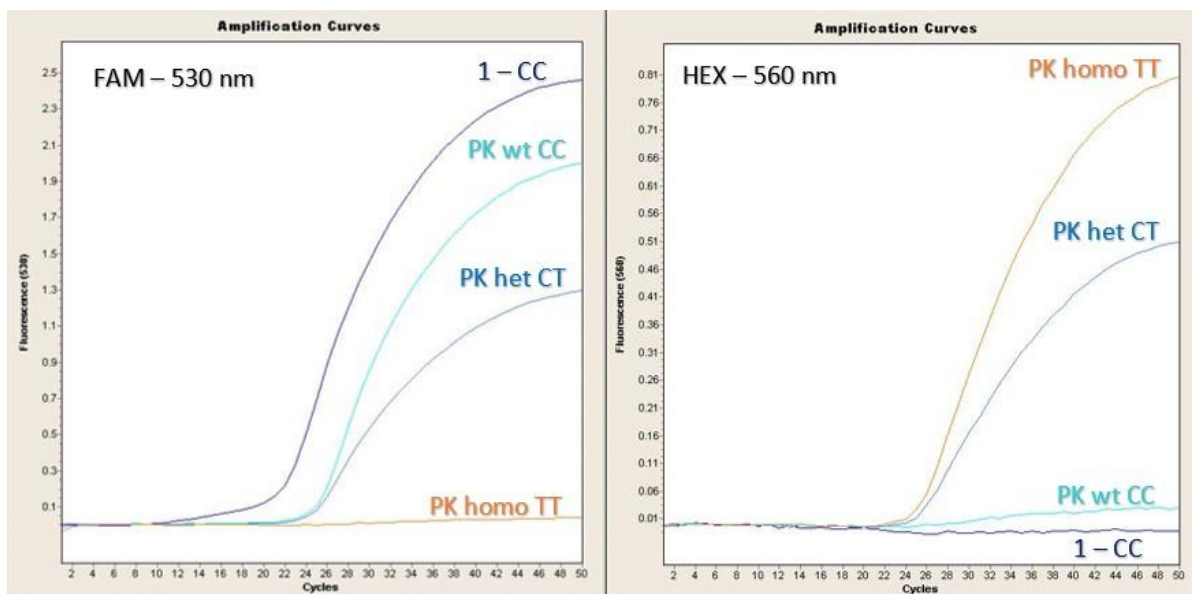
Pro detekci polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018 spojených s laktózovou intolerancí byla v rámci SGA projektu použita metoda real-time PCR s využitím fluorescenčně značených sond (alelická diskriminace). Byl použit kit gb GENETIC LACTO od firmy *generi biotech*. Výhodou použitého kitu bylo ready-to-use assay provedení. Součástí kitu byly také pozitivní kontroly pro každý z genotypů. Do skleněných kapilár bylo napipetováno 16 μ l amplifikačního mixu a 4 μ l templátu. Pro každý polymorfismus byly přítomny tři standardy jako pozitivní kontroly: PK wild type, PK heterozygot a PK mutovaný homozygot a negativní kontrola (bez DNA, obsahovala stejný objem vody). Reakce probíhala v přístroji LightCycler 2.0 od firmy *Roche Diagnostics*. Teplotní profil PCR reakce byl nastaven dle doporučení výrobce a je uveden v tabulce X.

Tab. X: Teplotní profil qPCR kitu gb GENETIC LACTO.

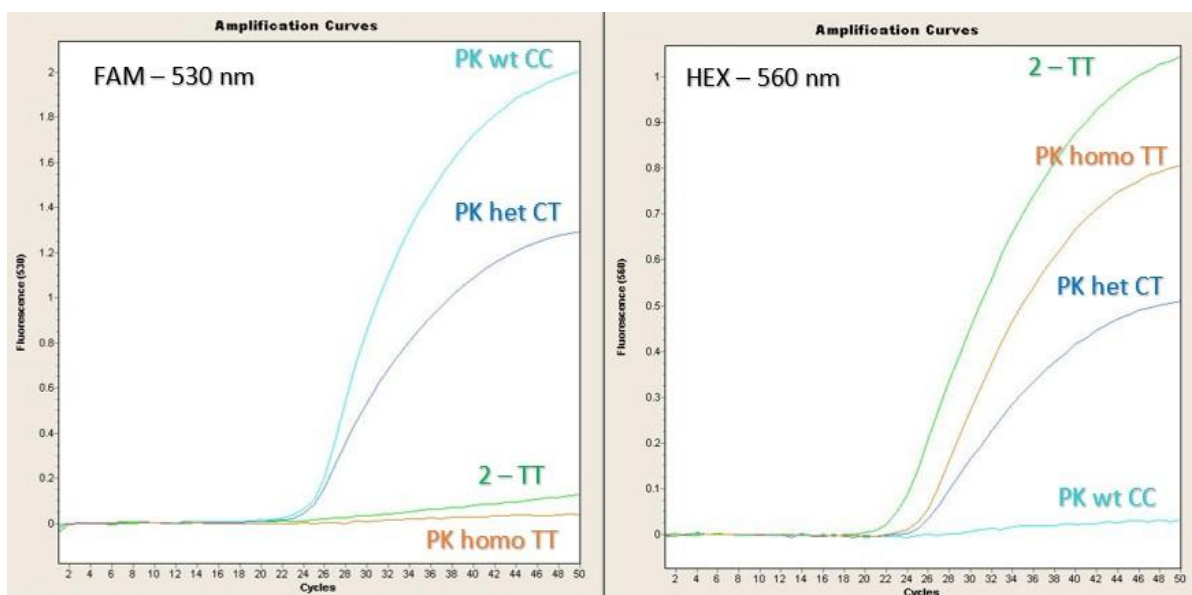
| | | | |
|----------|---|-------|-------|
| 1 cyklus | počáteční denaturace | 95 °C | 3 min |
| 50 cyklů | denaturace | 95 °C | 10 s |
| | annealing + elongace (+ snímání fluorescence) | 60 °C | 20 s |

4.4.3.2 Analýza dat

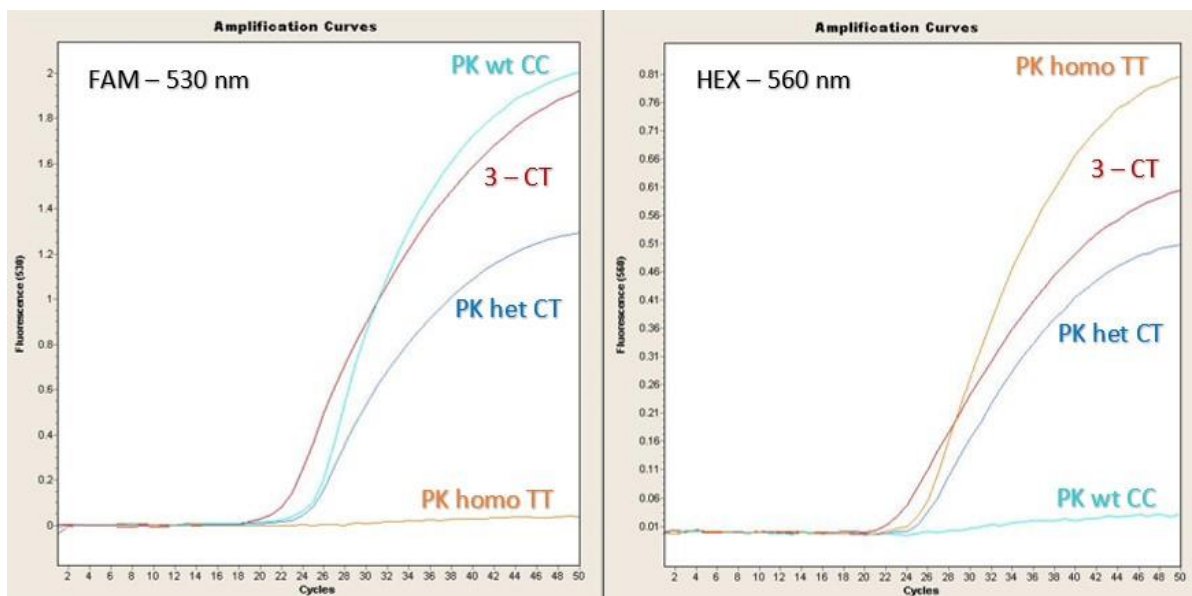
Detekce a následná analýza probíhala ve dvou fluorescenčních kanálech FAM (530nm) a HEX (560nm). Na následujících obrázcích (Obr. 16, 17, 18) je vyobrazena interpretace 3 různých genotypů v případě polymorfismu C/T-13910.



Obr. 16: Příklad interpretace qPCR analýzy wild type genotypu 13910 CC na přístroji LightCycler 2.0 v kanálech FAM a HEX: PK wt CC – pozitivní kontrola wild type genotypu CC, PK het – pozitivní kontrola heterozygotního genotypu CT, PK homo – pozitivní kontrola mutovaného homozygotního genotypu TT, 1-CC – testovaný vzorek vyhodnocený jako genotyp CC.



Obr. 17: Příklad interpretace qPCR analýzy mutovaného homozygota genotypu 13910 TT na přístroji LightCycler 2.0 v kanálech FAM a HEX: PK wt CC – pozitivní kontrola wild type genotypu CC, PK het – pozitivní kontrola heterozygotního genotypu CT, PK homo – pozitivní kontrola mutovaného homozygotního genotypu TT, 2-TT – testovaný vzorek vyhodnocený jako genotyp TT.



Obr. 18: Příklad interpretace qPCR analýzy heterozygotního genotypu 13910 CT na přístroji LightCycler 2.0 v kanálech FAM a HEX: PK wt CC – pozitivní kontrola wild type genotypu CC, PK het – pozitivní kontrola heterozygotního genotypu CT, PK homo – pozitivní kontrola mutovaného homozygotního genotypu TT, 3-CT – testovaný vzorek vyhodnocený jako genotyp CT.

4.5 Analýza polymorfismu v genu *TNF SF15*

4.5.1 Sekvence

4.5.1.1 PCR a její optimalizace

Ke stanovení SNP rs4263839 (A>G) v genu *TNF SF15* spojeného s výskytem syndromu dráždivého tračníku byla zvolena jako první metoda sekvenace. Pro PCR amplifikaci byly použity specifické primery uvedené v Tab. XI., které byly převzaty z publikace Wei *et al.* (2011).

Tab. XI: Sekvence primerů pro PCR amplifikaci.

| Gen | Směr | Sekvence primerů 5'-3' | Velikost templátu (bp) |
|-----------------|------|------------------------|------------------------|
| <i>TNF SF15</i> | F | GTTGCTGGTTCCCACTGTT | 475 |
| | R | GCCAGAAGGTGAGATGGAGA | |

Vzhledem k tomu, že ve výše uvedeném článku nebyl popsán teplotní profil PCR reakce, byla nejdříve provedena optimalizace PCR reakce pro gradient anealingu od 55-61°C.

V laminárním boxu (ESCO PCR Cabinet) byly na ledu připraveny dva tzv. master mixy, jejichž složení je uvedeno v Tab. XII. Tyto mixy byly dále rozpipetovány po 48 μ l či 23 μ l do popsaných 0,2ml mikrozkušavek. Mimo laminární box byly do mixu přidány 2 μ l DNA izolátu. Výsledný objem reakční směsi byl 50 μ l a 25 μ l pro každý vzorek. Vzorky byly před vložením do gradientového PCR termocycleru (MultiGene, Labnet) zvortexovány a stočeny. Reakční profil je uveden v tabulce XIII.

Tab. XII: Složení PCR reakce.

| Reagenty 1. mixu | Objem (μ l) | Reagenty 2. mixu | Objem (μ l) |
|-------------------------------|------------------|-------------------------------|------------------|
| deionizovaná H ₂ O | 8,25 | deionizovaná H ₂ O | 34,3 |
| 2x PCRBIO Taq Mix Red | 12,5 | 5x MyTaq Red Reaction Buffer | 10 |
| DMSO (100%) | 1,25 | MyTaq Red DNA polymerase | 0,2 |
| forward primer (20 pmol) | 0,5 | DMSO (100%) | 2,5 |
| reverse primer (20 pmol) | 0,5 | forward primer (20 pmol) | 0,5 |
| | | reverse primer (20 pmol) | 0,5 |
| DNA | 2 | DNA | 2 |

Tab. XIII: Reakční profil PCR reakce s gradientem.

| | | | |
|----------|----------------------|----------|-------|
| 1 cyklus | denaturace | 95 °C | 5 min |
| 30 cyklů | denaturace | 95 °C | 30 s |
| | Annealing (gradient) | 55-61 °C | 30 s |
| | elongace | 72 °C | 30 s |
| 1 cyklus | finální elongace | 72 °C | 5 min |

Po PCR amplifikaci byly PCR produkty vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (viz 4.4.1.2 *Kontrola PCR produktu na agarózovém gelu*). Tím byla zkontrolována přítomnost a velikost ampliconů a možné kontaminace. U první optimalizace byla určena nejvhodnější teplota annealingu, které odpovídala 57 °C. Při druhé optimalizaci byl použit shodný teplotní profil PCR reakce bez gradientu a teplota annealingu byla nastavena na 57 °C.

4.5.1.2 Kontrola PCR produktu na agarózovém gelu

Po skončení amplifikace byly PCR produkty znovu zkontrolovány pomocí gelové elektroforézy na 4 % agarózovém gelu. Tento postup je podrobně popsán v kapitole 4.4.1.2. Gel byl poté přenesen na detekční systém a byly odečteny výsledky amplifikace. Výsledný produkt amplifikace byl dlouhý 475 bp.

4.5.1.3 Přečištění PCR produktu

PCR produkty byly po amplifikaci přečištěny pomocí ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup (viz. 4.4.2.2. *Přečištění PCR produktu*).

4.5.1.4 Příprava vzorku na sekvenaci

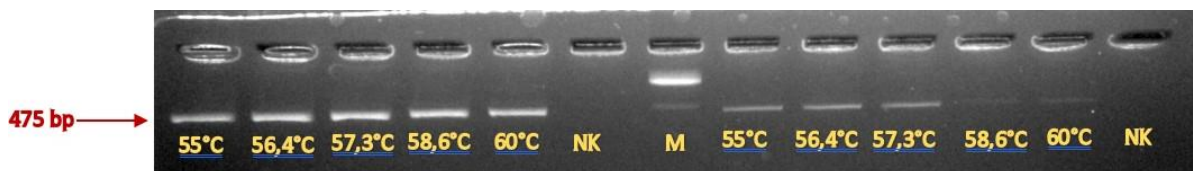
Přečištěné PCR produkty byly připraveny pro sekvenační analýzu dle postupu uvedeného v kapitole 4.4.2.3 a v poměru uvedeném v tabulce XIV. Pro analýzu byl použit forward primer.

Tab. XIV: Složení 1 vzorku pro sekvenační analýzu

| Reagenty | Objem (μl) |
|-------------------------------|-------------------|
| PCR produkt | 1-5 |
| Forward primer (20 pmol) | 0,5 |
| Deionizovaná H ₂ O | 4,5-8,5 |

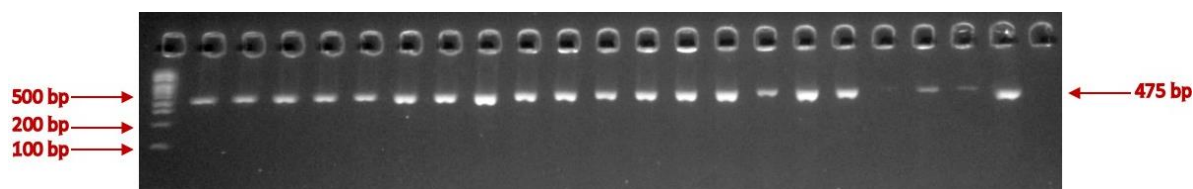
4.5.1.5 Analýza dat

Pro testování probandů na SNP rs4263839 (A>G) v genu *TNF SF15* musela být před PCR amplifikací provedena optimalizace. Ta byla provedena ve dvou reakčních mixech a v teplotním gradientu při annealingu. Vizualizované PCR produkty na 4% agarózovém gelu jsou vyobrazeny na obrázku 19. Optimální teplota annealingu byla stanovena na 57 °C.



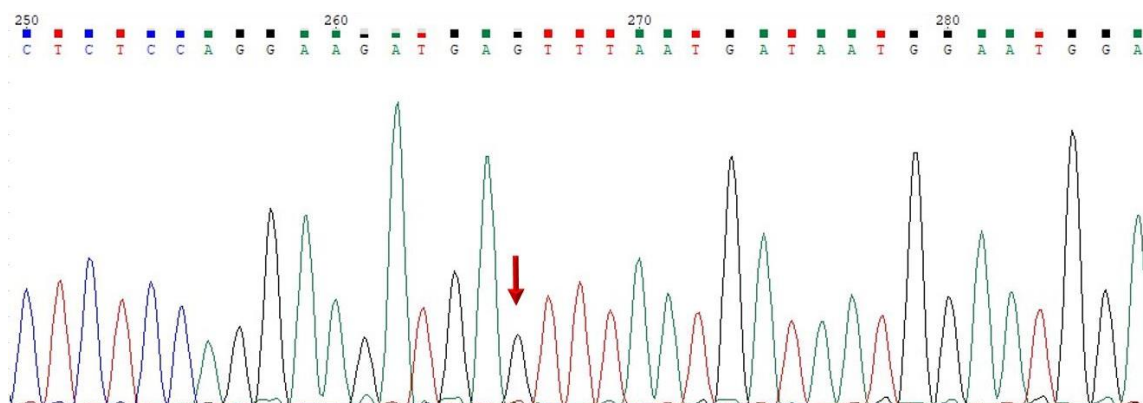
Obr. 19: Vizualizace PCR produktů, kdy amplifikace probíhala v gradientu pro anealingovou teplotu na 4% agarózovém gelu. V prvním PCR mixu byla teplota anealingu vhodná ve všech stupních gradientu, zatímco u druhého PCR mixu byly dobře viditelné PCR produkty amplifikované pouze při teplotách anealingu 55-57,3 °C. NK – negativní kontrola, M – hmotnostní marker (FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU; *Nippon Genetics*).

Výsledek gelové elektroforézy po PCR amplifikaci vybrané oblasti genu *TNF SF15* je znázorněn na obrázku 20. Velikost PCR produktu byla 475bp.

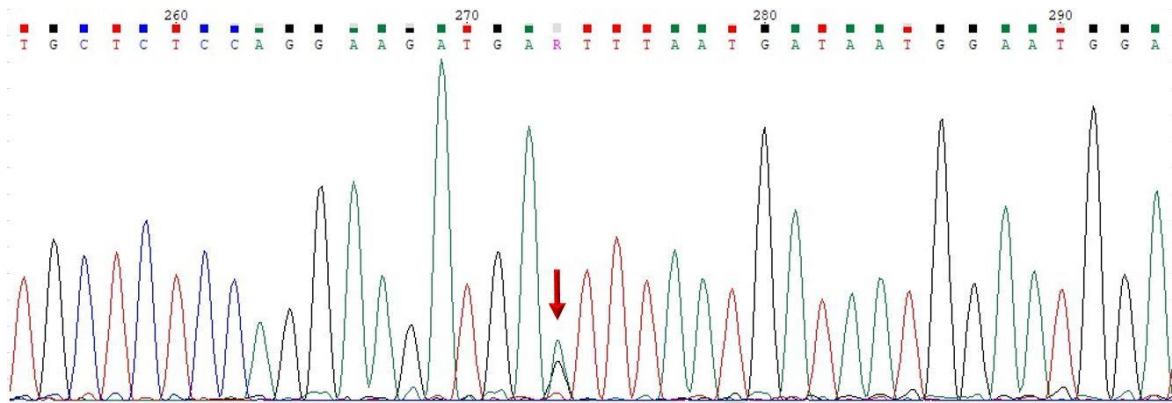


Obr. 20: Příklad vizualizace PCR produktů získaných analýzou genu *TNF SF15* pomocí gelové elektroforézy. M – hmotnostní marker (FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU; *Nippon Genetics*), 1-20 – produkty PCR reakcí (475bp), NK – negativní kontrola.

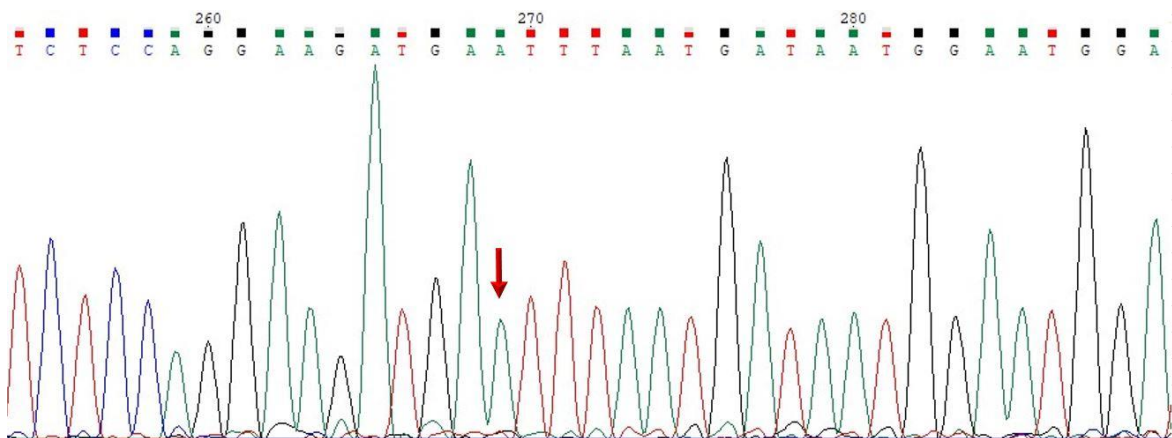
Po přečištění PCR produktů byly vzorky odeslány na sekvenační analýzu firmě SEQme s.r.o. Výsledné sekvence byly zpracovány a vyhodnoceny ve freewarem programu Chromas. Příklady interpretace sekvenační analýzy jsou znázorněny na obrázcích 21-23.



Obr. 21: Část sekvence vyšetřovaného genu pro SNP rs4263839 (A>G) v genu *TNF SF15*. Šipkou je označen analyzovaný genový polymorfismus.. Výsledkem této sekvenační reakce je homozygot GG.



Obr. 22: Část sekvenace vyšetřovaného genu pro SNP rs4263839 (A>G) v genu *TNF SF15*. Šipkou je označen analyzovaný genový polymorfismus. Výsledkem sekvenace je heterozygotní genotyp GA.



Obr. 23: Část sekvenace vyšetřovaného genu pro SNP rs4263839 (A>G) v genu *TNF SF15*. Šipkou je označen analyzovaný genový polymorfismus. Výsledkem této sekvenační reakce je homozygot AA.

Poté, co byly výsledné sekvenace upraveny a zkontrolovány v programu Chromas, byly vloženy do vyhledávacího nástroje BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*). Tento nástroj umožňuje porovnání sekvenace vzorku s referenční genovou databází NCBI a upozorňuje na případné neshody. Příklad spárování vzorku s databází je vyobrazen na obrázku 24.

Homo sapiens TNF superfamily member 15 (TNFSF15), RefSeqGene on chromosome 9 Sequence ID: NG_011488.2 Length: 28494 Number of Matches: 1
 Range 1: 6792 to 7155

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand | Frame |
|--------------------------------|-----------|--|-----------|-----------|-------|
| 667 bits (361) | 0.0() | 363/364(99%) | 0/364(0%) | Plus/Plus | |
| Query 1 | | GCCAGAAGGTGAGATGGAGA CATGCACTGTCACTAGACGGGAAGCTCGGTGAAGGAAGGC | | | 60 |
| Sbjct 6792 | | GCCAGAAGGTGAGATGGAGACATGCACTGTCACTAGACGGGAAGCTCGGTGAAGGAAGGC | | | 6851 |
| Query 61 | | ACGGGGTCTTTTTACTCACTGCTACTGCCCTACCTGAATCTACTGTGCCTATCCA | | | 120 |
| Sbjct 6852 | | ACGGGGTCTTTTTACTCACTGCTACTGCCCTACCTGAATCTACTGTGCCTATCCA | | | 6911 |
| Query 121 | | ATTGCAGATGCTCAAGAAATGAATAAGGCTGACACCATCCATTCCATTATCATTAACTC | | | 180 |
| Sbjct 6912 | | ATTGCAGATGCTCAAGAAATGAATAAGGCTGACACCATCCATTCCATTATCATTAAATTC | | | 6971 |
| Query 181 | | ATCTTCCTGGAGAGCAGATGTGTGGGGATGATTGCAGCTCTGGTTTGCCAGGCTCTGTA | | | 240 |
| Sbjct 6972 | | ATCTTCCTGGAGAGCAGATGTGTGGGGATGATTGCAGCTCTGGTTTGCCAGGCTCTGTA | | | 7031 |
| Query 241 | | ACTTCTTAGTGTGTGCAAGAAAAGGAGAGGGAAATGGGGGTGAGGCTGGGCTCATGTAG | | | 300 |
| Sbjct 7032 | | ACTTCTTAGTGTGTGCAAGAAAAGGAGAGGGAAATGGGGGTGAGGCTGGGCTCATGTAG | | | 7091 |
| Query 301 | | CAATCAGGGTCTGAAAAGAAACAGCTGGCTCACTCAAGAAAGTCATTTGTAGAAGAAT | | | 360 |
| Sbjct 7092 | | CAATCAGGGTCTGAAAAGAAACAGCTGGCTCACTCAAGAAAGTCATTTGTAGAAGAAT | | | 7151 |
| Query 361 | ATTT 364 | | | | |
| Sbjct 7152 | ATTT 7155 | | | | |

Obr. 24: Příklad porovnání sekvence vzorku s databází NCBI BLAST. Řádek označený Query odpovídá sekvenci analyzovaného vzorku, řádek označený Sbjct odpovídá referenční sekvenci. Zeleně je znázorněna sekvence primeru a červeně tučně je označen SNP rs4263839. V tomto případě jde o mutovaného homozygota GG (bylo sekvenováno komplementární vlákno).

4.5.2 real-time PCR

4.5.2.1 PCR

Pro vyšetřování SNP rs4263839 spojovaného s výskytem IBS byla zvolena metoda real-time PCR s analýzou křivek tání. K této analýze byla použita souprava LightSNiP assay (výrobce TIB MolBiol). Před použitím kitu bylo postupováno dle doporučení výrobce, směs primerů a sond byla rozpuštěna ve 100 μ l deionizované H₂O. Po zvortexování a stočení byl připraven roztok s reagenty pro 96 reakcí. PCR reakční mix byl následně namíchán opět dle následující tabulky dle doporučení výrobce.

Tab. XV: Složení reakčního mixu pro jednu reakci.

| Reagenty | Objem (μ l) |
|---|------------------|
| deionizovaná H ₂ O | 14,4 – 10,4 |
| Reagent Mix | 1 |
| LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe (Roche Diagnostics) | 2 |
| MgCl ₂ (25mM) | 1,6 |
| DNA (~ 50ng) | 1 – 5 |
| Celkem | 20 |

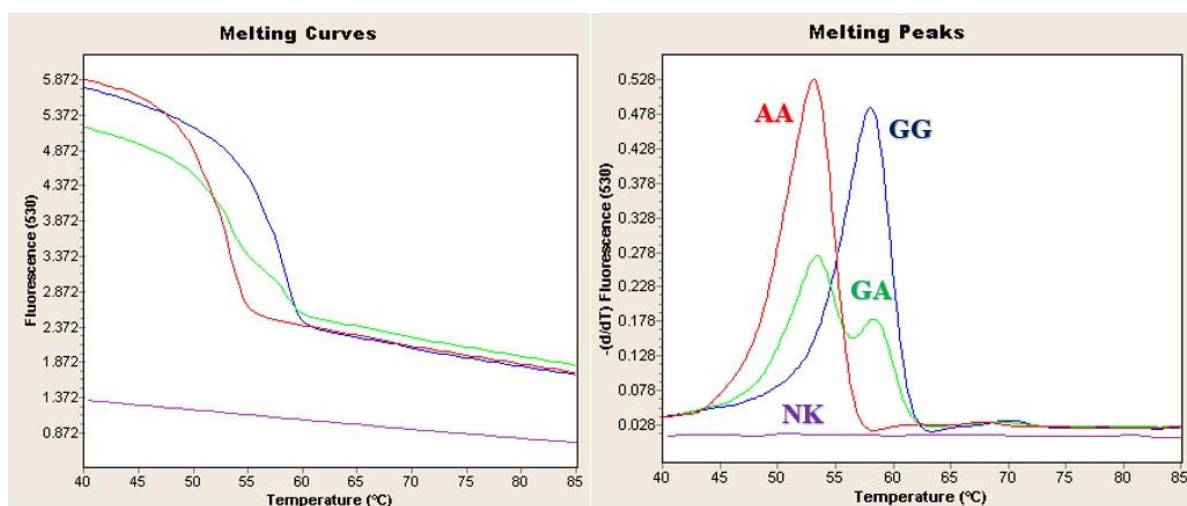
Reakce probíhala v přístroji LightCycler 2.0 od firmy *Roche Diagnostics*. Teplotní profil PCR reakce byl nastaven dle doporučení výrobce a je uveden v tabulce XVI. V každém běhu byly analyzovány pozitivní a negativní kontroly.

Tab XVI: Teplotní profil a reakční podmínky 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 | - |

4.5.2.2 Analýza dat

Detekce a následná analýza probíhala ve fluorescenčním kanálu FAM (530 nm). Výsledkem je křivka tání, která je specifická pro určitý PCR produkt. Analýza křivek tání záleží především na teplotě tání (T_M , Melting temperature), při které je dsDNA denaturována na ssDNA. Hodnota T_M závisí na délce, sekvenci a obsahu GC a AT párů. GC páry disociují pomaleji než AT páry kvůli vyššímu počtu vodíkových můstků. Po amplifikaci, v průběhu tání DNA, je kontinuálně měřena fluorescence a při postupném zvyšování teploty dochází k postupnému uvolňování sond a tím i k poklesu intenzity fluorescence. Křivka má nejstrmější pokles v bodu T_M . Na následujícím obrázku (Obr. 25) je znázorněn příklad analýzy křivek tání při vyšetření SNP rs4263839.



Obr. 25: Příklad analýzy křivek tání při vyšetření real-time PCR SNP rs4263839 v genu *TNF SF15* na přístroji LightCycler 2.0 ve fluorescenčním kanálu FAM (530 nm). Červená křivka označuje homozygotní genotyp AA, modrá křivka homozygota GG, zelená křivka heterozygota GA a fialová křivka je negativní kontrola (NK). Teploty tání pro tuto reakci byly: $TM1 = 53.35$ °C, $TM2 = 58.27$ °C. (Teploty tání se mohou pro každý běh nepatrně lišit, ale rozdíl teplot tání ΔTM je relativně konstantní.)

5 VÝSLEDKY

Experimentální část této práce byla uskutečněna v laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích. Získaná data byla vyhodnocována programem MS Excel 2019. Frekvence alel byla porovnávána s databází Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI).

5.1 Vyhodnocení predispozice pro laktózovou intoleranci

Soubor pro vyhodnocení genetické predispozice pro laktózovou intoleranci byl tvořen výslednými genotypy získanými od klientů genetické laboratoře GENLABS s.r.o., kteří byli na základě žádanky a informovaného souhlasu ke genetickému vyšetření testování na dva SNP (C/T-13910 a G/A-22018) v genu *MCM6* spojovanými s laktázovou perzistencí. Během roku 2014-2021 bylo vyšetřeno celkem 1989 jedinců.

Tabulka XVII ukazuje počet vyšetření na laktózovou intoleranci provedených v jednotlivých letech v rozmezí let 2014-2021.

Tab. XVII: Počet vyšetření na laktózovou intoleranci v rozmezí let 2014-2021.

| Rok | N | % |
|------|------|-------|
| 2014 | 4 | 0,20 |
| 2015 | 21 | 1,06 |
| 2016 | 65 | 3,27 |
| 2017 | 153 | 7,69 |
| 2018 | 41 | 2,06 |
| 2019 | 24 | 1,21 |
| 2020 | 648 | 32,58 |
| 2021 | 1033 | 51,94 |

Z tabulky XVII je patrné, že v posledních dvou letech několikanásobně stoupl počet vyšetření na laktózovou intoleranci. V předchozích letech byla poptávka po genetickém testování nižší.

Tab. XVIII znázorňuje rozložení věkových kategorií u všech vyšetřených klientů na laktózovou intoleranci po dekádách.

Tab. XVIII: Počty vyšetřených jedinců na LI v jednotlivých věkových skupinách.

| Věkové rozmezí | N | % |
|----------------|-----|-------|
| 0 – 10 | 228 | 11,46 |
| 11 – 20 | 134 | 6,74 |
| 21 – 30 | 221 | 11,11 |
| 31 – 40 | 442 | 22,22 |
| 41 – 50 | 493 | 24,79 |
| 51 – 60 | 280 | 14,08 |
| 60+ | 191 | 9,60 |

Nejvíce klientů (47,01 %) se nechalo otestovat v produktivním až středním věku, což odpovídá věkovým skupinám 31-40 a 41-50 let. Pro hodnocení laktóзовé intolerance je dále důležitá věková skupina, kdy jsou pozorovány první klinické příznaky. Zde je dle Tab. XVIII zastoupení 11,46 %. Pro lepší orientaci ve věkových skupinách byl vytvořen graf na obrázku 26.



Obr. 26: Grafické znázornění počtu jedinců v jednotlivých věkových skupinách.

V následující tabulce (Tab. XIX) je uvedeno zastoupení otestovaných žen a mužů na laktóзовou intoleranci.

Tab. XIX: Počet vyšetřených jedinců dle pohlaví s průměrným věkem pro každou skupinu.

| Pohlaví | N | % | Ø věk |
|----------------|----------|----------|--------------|
| Žena | 1438 | 72,30 | 39,41 |
| Muž | 551 | 27,70 | 31,74 |

Z tabulky XIX je patrné, že větší zájem o testování mají ženy než muži. Jejich průměrný věk koreluje s výše uvedenými údaji o věkových kategoriích vyšetřených klientů.

V tabulce XX jsou uvedeny výsledky vyšetření pro SNP C/T-13910 v genu *MCM6* spojovaného s laktózovou intolerancí.

Tab. XX: Výsledky vyšetření polymorfismu C/T-13910 spojovaného s laktózovou intolerancí.

| Genotyp | N | % | Výsledek |
|----------------|----------|----------|--------------------------------|
| CC | 599 | 30,12 | Laktózová intolerance |
| CT | 1003 | 50,43 | Částečná laktózová intolerance |
| TT | 387 | 19,46 | Laktózová tolerance |

Téměř polovina testovaných jedinců se vyznačovala heterozygotním genotypem CT, který se vyznačuje částečnou laktózovou intolerancí. U 30,12 % klientů by zachycen wild-type genotyp CC, který způsobuje úplný pokles aktivity enzymu laktázy v tenkém střevě v dospělosti a přispívá tak k rozvoji laktózové intolerance. Necelých 20 % jedinců bylo nositeli mutovaného homozygotního genotypu TT, který je spojován s celoživotní laktázovou perzistencí.

Dle databáze NCBI (NCBI: rs182549 [online]) má alela C frekvenci výskytu v evropské populaci C=0,445945, alela T má frekvenci výskytu T=0,554055. Frekvence alel ze získaných výsledků je pro alelu C=0,553293, a pro alelu T je četnost alely T=0,446707.

Tabulka XXI se věnuje výsledkům vyšetření druhého SNP spojovaného s laktózovou intolerancí, a to G/A-22018.

Tab. XXI: Výsledky vyšetření polymorfismu G/A-22018 spojovaného s laktózovou intolerancí.

| Genotyp | N | % | Výsledek |
|----------------|----------|----------|--------------------------------|
| GG | 574 | 28,86 | Laktózová intolerance |
| GA | 1003 | 50,43 | Částečná laktózová intolerance |
| AA | 412 | 20,71 | Laktózová tolerance |

Výsledky v četnosti jednotlivých genotypů u SNP G/A-22018 vykazují jen drobné odchylky od SNP C/T-13910. Přibližně polovina jedinců byla nositelem heterozygotního genotypu, který způsobuje mírný pokles aktivity enzymu LCT. Nositelů wild-type genotypu GG, který má za následek laktázovou non-perzistenci, bylo genetickým testováním zjištěno 574 jedinců, což odpovídá 28,86 %. Nejmenší četností (20,71 %) se vyznačovali jedinci s laktáza perzistentním genotypem AA.

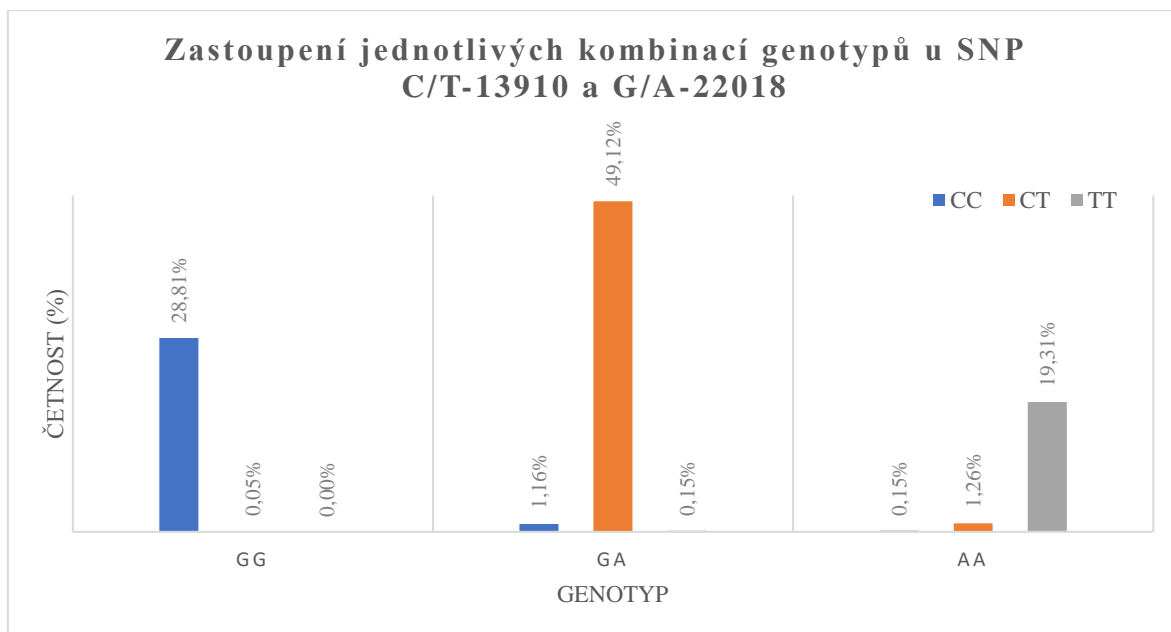
Dle databáze NCBI (NCBI: rs4988235 [online]) má alela G frekvenci výskytu v evropské populaci $G=0,456934$, alela A má frekvenci výskytu $A=0,543066$. Ze získaných výsledků je pro alelu G četnost $G=0,540724$, a pro alelu A je četnost alely $A=0,459276$.

V následující tabulce XXII jsou uvedeny výsledky genetické analýzy pro oba testované SNP C/T-13910 a G/A-22018 společně.

Tab. XXII: Výsledky genetického testu pro predispozici k laktózové intoleranci – SNP C/T-13910 a G/A-22018.

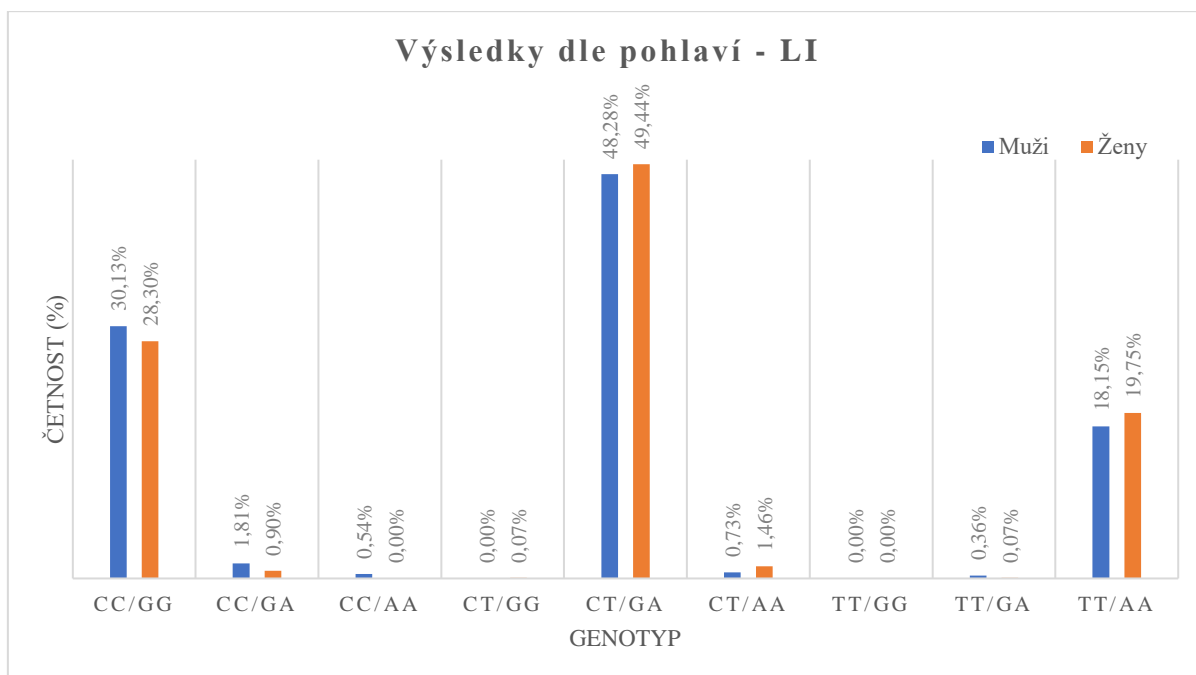
| G/A-22018 C/T-13910 | GG | GA | AA |
|--------------------------------------|---------------|---------------|---------------|
| CC | 573 (28,81 %) | 23 (1,16 %) | 3 (0,15 %) |
| CT | 1 (0,05 %) | 977 (49,12 %) | 25 (1,26 %) |
| TT | 0 (0,00 %) | 3 (0,15 %) | 384 (19,31 %) |

Ve většině případů výsledky obou SNP spolu korelují, tzn. pokud je u jednoho SNP zjištěn wild-type homozygot, u druhého SNP byl zjištěn také (CC/GG). V některých případech (N=55), byly stanoveny tzv. kombinované genotypy (např. CC/GA, CT/AA). Pro lepší vizualizaci výsledků byl vytvořen graf na Obr. 27.



Obr. 27: Grafické znázornění zastoupení jednotlivých kombinací genotypů zjištěných za základě genetického testování SNP C/T-13910 a G/A-22018 v genu *MCM6* spojených s laktózovou intolerancí.

Na obrázku 28 je vyobrazen genderový rozdíl v zastoupení jednotlivých frekvencí genotypů. Z grafu je vidět, že nebyl pozorován žádný genderový rozdíl.



Obr. 28: Grafické znázornění výsledků vyšetření žen a mužů na SNP C/T-13910 a G/A-22018 spojených s laktózovou intolerancí.

5. 2 Vyhodnocení možné asociace laktóзовé intolerance a IBS

Dílejší částí experimentální části této práce bylo na základě genetického testování vyhodnotit možnou souvislost laktóзовé intolerance se syndromem dráždivého tračníku. Kromě detekce rizikových SNP spojených s rozvojem laktóзовé intolerance, bylo v rámci projektu SGA navrženo vyšetření genové predispozice v genu *TNF SF15* (rs4263839) pro rozvoj syndromu dráždivého tračníku. Po ukončení projektu SGA se toto vyšetření zařadilo do rutinní nabídky genetických testů laboratoře GENLABS s.r.o. Metodou sekvenování a real-time PCR bylo vyšetřeno v letech 2020-2021 již 311 jedinců na základě žádanky a informovaného souhlasu ke genetickému vyšetření.

V tabulce XXIII je vyobrazen počet provedených testů na vyšetření SNP rs4263839 (A>G) spojovaného s rozvojem IBS v letech 2020 a 2021.

Tab. XXIII: Celkový počet vyšetření SNP rs4263839 (A>G) v letech 2020 a 2021

| Rok | N | % |
|------|-----|-------|
| 2020 | 61 | 19,61 |
| 2021 | 250 | 80,39 |

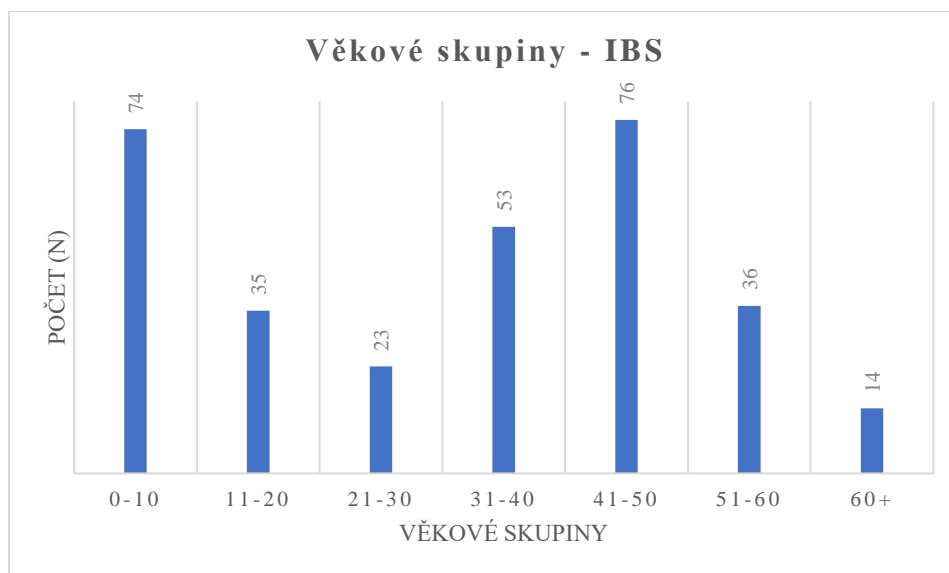
Z tabulky lze vidět relativní zájem o nové vyšetření. Z 311 požadavků na vyšetření bylo provedeno, na základě žádanky o genetické vyšetření, ve 292 případech současně vyšetření SNP rs4263839 (A>G) i laktóзовé intolerance (SNP C/T-13910 a G/A-22018).

Tab. XXIV znázorňuje rozložení klientů vyšetřených na SNP rs4263839 (A>G) spojeným s rozvojem IBS do věkových skupin do dekadách.

Tab. XXIV: Počet vyšetřených jedinců na SNP spojený s IBS ve věkových skupinách.

| Věkové rozmezí | N | % |
|----------------|----|-------|
| 0 – 10 | 74 | 23,79 |
| 11 – 20 | 35 | 11,25 |
| 21 – 30 | 23 | 7,40 |
| 31 – 40 | 53 | 17,04 |
| 41 – 50 | 76 | 24,44 |
| 51 – 60 | 36 | 11,58 |
| 60+ | 14 | 4,50 |

Z Tab. XXIV lze pozorovat nejvyšší zájem o testování ve věkové skupině 41-50 let a ve skupině 0-10 let. Na obrázku 29 je graficky znázorněno rozdělení vyšetřených klientů do věkových skupin.



Obr. 29: Grafické znázornění počtu jedinců v jednotlivých věkových skupinách.

Tabulka XXV. se zabývá genderovým zastoupením jedinců vyšetřovaných na predispozici pro onemocnění dráždivého tračníku a jejich průměrným věkem.

Tab. XXV: Počet vyšetřených jedinců dle pohlaví s průměrným věkem pro každou skupinu.

| Pohlaví | N | % | Ø věk |
|---------|-----|-------|-------|
| Žena | 204 | 65,59 | 34,98 |
| Muž | 107 | 34,41 | 24,18 |

Z tabulky XXV lze vyčíst, že ženy se testují častěji než muži a tvoří téměř dvě třetiny z vyšetřených jedinců.

Výsledky analyzovaného SNP rs4263839 (A>G) jsou znázorněny v tabulce XXVI.

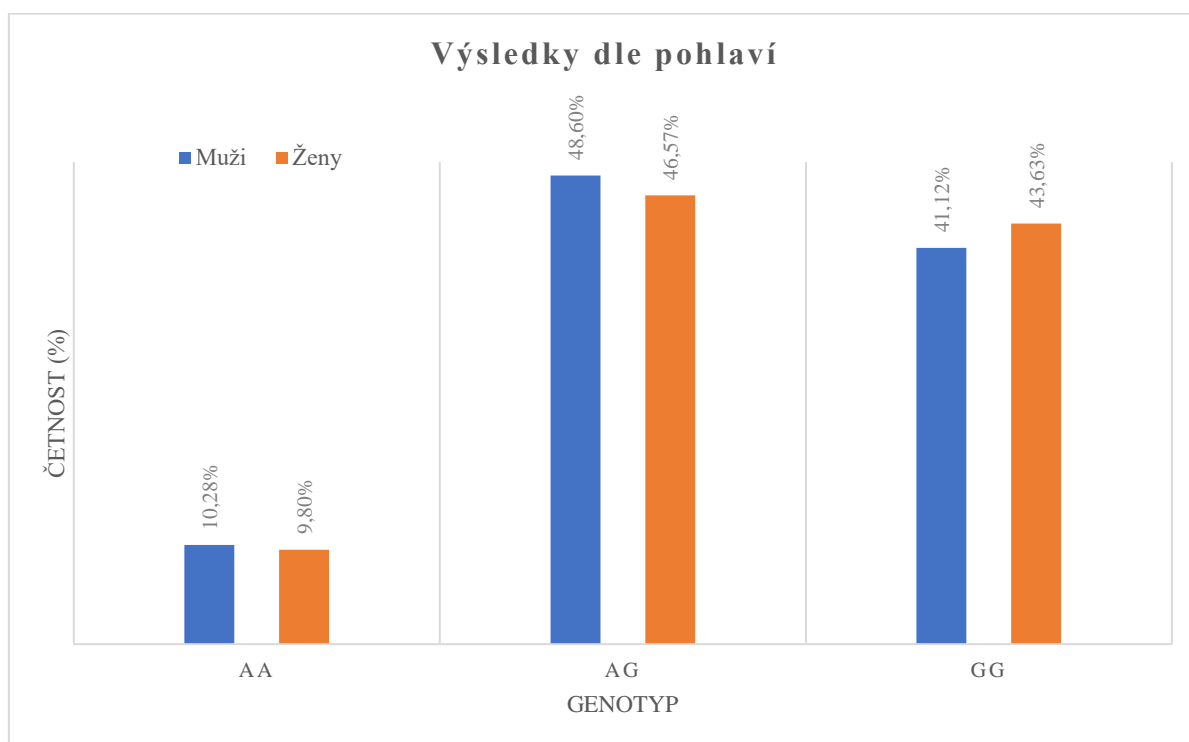
Tab. XXVI: Výsledky vyšetření polymorfismu SNP rs4263839 spojovaného s rozvojem IBS.

| Genotyp | N | % | Výsledek |
|---------|-----|-------|--------------------------------|
| AA | 31 | 9,97 | Žádné riziko spojené s IBS |
| AG | 147 | 47,27 | Možné riziko spojené s IBS |
| GG | 133 | 42,77 | Potvrzené riziko spojené s IBS |

Z výsledků je patrné, že téměř 90 % vyšetřených jedinců bylo nositeli rizikové alely G. Jen 9,97 % z vyšetřených klientů vykazovala genotyp AA, který dle recentních studií není spojován se zvýšeným rizikem rozvoje syndromu dráždivého tračníku.

Dle databáze NCBI má alela G frekvenci výskytu v evropské populaci $G=0,681836$, alela A má frekvenci výskytu $A=0,318164$. Frekvence alely G je ze získaných dat $G=0,66399$ a frekvence alely A $A=0,33601$. Z výsledků je patrné, že frekvence alel přibližně odpovídají frekvenci výskytu dle databáze NCBI pro evropskou populaci.

Na obrázku 30 je vyobrazen genderový rozdíl v zastoupení jednotlivých frekvencí genotypů. Z grafu lze pozorovat jen minimální genderový rozdíl.



Obr. 30: Výsledky vyšetření žen a mužů na SNP rs4263839 (A>G) spojený s rozvojem syndromu dráždivého tračníku.

Na laktózovou intoleranci i na IBS SNP rs4263839 spojeného s rozvojem syndromu dráždivého tračníku bylo vyšetřeno celkem 292 jedinců. V tabulce XXVII jsou uvedeny výsledky 20 dobrovolníků ve věku 1-14 let, kteří byli vyšetřeni v rámci projektu SGA.

Tab. XXVII: Souběžný výskyt kombinací jednotlivých genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí a syndromem dráždivého tračníku u analyzovaných 20 jedinců se známou diagnózou.

| Laktózová intolerance | Syndrom dráždivého tračníku | N | % |
|-----------------------|-----------------------------|---|----|
| CC/GG | AA | 1 | 5 |
| CC/GG | AG | 7 | 35 |
| CC/GG | GG | 2 | 10 |
| CT/GA | AA | 0 | 0 |
| CT/GA | AG | 0 | 0 |
| CT/GA | GG | 5 | 25 |
| TT/AA | AA | 0 | 0 |
| TT/AA | AG | 4 | 20 |
| TT/AA | GG | 1 | 5 |

Z výsledků je patrné, že 50 % vyšetřovaných dobrovolníků by mohlo mít gastrointestinální problémy zejména kvůli laktázové non-perzistenci, protože jsou nositeli genotypu CC/GG pro laktózovou intoleranci. U druhé poloviny by se mohla na rozvoji nespecifických zánětů a ostatních příznacích podílet i mutovaná alela G v polymorfismu rs4263839 asociovaná se syndromem dráždivého tračníku. Je zajímavé, že nositelé heterozygotního genotypu CT/GA v laktázové intoleranci byli ve všech případech i nositeli plně mutovaného homozygotního genotypu GG v SNP rs4263839. U nositelů genotypu TT/AA v genu *MCM6* pro laktózovou intoleranci, byla zachycena vždy genotypová varianta v SNP rs4263839 s alespoň jednou mutovanou alelou G. V této skupině byl nejčastější haplotyp pro sledované polymorfismy: CC-GG-AG.

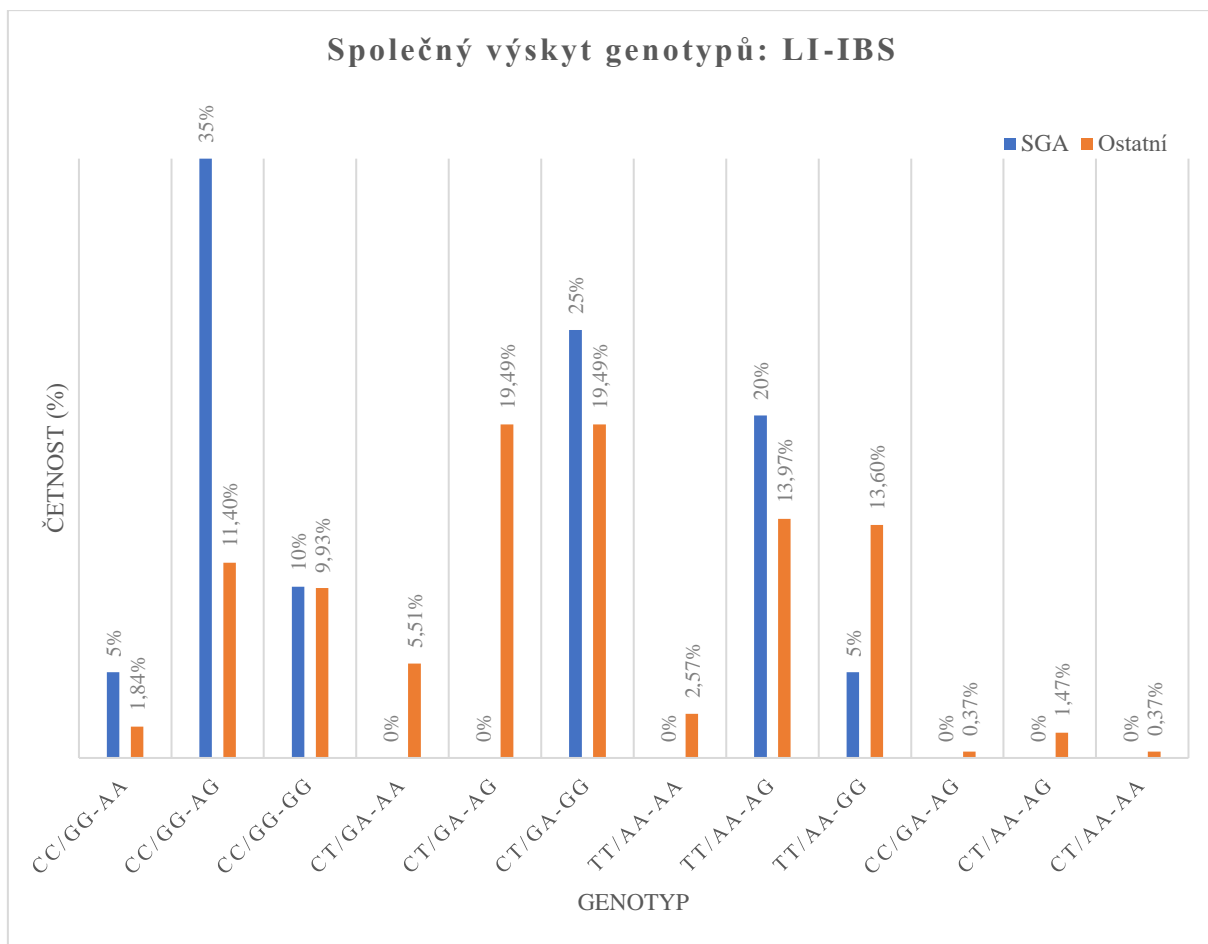
V tabulce XXVIII jsou uvedeny výsledky zbylých jedinců vyšetřených současně jak na laktózovou intoleranci, tak i na SNP rs4263839 (A>G).

Tab. XXVIII: Souběžný výskyt kombinací jednotlivých genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí a syndromem dráždivého tračníku u nedagnostikovaných jedinců.

| Laktózová intolerance | Syndrom dráždivého tračníku | N | % |
|------------------------------|------------------------------------|----------|----------|
| CC/GG | AA | 5 | 1,84 |
| CC/GG | AG | 31 | 11,40 |
| CC/GG | GG | 27 | 9,93 |
| CT/GA | AA | 15 | 5,51 |
| CT/GA | AG | 53 | 19,49 |
| CT/GA | GG | 53 | 19,49 |
| TT/AA | AA | 7 | 2,57 |
| TT/AA | AG | 38 | 13,97 |
| TT/AA | GG | 37 | 13,60 |
| CC/GA | AG | 1 | 0,37 |
| CT/AA | AG | 4 | 1,47 |
| CT/AA | AA | 1 | 0,37 |

Z tabulky XXVIII lze vyčíst, že existuje pravidelná distribuce genotypů pro SNP rs4263839 (A>G) u nejčastěji zastoupených genotypů LI a to zhruba v poměru 1:5:5 (AA:AG:GG), což koresponduje s celkovými výsledky uvedenými v tabulce XXVI (viz. výše). Nejvyšší výskyt rizikové IBS alely G byl detekován u LI genotypu CT/GA, zatímco nejnižší výskyt byl zaznamenán u plně laktóza intolerantních jedinců (CC/GG). U kombinovaných genotypů pro laktózovou intoleranci byl počet jedinců nízký, proto z těchto výsledků nelze vyvozovat závěry.

Pro lepší vizualizaci výsledků byl zhotoven graf na obrázku 31. Zde jsou zahrnuty obě sledované skupiny (s/bez diagnózy): modře jsou označeny výsledky diagnostikovaných pacientů uvedné v Tab. XXVII získané v rámci projektu SGA a oranžově jsou označeny výsledky nedagnostikovaných jedinců, vyšetřených současně na laktózovou intoleranci i na SNP rs4263839, uvedených v Tab. XXVIII (data z projektu SGA v nich nejsou zahrnuta, aby nedošlo ke zkreslení dat). V této skupině převažuje haplotyp: CT-GA-AG a CT-GA-GG.



Obr. 31: Grafické znázornění společného výskytu genotypů pro laktózovou intoleranci (SNP C/T-13910 a G/A-22018 a pro rozvoj syndromu dráždivého tračníku (rs4263839 A>G) u dvou testovaných skupin. První skupinu tvoří diagnostikovaní dobrovolníci vyšetřeni v rámci projektu SGA, druhá skupina je tvořena nediodagnostikovanými klienty laboratoře GENLABS s.r.o.

6 DISKUSE

Vědecké poznatky o intoleranci laktózy v posledních desetiletích výrazně pokročily, zejména pokud jde o průkazné genetické markery a diagnostiku tohoto stavu. Pro různé rasy byly sekvenovány různé genové polymorfismy spojené s touto gastrointestinální poruchou. Vzhledem k tomu, že asi u 65 % celosvětové populace dochází přirozeně ke snížení aktivity laktázy během života, vyvinul potravinářský průmysl mnoho alternativních produktů k mléčným výrobkům, jako jsou rostlinné nápoje nazývané nesprávně mléky, a naopak mléčné výrobky bez laktózy, získané enzymatickou hydrolyzou laktózy pomocí laktázy získané z různých kmenů mikroorganismů. Mnoho intolerantních jedinců snese asi 5-10 g laktózy konzumované rozložené během celého dne. Nejdůležitější strategií léčby je odstranění, či minimalizace klinických příznaků, proto aby se pozitivně podpořil životní komfort i psychický stav jedince. Avšak každý jedinec musí být správně poučen o výhodách/nevýhodách bezlaktózové diety, protože při celkovém vysazení mléka a mléčných produktů, může docházet k disbalanci ostatních důležitých látek. Při podezření na laktózovou intoleranci je vhodné nechat se vyšetřit u praktického lékaře, či gastroenterologa, aby potvrdil diagnózu vhodným testem a doporučil odpovídající dietní opatření.

Experimentální část diplomové práce obnášela zvládnutí laboratorních metod jako je izolace DNA, optimalizace PCR reakce, gelová elektroforéza, analýza daných oblastí genů metodou PCR-RFLP, real-time PCR a příprava vzorků pro sekvenační analýzu. Všechny tyto analytické přístupy vedly k určení genových polymorfismů zodpovědných za laktózovou intoleranci, konkrétně se jednalo o SNP C/T-13910 a G/A-22018 v genu *MCM6*.

Většina stanovení těchto dvou SNP je v laboratoři GENLABS s.r.o. byla získána pomocí metody PCR-RFLP. Je to metoda, která se dá použít na větší počet vzorků a je jednoduchá na přípravu. Nevýhodou této metody je její časová náročnost a výjimečně nižší citlivost vzhledem k méně očekávaným situacím, jako například u kombinovaných genotypů, či skrytých mutací v okolí analyzovaného polymorfismu. Finální odečítání výsledků je ovlivněno zejména dostatečnou vstupní koncentrací a kvalitou DNA pro PCR a zkušenostmi odečítajícího analytika.

V rámci projektu SGA bylo možné vyzkoušet pro stanovení LI také metodu real-time PCR s využitím fluorescenčně značených sond (alelická diskriminace). U této metody bylo velkou výhodou její ready-to-use provedení s poměrně rychlou detekcí SNP

v LightCycleru 2.0. Odečítání bylo přesné a snadné i pro méně zkušeného analytika a křivky vycházely perfektně i u nižších koncentrací DNA. Nevýhodou metody byla určitě vyšší pořizovací cena kitu a možnost analýzy omezeného počtu vzorků v jednom běhu (max. 32 vzorků). Tato metoda sice dokázala potvrdit existenci kombinovaných genotypů, ale stejně jako PCR RFLP detekuje pouze místo analyzovaného SNP, takže pro detekci dalších možných mutací musela být použita metoda sekvenace.

Sekvenční analýza byla provedena v externí firmě formou služby, protože genetická laboratoř GENLABS nemá vlastní sekvenátor. Sekvenace byla použita v případě ověření kombinovaných genotypů mimo projekt SGA a pro potřeby zjištění, zda se v okolí SNP spojených s laktózovou intolerancí nenachází ještě jiná bodová mutace. Příprava vzorku k sekvenaci je nenáročná. Pro následnou analýzu bylo potřeba se zorientovat v programu Chromas a po úpravě byla výsledná sekvence vložena do databáze NCBI, kde byla porovnána s referenčními sekvencemi. Tento přístup je vhodný pro případné určení jiné bodové mutace v analyzované části genu. Výhodou je tedy naprostá přesnost s možností porovnání sekvencí testovaných vzorků s referenčními sekvencemi uloženými v genové bance. Nevýhodou je vyšší cena analýzy, externí řešení (výsledky jsou dostupné do 2 pracovních dnů), celková náročnost na kvalitu DNA a čistotu PCR produktů určených k sekvenaci.

Při porovnání tří výše uvedených analytických přístupů, se jako nejvhodnější metoda pro analýzu SNP spojených s laktózovou intolerancí, pro rutinní využití a menší laboratoře s přiměřeným počtem vzorků, jeví metoda PCR-RFLP. Pro případnou confirmaci nejasných výsledku může být použita metoda sekvenování, která může zachytit i další mutace ve sledovaných oblastech genu.

Soubor dat pro statistické zpracování sestával ze 1989 vzorků získaných od klientů genetické laboratoře GENLABS s.r.o. Jedná se o neselektovaný soubor jedinců z hlediska diagnózy. Naprostá většina testovaných klientů řešila gastrointestinální nebo dermatologické obtíže, jejichž výskyt spojovala s konzumací laktózy. Ti byli testováni v letech 2014 až 2021 na dva polymorfismy (C/T-13910 a G/A-22018), které jsou v bělošské populaci spojovány s predispozicí laktózové intolerance. Všichni testovaní jedinci měli řádně vyplněnou žádanku k laboratornímu vyšetření, a dali souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením. U těchto jedinců byly zaznamenány pouze základní údaje jako je pohlaví, věk, a výsledek genetické analýzy.

Na základě získaných dat je možné říci, že zájem o vyšetření LI má v posledních letech vzestupný trend. V roce 2020 bylo vyšetřeno celkem 648 klientů a do listopadu roku 2021 jich bylo 1033. To může být dáno vyšším povědomím o možnostech genetického testování. Nejvíce klientů (47,01 %) se nechává otestovat ve věkových kategoriích 31-40 a 41-50 let. Tento fakt zřejmě souvisí s postupným snižováním aktivity enzymu laktázy s věkem. Protože u většiny dospělých už není mléko hlavní složkou potravy, pozorují příznaky LI až později, kdy aktivita laktázy klesne pod kritickou mez. Teprve pak dochází k manifestaci klinických příznaků. V odborné literatuře se uvádí, že k postupnému snižování aktivity laktázy v kavkazské populaci dochází až po 20 roku věku (Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018) a většina jedinců s primární hypolaktázií snese až 10-12 g laktózy bez výraznějších příznaků (Deng *et al.*, 2015).

Na laktózovou intoleranci se v letech 2014-2021 nechalo otestovat výrazně více žen (72,3 %) než mužů (27,7 %). Pohlaví nemá na výskyt laktózové intolerance vliv (Vesa *et al.*, 2000), což můžeme na základě vlastních dat a výsledků (Obr. 28) potvrdit. Zde se četnosti genotypů lišily jen minimálně a nebyl pozorován žádný genderový rozdíl. Vyšší procento testovaných žen může být způsobeno jejich výraznějším sklonem k manifestaci symptomů laktózové intolerance (Čurda 2006).

Z výsledků genetického testování SNP C/T-13910 vyplývá, že téměř polovina testovaných jedinců (50,43 %) se vyznačovala heterozygotním genotypem CT, který se vyznačuje jen částečnou laktózovou intolerancí. Přítomnost heterozygotního genotypu CT je charakterizována přítomností středních úrovní exprese laktázy, které jsou ale obvykle dostatečné pro trávení laktózy (Fassio *et al.*, 2018). Ve většině publikací je heterozygotní genotyp zařazován do skupiny jako laktáza perzistentní. Dzialanski *et al.* (2016), ale přišel se studií, ve které porovnával výsledky genotypového testování s výsledky dechového vodíkového testu. Na základě této studie existují tři různé úrovně aktivity laktázy a u jedinců s heterozygotním genotypem CT se může projevat přechodný fyziologický fenotyp, který nese příznaky laktázové non-perzistence. U 30 % klientů by zachycen wild-type genotyp CC, který způsobuje úplný pokles aktivity enzymu laktázy v tenkém střevě v dospělosti a přispívá tak k rozvoji laktózové intolerance. Heterozygotních genotypových variant bylo zachyceno přibližně 50 %. Tento genotyp charakterizuje částečnou laktózovou intoleranci. Necelých 20 % jedinců bylo nositeli mutovaného homozygotního genotypu TT, který je spojován s celoživotní laktázovou perzistencí. Při srovnání frekvencí alel s databází NCBI bylo dosaženo následujícího výsledku: Dle referenční databáze mají alely C a T frekvenci

výskytu v evropské populaci C=0,445945 a alela T=0,554055. Frekvence alel ze získaných výsledků jsou C=0,553293 a T=0,446707. Frekvence v databázi NCBI byly počítány pro evropskou populaci, takže nezohledňují variabilní rozptřeni výskytu genotypů v Evropě. To může ovlivňovat referenční hodnoty. Na severu Evropy je totiž výskyt laktázové perzistence výrazně vyšší než na jihu Evropy. Proto je možné, že byla frekvence alel C a T opačná oproti frekvencím referenčním. Druhým faktorem ovlivňujícím tento rozdíl by mohl být fakt, že námi analyzovaný soubor tvoří jedinci, kteří se nechali otestovat kvůli blíže nespecifikovaným gastrointestinálním obtížím. To by mohlo vysvětlovat vyšší frekvenci alely C, která způsobuje pokles exprese mRNA, který je zodpovědný za částečný či úplný pokles aktivity laktázy v tenkém střevě.

U výsledků genetického testování SNP G/A-22018 lze sledovat jen drobné odchylky od SNP C/T-13910, což dokazuje, že oba polymorfismy podléhají genové vazbě. Vyskytují se ve vzdálenosti přibližně 8,1 kb od sebe a jejich rekombinace je tedy velmi vzácná. Přibližně polovina jedinců byla nositelem heterozygotního genotypu GA, který způsobuje pokles aktivity enzymu LCT. Jelikož je jen malá odchylka od výsledků heterozygotního genotypu 13910CT, tak lze předpokládat, že i genotyp 22018GA by se mohl projevit přechodně jako laktáza non-perzistentní. Nositelů wild-type genotypu GG, který má za následek laktázovou non-perzistenci, bylo genetickým testováním zjištěno 28,86 % případů. Nejmenší četností (20,71 %) se vyznačovali jedinci laktáza perzistentního genotypu AA. Při porovnávání frekvencí výskytu alel s referenční databází bylo dosaženo přibližně stejného výsledku jako u C/T-13910. Dříve byl polymorfismu G/A-22018 připisován menší význam, pokud jde o řízení exprese *LCT* genu, který kóduje laktázu (Kuchay *et al.*, 2013). U některých populací se ale ukázalo, že je tento SNP dobrým indikátorem laktázové intolerance, u některých populací i lepším než SNP C/T-13910 (Mattar *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2010).

Při porovnání získaných výsledků s publikacemi zjišťujícími prevalenci LI v České republice, či sousedních státech, nebyly nalezeny výrazné rozdíly v populačních frekvencích jednotlivých genotypů. Swallow (2003) publikoval, že by se v české populaci mělo vyskytovat přibližně 65 % laktáza perzistentních jedinců. Hubáček *et al.* (2017) se zabýval frekvencí genotypů SNP C/T-13910 přímo v české/slovenské populaci a u významné české menšiny (Romů/Cikánů). V této studii je uvedeno, že v české/slovenské populaci bylo zachyceno 23,6 % jedinců s laktáza non-perzistentním genotypem CC. Heterozygotní genotyp byl zjištěn u 50,7 % jedinců a laktáza perzistentní genotyp TT mělo 25,7 % probandů. Jejich soubor tvořilo 288 jedinců. Z výsledků získaných v rámci této diplomové práce bylo 573 jedinců

(28,81 %) nositeli genotypu CC/GG, který charakterizuje primární laktózovou intoleranci. 977 jedinců (49,12 %) jsou nositeli heterozygotního genotypu CT/GA a 384 jedinců (19,31 %) jsou nositeli plně mutovaného genotypu TT/AA, u kterého dochází k celoživotní perzistenci enzymu laktázy. Pokud by se heterozygotní genotyp považoval za laktáza perzistentního jako v ostatních studiích zabývajících se prevalencí laktózové intolerance, tak je prevalence v české populaci dle této práce 69,4 %, což by odpovídalo ostatním publikovaným výzkumům. Na základě recentních studií by se však měli rozlišovat všechny tři genotypy, protože u všech tří byl popsán jejich specifický fenotyp dle různých hladin aktivity laktázy (Dzialanski *et al.*, 2016). O jedincích s heterozygotním genotypem se pak tedy dá říct, že mají vyšší predispozici k rozvoji laktázové non-perzistence v dospělosti, a tvoří tak samostatnou skupinu. To by znamenalo, že úplnou laktázovou perzistenci (genotyp TT/AA) má pouze přibližně jen 20 % jedinců, a ne staršími studiemi deklarovaných 70 %.

V rámci této diplomové práce byly nalezeny i netradiční kombinace genotypů. Konkrétně se jedná o genotypy CC/GA (N=23), CC/AA (N=3), CT/GG (N=1), CT/AA (N=25) a TT/GA (N=3). Existuje jen málo studií, které se zabývají těmito kombinacemi genotypů pro SNP C/T-13910 a G/A-22018. Například ve studii Santonocito *et al.* (2015) byl zachycen a popsán genotyp CC/GA. Při vyhodnocování byl tento genotyp zařazen jako laktóza intolerantní i přesto, že u jednoho probanda tohoto genotypu byla provedena vodíková dechová zkouška s negativním výsledkem. Ve studii publikované Tomczonek-Moruš *et al.* (2019), byly zachyceny genotypy CC/AA (N=10), CC/GA (N=4) a CT/AA (N=1). U všech jedinců byla provedena vodíková dechová zkouška s následujícími výsledky: CC/AA: HBT+ 2, HBT- 8; CC/GA: HBT+1, HBT- 3; CT/AA: HBT+ 1. Genotypy z této studie byly vyhodnoceny s přihlédnutím k výsledkům vodíkového dechového testu, ale i tak tam měli zásadní roli jejich genové varianty a nízký věk probandů, u kterých se primární laktózová intolerance ještě nemusela rozvinout. To znamená, že genotypy CC/AA a CC/GA byly dle vodíkového dechového testu vyhodnoceny fenotypem jako laktáza perzistentní, ale s genetickou predispozicí k hypolaktázii v dospělosti, a genotyp CT/AA byl vyhodnocen jako laktáza non-perzistentní fenotyp, který autor přisuzoval sekundární laktózové intoleranci. Dle studie Bulhões *et al.* (2007) byl genotyp CT/AA vyhodnocen jako související s perzistencí enzymu laktázy. Jediná kombinace genotypů TT/GG se v obou testovaných skupinách jedinců neobjevila ani jednou. Bez dotazníkového šetření, či provedení nějakého dalšího testu na laktózovou intoleranci není možné jednoznačně říct, jaký mají tyto zjištěné genotypové varianty fenotyp.

Dílejší částí této práce bylo na základě genetického testování vyhodnotit možnou souvislost laktózové intolerance se syndromem dráždivého tračníku. Kromě detekce rizikových SNP spojených s rozvojem laktózové intolerance, bylo v rámci projektu SGA navrženo vyšetření genové predispozice v genu *TNF SF15* (rs4263839) pro rozvoj syndromu dráždivého tračníku. V rámci SGA projektu byly nasbírány a vyšetřeny vzorky od 20 dobrovolníků ve věku 1-14 let, kteří vykazují dlouhodobé gastrointestinální obtíže a problémy s trávením laktózy. Většina (17) dobrovolníků byla vybrána ve spolupráci s dětskou gastroenterologií Nemocnice Písek, a.s. Pro doplnění zkoumané skupiny dětských pacientů byly vybráni další 3 dětské dobrovolníky, kteří byli klienty genetické laboratoře GENLABS a byly u nich popsány dlouhodobé gastrointestinální potíže. Každý účastník a jeho zákonný zástupce byl seznámen s účastí v projektu a podepsal souhlas s genetickým laboratorním vyšetřením. Po ukončení projektu SGA se toto vyšetření zařadilo do rutinní nabídky laboratoře GENLABS s.r.o. Metodou sekvenování a real-time PCR tak bylo vyšetřeno v letech 2020-2021 již 311 blíže nedidiagnostikovaných jedinců požadující toto vyšetření v režimu samoplátce.

Vzhledem k množství vyšetřených vzorků jde vidět stoupající zájem o toto genetické vyšetření. Za rok 2020, kdy se v srpnu odstartovalo testování, bylo vyšetřeno do konce roku 61 vzorků a od ledna do listopadu roku 2021 bylo vyšetřeno 250 vzorků na SNP rs4263839 (A>G) spojovaným s rizikem rozvoje syndromu dráždivého tračníku. Tento polymorfismus byl vyhodnocen dvěma metaanalýzami (Zhu *et al.*, 2019; Czogalla *et al.*, 2015) jako významný při manifestaci syndromu dráždivého tračníku. Základem asociace polymorfismu rs4263839 s IBS je hypotetický mechanismus, který je uveden v kapitole 2.9.2 *Syndrom dráždivého tračníku*. Z dat lze vyčíst, že se ženy nechávají testovat častěji než muži a tvoří téměř dvě třetiny z vyšetřených jedinců. I přesto nebyl pozorován genderový rozdíl v zastoupení jednotlivých četností výsledných genotypů.

Z výsledků genetického vyšetření je patrné, že téměř 90 % vyšetřených jedinců bylo nositeli alespoň jedné rizikové alely G. Jen 9,97 % z vyšetřených klientů vykazovala genotyp AA, který dle recentních studií není spojován se zvýšeným rizikem rozvoje syndromu dráždivého tračníku. Dle referenční databáze NCBI má alela G frekvenci výskytu v evropské populaci $G=0,681836$, alela A má frekvenci výskytu $A=0,318164$. Frekvence alel ze získaných dat jsou $G=0,66399$ a $A=0,33601$. Z výsledků je patrné, že zjištěné frekvence alel přibližně odpovídají frekvenci výskytu v evropské populaci.

Společně, jak na laktózovou intoleranci, tak i na IBS SNP rs4263839 (A>G) spojovaného s rozvojem syndromu dráždivého tračníku, bylo vyšetřeno 292 jedinců včetně účastníku projektu SGA.

Účastníci studie byli vybráni ve spolupráci dětské gastroenterologické poradny Nemocnice Písek, a.s. Kritéria pro zařazení do studie byly následující: dlouhodobé gastrointestinální potíže zejména po požití mléka a mléčných produktů, nespecifické abdominální bolesti a průjem. Povedlo se vybrat 17 dětských pacientů, u kterých jejich zákonní zástupci projeví zájem o aktivní účast ve studii.

Z výsledků je patrné, že 50 % vyšetřovaných dobrovolníků by mohlo mít gastrointestinální problémy zejména kvůli laktózové intoleranci, jelikož jsou nositeli genotypu CC/GG, který charakterizuje laktázovou non-perzistenci. U druhé poloviny vyšetřených jedinců by se mohla na rozvoji nespecifických zánětů a ostatních příznacích podílet i mutovaná alela G v polymorfismu rs4263839 (A>G) asociovaná s rozvojem syndromu dráždivého tračníku. Je zajímavé, že nositelé heterozygotního genotypu CT/GA v laktózové intoleranci jsou ve všech případech i nositeli plně mutovaného homozygotního genotypu GG v SNP rs4263839. U těchto 25 % probandů by mohla mít větší vliv na manifestaci příznaků mutovaná alela G v SNP rs4263839 (A>G) spojovaná s rozvojem syndromu dráždivého tračníku. To samé by mohlo platit i pro genotyp TT/AA odpovídající laktózové intoleranci. Jelikož se tento genotyp vyznačuje zachováním činnosti laktázy i v dospělosti, musí se zde prezentovat i jiný faktor, který je schopný vyvolat podobné příznaky. U nositelů genotypu TT/AA v genu *MCM6* pro laktózovou intoleranci byly zachyceny genotypové varianty AG (80 %) a GG (20 %) v SNP rs4263839 (A>G).

Z výsledků genetického vyšetření ostatních klientů lze vyčíst, že existuje pravidelná distribuce genotypů pro SNP rs4263839 (A>G) a genotypů pro jednotlivé SNP spojenými s laktózovou non-perzistencí, a to zhruba v poměru 1:5:5 (AA:AG:GG). Nejvyšší výskyt rizikové alely G byl u genotypu CT/GA laktózové intolerance, zatímco nejnižší výskyt byl zaznamenán u plně laktóza intolerantních jedinců. Nejčastěji zachycenými haplotypy byly: CT-GA-AG (N=53) a CT-GA-GG (N=53). Naopak nejméně byly zachyceny haplotypy: CC-GG-AA (N=5) a TT-AA-AA (N=7). Vzhledem k tomu, že většina vyšetřovaných jedinců řešila nějaké blíže neurčené gastrointestinální obtíže, jsou tedy výsledky genetického vyšetření odpovídající. Z toho důvodu by mohl být zachycen jen nízký podíl jedinců se zcela

nerizikovým haplotypem TT-AA-AA. U kombinovaných genotypů pro laktózovou intoleranci byl počet jedinců velmi nízký, proto nelze u těchto genotypů vyvozovat závěry.

Na otázku, zda IBS hraje roli v patogenezi laktózové intolerance se snažil odpovědět Alpers (2006). Uvedl, že 45 % pacientů s IBS má intoleranci laktózy, ale pouze 30 % spojovalo své příznaky s konzumací mléka a mléčných výrobků. Při vyloučení mléka a mléčných produktů ze stravy se symptomy zlepšily pouze u 52 % pacientů (Alpers, 2006; Varjú *et al.*, 2019). Je zajímavé, že někteří pacienti s IBS bez maldigesce laktózy popisují příznaky intolerance laktózy. Kromě toho studie ukázaly, že u IBS pacientů může i bezlaktózové mléko způsobovat stejné příznaky jako laktóza u lidí s diagnostikovanou intolerancí laktózy. To může znamenat, že základní diagnózou by mohlo být IBS (Bernardes-Silva *et al.*, 2007; Vesa *et al.*, 1998; Suarez a Levitt, 1996).

Na základě doporučení odborné společnosti, a i recentních studií v oblasti možné terapie je potřeba vycházet z dominantního symptomu. Syndrom dráždivého tračníku nemá přesnou etiologii ani patogenezi. Diagnostika se v současné době provádí jen dle klinického obrazu a fyzikálním vyšetřením s následným podrobným rozbořením dietních návyků. Poté je doporučováno začít s jednoduchou vylučovací dietou několika běžných, ale rizikových položek stravy, jako je pšenice, mléko, nadměrné množství kofeinu (Lukáš, 2007; Spiller, 2021). Pokud tato strategie nezabírá doporučuje se zkusit dietu, která omezí příjem obtížně stravitelných sacharidů, tzv. FODMAP dieta. Dle recentní studie Krieger-Grübel *et al.* (2020) má tato dieta velice dobré výsledky v eliminaci nepříjemných symptomů.

Po ukončení projektu SGA byla u jedinců, kteří byli nositeli laktáza non-perzistentního genotypu CC/GG zahájena striktní bezlaktózová dieta. Již před potvrzením laktózové intolerance bylo doporučováno konzumace nízkolaktózových či bezlaktózových produktů. Vzhledem k tomu, že naprostá většina z nich byly už větší děti, které již nebyly kojeny, o to jednodušší byla náhrada laktózových produktů za bezlaktózové. Rodiče byly poučeni o rizicích bezlaktózové diety a měli by dodržovat zásady pestré stravy pro kompenzaci látek, které nejsou přijaty společně s mlékem. Mladší děti zůstaly ještě v péči gastroenterologa, ale starší už byly pro stabilní ústup GIT problémů propuštěny do péče obvodního lékaře. U heterozygotních jedinců pro laktózovou intoleranci už bylo bližší určení primárního problému složitější a na bezlaktózovou dietu zareagovalo jen jedno dítě ze čtyř. Ostatní měly i nadále problém s některými složkami stravy, proto jim byla doporučena dieta s nízkým obsahem FODMAP potravin, jako jsou například některé druhy ovoce (např. jablka, meruňky,

třešně, mango, meloun), zeleniny (např. fazole, česnek, zelí, květák, cibule), houby, pšeničné a žitné produkty, produkty s vysokým obsahem fruktózy a sladidla (sorbitol, manitol). Při dodržování této diety došlo ke zlepšení klinických projevů. Jelikož tyto jedinci byli zároveň nositeli i plně mutovaného genotypu GG pro SNP rs4263839 (A>G), byla jim poté diagnóza změněna na syndrom dráždivého tračníku s průjmem. Stejný osud měli i dva laktóza tolerantní jedinci TT/AA, jeden z nich byl zároveň nositelem genotypu GG pro SNP rs4263839 a druhý měl genotyp AG. U dalších dvou dětí s genotypem TT/AA-AG byla při eliminační dietě zjištěna přecitlivělost na lepek a následně po dalším testování jim byla potvrzena celiakie. Poslední případ ze skupiny TT/AA-AG měl i přes laktáza perzistentní genotyp stále problémy s mlékem, a při kojení se objevovaly, kromě průjmu a zvracení, i jemné vyrážky, které byly nejdříve přisuzovány přecitlivělosti na prací prášek. Později byla tomuto kojenci zjištěna alergie na mléčnou bílkovinu. I tato situace je dnes ale dobře řešitelná, existuje totiž hypoalergenní mléko vhodné pro malé děti s prokázanou alergií na mléčnou bílkovinu.

I přes omezenou skupinu jedinců s klinickou diagnózou lze říci, že by SNP rs4263839 (A>G) v genu *TNF SF15* mohl v některých případech sloužit jako průkazný genetický faktor pro predikci citlivosti k rozvoji syndromu dráždivého tračníku.

Závěrem lze říci, že jako u všech známých chorob a poruch je i pro gastrointestinální potíže, jako je laktózová intolerance či syndrom dráždivého tračníku, velice důležité najít tu správnou příčinu klinických obtíží. I když jde na první pohled o banální problémy, ne vždy by se mohla samoléčba, či nějaká nespécifická dieta vyplatit. Může se stát, že by se někteří lidé zbytečně moc omezovali v konzumaci určitých druhů potravin a pak si nevědomě způsobili ještě horší obtíže či onemocnění. Jedná se o velmi citlivé téma, kdy může být nepříjemné přiznat v dospělosti obtíže tohoto druhu praktickému lékaři, či specialistovi. V každém případě je vždy lepší variantou včas zjistit, co se v organismu děje, a zahájit vhodná opatření či léčbu, než nechat vše svému osudu a vyhýbat se lékařům. Současné trendy upozorňují na význam zdravého životního stylu a řeší také zdravé stravovací návyky. Proto i povědomí o potravinových intolerancích poslední dobou spíše roste jak mezi lékaři, tak i v laickém prostředí. Genetické testy umožňují zpřesnění diagnostiky bez potřeby invazivních zákroků a pomáhají včasné úlevě od nepříjemných gastrointestinálních symptomů díky dodržování specifických dietních opatření.

7 ZÁVĚR

V rámci teoretické části diplomové práce byly shrnuty recentní poznatky o problematice laktóзовé intolerance. Je zde popsána hlavně její základní charakteristika, formy, genetické aspekty a její diagnostické a léčebné postupy. V současné době je velice důležitá, při podezření na tuto gastrointestinální poruchu, přesná diagnostika a včasné nastavení správných dietních opatření. Při nekompenzované laktóзовé intoleranci může docházet k zásadním deficitům zejména vápníku a vitamínu D, který má za následek nejen riziko zvýšené lámavosti kostí, či osteoporózy, ale i jiné závažnější zdravotní problémy.

Hlavním cílem experimentální části bylo praktické zvládnutí laboratorních metod vedoucích k zjištění genových variant asociovaných s rozvojem laktóзовé intolerance a v rámci SGA projektu také s rozvojem syndromu dráždivého tračníku. Jednalo se o analytické metody PCR-RFLP, sekvenaci a real-time PCR. Realizace praktické části práce probíhala v laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích. Zjišťovanými jednonukleotidovými polymorfismy byly pro laktóзовou intoleranci SNP C/T-13910 a G/A-22018 v genu *MCM6* a pro syndrom dráždivého tračníku SNP rs4263839 (A>G) v genu *TNF SF15*. Následovalo vyhodnocení a retrospektivní zpracování výsledků vyšetření provedených v letech 2014 až 2021. Tyto výsledky nám poskytli náhled do současné prevalence jednotlivých genotypů v diagnosticky neselektované české populaci.

Dílčím cílem experimentální části této práce bylo vyhodnocení možné genetické asociace mezi laktóзовou intolerancí a syndromem dráždivého tračníku. Tento dílčí cíl vycházel z projektu financovaného Studentskou grantovou agenturou (SGA). Výstupem tohoto cíle bylo zjištění, zda se u některé z jednotlivých genotypových variant pro laktóзовou intoleranci může nacházet vyšší genetické riziko rozvoje syndromu dráždivého tračníku. Přes omezený počet účastníků studie s klinickou diagnózou lze říci, že by SNP rs4263839 (A>G) v genu *TNF SF15* mohl sloužit jako vrozený genetický faktor predisponující jedince k rozvoji syndromu dráždivého tračníku.

8 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALPERS D. H. (2006): Diet and irritable bowel syndrome. *Current opinion in gastroenterology*, **22**(2), 136–139. doi:10.1097/01.mog.0000208462.92136.02.

AMIRI, M.; DIEKMANN, L.; VON KÖCKRITZ-BLICKWEDE, M.; NAIM, H. (2015): The Diverse Forms of Lactose Intolerance and the Putative Linkage to Several Cancers. *Nutrients*, **7**(9), 7209-7230. ISSN 2072-6643. doi:10.3390/nu7095332.

ANGUITA-RUIZ, A.; AGUILERA, C. M.; GIL, Á. (2020): Genetics of Lactose Intolerance: An Updated Review and Online Interactive World Maps of Phenotype and Genotype Frequencies. *Nutrients*, **12**(9), 2689. doi:10.3390/nu12092689.

AURICCHIO, S.; LANDOLT, M.; RUBINO, A.; SEMENZA, G.; PRADER, A. (1963): Isolated Intestinal Lactase Deficiency In The Adult. *The Lancet*, **282**(7303), 324-326. ISSN 01406736. doi:10.1016/S0140-6736(63)92991-X.

AURISICCHIO, L. N.; PITCHUMONI, C. S. (1994): Lactose intolerance. Recognizing the link between diet and discomfort. *Postgraduate medicine*, **95**(1), 113–120.

BEJA-PEREIRA, A.; LUIKART, G.; ENGLAND, P. R. *et al.* (2003): Gene-culture coevolution between cattle milk protein genes and human lactase genes. *Nature*, **35**(4), 311-313. ISSN 1061-4036. doi:10.1038/ng1263.

BERECZKY, S.; DOLO, A.; MAIGA, B. *et al.* (2006): Spleen enlargement and genetic diversity of Plasmodium falciparum infection in two ethnic groups with different malaria susceptibility in Mali, West Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **100**(3), 248-257. ISSN 00359203. doi:10.1016/j.trstmh.2005.03.011.

BERNARDES-SILVA, C. F.; PEREIRA, A. C.; DE FÁTIMA ALVES DA MOTA, G.; KRIEGER, J. E.; LAUDANNA, A. A. (2007): Lactase persistence/non-persistence variants, C/T_13910 and G/A_22018, as a diagnostic tool for lactose intolerance in IBS patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **386**(1-2), 7–11. doi:10.1016/j.cca.2007.07.012.

BERNI CANANI, R.; PEZZELLA, V.; AMOROSO, A.; COZZOLINO, T.; DI SCALA, C.; PASSARIELLO, A. (2016): Diagnosing and Treating Intolerance to Carbohydrates in Children. *Nutrients*, **8**(3), 157. doi:10.3390/nu8030157.

- BRIET, F.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; FLOURIE, B.; ARRIGONI, E.; RAMBAUD, J. C. (1997). Improved clinical tolerance to chronic lactose ingestion in subjects with lactose intolerance: a placebo effect? *Gut*, **41**(5), 632–635. doi:10.1136/gut.41.5.632.
- BRÜSSOW, H. (2013): Nutrition, population growth and disease: a short history of lactose. *Environmental Microbiology*, **15**(8), 2154-2161. ISSN 14622912. doi:10.1111/1462-2920.12117.
- BULHÕES, A. C.; GOLDANI, H. A.; OLIVEIRA, F. S.; MATTE, U. S.; MAZZUCA, R. B.; SILVEIRA, T. R. (2007): Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas*, **40**(11), 1441–1446. <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2007001100004>.
- BURGER, J.; KIRCHNER, M.; BRAMANTI, B.; HAAK, W.; THOMAS, M. G. (2007): Absence of the lactase-persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**(10), 3736-3741. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.0607187104.
- CAMILLERI, M. a KATZKA, D. A. (2012): Irritable Bowel Syndrome: Methods, Mechanisms, and Pathophysiology. Genetic epidemiology and pharmacogenetics in irritable bowel syndrome. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. **302**(10), G1075-G1084. ISSN 0193-1857. doi: 10.1152/ajpgi.00537.2011.
- CAMPBELL, A. K.; WAUD, J. P.; MATTHEWS, S. B. (2009): The Molecular basis of Lactose Intolerance. *Science Progress*, **92**(3-4), 241-287. ISSN 0036-8504. doi:10.3184/003685009X12547510332240.
- CASTIGLIONE, F.; DI GIROLAMO, E.; CIACCI, C. *et al.* (2008): Lactose malabsorption: Clinical or breath test diagnosis? *E-SPEN, the European e-Journal of Clinical Nutrition and Metabolism*, **3**(6), e316-e320. ISSN 17514991. doi:10.1016/j.eclnm.2008.07.018.
- CATANZARO, R.; SCIUTO, M.; MAROTTA, F. (2021): Lactose intolerance: An update on its pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Nutrition research (New York, N.Y.)*, **89**, 23–34. doi:10.1016/j.nutres.2021.02.003.

CEDERLUND, A.; KAI-LARSEN, Y.; PRINTZ, G. *et al.* (2013): Lactose in Human Breast Milk an Inducer of Innate Immunity with Implications for a Role in Intestinal Homeostasis. *PLoS ONE*, **8**(1). ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0053876.

COELHO, M.; LUISELLI, D.; BERTORELLE, G.; LOPES, A. I.; SEIXAS, S.; DESTRO-BISOL, G.; ROCHA, J. (2005): Microsatellite variation and evolution of human lactase persistence. *Human Genetics*, **117**(4), 329-339. ISSN 0340-6717. doi:10.1007/s00439-005-1322-z.

COOK, G. C. (1978): Breath hydrogen concentrations after oral lactose and lactulose in tropical malabsorption and adult hypolactasia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **72**(3), 277-281. ISSN 00359203. doi:10.1016/0035-9203(78)90208-0.

COOK, G. C. a AL-TORKI, M. T. (1975): High intestinal lactase concentrations in adult Arabs in Saudi Arabia. *BMJ*, **3**(5976), 135-136. ISSN 0959-8138. doi:10.1136/bmj.3.5976.135.

CORDAIN, L.; HICKEY, M. S.; KIM, K. (2012): Malaria and rickets represent selective forces for the convergent evolution of adult lactase persistence. *Biodiversity in Agriculture: Domestication, Evolution, and Sustainability*, 299.

CZOGALLA, B.; SCHMITTECKERT, S.; HOUGHTON, L. A.; SAYUK, G. S.; CAMILLERI, M.; OLIVO-DIAZ, A.; SPILLER, R.; WOUTERS, M. M.; BOECKXSTAENS, G.; BERMEJO, J. L.; NIESLER, B. (2015): A meta-analysis of immunogenetic Case-Control Association Studies in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil*, **27**(5):717-27. doi: 10.1111/nmo.12548.

ČURDA L. (2006): Mléčné výrobky a intolerance laktózy. *Potravinářská revue*, **4**, 19-22. ISSN: 1801-9102.

DEMIRBAS, D.; COELHO, A. I.; RUBIO-GOZALBO, M. E.; BERRY, G. T. (2018): Hereditary galactosemia. *Metabolism*, **83**, 188-196. ISSN 00260495. doi:10.1016/j.metabol.2018.01.025.

DENG, Y.; MISSELWITZ, B.; DAI, N.; FOX, M. (2015): Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients*, **7**(9), 8020-8035. ISSN 2072-6643. doi:10.3390/nu7095380.

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** Suppl 2, 18–25.

DZIALANSKI, Z.; BARANY, M., ENGFELDT, P.; MAGNUSON, A.; OLSSON, L. A.; NILSSON, T. K. (2016): Lactase persistence versus lactose intolerance: Is there an intermediate phenotype?. *Clinical biochemistry*, **49**(3), 248–252.

DZYADEVYCH, S. a JAFFREZIC-RENAULT, N. (2014): Conductometric biosensors. *Biological Identification*, Elsevier, s. 153-193. ISBN 9780857095015. doi:10.1533/9780857099167.2.153.

EL-AGAMY, E. I. (2007): The challenge of cow milk protein allergy. *Small Ruminant Research*, **68**(1-2), 64-72. ISSN 09214488. doi:10.1016/j.smallrumres.2006.09.016.

ENATTAH, N. S.; JENSEN, T. G.; NIELSEN, M.; LEWINSKI, R.; KUOKKANEN, M.; RASINPERA, H. *et al.* (2008): Independent introduction of two lactase-persistence alleles into human populations reflects different history of adaptation to milk culture. *American journal of human genetics*, **82**(1), 57–72. doi:10.1016/j.ajhg.2007.09.012.

ENATTAH, N. S.; SAHI, T.; SAVILAHTI, E.; TERWILLIGER, J. D.; PELTONEN, L.; JÄRVELÄ, I. (2002): Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature genetics*, **30**(2), 233–237. doi:10.1038/ng826.

ENATTAH, N.; VÄLIMÄKI, V. V.; VÄLIMÄKI, M. J.; LÖYTTYNIEMI, E.; SAHI, T.; JÄRVELÄ, I. (2004): Molecularly defined lactose malabsorption, peak bone mass and bone turnover rate in young finnish men. *Calcified tissue international*, **75**(6), 488–493. doi:10.1007/s00223-004-0029-9.

FASSIO, F.; FACIONI, M.; GUAGNINI, F. (2018): Lactose Maldigestion, Malabsorption, and Intolerance: A Comprehensive Review with a Focus on Current Management and Future Perspectives. *Nutrients*, **10**(11). ISSN 2072-6643. doi:10.3390/nu10111599.

FAZELI, W.; KACZMAREK, S.; KIRSCHSTEIN, M.; SANTER, R. (2015): A novel mutation within the lactase gene (LCT): the first report of congenital lactase deficiency diagnosed in Central Europe. *BMC gastroenterology*, **15**, 90. doi:10.1186/s12876-015-0316-0.

FLATZ, G.; ROTTHAUWE, H. (1973): Lactose Nutrition and Natural Selection. *The Lancet*, **302**(7820), 76-77. ISSN 01406736. doi:10.1016/S0140-6736(73)93267-4.

FORSGÅRD, R. A. (2019): Lactose digestion in humans: intestinal lactase appears to be constitutive whereas the colonic microbiome is adaptable. *The American journal of clinical nutrition*, **110**(2), 273–279. doi:10.1093/ajcn/nqz104.

FRANCAVILLA, R.; CALASSO, M.; CALACE, L.; SIRAGUSA, S.; NDAGIJIMANA, M.; VERNOCCHI, P.; BRUNETTI, L.; MANCINO, G.; TEDESCHI, G.; GUERZONI, E.; INDRIO, F.; LAGHI, L.; MINIELLO, V. L.; GOBBETTI, M.; DE ANGELIS, M. (2012): Effect of lactose on gut microbiota and metabolome of infants with cow's milk allergy. *Pediatric allergy and immunology : official publication of the European Society of Pediatric Allergy and Immunology*, **23**(5), 420–427. doi:10.1111/j.1399-3038.2012.01286.x.

FURNARI, M.; BONFANTI, D.; PARODI, A.; FRANZÈ, J.; SAVARINO, E.; BRUZZONE, L.; MOSCATELLI, A.; DI MARIO, F.; DULBECCO, P.; SAVARINO, V. (2013): A comparison between lactose breath test and quick test on duodenal biopsies for diagnosing lactase deficiency in patients with self-reported lactose intolerance. *Journal of clinical gastroenterology*, **47**(2), 148–152. doi:10.1097/MCG.0b013e31824e9132.

GALLEGO ROMERO, I.; BASU MALLICK, C.; LIEBERT, A.; CRIVELLARO, F.; CHAUBEY, G.; ITAN, Y.; KIVISILD, T. (2012): Herders of Indian and European cattle share their predominant allele for lactase persistence. *Molecular biology and evolution*, **29**(1), 249-260.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E. *et al.* (2017): Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, **14**(8), 491-502. ISSN 1759-5045. doi:10.1038/nrgastro.2017.75.

GORDON, C. M.; DEPETER, K. C.; FELDMAN, H. A.; GRACE, E.; EMANS, S. J. (2004): Prevalence of vitamin D deficiency among healthy adolescents. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, **158**(6), 531–537. doi:10.1001/archpedi.158.6.531.

GRIESSEN, M.; COCHET, B.; INFANTE, F.; JUNG, A.; BARTHOLDI, P.; DONATH, A.; LOIZEAU, E.; COURVOISIER, B. (1989): Calcium absorption from milk in lactase-deficient

subjects. *The American journal of clinical nutrition*, **49**(2), 377–384. doi:10.1093/ajcn/49.2.377.

GUGATSCHKA, M.; DOBNIG, H.; FAHRLEITNER-PAMMER, A.; PIETSCHMANN, P.; KUDLACEK, S.; STRELE, A.; OBERMAYER-PIETSCH, B. (2005): Molecularly-defined lactose malabsorption, milk consumption and anthropometric differences in adult males. *QJM: monthly journal of the Association of Physicians*, **98**(12), 857–863. doi:10.1093/qjmed/hci140.

HE, T.; PRIEBE, M. G.; HARMSSEN, H. J. M.; STELLAARD, F.; SUN, X.; WELLING, G. W.; VONK, R. J. (2006): Colonic Fermentation May Play a Role in Lactose Intolerance in Humans. *The Journal of Nutrition*, **136**(1), 58-63. ISSN 0022-3166. doi:10.1093/jn/136.1.58.

HERTZLER, S. R., A SAVAIANO, D. A. (1996): Colonic adaptation to daily lactose feeding in lactose maldigesters reduces lactose intolerance. *The American journal of clinical nutrition*, **64**(2), 232–236. doi:10.1093/ajcn/64.2.232.

HEYMAN, M. B. (2006): Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics*, **118**(3), 1279–1286. doi:10.1542/peds.2006-1721.

HOLDEN, C., A MACE, R. (2009): Phylogenetic analysis of the evolution of lactose digestion in adults. *Human biology*, **81**(5/6), 597-619.

HOLDEN, H. M.; RAYMENT, I.; THODEN, J. B. (2003): Structure and Function of Enzymes of the Leloir Pathway for Galactose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, **278**(45), 43885-43888. ISSN 00219258. doi:10.1074/jbc.R300025200.

HUBÁČEK, J. A.; ADÁMKOVÁ, V.; ŠEDOVÁ, L.; OLIŠAROVÁ, V.; ADÁMEK, V.; TÓTHOVÁ, V. (2017): Frekvence genotypů LCT-13910C/T v populaci českých/slovanských a českých Romů/Cikánů. *Genetika a molekulární biologie*, **40** (2), 450-452. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2016-0071.

INGRAM, C. J. E.; MULCARE, C. A.; ITAN, Y. *et al.* (2009): Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Hum Genet* **124**, 579–591. doi:10.1007/s00439-008-0593-6.

INGRAM, C. J. E.; RAGA, T. O.; TAREKEGN, A. *et al.* (2009): Multiple Rare Variants as a Cause of a Common Phenotype: Several Different Lactase Persistence Associated Alleles in a Single Ethnic Group. *J Mol Evol* **69**, 579. doi:10.1007/s00239-009-9301-y.

INGRAM, C. J.; ELAMIN, M. F.; MULCARE, C. A.; WEALE, M. E.; TAREKEGN, A.; RAGA, T. O.; BEKELE, E.; ELAMIN, F. M.; THOMAS, M. G.; BRADMAN, N.; SWALLOW, D. M. (2007): A novel polymorphism associated with lactose tolerance in Africa: multiple causes for lactase persistence?. *Human genetics*, **120**(6), 779–788. doi:10.1007/s00439-006-0291-1.

ITAN, Y.; JONES, B. L.; INGRAM, C. J.; SWALLOW, D. M.; THOMAS, M. G. (2010): A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes. *BMC evolutionary biology*, **10**, 36. doi:10.1186/1471-2148-10-36.

JABLONSKI, N. G. a CHAPLIN, G. (2010): Human skin pigmentation as an adaptation to UV radiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(Supplement_2), 8962-8968. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.0914628107.

JANSSON-KNOPELL, C. L.; KRAJICEK, E. J.; SAVAIANO, D. A.; SHIN, A. S. (2020): Lactose Intolerance: A Concise Review to Skim the Surface. *Mayo Clinic proceedings*, **95**(7), 1499–1505. doi:10.1016/j.mayocp.2020.04.036.

JASIELSKA, M., A GRZYBOWSKA-CHLEBOWCZYK, U. (2019): Lactose Malabsorption and Lactose Intolerance in Children with Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology research and practice*, 2507242. doi:10.1155/2019/2507242.

KNOL, J.; SCHOLTENS, P.; KAFKA, C.; STEENBAKKERS, J.; GRO, S.; HELM, K.; KLARCZYK, M.; SCHÖPFER, H.; BÖCKLER, H. M.; WELLS, J. (2005): Colon microflora in infants fed formula with galacto- and fructo-oligosaccharides: more like breast-fed infants. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, **40**(1), 36–42. doi:10.1097/00005176-200501000-00007.

KRIEGER-GRÜBEL, C.; HUTTER, S.; HIESTAND, M.; BRENNER, I.; GÜSEWELL, S.; BOROVIČKA, J. (2020): Treatment efficacy of a low FODMAP diet compared to a low lactose diet in IBS patients: A randomized, cross-over designed study. *Clinical Nutrition ESPEN*, **40**, 83-89. ISSN 24054577. doi:10.1016/j.clnesp.2020.09.020.

- KUCHAY, R. A.; ANWAR, M.; THAPA, B. R.; MAHMOOD, A; MAHMOOD, S. (2013): Correlation of G/A -22018 single-nucleotide polymorphism with lactase activity and its usefulness in improving the diagnosis of adult-type hypolactasia among North Indian children. *Genes & nutrition*, **8**(1), 145–151. <https://doi.org/10.1007/s12263-012-0305-7>.
- KUOKKANEN, M.; KOKKONEN, J.; ENATTAH, N. S.; YLISAUKKO-OJA, T.; KOMU, H.; VARILO, T.; PELTONEN, L.; SAVILAHTI, E.; JARVELA, I. (2006): Mutations in the translated region of the lactase gene (LCT) underlie congenital lactase deficiency. *American journal of human genetics*, **78**(2), 339–344. doi:10.1086/500053.
- LAXMINARAYAN, S.; REIFMAN, J.; EDWARDS, S. S.; WOLPERT, H.; STEIL, G. M. (2015): Bolus Estimation--Rethinking the Effect of Meal Fat Content. *Diabetes technology & therapeutics*, **17**(12), 860–866. doi:10.1089/dia.2015.0118.
- LIEBERT, A.; LÓPEZ, S.; JONES, B. L. *et al.* (2017): World-wide distributions of lactase persistence alleles and the complex effects of recombination and selection. *Hum Genet* **136**, 1445–1453. doi:10.1007/s00439-017-1847-y.
- LOMER, M. C. E.; PARKES, G. C.; SANDERSON, J. D. (2008): Review article: lactose intolerance in clinical practice - myths and realities. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, **27**(2), 93-103. ISSN 02692813. doi:10.1111/j.1365-2036.2007.03557.x.
- LONGSTRETH, G. F.; THOMPSON, W. G.; CHEY, W. D.; HOUGHTON, L. A.; MEARIN, F.; SPILLER, R. C. (2006): Functional Bowel Disorders. *Gastroenterology*. **130**(5), 1480-1491. doi:10.1053/j.gastro.2005.11.061. ISSN 00165085.
- LUKÁŠ M. (2007): Syndrom dráždivého tračníku. *Interní med*, **9**(12): 544-547.
- MAĐRY E.; FIDLER E.; WALKOWIAK J. (2010): Lactose intolerance – current state of knowledge. *Acta Sci.Pol. Technol. Aliment.* **9** (3), 343-350.
- MAGIERA, R.; SCHÜRER-MALY, C. C.; MORTSIEFER, A.; ABHOLZ, H. H.; MALY, F. E.; PENTZEK, M. (2014): Are there differences between patients with and without the homozygous--13910CC genetic variant in the MCM-6 gene upstream from the lactase gene?-A non-randomised, two armed intervention study without control group. *Clinical laboratory*, **60**(10), 1617–1625. doi:10.7754/clin.lab.2014.140219.

- MÄKINEN, O. E.; WANHALINNA, V.; ZANNINI, E.; ARENDT, E. K. (2015): Foods for Special Dietary Needs: Non-dairy Plant-based Milk Substitutes and Fermented Dairy-type Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **56**(3), 339-349. ISSN 1040-8398. doi:10.1080/10408398.2012.761950.
- MANUYAKORN, W. A TANPOWPONG, P. (2019): Cow milk protein allergy and other common food allergies and intolerances. *Paediatrics and International Child Health*, **39**:1, 32-40, doi:10.1080/20469047.2018.1490099.
- MARTON, A.; XUE, X.; SZILAGYI, A. (2012): Meta-analysis: the diagnostic accuracy of lactose breath hydrogen or lactose tolerance tests for predicting the North European lactase polymorphism C/T-13910. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, **35**(4), 429–440. doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04962.x.
- MATTAR, R.; DE CAMPOS MAZO, D. F.; CARRILHO, F. J. (2012): Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clinical and experimental gastroenterology*, **5**, 113–121. doi:10.2147/CEG.S32368.
- MATTAR, R.; MONTEIRO, M.; SILVA, J. M.; CARRILHO, F. J. (2010): LCT-22018G>A single nucleotide polymorphism is a better predictor of adult-type hypolactasia/lactase persistence in Japanese-Brazilians than LCT-13910C>T. *Clinics* (Sao Paulo, Brazil), **65**(12), 1399. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322010001200030>.
- 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.
- MATTHEWS, S B. (2005): Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgraduate Medical Journal*, **81**(953), 167-173. ISSN 0032-5473. doi:10.1136/pgmj.2004.025551.
- MCCRACKEN, R. D. (1971). Lactase deficiency: An example of dietary evolution. *Current Anthropology*, **12**(4/5), 479-517.
- MILLER, J. B., A MCVEAGH, P. (1999): Human milk oligosaccharides: 130 reasons to breast-feed. *British journal of nutrition*, **82**(5), 333-335.

- MISSELWITZ, B.; BUTTER, M.; VERBEKE, K.; FOX, M. R. (2019): Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut*, **68**(11), 2080–2091. doi:10.1136/gutjnl-2019-318404.
- 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. doi:10.1177/2050640613484463.
- MULCARE, C. A.; WEALE, M. E.; JONES, A. L. *et al.* (2004): The T Allele of a 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. *The American Journal of Human Genetics*, **74**(6), 1102-1110. ISSN 00029297. doi:10.1086/421050.
- NÉMETH, K. (2003): Calculation of long-term erosion in Central Otago, New Zealand, based on erosional remnants of maar/tuff rings. *Zeitschrift für Geomorphologie*, **47**(1), 29-49. ISSN 0372-8854. doi:10.1127/zfg/47/2003/29.
- OUELLETTE, R. J. a RAWN, J D. (2015): Carbohydrates. *Principles of Organic Chemistry*, Elsevier, s. 343-370. ISBN 9780128024447. doi:10.1016/B978-0-12-802444-7.00013-6.
- PHILLIPS S. F. (1999). Irritable bowel syndrome: making sense of it all. *Bailliere's best practice & research. Clinical gastroenterology*, **13**(3), 489–503. doi:10.1053/bega.1999.0042.
- RANCIARO, A.; CAMPBELL, M. C.; HIRBO, J. B.; KO, W. Y.; FROMENT, A.; ANAGNOSTOU, P.; KOTZE, M. J.; IBRAHIM, M.; NYAMBO, T.; OMAR, S. A.; TISHKOFF, S. A. (2014): Genetic origins of lactase persistence and the spread of pastoralism in Africa. *American journal of human genetics*, **94**(4), 496–510. doi:10.1016/j.ajhg.2014.02.009.
- RASINPERA, H.; SAARINEN, K.; PELKONEN, A.; JARVELA, I.; SAVILAHTI, E.; KOLHO, K. L. (2006): Molecularly defined adult-type hypolactasia in school-aged children with a previous history of cow's milk allergy. *World journal of gastroenterology*, **12**(14), 2264–2268. doi:10.3748/wjg.v12.i14.2264.
- REZAIIE, A.; BURESI, M.; LEMBO, A.; LIN, H.; MCCALLUM, R.; RAO, S.; SCHMULSON, M.; VALDOVINOS, M.; ZAKKO, S.; PIMENTEL, M. (2017): Hydrogen and Methane-Based Breath Testing in Gastrointestinal Disorders: The North American

Consensus. *The American journal of gastroenterology*, **112**(5), 775–784. doi:10.1038/ajg.2017.46.

ROBLES, L. a PRIEFER, R. (2020): Lactose Intolerance: What Your Breath Can Tell You. *Diagnostics*, **10**(6). ISSN 2075-4418. doi:10.3390/diagnostics10060412.

SAAVEDRA, J. M., A PERMAN, J. A. (1989). Current concepts in lactose malabsorption and intolerance. *Annual review of nutrition*, **9**, 475–502. doi:10.1146/annurev.nu.09.070189.002355.

SALQUE, M.; BOGUCKI, P.; PYZEL, J. *et al.* (2013): Earliest evidence for cheese making in the sixth millennium BC in northern Europe. *Nature* **493**, 522–525. doi:10.1038/nature11698.

SANTONOCITO, C.; SCAPATICCI, M.; GUARINO, D.; ANNICCHIARICO, E. B.; LISCI, R.; PENITENTE, R.; GASBARRINI, A.; ZUPPI, C.; CAPOLUONGO, E. (2015): Lactose intolerance genetic testing: is it useful as routine screening? Results on 1426 south-central Italy patients. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, **439**, 14–17. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.09.026>.

SANTOS, G. J.; ROCHA, R.; SANTANA, G. O. (2019): Lactose intolerance: what is a correct management?. *Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)*, **65**(2), 270–275. doi:10.1590/1806-9282.65.2.270.

SCHAAFSMA, G. (2008): Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, **18**(5), 458-465. ISSN 09586946. doi:10.1016/j.idairyj.2007.11.013.

SCHLEBUSCH, C.; SJÖDIN, P.; SKOGLUND, P. *et al.* (2013): Stronger signal of recent selection for lactase persistence in Maasai than in Europeans. *Eur J Hum Genet* **21**, 550–553. doi:10.1038/ejhg.2012.199.

SICHERER, S. H., A SAMPSON, H. A. (2010): Food allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, **125**(2), S116-S125. doi:10.1016/j.jaci.2009.08.028.

SILVA, A. R. A.; SILVA, M. M. N.; RIBEIRO, B. D. (2020): Health issues and technological aspects of plant-based alternative milk. *Food Research International*, **131**. ISSN 09639969. doi:10.1016/j.foodres.2019.108972.

- SIMOONS, F. J. (1969): Primary adult lactose intolerance and the milking habit: A problem in biological and cultural interrelations. *Digestive Diseases and Sciences*, **14**(12), 819-836.
- SIMOONS, F. J. (1970): Primary adult lactose intolerance and the milking habit: A problém in biologic and cultural interrelations. *The American Journal of Digestive Diseases*, **15** (8), 695-710.
- SPILLER, R. (2021): Impact of Diet on Symptoms of the Irritable Bowel Syndrome. *Nutrients*, **13**(2). ISSN 2072-6643. doi:10.3390/nu13020575.
- SUAREZ, F. L.; SAVAIANO, D. A.; LEVITT, M. D. (1995): A comparison of symptoms after the consumption of milk or lactose-hydrolyzed milk by people with self-reported severe lactose intolerance. *The New England journal of medicine*, **333**(1), 1–4. doi:10.1056/NEJM199507063330101.
- SUAREZ, F., A LEVITT, M. D. (1996): Abdominal symptoms and lactose: the discrepancy between patients' claims and the results of blinded trials. *The American journal of clinical nutrition*, **64**(2), 251–252. doi:10.1093/ajcn/64.2.251.
- SUCHY, F. J.; BRANNON, P. M.; CARPENTER, T. O.; FERNANDEZ, J. R.; GILSANZ, V.; GOULD, J. B.; HALL, K.; HUI, S. L.; LUPTON, J.; MENNELLA, J.; MILLER, N. J.; OSGANIAN, S. K.; SELLMAYER, D. E.; WOLF, M. A. (2010): National Institutes of Health Consensus Development Conference: lactose intolerance and health. *Annals of internal medicine*, **152**(12), 792–796. doi:10.7326/0003-4819-152-12-201006150-00248.
- SVERRISDÓTTIR, O. Ó.; TIMPSON, A.; TOOMBS, J. *et al.* (2014): Direct Estimates of Natural Selection in Iberia Indicate Calcium Absorption Was Not the Only Driver of Lactase Persistence in Europe. *Molecular Biology and Evolution*, **31**(4), 975-983. ISSN 1537-1719. doi:10.1093/molbev/msu049.
- SWAGERTY, D. L.; JR, WALLING, A. D.; KLEIN, R. M. (2002). Lactose intolerance. *American family physician*, **65**(9), 1845–1850.
- SWALLOW, D. M. (2003): Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance. *Annual Review of Genetics*, **37**(1), 197-219. ISSN 0066-4197. doi:10.1146/annurev.genet.37.110801.143820.

SWALLOW, D. M. A HOLLOX, E. J. (2000): The genetic polymorphism of intestinal lactase activity in adult humans. In C. Scriver, A. Beaudet, W. Sly, & D. Valle (Eds.), *Metabolic basis of inherited disease* (pp. 1651-1663). McGraw-Hill.

TAG, C. G.; OBERKANINS, C.; KRIEGSHÄUSER, G.; INGRAM, C. J. E.; SWALLOW, D. M.; GRESSNER, A. M.; LEDOCHOWSKI, M.; WEISKIRCHEN, R. (2008): Evaluation of a novel reverse-hybridization StripAssay for typing DNA variants useful in diagnosis of adult-type hypolactasia. *Clinica Chimica Acta*, **392**(1-2), 58-62. ISSN 00098981. doi:10.1016/j.cca.2008.03.006.

TAN, M.; MUHARDI, L.; OSATAKUL, S.; HEGAR, B.; VANDENPLAS, Y.; LUDWIG, T.; BINDELS, J.; VAN DER BEEK, E. M.; QUAK, S. H. (2018): An Electronic Questionnaire Survey Evaluating the Perceived Prevalence and Practices of Lactose Intolerance in 1 to 5 Year Old Children in South East Asia. *Pediatric gastroenterology, hepatology & nutrition*, **21**(3), 170–175. doi:10.5223/pghn.2018.21.3.170.

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.; DELOUKAS, P. (2007): Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature genetics*, **39**(1), 31–40. doi:10.1038/ng1946.

TOMCZONEK-MORUŚ, J.; WOJTASIK, A.; ZEMAN, K.; SMOLARZ, B.; BAĀ-ROMANISZYN, L. (2019): 13910C>T and 22018G>A LCT gene polymorphisms in diagnosing hypolactasia in children. *United European gastroenterology journal*, **7**(2), 210–216. <https://doi.org/10.1177/2050640618814136>.

TORNIAINEN, S.; FREDDARA, R.; ROUTI, T.; GIJSBERS, C.; CATASSI, C.; HÖGLUND, P.; SAVILAHTI, E.; JÄRVELÄ, I. (2009): Four novel mutations in the lactase gene (LCT) underlying congenital lactase deficiency (CLD). *BMC gastroenterology*, **9**, 8. doi:10.1186/1471-230X-9-8.

TREUDLER, R.; TEBBE, B.; STEINHOFF, M.; ORFANOS, C. E. (2002): Familial aquagenic urticaria associated with familial lactose intolerance. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **47**(4), 611–613. doi:10.1067/mjd.2002.124599.

- TROELSEN J. T. (2005). Adult-type hypolactasia and regulation of lactase expression. *Biochimica et biophysica acta*, **1723**(1-3), 19–32. doi:10.1016/j.bbagen.2005.02.003.
- UGIDOS-RODRÍGUEZ, S.; MATA LLANA-GONZÁLEZ, M. C.; SÁNCHEZ-MATA, M. C. (2018): Lactose malabsorption and intolerance: a review. *Food & Function*, **9**(8), 4056-4068. ISSN 2042-6496. doi:10.1039/C8FO00555A.
- UCHIDA, N.; SAKAMOTO, O.; IRIE, M.; ABUKAWA, D.; TAKEYAMA, J.; KURE, S.; TSUCHIYA, S. (2012): Two novel mutations in the lactase gene in a Japanese infant with congenital lactase deficiency. *The Tohoku journal of experimental medicine*, **227**(1), 69–72. doi:10.1620/tjem.227.69.
- 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 and therapeutics*, **3**(3), 29–33. doi:10.4292/wjgpt.v3.i3.29.
- VARJÚ, P.; GEDE, N.; SZAKÁCS, Z.; HEGYI, P.; CAZACU, I. M.; PÉCSI, D.; FÁBIÁN, A.; SZEPES, Z.; VINCZE, Á.; TENK, J.; BALASKÓ, M.; RUMBUS, Z.; GARAMI, A.; CSUPOR, D.; CZIMMER, J. (2019): Lactose intolerance but not lactose maldigestion is more frequent in patients with irritable bowel syndrome than in healthy controls: A meta-analysis. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, **31**(5), e13527. doi:10.1111/nmo.13527.
- VESA, T. H.; MARTEAU, P.; KORPELA, R. (2000): Lactose intolerance. *Journal of the American College of Nutrition*, **19**(2 Suppl), 165S–175S. doi:10.1080/07315724.2000.10718086.
- VESA, T. H.; SEPO, L. M.; MARTEAU, P. R.; SAHI, T.; KORPELA, R. (1998): Role of irritable bowel syndrome in subjective lactose intolerance. *The American journal of clinical nutrition*, **67**(4), 710–715. doi:10.1093/ajcn/67.4.710.
- VOJDANI, A.; TURNPAUGH, C.; VOJDANI, E. (2018): Immune reactivity against a variety of mammalian milks and plant-based milk substitutes. *Journal of Dairy Research*, **85**(3), 358-365. doi:10.1017/S0022029918000523.
- WAHLQVIST, M. L. (2015): Lactose nutrition in lactase nonpersisters. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, **24**(Supplement), s21-s25.

- WAL, JEAN-MICHEL (2004): Bovine milk allergenicity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **93**(5), S2-S11. ISSN 10811206. doi:10.1016/S1081-1206(10)61726-7.
- WALKER, C. a THOMAS, M. G. (2019): The evolution of lactose digestion. *Lactose*. Elsevier, s. 1-48. ISBN 9780128117200. doi:10.1016/B978-0-12-811720-0.00001-5.
- WANG, Y.; HARVEY, C. B.; HOLLOX, E. J.; PHILLIPS, A. D.; POULTER, M.; CLAY, P.; WALKER-SMITH, J. A.; SWALLOW, D. M. (1998): The genetically programmed down-regulation of lactase in children. *Gastroenterology*, **114**(6), 1230-1236. ISSN 00165085. doi:10.1016/S0016-5085(98)70429-9.
- WEAVER, L. T.; LAKER, M. F.; NELSON, R. (1986): Neonatal intestinal lactase activity. *Archives of disease in childhood*, **61**(9), 896–899. doi:10.1136/adc.61.9.896.
- WIJESINHA-BETTONI, R., a BURLINGAME, B. (2013). Milk and dairy product composition. *Milk and dairy products in human nutrition*, 41-102.
- XU, L.; SUN, H.; ZHANG, X.; WANG, J.; SUN, D.; CHEN, F., BAI, J.; FU, S. (2010): The -22018A allele matches the lactase persistence phenotype in northern Chinese populations. Scandinavian. *Journal of gastroenterology*, **45**(2), 168–174. <https://doi.org/10.3109/00365520903414176>.
- YANG, J.; DENG, Y.; CHU, H.; CONG, Y.; ZHAO, J.; POHL, D.; MISSELWITZ, B.; FRIED, M.; DAI, N.; FOX, M. (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 : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association*, **11**(3), 262–268.e1. doi:10.1016/j.cgh.2012.11.034.
- YANG, J.; FOX, M.; CONG, Y.; CHU, H.; ZHENG, X.; LONG, Y.; FRIED M.; DAI, N. (2014): Lactose intolerance in irritable bowel syndrome patients with diarrhoea: the roles of anxiety, activation of the innate mucosal immune system and visceral sensitivity. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*. **39**(3), 302-311. doi:10.1111/apt.12582. ISSN 02692813.
- ZECCA, L.; MESONERO, J. E.; STUTZ, A.; POIRÉE, J. C.; GIUDICELLI, J.; CURSIO, R.; GLOOR, S. M.; SEMENZA, G. (1998): Intestinal lactase-phlorizin hydrolase (LPH): the two catalytic sites; the role of the pancreas in pro-LPH maturation. *FEBS Letters*, **435**(2-3), 225-228. ISSN 00145793. doi:10.1016/S0014-5793(98)01076-X.

ZHENG, X.; CHU, H.; CONG, Y. *et al.* (2015): Self-reported lactose intolerance in clinic patients with functional gastrointestinal symptoms: prevalence, risk factors, and impact on food choices. *Neurogastroenterology & Motility*. **27**(8), 1138-1146. doi:10.1111/nmo.12602. ISSN 13501925.

ZHENG, X.; CHU, H.; CONG, Y.; DENG, Y.; LONG, Y.; ZHU, Y.; POHL, D.; FRIED, M.; DAI, N.; FOX, M. (2015): Self-reported lactose intolerance in clinic patients with functional gastrointestinal symptoms: prevalence, risk factors, and impact on food choices. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society*, **27**(8), 1138–1146. doi:10.1111/nmo.12602.

ZHU, S.; WANG, B.; JIA, Q.; DUAN, L. (2019): Candidate single nucleotide polymorphisms of irritable bowel syndrome: a systemic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterology*. **19**(1). doi:10.1186/s12876-019-1084-z. ISSN 1471-230X.

ZHU, Y.; ZHENG, X.; CONG, Y.; CHU, H.; FRIED, M.; DAI, N.; FOX, M. (2013): Bloating and distention in irritable bowel syndrome: the role of gas production and visceral sensation after lactose ingestion in a population with lactase deficiency. *The American journal of gastroenterology*, **108**(9), 1516–1525. doi:10.1038/ajg.2013.198.

ZUCHELLI, M.; CAMILLERI, M.; ANDREASSON, A. N. *et al.* (2011): Association of TNFSF15 polymorphism with irritable bowel syndrome. *Gut*. **60**(12), 1671-1677. doi: 10.1136/gut.2011.241877. ISSN 0017-5749.

9 INTERNETOVÉ ZDROJE

HENSTRÖM, Maria (2018): Genetics of irritable bowel syndrome and associated gastrointestinal symptoms [online]. Seminar room "Gene", Dept. of Biosciences and Nutrition, Neo, Blickagången 16, Karolinska Institutet Flemingsberg., 2018 [cit. 2020-11-21]. ISBN 978-91-7676-958-4. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10616/46291>.

NCBI: rs182549. In: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [online]. [cit. 2021-11-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs182549>.

NCBI: rs4988235. In: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [online]. [cit. 2021-11-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4988235>.

NCBI: rs4263839. In: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov> [online]. [cit. 2021-11-23]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs4263839>.

PubChem: beta-Lactose. In: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> [online]. [cit. 2021-09-10]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/beta-Lactose>.

10 PŘÍLOHY

Příloha 1: Žádanka GENLABS s.r.o.- samoplátci

GENLABS s.r.o.
Genetická laboratoř GENLABS
Budova JVTP a.s.
Lipová 1789/9
370 05 České Budějovice 2
IČ: 0185 38 05

Kontakt:
Telefon: +420 603 286 725
e-mail: dagmar.bystricka@genlabs.cz

Přijem vzorků: Po-Pá 9.00 – 13.00
Nebo individuálně po telefonické domluvě.



ŽÁDANKA
PRO GENETICKÉ VYŠETŘENÍ

LIČ:

KLIENT

Jméno: Příjmení: Pohlaví: žena/muž

Číslo pojištěnce:

Informovaný souhlas pacienta:

Pojišťovna:

Samoplátce: ANO

Podpis:

Kontakt/adresa:

PRIMÁRNÍ VZOREK

periferní krev v EDTA*

bukalní stěr

jiné.....

*fialová vakueta, nesražená periferní krev

Datum odběru:

Čas odběru:

LABORATORNÍ TESTY

HEMOKOAGULACE

Trombotest/Leidenská mutace

Trombotest/mutace Protrombinu

Trombotest/MTHFR C667T

Trombotest/MTHFR A1298C

Rozšířený trombotest/ 8 mutací

POTRAVINOVÉ INTOLERANCE

Laktózová intolerance

Céliakie/stanovení vybraných alel HLA systému
asociovaných s rozvojem celiakální sprue

PREDISPOZICE PRO CIVILIZAČNÍ CHOROBY

Ateroskleróza

Alzheimerova choroba

Kardiovaskulární onemocnění

SPECIALIZOVANÁ VYŠETŘENÍ

Dědičné predispozice pro melanom

Bechtěrevova nemoc/ stanovení přítomnosti antigenu
HLA B27

JINÁ VYŠETŘENÍ

Gen Apo E samostatně

Gen COMT

Gen NQO1

Gen NRF2

LABORATOŘ

Vzorek přijal:


Datum/čas:

Podpis:

JINÉ VYŠETŘENÍ:

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
Verze 005

Příloha 2: Informovaný souhlas s genetickým 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 Rieggert 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., 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

| | | |
|---|--|--|
|  | GENLABS s.r.o. Lipová 1789/9 370 05 České Budějovice 2 | SOUHLAS S GENETICKÝM LABORATORNÍM VYŠETŘENÍM 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 lékaře 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 výsledky 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