



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Sciences

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

**Molekulární detekce vybraných genových
polymorfismů související s výživou (validace nutričipu)**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Studijní program: [Zdravotní laborant](#)

Autor: Kateřina Turková

Vedoucí práce: Dagmar Riegert Bystřická, Mgr. Ph.D

České Budějovice 2021

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci s názvem „Molekulární detekce vybraných genových polymorfismů související s výživou (validace nutričipu)“ jsem vypracoval/a samostatně pouze s použitím pramenů v seznamu citované literatury.

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

V Českých Budějovicích dne 4.5.2021

.....

podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala své školitelce Mgr. Dagmar Bystřické, PhD. za vstřícnost a rady při vedení bakalářské práce a také za trpělivost. Dále bych ráda poděkovala laborantce paní Škopkové v laboratoři GENLABS v Českých Budějovicích, která se mě ujala a mohla jsem díky ní nejen provést práci samotnou, ale vidět i další genetická vyšetření. A největší dík patří mé rodině, která stála při mně a vždy pomohla, když jsem potřebovala studovat a pracovat.

Molekulární detekce vybraných genových polymorfismů související s výživou (validace nutričipu)

Abstrakt

Laktózová intolerance je nejběžnější potravinovou intolerancí, vyskytující se celosvětově. Jedinci s laktózovou intolerancí nedokáží v tenkém střevě tvořit enzym laktázu, který umožňuje štěpit laktózu obsaženou v mléčných produktech. Nedostatečná tvorba laktázy může být geneticky podmíněná. V Evropské populaci byly nalezeny dva jednonukleotidové polymorfismy odpovědné za přetrvávání laktázové aktivity v dospělosti.

Celiakie patří mezi autoimunitní onemocnění, které postihuje především sliznici tenkého střeva. Onemocnění je charakterizováno nesnášenlivostí gliadinu, který je součástí lepku. Intolerance vede k chronickému zánětu na sliznici tenkého střeva a tím dochází k chronickému průjmům, tukovité stolici, zvracení a únavě. Rozvoj celiakie je podmíněn přítomností genetické predispozice. Genetická predispozice je vázána na alely HLA systému. Konkrétně se jedná o haplotypy HLA-DQ2 a HLA-DQ8.

Praktická část této bakalářské práce je zaměřena na vyšetření vrozených rizikových faktorů pro laktózovou intoleranci a celiakii pomocí rutinních metod molekulární biologie. Detekční metody použité v praktické části jsou PCR RFLP a Real-time PCR. Pomocí PCR RFLP budou vyšetřeny dva polymorfismy genu *MCM6* C/T 13910 a G/A 22018 ýpro laktózovou intoleranci vyskytující se v evropské populaci se nejčastěji, které zásadně ovlivňují tvorbu laktázy v dospělosti. Metoda real-time bude použita pro detekci rizikových haplotypů HLA DQ2.5, HLA DQ2.2 a HLA DQ8 významě asociovaných s výskytem celiakie.

Klíčová slova

laktóza; laktáza; polymorfismus C/T 13910 a G/A 22018; celiakie; HLA typizace; PCR; Real-time PCR

Molecular detection of selected gene polymorphisms related to nutrition (nutrichip validation)

Abstract

Lactose intolerance is the most common food intolerance in the world. Individuals with lactose intolerance are unable to produce the enzyme lactase in the small intestine, which makes it possible to break down the lactose contained in dairy products. Insufficient lactase production may be genetically determined. Two single nucleotide polymorphisms responsible for the persistence of lactase activity in adulthood have been found in the European population.

Celiac disease is one of the autoimmune diseases that mainly affects the mucous membrane of the small intestine. The disease is characterized by intolerance to gliadin, which is part of gluten. Intolerance leads to chronic inflammation of the small intestinal mucosa, leading to chronic diarrhea, fatty stools, vomiting and fatigue. The development of celiac disease is conditioned by the presence of a genetic predisposition. Genetic predisposition is linked to HLA system alleles. Specifically, these are the HLA-DQ2 and HLA-DQ8 haplotypes.

The practical part of this bachelor thesis is focused on the examination of innate risk factors for lactose intolerance and celiac disease using routine methods of molecular biology. The detection methods used in the practical part are RFLP PCR and Real-time PCR. Using PCR RFLP, two polymorphisms of the *MCM6* gene C / T 13910 and G / A 22018 for lactose intolerance occurring in the European population will be examined, with the most frequently affecting lactase production in adulthood. The real-time method will be used to detect risk haplotypes of HLA DQ2.5, HLA DQ2.2 and HLA DQ8 significantly associated with the occurrence of celiac disease.

Key words

lactose; lactase; polymorphism C / T 13910 and G / A 22018; celiac disease; HLA typing; PCR; Real-time PCR

Obsah

Úvod	8
1. Laktóza	9
1.1 Laktóza	9
1.1.1 Laktáza	9
1.2 Mechanismus laktózové intolerance	10
1.3 Formy laktózové intolerance	11
1.3.1 Vrozená laktózová intolerance.....	11
1.3.2 Primární laktózová intolerance	11
1.3.3 Sekundární laktózová intolerance	12
1.4 Genetická podstata laktózové intolerance	12
1.5 Popis <i>LCT</i> a <i>MCM6</i> genu	12
1.5.1 C/T 13910.....	13
1.5.2 G/A 22018	14
1.6 Diagnostika laktózové intolerance	15
1.6.1 Expoziční test.....	16
1.6.2 Laktóztoleranční test	16
1.6.3 Dechový vodíkový test.....	16
1.6.4 Biopsie sliznice tenkého střeva s imunochemickým vyšetřením.....	16
1.6.5 Genetický test	16
1.7 Léčba	17
2. Celiakie	19
2.1 Charakteristika celiakie	19
2.1.1 Patogeneze celiakie	19
2.1.2 Lepek.....	20
2.2 Formy a klinické projevy.....	21
2.2.1 Projevy celiakie.....	21
2.2.2 Formy celiakie	21
2.3 Screening celiakie	22
2.4 Genetika celiakie.....	22
2.4.1 HLA systém	22
2.5 Genetická predispozice k celiakii	23
2.5.1 Genetické vyšetření.....	25
2.6 Léčba	26
3. Cíle práce a hypotézy	27
3.1 Cíl práce.....	27
3.2 Hypotézy práce	27

4. Praktická část	28
4.1 Princip vyšetření	28
4.2 Metodika vyšetření	28
4.2.1 Izolace genomové DNA	28
4.2.2 Měření koncentrace DNA	29
4.2.3 PCR reakce – princip, příprava a provedení	30
4.2.4 Restrikční štěpení	34
4.2.5 Real-time PCR reakce –princip, příprava a provedení	36
5. Výsledky	41
6. Diskuse	45
7. Závěr	48
8. Literatura.....	49
9. Zkratky	53

Úvod

Na úvod bych chtěla zmínit, že existuje více než 200 druhů potravinových intolerancí o jejichž genetickém základě stále nevíme nic. Mezi takové intolerance patří zejména mléko a pšenice, dále ořechy, fruktóza, oves, rýže, kukuřice, gluten, kvasnice, jablko, maliny, hroznové víno, pomeranč, citrón a mnoho dalších potravin. V této práci jsem se zaměřila na laktózovou intoleranci a predispozici k celiakii u kterých byl prokázán významný faktor dědičnosti.

Laktózovou intolerancí trpí přibližně 70% světové populace a tím se stává nejčastěji se vyskytující potravinovou intolerancí na světě.

Intolerance mléčného cukru vzniká neschopností organismu člověka tvořit enzym laktázu v dospělosti. Existuje několik možností, proč tělo není schopno tento enzym syntetizovat. Jedná se o primární hypolaktázii u dospělých, která byla původním nastavením organismu u našich předků.

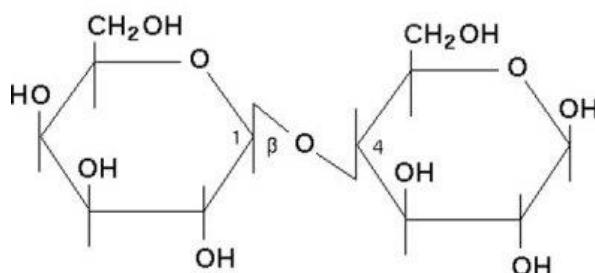
Dalším významným onemocněním trávicího traktu je celiakie neboli nesnášenlivost lepku. Jedná se o autoimunitní onemocnění. S objevením genů, které se podílejí na rozvoji celiakie, došlo také k rozvoji molekulárně-genetických diagnostických přístupů, které dokáží detekovat predisponující rizikové haplotypy a s vysokou pravděpodobností potvrdit nebo vyvrátit predispozici celiakie. Genetické vyšetření je vhodné provádět hlavně v rodinách, kde se celiakie vyskytuje u více členů. Pokud nejsou přítomny rizikové haplotypy, pak může být vznik celiakie s 99 % pravděpodobností vyloučen. I v případě negativního testu na predispozici k celiakii může některým jedincům konzumace lepku stále dělat potíže. Pak mluvíme o tzv. neceliakální glutenové senzitivitě (NCGS) (Hoffmanova *et al*, 2015).

U celiakie navozuje gluten ve sliznici tenkého střeva imunopatologickou reakci, ve které se uplatňuje především systém adaptivní imunity. U NCGS klíčovou roli hraje aktivace buněčné i humorální odpovědi. Řada prací ukázala, že celiakie i NCGS sdílejí zapojení složek přirozené imunity. Na rozdíl od celiakie však u NCGS nebyla doložena aktivace adaptivních imunitních mechanismů (nebyla např. prokázána zvýšená slizniční exprese interleukinů IL6, IL17A, IL17, IL21 a interferonu γ). U NCGS byla naopak (ve srovnání s celiakií) prokázána vyšší exprese receptorů přirozené imunity, tj. toll-like receptoru 2, TLR1 či TLR4 a zvýšená produkce cytokinů systému přirozené imunity (TNF α , IL10 a GM-CSF). Diagnóza neceliakální glutenové senzitivity je založena na vyloučení celiakie a alergie na pšenici, na zlepšení symptomů po bezlepkové dietě a měla být potvrzena glutenovým expozičním testem (Hoffmanova *et al*. 2015).

1. Laktóza

1.1 Laktóza

Laktóza je disacharid složený z glukózy a galaktózy, spojený pomocí β -glykosidických vazeb (Obr 1). V mléce savců představuje snadno využitelnou energetickou složku (Kalač 2001) Jedná se o první sacharid, kterému jsou novorozenci vystaveni. Z evolučního a biologického hlediska je laktóza jedinečný cukr, protože existuje jako volná molekula pouze v mléce. Je syntetizována syntetázou laktózy výlučně v mléčné žláze prakticky všech savců během pozdního těhotenství a laktace. (Solomon 2002, *Mądry et al*, 2010).

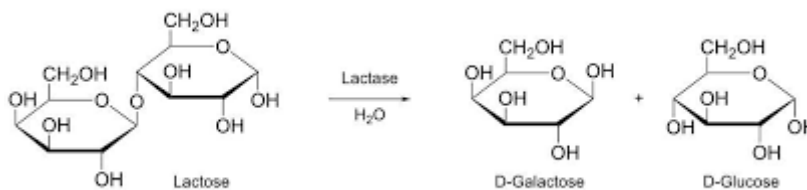


Obrázek 1:Laktóza

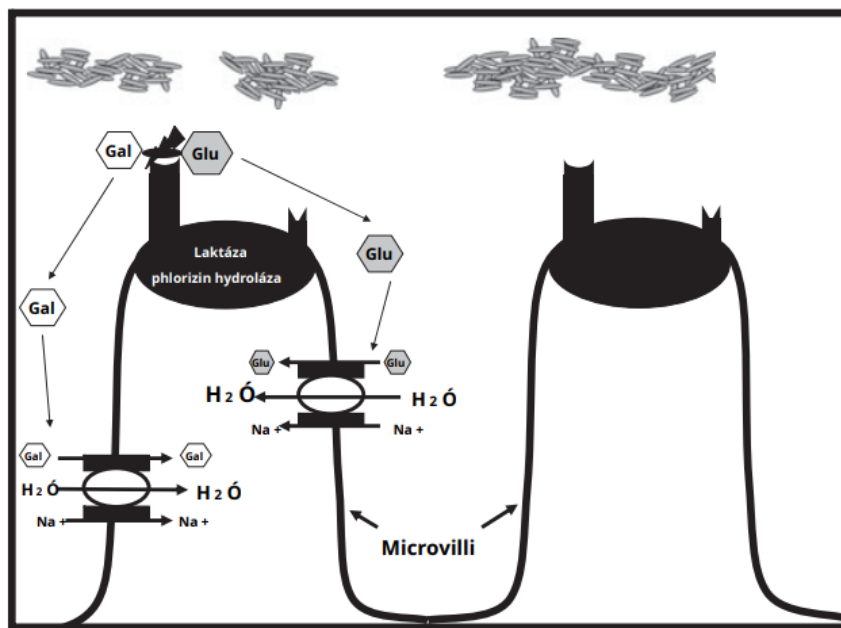
Koncentrace laktózy v mateřském mléce je 7,2 mg/100 ml, zatím co kravské mléko obsahuje pouze 4,7 mg/100ml laktózy (Vandenplas Y. 2015).

1.1.1 Laktáza

Laktáza-phlorizin hydroláza (LCT), také známá jako laktáza, je enzym tenkého střeva, který je odpovědný za štěpení laktózy na vstřebatelné monosacharidy glukózu a galaktózu (Obr 2,3) (Igram *et al*,2009). Ty jsou absorbovány pomocí střevních erytrocytů do krevního řečiště. Glukóza se nakonec využita jako zdroj energie a galaktóza se stává součástí glykoproteinů a glykolipidů. Enzym má dvě aktivní místa jedno hydrolyzuje laktózu a druhé aktivní místo hydrolyzuje phlorizin (aryl A- glukosid) a řadu dietních glykolipidů (Lomer *et al*, 2008).



Obrázek 2:Hydrolyza laktózy na glukózu a galaktózu (převzato z Lomer *et al* 2008).



Obrázek 3:Hydrolyza laktózy v tenkém střevě (převzato z Lomer et al 2008).

Laktáza je přítomna na apikálním (vrcholovém) povrchu erytrocytů na okraji kartáčovitého lemu tenkého střeva. Nejvyšší exprese laktázy byla zjištěna ve střední části jejunu (Lomer *et al*, 2008).

Ačkoli je laktáza produkována ve vysokých hladinách u všech zdravých kojenců, její exprese je výrazně snížena v raném dětství přibližně u 60% lidské populace. Toto vede k hypolaktázii dospělého typu, běžněji známé pod názvem laktózová intolerance (Schultheis 2011).

1.2 Mechanismus laktózové intolerance

Laktózová porucha trávení nastává, když laktóza není absorbována v tenkém střevě. Prochází skrz gastrointestinální trakt do tlustého střeva, kde pak u některých jedinců vede k příznakům laktózové intolerance (Lomer *et al*, 2008). Mezi klinické příznaky patří: plynatost, nadýmání, křeče v břiše, průjmy a příležitostné zvracení. Tyto příznaky nastávají ve většině případů po požití většího množství potravin obsahující laktózu (Szilagyi 2018).

Snížená aktivita laktázy vede k malabsorpci laktózy, což má za následek tyto nepříjemné příznaky. Znamky malabsorpce laktózy se objeví, když neabsorbovaná laktóza zvyšuje obsah vody v tlustém střevě a bakterie tlustého střeva přeměňují neabsorbovanou laktózu na mastné kyseliny, oxid uhličitý a vodík a methan (Moor 2018).

1.3 Formy laktózové intolerance

Nejběžnější typ poruchy trávení a malabsorpce sacharidů je způsoben střevním nedostatkem laktázy. Laktózová malabsorpce nebo hypolaktázie je běžnou podmínkou způsobenou nízkou aktivitou laktázy (Vandenplas 2015).

Hypolaktázie neboli nedostatek laktázy existuje ve třech formách: vrozená, primární a sekundární. (Lomer *et al*, 2008).

1.3.1 Vrozená laktózová intolerance

Vrozený nedostatek laktázy byl popsán, ale je vzácný. Příznaky se objevují krátce po narození. V prvním roce života může řada kojenců vykazovat částečnou malabsorpci zbytkového uhlohydrátu přítomného v lidském mléce nebo umělé výživě (Vandenplas 2015).

Charakteristickým klinickým příznakem kongenitální laktózové deficience (CLD) je těžký vodnatý osmotický průjem, následuje dehydratace, acidóza a ztráta hmotnosti (Kuokkanen *et al*. 2005).

Výskyt CLD je 1: 60 000 jedinců a je jedním ze 36 vzácných monogenních chorob vykazujících autozomálně recesivní typ dědičnosti (Kuokkanen *et al* 2005).

1.3.2 Primární laktózová intolerance

Přirozený genetický pokles množství laktázy až o 90 % a více začíná od druhého roku života. Tento pokles se označuje jako primární deficit laktázy, jinak známý jako primární laktózová intolerance (Enattah *et al* 2002). Primární deficit se vyskytuje u 70% populace, a proto je i nejběžnější (Fojtík *et al* 2013).

Primární hypolaktázie je rozšířená v celé světové populaci, ale její výskyt se značně liší mezi různými etnickými skupinami (Di Rienzo *et al* 2013).

Jde tedy o geneticky determinovaný proces s autozomálně recesivní dědičností (Kuokkanen 2003), který vede k poklesu aktivity laktázy. Adult-type hypolaktázie je spojována ve většině etnik s genomovými polymorfismy v genu *MCM6* C/T-139110 a *MCM6* G/A-22018. Výjimkou je např. Afrika, kde se vyskytují odlišné polymorfismy *MCM6* C/G-14010 a *MCM6* C/G-13907 (Enattah *et al* 2002), a Saúdská Arábie, kde se vyskytuje polymorfismus *MCM6* T/G-13915. Zdá se tedy, že perzistence laktázy se objevuje během vývoje člověka paralelně v různých oblastech světa (Fassio 2018).

1.3.3 Sekundární laktózová intolerance

U menšiny jedinců jsou gastrointestinální příznaky po konzumaci laktózy způsobeny sekundárním nedostatkem laktázy, který je způsoben odlišnými patologiemi tenkého střeva. Sekundární hypolaktázie se vyskytuje v důsledku gastrointestinálního onemocnění, které souvisí s poškozením kartáčového lemu tenkého střeva, například při giardiáze, celiakii, virové gastroenteritidě, Crohnově nemoci, radioterapii, chemoterapii nebo dokonce při použití některých léků. Při adekvátní léčbě základního onemocnění je tento stav obvykle reverzibilní [Saavedra a Perman 1989, Gudmand-Hoyer a Skovbjerg 1996] (Madry 2010). Obvykle se tedy jedná o přechodnou intoleranci (Čurda 2006).

1.4 Genetická podstata laktózové intolerance

Již na počátku sedmdesátých let bylo zjištěno, že tolerance laktózy má genetický původ. Za perzistenci laktázy v průběhu života odpovídají autosomálně dominantní alely genu *LCT*. Exprese genu *LCT* je regulována jak transkripčními, tak posttranskripčními mechanismy. Regulace zahrnuje i cis-působící prvky, které řídí podobu laktázy ještě před narozením (Waud *et al.*, 2008).

První objevenou mutací, spojovanou s laktózovou tolerancí, byla alela *MCM6* T 13910. Velmi dlouhou dobu byla tato alela považována za jedinou možnou mutaci. Právě kvůli tomu, že výzkumy genových polymorfismů zodpovědných za laktózovou tolerance probíhaly zpočátku hlavně v severní Evropě, kde je výskyt této alely nejčtenější (Ingram *et al.*, 2009).

Osoby s homozygotní formou *MCM6* 13910 CC a *MCM6* 22018 GG prakticky nemají v dospělosti zjizitelnou hladinu laktázy ve střevním epitelu, zatímco homozygoti s *MCM6* 13910 TT nebo *MCM6* 22018 AA mají aktivitu laktázy celoživotně stálou (Amiri *et al.* 2015).

1.5 Popis *LCT* a *MCM6* genu

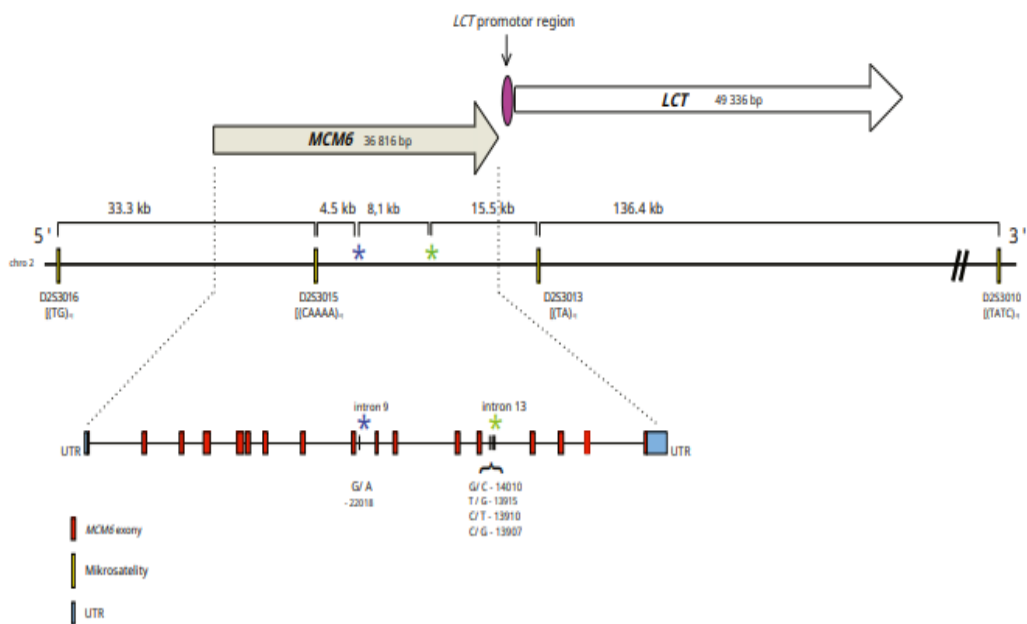
Enzym laktáza je kódována *LCT* genem, který je lokalizován na chromozomu 2 (2q21) (Rienzo *et al.*, 2013).

Bylo identifikováno několik jednonukleotidových polymorfismů (SNP) v sekvenci DNA kódující regulační oblasti tohoto genu (Genco 2017). Jeho exprese je regulována

promotorovou oblastí umístěnou před genem *LCT*. K maximální expresi laktázy v enterocytech dochází během prvních měsíců života a její aktivita klesá po odstavení od mateřského mléka (Heine *et al* 2017).

LCT gen má délku 49,3 Kb a je umístěn na dlouhém (q) rameni chromozomu 2 v poloze 21. Jedinci s hypolaktázií a persistencí laktázy mají identické kódující sekvence (Mattar *et al* 2012). Enattah *et al.* (2002) identifikoval dva polymorfismy v genu *MCM6* ležícím v blízkosti genu *LCT* určující laktázovou persistenci či nonperzistenci. Jedná se o jednonukleotidové polymorfismy *MCM6* C/T-13910 a *MCM6* G/A-22018 (Ranciaro 2014).

Gen *MCM6* zřejmě také řídí transkripci *LCT* genu na úrovni promotoru. Gen je složen z 17 exonů, při tom obsahuje dvě polymorfní místa důležitá pro regulaci exprese *LCT* genu lokalizované v intronech 13 (C/T- 13910) a 9 (G/A-22018) *MCM6* genu, které leží přibližně 14 kb a 22 kb od konce 5' konce *LCT* genu (Enattah *et al* 2002) (Obr. 4).



Obrázek 4: Zvětšená mapa *MCM6* a *LCT*, nachází se na chromozomu 2 a umístění sekvenčních genomových oblastí a čtyř genotypových mikrosatelitů (převzato z Ranciaro 2014).

1.5.1 C/T 13910

Polymorfismus *MCM6* 13910 C/T je v lidském genomu asociován s nejsilnější interakcí s intestinální mikroflórou. V populaci je persistence laktózy (LP) způsobena polymorfismy zodpovědnými za zesílení funkce *LCT* genu 13,9 kb před tímto genem

(*MCM6* 13910: C–T kde „T“ je pro toleranci). Tento SNP je daleko proti proudu od jednotky tvořící protein v intronu nepříbuzného genu (Misselwitz 2019).

Tato varianta genu byla prvním objeveným SNP, který byl spojen s laktózovou intolerancí. SNP v místě 13910 určuje laktózovou toleranci nebo intoleranci. Pro C 13910 existuje homozygotní variant genu *MCM6* C/C 13910, *MCM6* T/T 13910 a heterozygotní varianta *MCM6* C/T 13910. Jedná se o jednonukleotidovou záměnu cytosinu za thymin (Kuchay *et al* 2011).

V rámci studie Kuchay *et al* (2011) bylo testováno 56 jedinců s genotypem *MCM6* 13910 C/C a předpoklady pro primární hypolaktázii. Tyto děti měli ve věku 3-5 let průměrnou aktivitu laktázy asi 15,9 jednotek na gram bílkoviny (U/g bílkoviny) a u dětí s genotypem *MCM6* 13910 C/C ve věku 5-16 let klesla aktivita na 8,8 jednotek na gram bílkoviny. U jedinců s genotypem *MCM6* 13910 T/T a C/T byla průměrná aktivita laktázy ve věku 3-5 let 30,2 U/g bílkoviny a ve věku 5-16 let 28,3 U/g bílkoviny.

Z těchto výsledků vyplývá že genotypy *MCM6* 13910 C/T a T/T jsou odpovědné za vznik laktózové tolerance. Tato polymorfismus se nejvíce objevuje v severní Evropě (Enattah *et al.* 2002) a podle výsledků Kuchaye *et al.* (2011) také v Indii.

1.5.2 G/A 22018

Druhý polymorfismus genu *MCM6* 22018 G/A se nachází v poloze 22,018 bp od 5' konce genu pro LCT v intronu 9 *MCM6* genu. Bodovou mutaci tvoří záměna guaninu za adenin (Koukkanen *et al* 2003).

Ridefeld a Hakanssonová (2005) zkoumali výskyt tohoto genotypu. Porovnávali korelaci výskytu mutací v místě *MCM6* 13910 a *MCM6* 22018. V 98 % případech se shodovali genotypy testovaných jedinců. Jedinci nesoucí genotyp *MCM6* C/C-13910 vykazovali genotyp G/G-22018, jedinci s genotypem *MCM6* 13910 C/T měli genotyp *MCM6* 22018 G/A.

Téměř 95 % testovaných jedinců s genotypem *MCM6* 13910 C/C mělo také genotyp *MCM6* 22018 G/G, proto alela *MCM6* 13910 C/C může být použita jako testovací ukazatel pro laktózovou intoleranci (Matter *et al.*, 2010).

Stejně závěry potvrdil Stefana *et al.* (2009), ve své studii, ve které byla zjištěna 100% korelace mezi těmito dvěma genotypy.

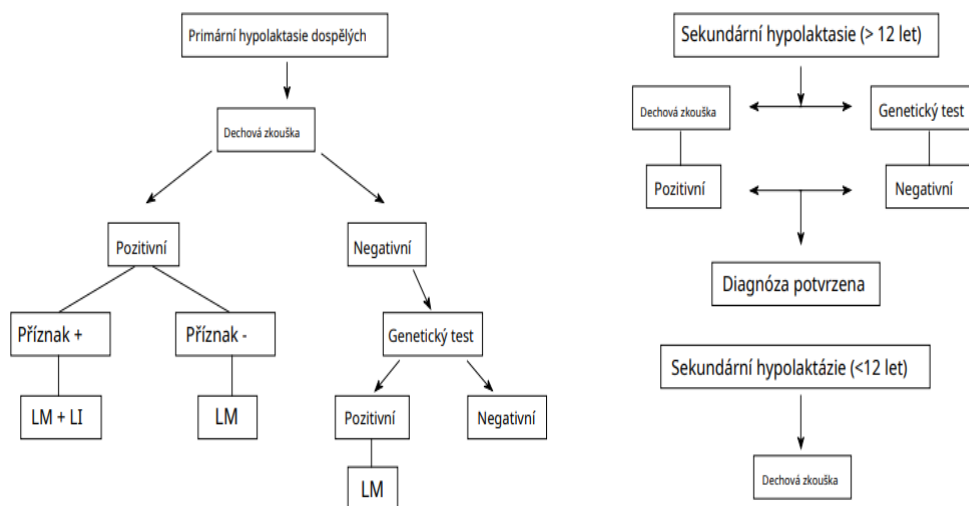
1.6 Diagnostika laktóзовé intolerance

K diagnostice hypolaktázie mohou být použity následující testy: laktóзовý toleranční test, expoziční test, test kyselosti stolice, dechový vodíkový test, biopsie sliznice tenkého střeva a genetický test (Weiskirchen *et al*, 2007).

Na obrázku 5 je vyobrazen doporučený algoritmus pro určení laktóзовé intolerance a laktóзовé malabsorpce v případě primární a sekundární hypolaktázie.

Při podezření na primární deficit laktázy lékaři provádějí dechový test. U jedinců s pozitivním výsledkem určují diagnózu podle klinických příznaků buď jako laktóзовou intoleranci nebo malabsorpci. U jedinců s negativním výsledkem dechového testu, se posléze provádí genetický test, na jeho základě určují vrozenou laktóзовou intoleranci.

Postup vyšetření u sekundární hypolaktázie se liší u věkové skupiny do 12 let a od 12 let věku (Obr5). U jedinců mladších 12 let se předpokládá, že aktivita laktázy zčásti přetrvává a provádí se tedy dechový test. Při jeho pozitivitě je diagnóza sekundární hypolaktázie potvrzena. U starších dětí je nutné povést jak dechový, tak genetický test. Když je současně pozitivní dechový test a negativní genetický test je diagnostikována sekundární hypolaktázie.



Obrázek 5: Diagnostický algoritmus pro podezření na malabsorpci a intoleranci laktózy (LM laktóзовá malabsorpce, LI laktóзовá intolerance) (převzato z Usai-Satta 2012).

1.6.1 Expoziční test

Expoziční test spočívá v podání jednoho litru mléka, který obsahuje 50 g laktózy (Fojík et al. 2013). Při rozvoji gastrointestinálních příznaků, které jsou typické pro laktózovou intoleranci do 4 hodin po požití je ve většině případů diagnostikována laktózová intolerance (Misselwitz et al. 2013).

1.6.2 Laktózetoleranční test

Při tomto testu pacient vypije 50g laktózy rozpuštěné ve vodě. Vzorky kapilární krve pro testování glukózy v plazmě se odebírají po 5, 10, 30, 45, 60 minutách. Pokud hladina glukózy nestoupá, znamená to, že tělo špatně tráví laktózu. Před testem by se nemělo jíst ani pít. Falešně negativní výsledky se mohou vyskytnout u pacientů s diabetem a se syndromem bakteriálního přerůstání a u pacientů s poruchou glukózové tolerance. Laktózový toleranční test má citlivost 75 % a specifitu 96 % (Rienzo 2013).

1.6.3 Dechový vodíkový test

Představuje nepřímý test malabsorpce laktózy a je běžně považován za nejspolehlivější, neinvazivní a levnou metodu pro stanovení laktózové intolerance (Rienzo 2013). Dechový test je založen na fermentaci nestrávené laktózy střevní mikroflórou za vzniku vodíku, oxidu uhličitého a methanu, které jsou absorbovány a eliminovány plícemi. Spolehlivost tohoto testu, i když je široce používán, závisí na aktivitě bakteriální flóry. Negativita testu může být způsobena podáním antibiotik měsíc před testováním (Mattar 2012).

1.6.4 Biopsie sliznice tenkého střeva s imunochemickým vyšetřením

Biopsie tenkého střeva je jediným diagnostickým postupem, který umožňuje přímé měření aktivity laktázy. Vzhledem k invazivní povaze je pacienty špatně přijímán, pokud nemusí podstoupit gastrointestinální endoskopii z jiných důvodů (Madry et al, 2010). Aktivita se stanovuje ve stupnici normální aktivita, lehký střední a těžký deficit. Výhodou je odlišení sekundární příčiny deficitu laktázy spojený s jiným postižením sliznice. (Fojík et al. 2013).

1.6.5 Genetický test

Nejbezpečnějším testem je genetický průkaz laktózové intolerance, který nám s velkou přesností stanoví, zda se v DNA jedince nachází genové varianty asociované s tvorbou

laktázy i v dospělosti. Pacient je tím ušetřen nepříjemných projevů, které provázejí jiné výše uvedené testovací postupy (Mattar *et al* 2012).

Při vyšetření polymorfismu genu *MCM6* 13910 C/T se setkáváme s třemi referenčními hodnotami:

- CC – wild-type (nemutovaný homozygot)
- CT – heterozygot
- TT – mutovaný homozygot

Wild-type je označení pro nemutovaného homozygota. Jedná se o původní genotyp. Jedinec, u kterého je detekován wild-type genotyp (*MCM6* 13910 CC) je typicky silně laktóзовě intolerantní stejně jako naši předci. Jedinec s genotypem *MCM6* 13910 C/T je heterozygotní. Z toho vyplývá, že od jednoho z rodičů zdědil gen pro intoleranci a od druhého gen zodpovědný za toleranci. Tento jedinec může mít občasné příznaky laktóзовé intolerance. Enzym se u něj sice tvoří, ale jeho množství je značně individuální. Posledním možným genotypem je genotyp *MCM6* 13910 TT, kdy má jedinec obě variantní alely, a proto je jeho organismus schopný tvořit laktázu i v dospělosti (Lomer *et al*, 2008).

Druhým významným polymorfismem, který se vyskytuje v souvislosti s laktóзовou intolerancí je polymorfismus *MCM6* 22018 G/A, který je většinou v segregaci s *MCM6* 13910 C/T.

1.7 Léčba

Léčba intolerance laktózy spočívá ve dvou možných klinických volbách, které se vzájemně nevylučují: eliminační dieta a farmakoterapie. Obvyklé je vyloučení mléka a mléčných výrobků ze stravy. Toto omezení však vede ke snížení příjmu látek, jako je vápník, fosfor a některé vitamíny, a může být způsobit sníženou minerální hustotou kostí. Tato dieta by měla být podávána pouze pacientům s gastrointestinálními příznaky nesnášenlivosti laktózy (Rienzo 2013).

Pokud má být snížen příjem laktózy, je nutné, aby pacienti byli poučeni o dietních opatřeních a o obsahu laktózy v běžných potravinách. Zdaleka nejvyšší koncentrace laktózy v potravinách se nachází v sušeném mléce (52,9 g/100 g), v kravském mléce (4,7g/100 ml) a pak ve zmrzlině. Tvaroh, kysané výrobky a tvarohové jogurty obsahují jen malé množství laktózy a záleží tedy na velikosti dávky, která bude přijata. Tvrdé a

měkké sýry a máslo již obsahují jen minimální množství laktózy, a to díky zrání sýrů a zpracování másla (Sziladyi 2018).

Úplné vyloučení mléka a mléčných výrobků ze stravy, může mít vážné nutriční nevýhody, jedná se o snížení příjmu vápníku a vitamínů, proto se nedoporučuje (Usai-Satta et al 2012).

2. Celiakie

2.1 Charakteristika celiakie

Celiakie je autoimunitní onemocnění s vysoce polymorfním obrazem klinických příznaků řadící se mezi opomíjené diagnózy, na něž se často v průběhu nemoci nemyslí. Odhaduje se, že tímto onemocněním trpí 40-50 tisíc obyvatel České republiky (Menšíková 2010).

Jedná se o chronickou glutenovou intoleranci, která se vyskytuje u geneticky predisponovaných jedinců (Megiorni *et al* 2012). Toto celoživotní chronické zánětlivé onemocnění spojené s poškozením tenkého střeva vede k malabsorpci různých živin. Škodlivým faktorem je lepek přítomný v pšenici, ječmeni a žitě (Abdulkarim *et al* 2002). Imunitní reakce vyvolaná lepkem vyvolá zánětlivý stav na sliznici tenkého střeva, což má za následek snížení výšky střevních klků a hyperplazii krypt a v konečném důsledku vede ke kompletní atrofii klků. Odstraněním lepku z potravy dochází k remisi onemocnění, klinické projevy mizí a atrofie ustupuje (Lisová 2005).

Na celiakii se mimo genetické predispozice podílí i faktory vnějšího prostředí. Experimentálně byla prokázána asociace s MCH II třídy, a to u haplotypu HLA-DQ8 a HLA-DQ2 (Kohout 2006). Celiakie není alergie, ale lepek je alergen (Klener 2006).

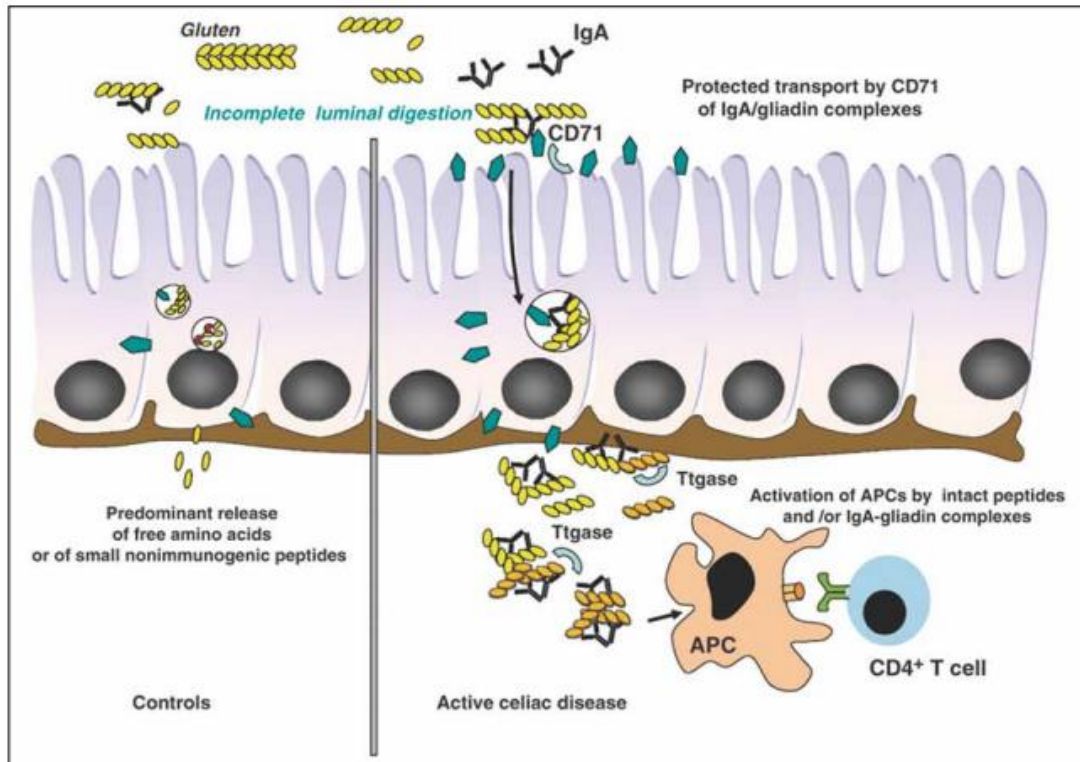
2.1.1 Patogeneze celiakie

Podstata autoimunitních chorob spočívá ve vzniku imunitní reakce (ať už zprostředkované humorální nebo buněčnou imunitou), při které dochází k napadení struktur vlastního těla a k jejich poškození (Kohout 2006).

K rozvoji celiakie dochází u predisponovaných jedinců po požití lepku, který je obsažen v zrnech pšenice, žita, ječmene a ovsa (Tanutti 2014). Proteinovým produktem genů HLA-DQ2 a HLA-DQ8 jsou povrchové glykoproteiny exprimované na různých buňkách (erytrocyty, makrofágy, dendritické buňky) Glutenové peptidy vzniklé působením digestivních proteáz reagují s těmito glykoproteiny, což vede k aktivaci glutenspecifických klonů CD4 Th1-buněk, které spouštějí u geneticky predisponovaných jedinců imunogenní odpověď (Klener 2006).

Na základě této reakce dochází k poškození buněk sliznice tenkého střeva (enterocytů) a k typickému histologickému obrazu poškozené sliznice, který se může objevit v široké škále od minimálního postižení sliznice (změny na úrovni kartáčového lemu enterocytů)

až k totální atrofii klků, hypertrofii Lieberkühnových krypt a infiltraci submukózy lymfocyty. Všechny tyto změny mohou v různém časovém úseku při dodržování bezlepkové diety regredovat (Kohout 2006).



Obrázek 6: Normální a patologická reakce organismu na lepek. Za normální situace je gliadin v komplexu se sekrečním imunoglobulinem IgA zachycen v hlenu a eliminován peristaltikou. Při aktivní celiakii s dysregulací CD71 s jeho abnormální expresí na apikálním povrchu enterocytů vstupují komplexy gliadin-IgA do enterocytů a spouštějí adaptivní odpověď. (převzato z Fojtík 2012)

2.1.2 Lepek

Lepek neboli gluten je součástí bílkoviny obilnin, je tvořen gluteniny, které mají různou toxicitu.

Prolaminy pšenice se nazývají gliadiny, žito obsahuje hordeiny, ječmen secaliny, oves aveniny, kukuřice zeiny a rýže oryzeiny. Prolaminy obsahují vysoké množství prolinu a glutaminu a jsou rozpustné jen v silných roztocích alkoholu (Kohout 2008). Toxické jsou hlavně gliadiny, hordeiny, secaliny a pravděpodobně i aveniny, ty obsahují sekvence aminokyselin, které jsou bohaté na glutamin a prolin (Tjon et al. 2001). Velký obsah prolinu způsobuje, že se lepek stává odolný proti degradaci gastrointestinálními enzymy. Aminokyseliny sekvence vyvolávají vznik autoprotilátů, které odpovídají za vznik autoimunitního onemocnění celiakie (Solid 2000)

Viskoelastické vlastnosti lepku jsou nezbytné pro tvorbu těsta z pšeničné mouky. Díky

svým jedinečným vlastnostem je lepek široce používán v potravinářském průmyslu (Tjon et al. 2010).

2.2 Formy a klinické projevy

2.2.1 Projevy celiakie

Celiakie se projevuje typickými klinickými příznaky (klasický typ), které se liší v dětství a v dospělosti (Kohout 2008). Pro celiakii typické gastrointestinální projevy se vyskytují pouze u 10-20 % pacientů, proto zůstává často nediodagnostikována (Souček 2011).

V dětství se po přidání obilných kaší do stravy objevují objemné mastné průjmy a dítě přestane prospívat (růst a přibývat na váze), může mít nafouklé břicho (Kohout 2008). Nejčastějšími příznaky u dospělých jsou bolesti břicha, průjem, anemie z nedostatku železa a také podvýživa, proto pacientům s celiakií může být chybně diagnostikován syndrom dráždivého tračníku (Abdulkarim et al. 2003).

2.2.2 Formy celiakie

Klasifikace celiakie je rozdělena do několika forem, které se určují na základě hematologických a imunologických nálezů. Jedná se o formu klasickou, atypickou, asymptomatickou, latentní a potenciální (Fasano et al. 2001).

Klasická forma je charakteristická pro typické příznaky celiakie jako jsou chronické průjmy, celkové neprospívání dítěte, nebo úbytek svalové hmoty. První projevy se dostávají mezi 6 a 8 měsícem věku dítěte, kdy začíná přijímat stravu ve které se vyskytuje lepek (Fasano et al. 2001). Typické jsou přítomné protilátky proti tkáňové transglutamináze a endomysiu. Objevují se i charakteristické změny histologického preparátu ze sliznice tenkého střeva, a to od mírné atrofie klků až po jejich úplnou atrofii (Souček 2011).

Atypická forma bývá diagnostikována mezi 5-6 rokem věku dítěte a až 50 % nově diagnostikovaných případů nemá typické gastrointestinální příznaky. Nejčastějším symptomem pro atypickou formu je *dermatitis herpetiformis*, která se považuje za kožní formu celiakie. Jedná se o kožní onemocnění projevující se puchýři a vyrážkou převážně na loktech, kolenou a hýždích. Po nasazení bezlepkové diety pomalu vymizí (Fasano et al. 2001).

Asymptomatická (tichá) forma je charakteristická nálezem histologických změn tenkého střeva s přítomností typických autoprotilátek, ale bez klinických příznaků. Nejčastěji se tato forma objeví náhodou prostřednictvím screeningových programů. Běžně se u dospělých jedinců nachází nedostatek železa, poruchy chování jako jsou sklony k depresím, podrážděnost, u dětí zhoršené prospívání ve škole, snadná únava při cvičení a celkové fyzické aktivitě, nebo snížená hustota kostí (Souček 2011). Po nasazení bezlepkové diety dojde ke zlepšení jak psychického, tak fyzického stavu jedince (Fasano et al. 2001).

Latentní forma je negativní pro histologická i imunologická vyšetření, pouze sérologické markery jsou pozitivní (Kohout 2006). Jedinec může, ale také nemusí mít klinické příznaky (Souček 2011).

Potenciální forma je velice vzácná. Tato forma může být symptomatická i asymptomatická, bez histologického nálezu. V tomto případě nalézáme specifické protilátky v krvi (Fojtík 2012).

2.3 Screening celiakie

Screening celiakie se provádí především u následujících skupin: příbuzní pacienta s celiakií, pacienti s chorobami sdruženými s celiakií jako je *diabetes mellitus* I. typu, autoimunitní onemocnění, primární biliární cirhóza atd. Další skupinou jsou pacienti s typickými i netypickými příznaky celiakie, to znamená pacienti s úbytkem váhy, bolestmi břicha a průjmy z neznámé příčiny. Tento screening je u rizikových skupin prováděn imunologicky pomocí stanovení autoprotilátek (Kohout 2006).

Negativní výsledek screeningového vyšetření nemůže vyloučit vznik celiakie v následujících letech (Fasano et al. 2001).

2.4 Genetika celiakie

2.4.1 HLA systém

HLA systém (Human leukocyte antigen) hraje významnou roli v patogenezi celiakie, což potvrzuje prokázaná genetická asociace mezi celiakií a konkrétními HLA alelami. Přítomnost specifické HLA alely je důležitou, ale ne jedinou podmínkou pro vznik onemocnění, protože kromě genetických faktorů se na vzniku onemocnění podílejí i vlivy vnějšího prostředí a další faktory (Hořejší, Bartůňková 2009).

Genový komplex MHC (Major Histocompatibility Complex), u člověka nazývaný jako HLA (Human leukocyte antigen) komplex, se nachází na krátkém raménku 6. chromozómu (6p21) a obsahuje stovky genů s imunologickou funkcí. Jedná se tedy o vysoce polymorfní systém. Každý člověk je z hlediska HLA systému vysoce unikátní a nese na povrchu svých buněk zcela individuální sestavu HLA molekul určenou kombinací alel zděděných od matky a od otce, která ovlivňuje jeho imunologickou reaktivitu (Souček 2011).

Geny kódující molekuly HLA dělíme do tří tříd: I., II., III. třídy. Jednotlivé třídy jsou tvořeny více geny. HLA I. třídy obsahuje asi 20 genů, HLA II. třídy obsahuje tři páry genů. Uvnitř lokusů pro geny HLA I. a II. třídy leží geny pro HLA III. třídy. Obecně se rozlišuje 6 hlavních HLA genů, které se označují jako HLA – A, B a C pro HLA molekuly I. třídy a HLA-DR, DQ a DP pro molekuly HLA II. třídy. Geny HLA vykazují vzhledem ke svému umístění v genomu těsnou genetickou vazbu, proto mezi nimi nedochází k rekombinaci nebo pouze s minimální pravděpodobností. Jedinečná kombinace HLA genů kódujících HLA molekuly se nazývá haplotyp (Nussbaum et al.2004).

HLA molekuly jsou glykoproteiny, které mají stejnou stavební strukturu, ale liší se sekvencemi aminokyselin. HLA molekuly rozdělujeme stejně jako kódující geny do dvou tříd, a to podle struktury, buněčné exprese a jejich funkce. Molekuly HLA I. třídy jsou kódovány geny HLA-A, B a C, molekuly II. třídy kódují geny HLA-DR, DQ a DP. Molekuly I. třídy se skládají ze dvou polypeptidových podjednotek: z variabilního těžkého řetězce α který je kódován MHC komplexem a β_2 -mikroglobulinu, který je kódován genem mimo MHC oblast. Antigeny II. třídy jsou heterodimery složené ze dvou těžkých řetězců α a dvou řetězců β . Oba řetězce jsou kódovány v MHC a stejně jako molekuly I. třídy tvoří součást buněčné membrány (Souček 2011).

Geny HLA III. třídy, které nejsou pravými HLA geny, zahrnují geny pro polymorfní sérové a membránové receptory a jsou úzce spjaté s imunologickými funkcemi, např. proteiny komplementu C2 a C4 (Nussbaum 2004).

2.5 Genetická predispozice k celiakii

Základním pilířem celiakie je genetická predispozice, která je asociována s HLA geny II. třídy. Alely DQA1*0501/DQB1*0201 jsou součástí hlavního histokompatibilního komplexu na 6. chromozomu – kódují povrchové glykoproteiny buněk – molekuly HLA-

DQ2. Dědičnost celiakie je autozomálně dominantní s nekompletní penetrancí. Polymorfní část HLA-DQ2 je zodpovědná za vazbu antigenních peptidů a následný komplex je rozpoznán klony T lymfocytů přítomných ve sliznici tenkého střeva (Fojtík 2012).

V rámci hledání všech možných genetických rizikových faktorů pro celiakii bylo studováno také mnoho jiných kandidátních genových oblastí, ale oficiálně byly jako predisponující genetické faktory uznány pouze 3 další chromozomální oblasti, a to 5q31-q33 (CELIAC2), 2q33 (CELIAC3) a 19p13.1 (CELIAC4). V posledních několika letech bylo identifikováno celogenomovými studiemi mnoho non-HLA genů, z nichž 33 je asociovaných se zvýšeným rizikem vzniku celiakie, jsou to např. geny kódující cytokiny, chemokiny a jejich receptory, buněčné adhezivní molekuly nebo T- a B- buněčné aktivátory. Podíl těchto non-HLA genů na rozvoji celiakie je ale velmi slabý, jedná se o přibližně 15 %, takže se jejich vliv nebere v úvahu ani při stanovení genetických rizik pro celiakii (Megiorni 2012).

Přibližně u 90 % pacientů s celiakií je přítomen HLA-DQ2 heterodimer, označovaný jako DQ2.5, který je kódován alelami DQA1*05 a DQB1*02. Tyto alely mohou být přenášeny společně. Většinou jsou DQA1*05 a DQB1*02 přítomny v cis konfiguraci jako DRB1*03:01-DQA1*05:01-DQB1*02:01 haplotyp, nebo v trans konfiguraci jako DRB1*11/12-DQA1*05:05-DQB1*03:01; DRB1*07-DQA1*02:01-DQB1*02:02 haplotyp. Na základě několika studií je přítomnost alely DQB1*02 v homozygotním stavu spojována s vysokým rizikem celiakie a její agresivnější formou (Megiorni 2012). U jedinců homozygotních pro HLA-DQ2.5 je prokázáno vyšší riziko rozvoje celiakie než u jedinců, kteří jsou pro HLA-DQ2.5 heterozygotní (Tjon et al. 2001).

U 5 - 10 % pacientů, kteří jsou DQ2.5 negativní, se nachází DQ8 heterodimer kódovaný alelou DQB1*03:02, a to většinou v kombinaci s DQA1*03 v cis konfiguraci. Asi 5 % DQ2.5/DQ8 negativních celiaků jsou DQ2.x pozitivní. Tento haplotyp je spojován s nízkým rizikem vzniku celiakie. DQ2.x je kódován alelou DQB1*02 (riziková alela) bez přítomnosti DQA1*05 (Megiorni 2012).

Velice zřídka se u pacientů s celiakií vyskytují jiné DQ molekuly. Vyskytují se i rozdíly mezi pohlavími, ženy často nesou DQ2.5 a/nebo DQ8 haplotypy, které se u mužů s celiakií nevyskytují (Megiorni 2012). Na obrázku 7 je vyobrazena rizikovitost odpovídající jednotlivým HLA-DQ haplotypům.

HLA status	Disease risk
DQ2.5 and DQ8	Very high
DQ2.5 (with a double dose of DQB1*02)	Very high
DQ8	High
DQ2.5 (with a single dose of DQB1*02)	High
DQ2x (with a double dose of DQB1*02)	High
DQ2x (with a single dose of DQB1*02)	Low
DQX.5	Extremely low
DQX.x	Extremely low

x = DQA1 alleles different from *05.

X = DQB1 alleles different from *02 and *03:02.

Obrázek 7: Rizikové HLA-DQ vyrianty (převzato z Megiorni et al. 2012)

2.5.1 Genetické vyšetření

Pacienti s celiakií mají na povrchu imunokompetentních buněk přítomny HLA molekuly typu DQ2 (přibližně v 95 %) nebo typu DQ8 (přibližně v 5 %). Kromě HLA-DQ2/8 genů se v patogenezi celiakie účastní i řada dalších genů mimo HLA komplex. Ačkoliv je přítomnost HLA-DQ2/8 genů bezmála 100 % průvodním rysem celiakie, ve skutečnosti znamená jen přítomnost zvýšeného genetického rizika. HLA-DQ2/8 genotyp se totiž vyskytuje u 35–40 % západní populace, z nichž pouze 2–3 % jsou jedinci s rozvinutou celiakií. Existují náznaky, že rovněž přítomnost genotypu HLA DQ9 může znamenat genetické riziko celiakie. Nepřítomnost HLA-DQ2/8 genotypu celiakii vykazuje negativní prediktivní hodnotou (NPV) pro diagnózu celiakie vyšší než 99 %. (Hoffmanová et al. 2019).

Výhoda genetického vyšetření je, že HLA genotyp je během života neměnný, takže vyšetření stačí provést jednou za život. Další pozitiva spočívají v minimální zátěži pro pacienta (odběr periferní krve nebo provedení bukalního stěru), kdy výsledek vyšetření není ovlivněn přítomností lepku ve stravě. Nepřítomnost predisponujících alel HLA-DQ2 a HLA-DQ8 vylučuje onemocnění s vysokou pravděpodobností (Brdička 2015). Genetické vyšetření má ale omezení ve své nízké selektivě a samotné ho nelze použít pro definitivní potvrzení diagnózy celiakie (Hoffmanová et al. 2019)

Haplotypy HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 jsou nalézány asi u 30 % populace, přičemž pouze u 3 % se následně vyvine skutečná nesnášenlivost lepku. Pokud ale není u jedince zjištěn žádný z rizikových haplotypů HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8, může být diagnóza celiakie s vysokou pravděpodobností vyloučena (Megiorni 2012).

2.6 Léčba

Jedinou účinnou léčbou celiakie je celoživotní dodržování bezlepkové diety. Jedinci s potvrzenou celiakií jsou o bezlepkové stravě informováni lékaři a dietology. Důležité informace poskytují také různá sdružení pacientů s celiakií (Fasano 2001).

Po nasazení diety dochází k úpravě příznaků, mnohem později i k obnovení struktury sliznice tenkého střeva a normalizaci protilátek. Proto lze protilátky využít k monitorování dodržování diety (Kohout 2006).

Bezlepková dieta zakazuje obiloviny, jakou jsou pšenice, žito, ječmen a oves, a s tím mimo jiné i potravinové výrobky, které tyto obiloviny přímo obsahují, obsahují jejich příměsi nebo jsou jimi kontaminovány. Základem bezlepkové diety jsou obiloviny nebo potraviny neobsahující lepek, jedná se o kukuřici, rýži, pohanku, proso, luštěniny (sója, hrách, čočka, fazole), ovoce a zeleninu. Přirozeně bezlepkové je také maso, mléko a mléčné výrobky. Bezlepková strava tedy může být dostatečně vyvážená a pestrá (Kohout 2006).

Problém při dodržování bezlepkové diety představují některá aditiva (přídavné látky), která mohou obsahovat malé množství lepku. Jedná se například o karamel (E 150 a-d), maltitol (E 965) a modifikované škroby (E 1400-1451). Lepek ani jeho štěpné produkty neobsahují čisté destiláty nebo přírodní víno. Naopak lepek mohou obsahovat výrobky dobarvované karamelem, doslazované nebo jinak dochucované. Pivo se podle legislativy označuje jako bezlepková potravina, ale množství, ve kterém se běžně požívá, překračuje povolený příjem lepku (Kohout 2008).

3. Cíle práce a hypotézy

3.1 Cíl práce

- 1) Teoretická část: Vypracování odborné rešerše na dané téma.
- 2) Praktická část: Praktické zvládnutí některých molekulárně biologických metod (izolace DNA, PCR, RFLP a elektroforéza, real-time PCR).

3.2 Hypotézy práce

Jak vybrané genové polymorfismy ovlivňují trávení?

Které vrozené rizikové faktory způsobují potravinové intolerance?

Jak často a jak významně vrozené rizikové faktory ovlivňují fenotypový projev potravinových intolerancí?

4. Praktická část

4.1 Princip vyšetření

Pro detekci polymorfismů laktóзовé intolerance byly použity dvě molekulárně genetické metody: polymerázová řetězová reakce (PCR) a polymorfismus restričních fragmentů (RFLP), označované zkratkou RFLP-PCR. Metoda je založena na amplifikaci cílového místa DNA pomocí alelově specifické PCR. Získaný PCR produkt je dále štěpen pomocí restriční endonukleázy v místě se specifickou nukleotidovou sekvencí. Vzniklé fragmenty, které mají jasně definovanou délku, jsou detekovány pomocí gelové elektroforézy a vizualizovány pomocí příslušného detekčního systému pro gelovou elektroforézu.

4.2 Metodika vyšetření

4.2.1 Izolace genomové DNA

Pro získání genomové DNA byly použity dva typy primárních vzorků, bukalní stěr nebo nesrážlivá periferní krev. Pro izolaci DNA byl použit komerčně dodaný kit (GeneAll ExGene™ Clinic SV mini) a izolace byla provedena dle přiložených instrukcí od výrobce. Volba primárního vzorku není zásadní vzhledem k výsledné koncentraci a kvalitě DNA. Ve většině případů byly k dispozici vzorky získané z bukalních stěrů.

Reagencie:

- Proteináza K
- Lyzační pufr = BL
- 100% Ethanol
- BW pufr
- Promývací pufr = TW
- Eluční pufr = AE

Pracovní postup pro izolaci vzorků:

Před zahájením samotné izolace byla nastavená suchá lázeň na teplotu 56°C.

- 1) Ke vzorku napipetujeme 25µl proteinázy K a 300 µl BL pufru.
- 2) Vzorek důkladně promícháme pomocí vortexu a inkubujeme 10 min při teplotě 56 °C.
- 3) Vzorek krátce stočíme a přidáme k němu 300µl 100% ethanolu.
- 4) Dále vortexujeme v pulzech a následně krátce stáčíme.
- 5) Postupně se směs přeneseme na kolonku (max. nabrat 700µl).
- 6) Centrifugujeme 1 min při > 8 000 rpm.
- 7) Nahradíme sběrnou zkumavku novou sběrnou zkumavkou.
- 8) Přidáme 600µl BW pufru.
- 9) Následně 1 min centrifugujeme při > 8 000 rpm a nahradíme sběrná zkumavka novou.
- 10) Dále přidáme 700µl TW pufru.
- 11) Centrifugujeme 1 min při > 8 000 rpm.
- 12) Odstraníme supernatant ze sběrné zkumavky a kolonku vložíme zpět do sběrné zkumavky.
- 13) Centrifugujeme při největších otáčkách 1 min. aby došlo k odstranění zbytkového promývacího pufru.
- 14) Kolonku následně umístíme do nové popsané 1,5 ml mikrozkušavky s víčkem.
- 15) Přidáme 50µl AE pufru a inkubujeme 1-5 při RT.
- 16) Centrifugujeme při nejvyšších otáčkách po dobu 1 min.
- 17) Opakujeme krok 15 a 16.
- 18) Kolonku centrifugujeme ve stejné zkumavce při nejvyšších otáčkách po dobu 1 min.

4.2.2 Měření koncentrace DNA

Před provedením samotného vyšetření je vhodné změřit koncentraci DNA. Tím zjistíme, jaké množství DNA vzorek obsahuje. Měření bylo provedeno pomocí fluorometru Qubit[®]2.0 (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific). Pro měření byl použit kit AccuGreen[™] Broad Range dsDNA Quantitation Solution.

4.2.3 PCR reakce – princip, příprava a provedení

4.2.3.1 Princip PCR

Principem metody je enzymatická amplifikace DNA *in vitro* syntézou mnoha kopií vybrané sekvence DNA v cyklické reakci o třech teplotních fázích. DNA amplifikace spočívá v cyklickém opakování 3 kroků:

1. denaturace
2. hybridizace primerů
3. syntéza komplementárního úseku DNA

Každá typická PCR začíná tepelnou denaturací dvoušroubovice DNA na dva jednoduché řetězce při teplotě 95° C. Reakce je založena na schopnosti dvojvláknové DNA denarovat při vysoké teplotě a opětovně renarovat po jejím snížení za zachování pravidla komplementarity bází. Jestliže jsou známy nukleotidové sekvence určitého úseku DNA, je možné úsek amplifikovat pomocí polymerázové řetězové reakce se specifickými primery.

Další fáze spočívá v ochlazení vzorku na 50 až 65° C. Při této teplotě dochází k nasednutí primerů na komplementární 3' konce cílové DNA. Primery nebo-li startéry jsou synteticky připravené jednovláknové oligonukleotidy, které mají sekvenci komplementární k sekvencím na 3'konci obou vláken rozmnožovaného úseku. Skládají se z přibližně 20 nukleotidů, jejich syntéza dnes probíhá na plně automatizovaných přístrojích a není finančně nákladná.

Jako základ pro syntézu nových vláken slouží právě primery. Aby bylo dostatek substrátu pro syntézu nových vláken, je v PCR reakci přítomno nadbytečné množství deoxynukleotidtrifosfátů. Syntézu nových vláken katalyzuje termostabilní DNA polymeráza. Nejčastěji používanou je DNA polymeráza, izolovaná z bakterie *Thermus aquaticus*, která žije v horkých pramenech. Tato DNA polymeráza je označována jako *Taq* polymeráza a prodlužuje vlákna DNA směrem od obou primerů, ve směru od 5' konce ke 3' konci při optimální teplotě 72°C, a zůstává aktivní i po zahřátí na 95° C, nutných k denaturaci. Když je syntéza obou vláken skončena, je zkumavka s PCR reakcí opět zahřátá na 95°C, aby došlo k denaturaci nově vytvořených DNA duplexů a celý cyklus začíná znovu. Produkty PCR se nazývají amplikony a jsou to úseky DNA

definované délky, jejichž velikost se pohybuje obvykle v desítkách či stovkách párů bází (bp). Přítomnost ampliconů v reakční směsi se prokazuje obvykle stanovením jejich velikosti pomocí elektroforézy na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu PCR (Grunenwald 2003).

4.2.3.2 Příprava a provedení PCR reakce

Vzorky DNA se musely smíchat s reagensy, které umožňují amplifikaci DNA, jedná se o nukleotidy, primery, polymerázu, reakční pufr a vodu. Tento reakční mix (bez DNA) nazýváme termínem mastermix. Po přidání DNA jsou reakce vloženy do thermocycleru.

V tomto případě laktózy intolerance byli testovány dva nejčastěji se vyskytující polymorfismy genu *MCM6* v populaci – C/T 13910 a G/A 22018. Každý z těchto polymorfismů je analyzován zvlášť a vyžaduje vlastní reakční mix.

Reagencie pro polymorfismus genu *MCM6* 13910 C/T:

- Voda
- MyTaq Red Reaction buffer
- MyTaq polymeráza
- DMSO
- Primery Forward+Reverse (LAC 13910 C/T for, LAC 3910 C/T rev)

Sekvence primerů pro polymorfismus genu *MCM6* 13910 C/T:

- 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'

Reagencie pro polymorfismus genu *MCM6* 22018 G/A

- Voda
- MyTaq Red Reaction buffer
- MyTaq polymeráza
- DMSO
- Primery Forward/Reverse (LAC 22018 G/A for, LAC 22018 G/A rev)

Sekvence primerů pro polymorfismus genu *MCM6* 22018 G/A:

- LAC 22018 for: 5' -CTC AGT GAT CCT CCC ACC TC-3'
- LAC 22018 rev: 5' -CCC CTA CCC TAT CAG TAA AGG-3'

Reagencie	1 reakce	Reagencie	1 reakce
Voda	34,3 μ l	Voda	34,3 μ l
MyTaq polymeráza	0,2 μ l	MyTaq polymeráza	0,2 μ l
MyTaq Red Reaction buffer (10x)	5 μ l	MyTaq Red Reaction buffer	5 μ l
DMSO (100 %)	2,5 μ l (5%)	DMSO	2,5 μ l
Primer C/T forward (20 pmol)	0,5 μ l	Primer G/A forward	0,5 μ l
Primer C/T reverse (20 pmol)	0,5 μ l	Primer G/A reverse	0,5 μ l
Celkem	48 μl	Celkem	48 μl
DNA	2 μ l	DNA	2 μ l

Tabulka 1: Rozpis pro přípravu PCR reakční směsi pro oba polymorfismy MCM6 C/T 13910 a G/A 22018

Pracovní postup pro přípravu PCR reakce:

1. Vysvítíme laminární box UV světlem.
2. Z mrazáku vyndáme chladící stojánek a reagencie: primery, DNA vzorky, reakční pufr a polymerázu. Připravíme zkumavku s DMSO.
3. Pro každý vzorek si připravíme jednu mikrozkušavku, která se označí číslem vzorku a dvě 1,5ml zkumavky pro namíchání mastermixů pro oba polymorfismy.
4. Do 1,5 ml zkumavek napipetujeme potřebné množství reagentů dle počtu reakcí, kromě DNA. V jedné zkumavce se připraví mix pro polymorfismus MCM6 13910 C/T a v druhé pro polymorfismus MCM6 22018 G/A.
5. Do každé mikrozkušavky napipetujeme 48 μ reakčního mixu.
6. Přidáme 2 μ l DNA vzorku.
7. Mikrozkušavky vložíme do termocycleru a spustíme příslušný PCR profil uvedený v tabulce 2.

Krok programu	Teplota	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95°C	5 min	1 cyklus
Denaturace	95°C	60 s	35 cyklů
Annealing	57,4°C pro C/T 13910 60,1°C pro G/A 22018	60 s	
Extenze	72°C	60 s	
Terminální extenze	72°C	5 min	1 cyklus
Chlazení	4°C	10 min	1 cyklus

Tabulka 2: PCR profil použitý pro analýzu laktóзовé intolerance.

Kontrola PCR produktů nebo restrikčních fragmentů (viz další kapitola) probíhala pomocí gelové elektroforézy.

Příprava gelové elektroforézy

Reagencie:

- Crystal 10x TBE buffer – skladuje se při RT
- 10x TBE – roztok připravený z Crystal 10x TBE buffer dle návodu od výrobce, skladuje se při RT
- Pracovní roztok 1x TBE – skladuje se při RT
- Agaróзовé tablety (1 tableta = 0,5g agarózy) skladování při RT
- EliDNA™ PS GREEN – barva, skladuje se v lednici

Pracovní postup:

1. Příslušný počet agaróзовých tablet vložíme do plastové kádinky (1% gel = 1 tableta/50 ml, 2% gel = 2 tablety/50 ml atd.).
2. K tabletám přidáme 50 ml 1x TBE pufru.
3. Kádinku s rozpuštěnými tabletami se vložíme do mikrovlnné trouby.
4. Kádinka se zahřívá cca tři minuty a během ohřevu se kontroluje a míchá, aby roztok nepřetekl.
5. Pro možnost vizualizace PCR produktů nebo fragmentů DNA přidáme do ještě tekutého gelu 10 µl fluorescenční barvičky.
6. Gel pečlivě promícháme a vlijeme do elektroforetické formy s připravenými hřebeny (pokud je třeba snažíme se lopatičkou zbavit gel bublin)

7. Gel necháme ztuhnout ve tmě po dobu 10-15 min.
8. Z tuhého gelu opatrně vyndáme hřebeny a gel vložíme do elektroforetické vany.

Na takto připravený gel byly naneseny vzorky a spuštěna elektroforéza (100-135 V na 10-15 min).

Průběh elektroforézy bylo možné sledovat pomocí speciálního iluminátoru. Po proběhnutí elektroforézy byl gel přenesen na dokumentační systém FastGene® GelPlic LED box umožňující detekci fluorescenční barvičky, vyfocen a foto gelu uloženo na paměťovou kartu a následně do PC.

4.2.4 Restrikční štěpení

Pro restrikční štěpení byly použity restrikční enzymy bakterie *Haemophilus influenzae*. Pro polymorfismus genu *MCM6* 13910 C/T se použila restriktáza *HinfI* a pro polymorfismus genu *MCM6* 22018 G/A byl použit enzym *Hin6I*. Tyto restrikční enzymy štěpí příslušné PCR produkty na fragmenty o známých délkách.

Místa štěpení:

HinfI

5'...G↓ANTC...3'

3'...CTNA↑G...5'

Hin6I

5'...G↓CGC...3'

3'...CGC↑G...5'

Reagencie:

- enzym *HinfI* + CutSmart Buffer pro LAC 13910 C/T
- enzym *Hin6I* + Tango buffer pro LAC 22018 G/A

Pracovní postup:

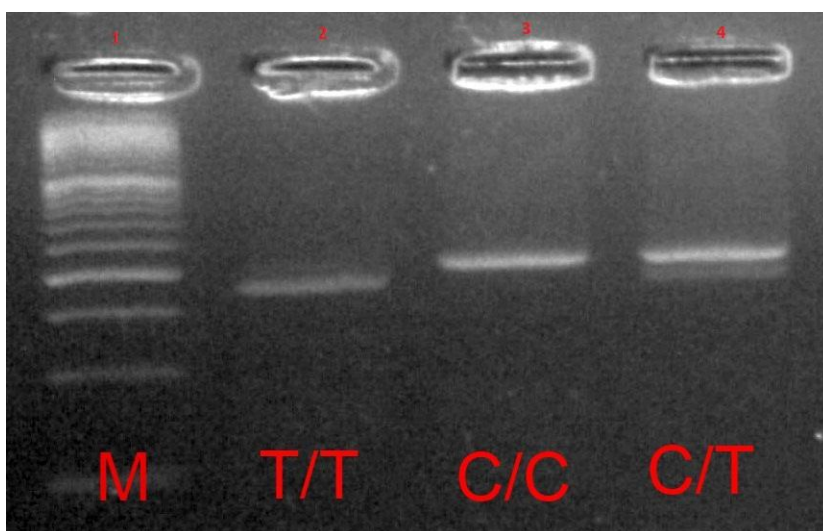
1. Z lednice si vyndáme chladicí stojan.
2. Z mrazáku vyndáme enzymy *HinfI* a *Hin6I* spolu s pufrý 10xNBE buffer a 10x Tango buffer.
3. Připravíme si dvě 1,5 zkumavky, které označíme čísly I pro C/T 19310 a II pro G/A 22018.
4. Do zkumavky označené I si napipetujeme pro každou reakci 1 µl (10 U) enzymu *HinfI* a 4,5 µl 10x NBE buffer.
5. Do zkumavky označené II si napipetujeme pro každou reakci 1 µl (10 U) enzymu *Hin6I* a 4,5 µl 10x Tango buffer.
6. Krátce zvertexujeme a stočíme.

7. Poté směs po 5 µl rozpipetujeme do mikrozkušavek s PCR produktem.
8. Opět zvertexujeme a stočíme.
9. Mikrozkušavky inkubujeme při 37 °C alespoň hodinu.
10. Výsledek restriční štěpení zkontrolujeme na 4% agarózovém gelu (Obr 8,9).

	PCR produkt	Restriktáza	Mutace	Wild-type	Heterozygot
Laktóza 13910	201 bp	Hinf 1	177bp+27bp TT	201bp CC	201bp+177bp+24bp CT
Laktóza 22018	271 bp	Hin6	271bp AA	196bp+75bp GG	271bp+196bp+75bp GA

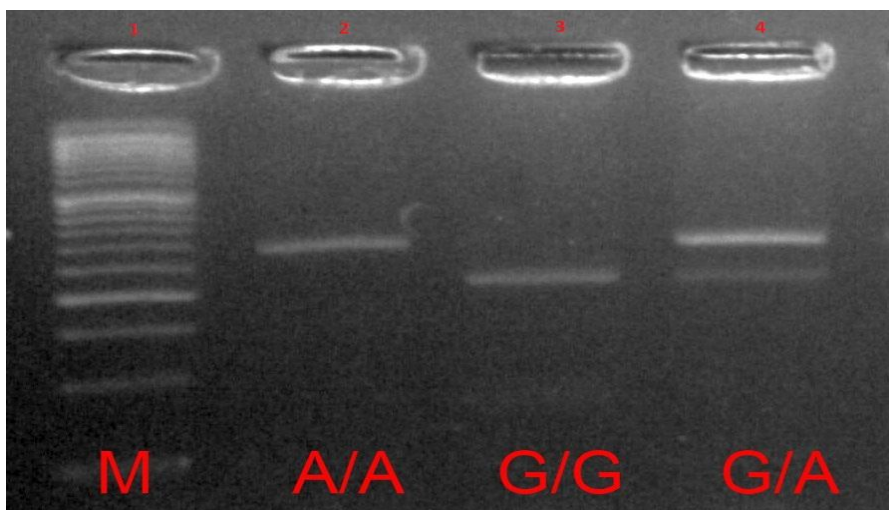
Tabulka 3: Velikosti PCR produktů a restričních fragmentů odpovídající jednotlivým genotypům MCM6 13910 CT a 22018 GA.

Na obrázku č.8 můžeme vidět výsledek restriční štěpení pro polymorfismus MCM6 13910 CT.



Obrázek 8: Foto gelu, restriční štěpení pro polymorfismus MCM6 13910, M- hmotnostní marker, čísla 1-4 představují označení vzorků, pomocí písmen jsou uvedeny výsledné genotypy (T/T homozygot, C/C wild type, C/T heterozygot).

Na obrázku č.9 můžeme vidět výsledek restriční štěpení pro polymorfismus MCM6 22018 GA



Obrázek 9: Foto gelu, restrikční štěpení pro polymorfismus MCM6 22018 GA, M – hmotnostní marker; čísla 1-4 představují jednotlivé označení vzorků, pomocí písmen jsou uvedeny výsledné genotypy (A/A homozygot, G/G wild-type, G/A heterozygot).

4.2.5 Real-time PCR reakce –princip, příprava a provedení

4.2.5.1 Princip Real-time PCR

Jedná se o metodu založenou na principu klasické PCR, umožňuje však kvantifikaci amplifikovaného úseku DNA v reálném čase. Na rozdíl od běžné PCR, kde se analyzuje až výsledný produkt pomocí elektroforézy, je při real-time PCR zaznamenána amplifikace v reálném čase. Detekce amplifikace je založena na principu fluorescence, kdy se používají fluorescenční sondy, vážící se specificky na amplifikovanou DNA. Primery pro alelově-specifickou amplifikaci se mísí dohromady s primery pro interní kontrolu v jedné zkumavce, což činí tuto metodu vhodnou pro klinické použití. Tato reakce je podobně jako klasická PCR prováděna v přístroji termocycler, který je ale oproti klasické verzi vybaven optickým zařízením pro snímání intenzity fluorescenčního záření v reálném čase. Optický signál je zaznamenáván a zpracováván specializovaným software prostřednictvím matematických metod. Tato metoda je rychlá, vyžaduje méně manipulačních kroků a poskytuje takřka 100 % specificitu a senzitivitu (Ruijter, 2013).

4.2.5.2 Příprava a provedení Real-time PCR

Pro provedení metody byl použit byl komerční kit CE IVD EliGene® Coeliac 3.0 RT (DQ2.5, DQ2.2, DQ8) (Elisabeth Pharmacon, s. r. o.), sloužící ke genotypizaci rizikových haplotypů HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 a HLA-DQ8. Pro detekci byly použity značené sondy (FAM a JOE) a primery. Pomocí soupravy EliGene® Coeliac RT je možné detekovat alely HLA-DQ2.5 (DQA1* 05, DQB1* 02), HLA-DQ2.2 (DQA1*02) a HLA-

DQ8 (DQA1* 03, DQB1* 03:02). Jako vnitřní pozitivní kontrola je v rámci kitu detekována přítomnost genu SYPL2.

Pro detekci alel DQA1* 05, DQA1* 02 a DQB1* 03:02 byla použita sonda značená fluorescenční barvou FAM (excitační spektrum 494 nm – emisní spektrum 518 nm) a pro detekci alel DQA1* 03, DQB1* 02 a SYPL2 (interní kontrola) alel sonda značená fluorescenční barvou JOE (excitační spektrum 520 nm – emisní spektrum 548 nm).

Kit EliGene® Coeliac 3.0 RT (DQ2.5, DQ2.2, DQ8) obsahuje již předmíchané mastermixy CELI-DQ2.5, CELI-DQ2.2 a CELI-DQ8. Po rozmražení byly master-mixy krátce zvortexovány a stočeny. Pro každý vzorek je nutné provést tři amplifikační reakce označené CELI-DQ2.5, CELI-DQ2.2 a CELI-DQ8, tzn. pro každý vzorek byly připraveny tři kapiláry pro tři různé master mixy.

Rozpipetování mastermixů pro jednotlivé reakce probíhalo v laminárním boxu. Pro skleněné kapiláry je používán speciální chlazený kovový stojan s tzv. adaptéry (LightCycler® Centrifuge Adapters, Roche Life Science). Do každé kapiláry (objem 20 µl) dle doporučení výrobce napipetováno 17,5 µl příslušného master mixu. V rámci kitu je dodávána pozitivní kontrola, která je stejně jako negativní kontrola analyzována při každém běhu real-time PCR spolu se vzorky. Jako negativní kontrola slouží reakce, do kterých je místo DNA přidána voda.

V dalším kroku bylo do jednotlivých kapilár přidáno 2,5 µl izolované DNA, kontrolní DNA (pozitivní kontrola) nebo vody (negativní kontrola). Následně byly kapiláry krátce stočeny v centrifuze a vloženy do karuselu, který se používá pro tento typ real-time cycleru (LightCycler® 2.0, Roche Life Science). Karusel s kapilárami byl vložen do přístroje LightCycler® 2.0 a následně byl spuštěn příslušný PCR program doporučený výrobcem

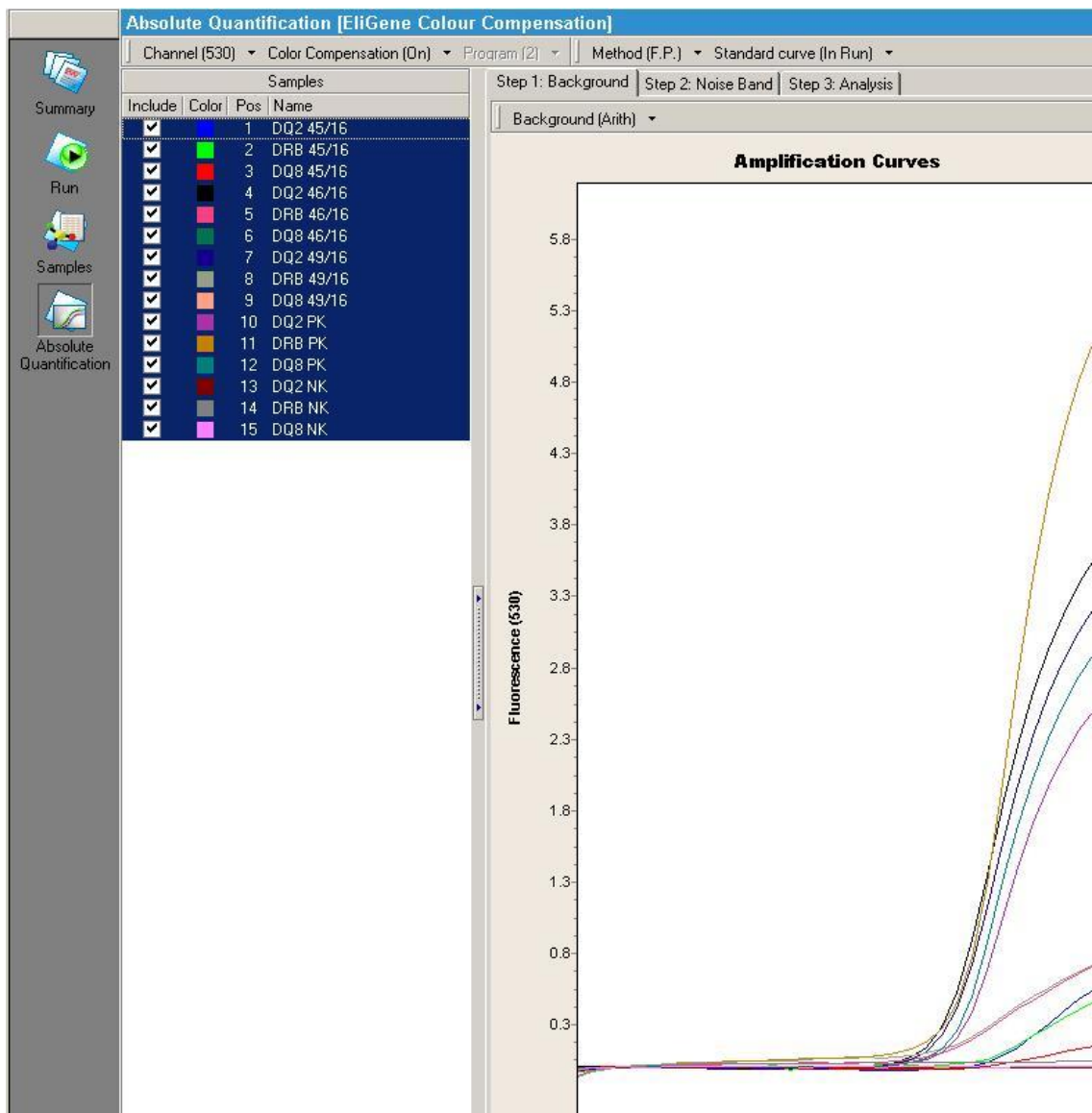
FÁZE	POČET CYKLŮ	TEPLOTA °C	ČAS
Denaturace	1	95°C	3 minuty
Cyklovací	40	95°C	15 sekund
		61°C (annealing, extenze) měření fluorescence	40 sekund

Tabulka 4: Real-time PCR profil použitý pro predispozici k celiakii.

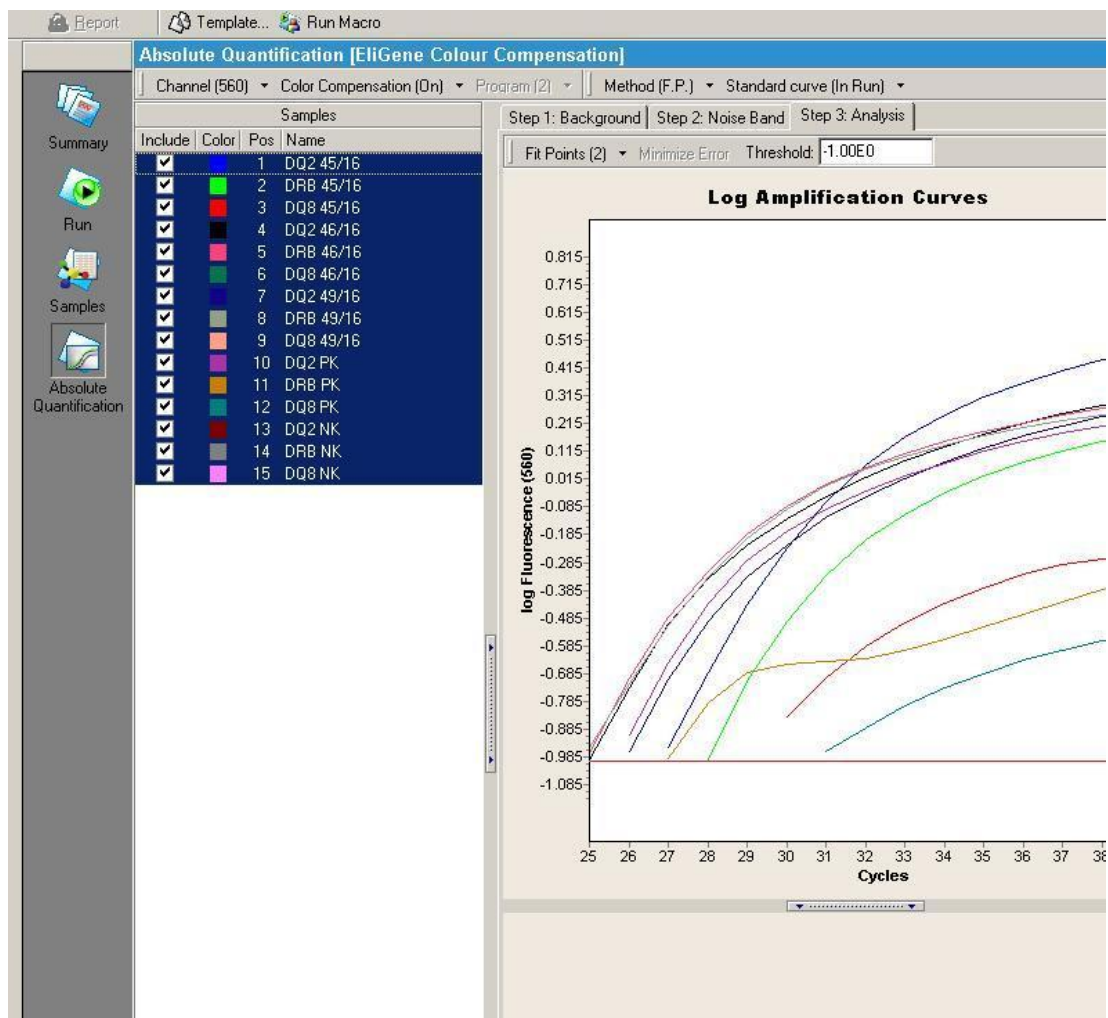
Pro analýzu výsledků bylo nutné zvolit odpovídající color kompenzaci a metodu fit-points, kdy jsou v jednotlivých detekčních kanálech použity specifické hraniční hodnoty (pro kanál FAM a 530 nm -0.1 a pro kanál JOE a 560 nm -1). Následně byla pak možná i interpretace získaných výsledků. V případě pozitivní amplifikace došlo v kanálu FAM (510-528) nebo JOE (530-548) k nárůstu signálu. Naopak v případě, kdy k amplifikaci vůbec nedošlo, nebyl detekován ani nárůst signálu v uvedených kanálech.

Číslo vzorku	CELI – DQ2.5 MIX		CELI-DQ2.2 MIX		CELI-DQ8 MIX		Haplotypy
	FAM DQA1* 05 (DQ2.5)	JOE DQB1* 02 (DQ2.5)	FAM DQA1*02 (DQ2.2)	JOE (vnitřní kontrola)	FAM DQB1*03: 02 (DQ8)	JOE DQA1*03 (DQ8)	
1	+	+	-	+	+	+	DQ2.5/DQ8
2	-	-	-	+	-	-	DQX.X
3	+	+	-	+	-	-	DQ2.5
4	-	+	+	+	-	-	DQ2.2
5	+	+	+	+	-	-	DQ2.5/DQ2.2
6	+	-	-	+	+	+	DQ8
7	+	-	-	+	-	-	DQX.5
8	+	+	+	+	-	+	DQ2.5/DQ2.2
9	+	+	+	+	+	-	DQ2.5/DQ2.2
10	+	+	+	+	+	+	DQ2.5/DQ8
11	+	-	-	+	-	-	DQX.5
12	-	+	+	+	-	-	DQ2.2

Tabulka 5: Tabulka pro vyhodnocení výsledků real-time PCR, převzato z příbalového letáku pro kit CE IVD EliGene® Coeliac 3.0 RT (DQ2.5, DQ2.2, DQ8) Elisabeth Pharmacon, s. r. o.



Obrázek 10: Příklad amplifikační křivky v kanálu 530 (Real-time PCR, CE IVD EliGene® Coeliac 3.0 RT (DQ2.5, DQ2.2, DQ8) (Elisabeth Pharmacon, s. r. o.) .



Obrázek 11: Příklad logaritmicke amplifikační křivky v kanálu 560 (Real-time PCR, CE IVD EliGene® Coeliac 3.0 RT (DQ2.5, DQ2.2, DQ8) (Elisabeth Pharmacon, s. r. o.).

5. Výsledky

V genetické laboratoři GENLABS bylo vyšetřeno od ledna 2019 do března 2021 celkem 729 dospělých a 122 dětí na laktózovou intoleranci a polymorfismy genu *MCM6* C/T-13910 a G/A-22018 metodou RFLP PCR. Dále bylo vyšetřeno 197 dospělých jedinců a 57 dětí na predispozici k celiakii metodou Real-time PCR.

V tabulce č. 6 můžeme vidět procentuální zastoupení jednotlivých haplotypů asociovaných s celiakií u dětí za sledované testovací období. Z dat na obrázku č. 12 můžeme vyčíst, že nejvíce zastoupený haplotyp u dětí je DQ2.5 (28 %), to znamená pozitivní predispozici k celiakii a haplotyp DQX.X (28 %), který diagnózu celiakie vylučuje s 99 % pravděpodobností.

Haplotypy	Zastoupení (%)
DQ2	2(3%)
DQ2.2	4(7%)
DQ2.5	16(28%)
DQ2.5/DQ2.2	2(4%)
DQ2.5/DQ8	1(2%)
DQ8	8(14%)
DQX.5	8(14%)
DQX.X	16(28%)
Celkem	57

Tabulka 6: Přehled všech zastoupených haplotypů asociovaných s celiakií u vyšetřovaných dětí.

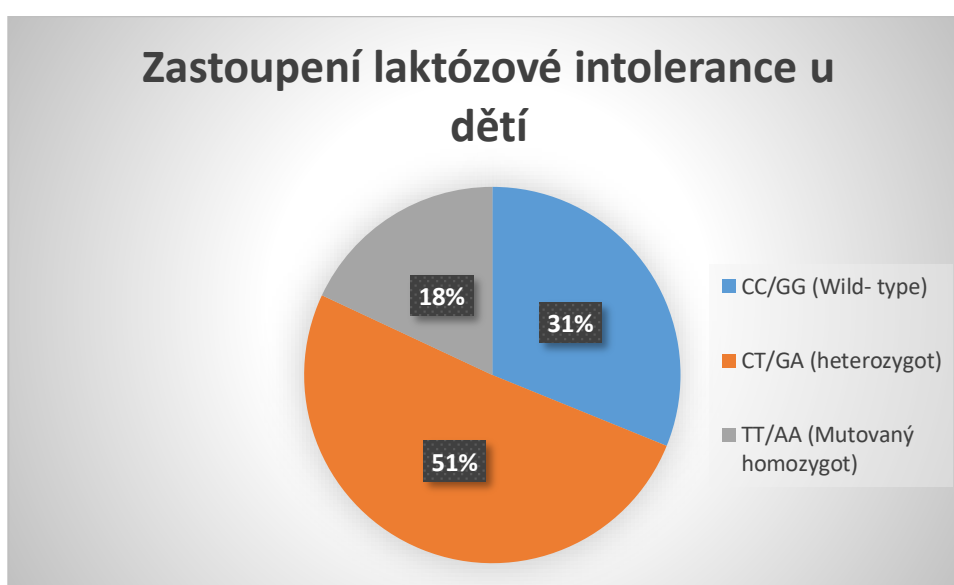


Obrázek 12: Souhrn všech zastoupených haplotypů asociovaných s celiakií u vyšetřovaných dětí.

V tabulce č.7 jsou uvedeny počty jednotlivých genotypů zjištěných u dětí vyšetřovaných na laktózovou intoleranci za celé testovací období. Jak je vyobrazeno na obrázku č. 13 nejvíce je zde zastoupen genotyp CT/GA (51 %).

Genotypy	Zastoupení
CC/GG (Wild – type)	38 (31%)
CT/GA (Heterozygot)	62(51%)
TT/AA (Mutovaný homozygot)	22 (18%)
Celkem	122

Tabulka 7: Přehled genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí u dětí.

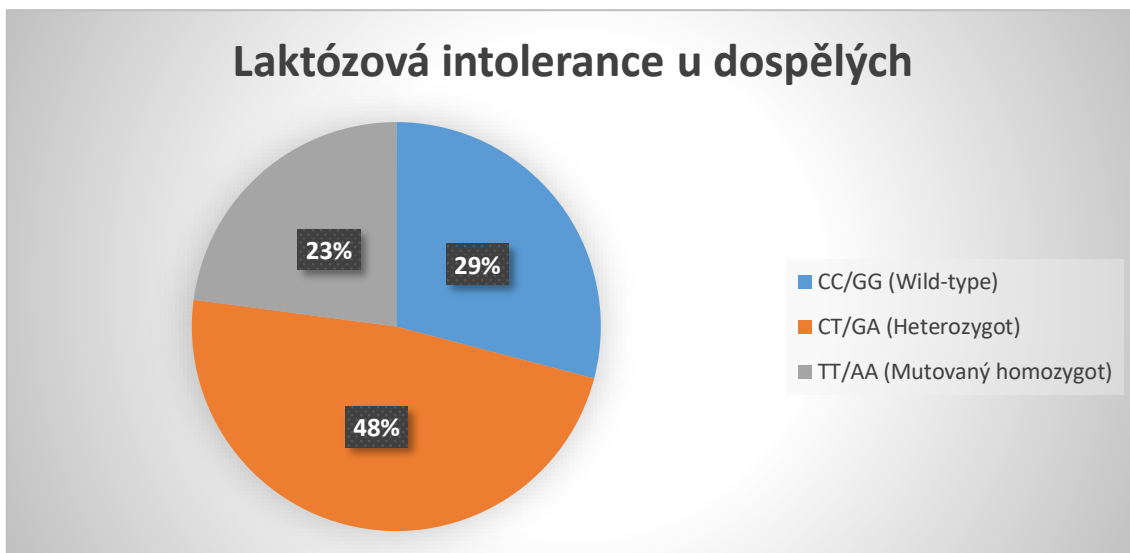


Obrázek 13: Zastoupení jednotlivých genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí u dětí.

V tabulce č. 8,9 jsou zobrazeny výsledky všech dospělých jedinců za celé testovací období. Nejvíce zastoupený genotyp pro laktózovou intoleranci za celé testovací období je CT/GA (48 %). Nejvíce zastoupený haplotyp pro celiakii je u dospělých nerizikový haplotyp DQX.X (27 %) a nejvíce zastoupený rizikový haplotyp je DQ2.5 (22 %).

Genotypy	Zastoupení v %	Počet dospělých jedinců
CC/GG (Wilde-type)	29 %	212
CT/GA (Heterozygot)	48 %	350
TT/AA (Mutovaný homozygot)	23 %	167
Celkem		729

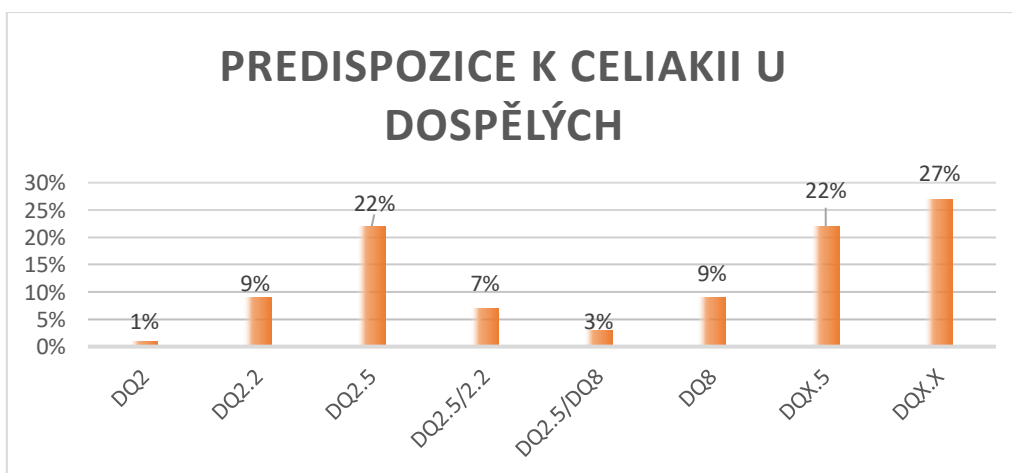
Tabulka 8: Přehled zastoupení jednotlivých genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí u dospělých.



Obrázek 14: Zastoupení jednotlivých genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí u dospělých.

Haplotyp	Zastoupení v %	Počet dospělých jedinců
DQ2	1 %	3
DQ2.2	9 %	17
DQ2.5	22 %	43
DQ2.5/2.2	7 %	15
DQ2.5/DQ8	3 %	6
DQ8	9 %	17
DQX.5	22 %	43
DQX.X	27 %	53
Celkem		197

Tabulka 9: Přehled všech zastoupených haplotypů asociovaných s celiakií u dospělých.

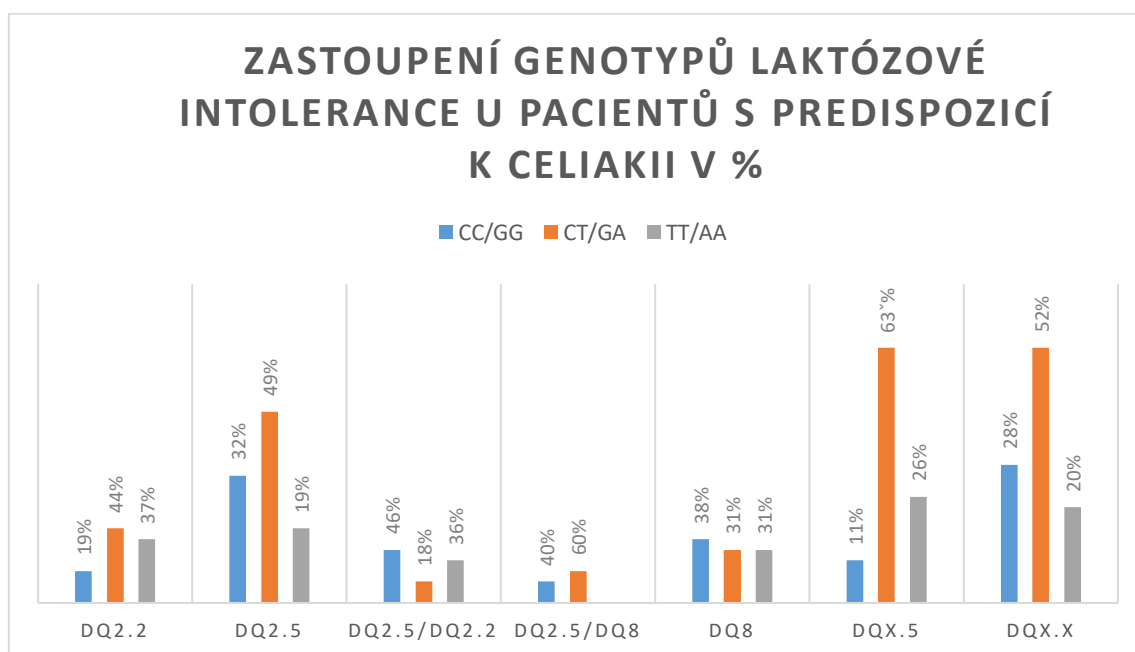


Obrázek 15: Zastoupení jednotlivých haplotypů asociovaných s celiakií u dospělých.

Ze získaných dat (tab č.9), lze vyčíst, že z celkového počtu 197 dospělých jedinců, byly u 101 jedinců detekovány rizikové haplotypy pro celiakii. Z tabulky č.8 lze vyčíst že 212 testovaných dospělých jedinců trpí laktózovou intolerancí, 350 dospělých jedinců může mít v budoucnu problém s konzumací laktózy a 167 jedinců je celoživotně tolerantních pro laktózu.

Genotypy	DQ2.2	DQ2.5	DQ2.5/DQ2.2	DQ2.5/DQ8	DQ8	DQX.5	DQX.X	Celkem
CC/GG	3(19%)	12(32%)	5(46%)	2(40%)	6(38%)	4(11%)	13(28%)	45
CT/GA	7(44%)	18(49%)	2(18%)	3(60%)	5(31%)	24(63%)	24(52%)	83
TT/AA	6(37%)	7(19%)	4(36%)		5(31%)	10(26%)	9(20%)	41
Celkem								169

Tabulka 10: Přehled genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí u pacientů vyšetřených pro predispozici k celiakii



Obrázek 16: Zastoupení jednotlivých genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí u pacientů vyšetřených pro predispozici k celiakii

Za celé testovací období bylo testováno celkem 169 dospělých jedinců současně pro predispozici k celiakii i pro laktózovou intoleranci. U 63 jedinců (tab č. 10) bylo prokázáno že mají jak laktózovou intoleranci, tak predispozici k celiakii. Z obrázku č. 16 můžeme vyčíst, že u jedinců s haplotypem DQ2.2, DQ2.5, DQ2.5/DQ8, DQX.5 a DQX.X převládá heterozygotní genotyp *MCM6* 13910/22018 CT/GA, který je zodpovědný za částečnou intoleranci laktózy. U jedinců s haplotypem DQ2.5/DQ2.2 a DQ8 převládá genotyp CC/GG zodpovědný za laktózovou intoleranci.

6. Diskuse

Hypolaktasie dospělého typu, známá také jako laktózová intolerance je běžným autozomálně recesivním stavem způsobeným fyziologickým poklesem aktivity laktasephlorizinhydrolázy (LPH) ve střevních buňkách po odstavení od kojení (Enattah et. al 2002). V evropské populaci se běžně geneticky testují dva polymorfismy genu *MCM6* – C/T 13910 a G/A 22018. Tyto dva polymorfismy jsou společně v segregaci.

Pro statistické zhodnocení byly použity výsledky vyšetření provedené v genetické laboratoři GENLABS od ledna 2019 do března 2021, kdy bylo celkově testováno 279 dospělých jedinců a 122 dětí metodou PCR RFLP na laktózovou intoleranci. Vyšetření bylo provedeno pro polymorfismy genu *MCM6* C/T-13910 a G/A-22018. Ve většině případů byl zachycen heterozygotní genotyp *MCM6* 13910 CT/22018 GA, u dospělých ve 48 % (350) a u dětí v 51 % (62), který může a nemusí vést k rozvoji laktózové intolerance. Heterozygotní jedinci nemusí mít problémy s trávením laktózy, ale při větším dlouhodobém stresu, či nemoci můžou mít tendenci netolerovat laktózu.

Genotyp asociovaný s laktózovou perzistencí *MCM6* 13910 TT/22018 AA (mutovaný homozygot) byl zachycen u 23 % (167) dospělých jedinců a 18 % (22) dětí. U tohoto genotypu je zachována činnost enzymu laktázy i v dospělosti a mléčný cukr je plně tolerován. Naopak s genotypem *MCM6* 13910 CC/22018 GG (původní homozygotní genotyp), u kterého není laktáza ve střevním epitelu v dospělosti téměř zjištělná, byl zachycen u 29 % (212) dospělých jedinců a u 31 % (38) dětí. Toto zjištění nám potvrzuje, že nejvíce zastoupený genotyp v české populaci ve všech věkových kategoriích je heterozygotní genotyp *MCM6* 13910 CT/22018 GA, který je označován jako spíše tolerantní k laktóze.

Rasinperä at al. 2004 ve své studii zmiňuje zastoupení jednotlivých genotypů u finských dětí, kdy genotyp *MCM6* 13910 CC/22018 GG se vyskytoval u 15 % dětí, genotyp *MCM6* 13910 CT/22018 GA u 54 % dětí a genotyp *MCM6* 13910 TT/22018 AA u 31 % dětí. V naší studii to bylo 31 % dětí s genotypem *MCM6* 13910 CC/22018 GG, 51 % dětí s genotypem *MCM6* 13910 CT/22018 GA a 18 % dětí s genotypem *MCM6* 13910 TT/22018 AA. Výrazný rozdíl byl tedy zaznamenán v případě obou homozygotních genotypů zodpovídajících za intoleranci/toleranci laktózy. Rozdílné výsledky mohou být způsobeny tím, že Rasinperä testoval finské děti, u kterých je perzistence laktózy častější, protože konzumují historicky daleko více mléka a

mléčných výrobků a také tím že ve Finsku jsou lidé vystaveni slunečnímu záření s nižší intenzitou. Vitamín D se pak přirozeně nemůže v pokožce dostatečně syntetizovat a je získáván právě z mléka, kde se nachází ve velkém množství. Dalším důvodem pro rozdílná zastoupení jednotlivých genotypů asociovaných s laktózovou intolerancí může být ten, že v laboratoři GENLABS jsou testovány děti, které již vykazují trávicí potíže, a proto je u nich častěji nacházen genotyp zodpovědný za intoleranci laktózy.

V jiné studii Krutli (2014) popsal zastoupení genotypů zodpovídajících za laktózovou intoleranci typické pro středoevropskou populaci. S výsledky této studie se shodujeme daleko více. Krüttli uvádí že 28 % dospělých jedinců má genotyp *MCM6* 13910/22018 CC/GG, 48 % *MCM6* 13910/22018 CT/GA a 28 % *MCM6* 13910/22018 TT/AA. Naše zastoupení jednotlivých genotypů je 29 % pro *MCM6* 13910/22018 CC/GG, 48 % pro *MCM6* 13910/22018 CT/GA a 23 % pro *MCM6* 13910/22018 TT/AA. Tuto významnou shodu můžeme vysvětlit tím, že byly testovány stejné populace.

Celiakie je onemocnění definované jako nesnášenlivost lepku a řadí se mezi autoimunitní onemocnění. Celiakie se projevuje zejména postižením sliznice tenkého střeva. Spouštěčem autoimunitní reakce proti buňkám tenkého střeva (enterocytům) je lepek, resp. peptidické štěpy, které jsou obsažené v různé míře v bílkovinách žita, ječmene, pšenice a částečně také ovsa. Nejvýznamnější rizikové faktory pro onemocnění celiakie jsou haplotypy HLA-DQ2 a HLA-DQ8, ačkoliv ale nemohou nikdy samostatně sloužit jako diagnostický prvek onemocnění. Teprve kombinace genetických a sérologických testů může potvrdit nebo vyloučit diagnózu celiakie (Fasano *et al.*, 2001).

V rámci experimentální části této práce byli použity výsledky vyšetření z genetické laboratoře GENLABS za poslední dva roky. Vyšetřeno bylo celkově 197 dospělých jedinců a 57 dětí metodou Real-time PCR pro vrozené predispozice k celiakii. Nejvíce zastoupený rizikový haplotyp u dětí i dospělých je DQ2.5 (28 % a 22 %).

Stejně tak dle studie Selleskiho *et al.* (2017) je u dětí nejčastěji zastoupen haplotyp DQ2.5 a to u 22 %. V naší studii se haplotyp DQ2.5 se objevuje u 28 % dětí. Výsledky se mohou lišit v závislosti na tom, že Selleski *et al.* (2017) prováděl testování na Brazílských dětech, které měly i jiná autoimunitní onemocnění. Rozdíly nacházíme i u ostatních rizikových haplotypů, ale nejvíce výrazná je neshoda u haplotypu DQ8, kde Selleski *et al.* (2017) uvádí výskyt u 1 %, přičemž my jsme detekovali tento haplotyp u

14 %. Pro DQ2.2 uvádí Selleski et al, (2017) 7 %, pro DQ2.5/DQ2.2 5 % a pro DQ2.5/DQ8 6 %. V naší studii jsme detekovali haplotyp DQ2.2 u 7 %, DQ2.5/DQ2.2 u 4 % a DQ2.5/DQ8 u 2 %. Podle Selleskiho et al, (2017) genotypizace celiakie HLA-DQ u Brazílských dětí vykazovala podobnost s evropskými vzory, což můžeme spíše potvrdit. Toto by bylo potřeba ověřit na větším souboru jedinců.

Dále bylo testováno 169 dospělých jedinců na predispozici k celiakii a laktózovou intoleranci. U 63 jedinců bylo prokázáno že mají jak laktózovou intoleranci, tak predispozici k celiakii. Jak z obrázku č. 16 můžeme vyčíst u jedinců s haplotypem DQ2.2, DQ2.5 a DQ2.5/DQ8 převládá genotyp pro laktózovou intoleranci *MCM6* 13910/22018 CT/GA. U jedinců s haplotypem DQ2.5/DQ2.2 a DQ8 převládá genotyp pro laktózovou intoleranci *MCM6* 13910/22018 CC/GG.

Klinické příznaky obou onemocnění se velmi podobají, jedná se o nafouklé břicho, průjem, nadýmání a křeče v břiše, proto se mohou nemoci prolínat, či přímo překrývat. Myslím si, že proto je lepší u jedince, který je pozitivní např. pro laktózovou intoleranci, vyšetřit také možnost vrozeného rizika celiakie. Zejména v případě, kdy se dodržuje dietní plán a pacientovi přesto přetrvávají zdravotní problémy.

7. Závěr

V teoretické části jsem shrnula poznatky o laktóзовé intoleranci a celiakii. Věnovala jsem se obecné podstatě obou nemocí. U laktóзовé intolerance jsem popsala důvod vzniku a vyšetření které se provádějí pro její zjištění. U celiakie jsem se více věnovala její genetické podstatě.

V praktické části jsem si osvojila principy správné laboratorní praxe a metody molekulární biologie, které se rutinně používají pro diagnostiku vrozených rizikových faktorů pro celiakii i laktóзовou intoleranci. Jedná se o izolaci DNA jak z bukalního stěru, tak periferní krve, metodu PCR RFLP a Real-time PCR. Uvedené metody byly provedeny dle validovaných standardních operačních protokolů nebo v případě certifikovaných kitů dle doporučení výrobce. Součástí práce byla také statistická analýza dat, zabývajících se genotypizací klientů genetické laboratoře z hlediska laktóзовé intolerance a celiakie, získaných od ledna 2019 do března 2021. Následně jsem v diskusi porovnála naše výsledky s jinými studii.

Ze získaných výsledků vyplývá, že laktóзовá intolerance a celiakie se může v jistých případech prolínat, a proto je dobré jedince vyšetřit z hlediska obou diagnóz. Myslím si, že genetické vyšetření je nejlepším možným neinvazivním vyšetřením, zejména pokud se jedná o velmi malé děti, protože lze provést obě vyšetření z bukalního stěru.

Tato práce mi byla velkým přínosem jak po teoretické, tak praktické stránce. V teoretické části jsem se dozvěděla nové informace o laktóзовé intoleranci i o celiakii. V praktické části jsem se naučila, jak pracovat v genetické laboratoři a osvojila jsem si metody izolace DNA, PCR RFLP a také Real time-PCR.

8. Literatura

1. . WAUD, J. P., MATTHEWS, S. B., CAMPBELL, A. K., 2008. Measurement of breath hydrogen and methane, together with lactase genotype, defines the current best practice for investigation of lactose sensitivity. *Annals of Clinical Biochemistry*. 45(1), 50-58. DOI: 10.1258/acb.2007.007147
2. ABDULKARIM, A. S.; MURRAY, J. A. 2003 The diagnosis of coeliac disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 17.8: 987-995.
3. BRDIČKA, R., DIDDEN, W. 2015. Genetika v klinické praxi. První vydání. Praha: Galén, ISBN 978-80-7492-182-7.
4. ČURDA, Ladislav. Mléčné výrobky a intolerance laktózy. *Potravinářská revue*, 2006, 4: 19-22.
5. DI RIENZO, T., et al. 2013 Lactose intolerance: from diagnosis to correct management. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 17.Suppl 2: 18-25.
6. DI STEFANO, M., et al., 2009 Genetic test for lactase non-persistence and hydrogen breath test: Is genotype better than phenotype to diagnose lactose malabsorption?. *Digestive and liver disease*, 41.7: 474-479.
7. ENATTAH, Nabil Sabri, et al.2002 Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nature genetics*, 30.2: 233-237.
8. FASANO, Alessio; CATASSI, Carlo. 2012, Celiac disease. *New England Journal of Medicine*, 367.25: 2419-2426.
9. FASSIO, Filippo; FACIONI, Maria Sole; GUAGNINI, Fabio, 2018 Lactose maldigestion, malabsorption, and intolerance: a comprehensive review with a focus on current management and future perspectives. *Nutrients*, 10.11: 1599.
10. FOJTÍK, Petr. 2012. *Celiakie a osteoporóza*. Disertační práce. Lékařská fakulta Masarykova univerzita Brno.
11. FOTJÍK P., FALT P., URBAN O., NOVOSAD P., RICHTEROVÁ L., BÓDAY A. 2013: Laktózová intolerance. *Practicus*, 5, 7-12. ISSN: 1213-8711.
12. FRIEDRICH, D. C., SANTOS, S. E. B., RIBEIRO-DOS-SANTOS, Â. K. C., HUTZ, M. H., CRAWFORD, D. C., 2012. Several Different Lactase Persistence Associated Alleles and High Diversity of the Lactase Gene in the Admixed Brazilian Population. *PLoS ONE*. 7(9). DOI: 10.1371/journal.pone.0046520. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0046520>.

13. GENCO GENÇDAL, Esin Salman; ÖZÜTEMİZ, Ömer; AKARCA, Ulus S. 2017 Association of LCT-13910 C/T polymorphism and colorectal cancer. *Annals of coloproctology*, 33.5: 169.
14. GRUNENWALD, Haiying. 2003. Optimization of polymerase chain reactions. In: *PCR protocols*. Humana Press, p. 89-99.
15. HEINE, Ralf G., et al. 2017, Lactose intolerance and gastrointestinal cow's milk allergy in infants and children—common misconceptions revisited. *World Allergy Organization Journal*, 10.1: 1-8.
16. HOFFMANOVÁ, Iva, et al. 2015, Neceliakální glutenová senzitivita. *Vnitřní lékařství*, 61.3: 219-227.
17. HOFFMANOVÁ, Iva; SÁNCHEZ, Daniel; TLASKALOVÁ-HOGENOVÁ, Helena. 2019, Diagnostická úskalí celiakie. *Vnitř Léč*, 65.1: 24-29.
18. INGRAM, Catherine JE, et al. 2009 Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence. *Human genetics*, 124.6: 579-591.
19. KALAČ, P., 2001 *Organická chemie přírodních látek a kontaminantů*. České Budějovice: Jihočeská fakulta, Zemědělská fakulta. 120 s. ISBN 80-7040-520-1
20. KOHOUT, P. 2007, Diagnostika a léčba celiakie. *Interní medicína pro praxi*, roč. 7, s. 324-326
21. KOHOUT, P. 2008, Novinky v bezlepkové dietě. *Interní medicína pro praxi*, roč. 10, č. 3, s. 113-116
22. KRÜTTLI, Annina, et al. 2014, Ancient DNA analysis reveals high frequency of European lactase persistence allele (T-13910) in medieval central europe. *PLoS One*, 9.1: e86251.
23. KUCHAY, Raja AH, et al. 2011, Effect of C/T–13910 cis-acting regulatory variant on expression and activity of lactase in Indian children and its implication for early genetic screening of adult-type hypolactasia. *Clinica chimica acta*, 412.21-22: 1924-1930.
24. KUOKKANEN M., ENATTAH N. S., OKSANEN A., SAVILAHTI E. et al. (2003): Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *An International Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 52, 647-652. ISSN: 2224-6509.
25. KUOKKANEN M., KOKKONEN J., ENATTAH N. S., YLISAUKKKO-OJA T. et al. (2005): Mutations in the translated region of the lactose gene (LCT) underlie congenital lactose deficiency. *Am J Hum Genet*, 78, 339-344. ISSN: 0002-9297.

26. LÍSOVÁ, S., EHRMANN, J., KOLEK, A., SEDLKOVÁ, E., KOLÁŘ, Z. 2005, Imunohistochemická studie mechanismů apoptózy a proliferace ve sliznici tenkého střeva u celiakální sprue. *Česko-slovenská patologie*, roč. 41, č. 3, s. 85-93.
27. LOMER M. C. E., PARKES G. C., SANDERSON J. D. 2008: Review article: lactose intolerance in clinical practise - myths and realities. *Aliment Pharmacol Ther*, 27, 93- 103. ISSN: 1365-2036.
28. MAĐRY E., FIDLER E., WALKOWIAK J. 2010: Lactose intolerance - current state of knowledge. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.*, 9 (3), 343-350. ISSN
29. MATTAR, Rejane, et al. 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*, 65.12: 1399-1399.
30. MATTAR, Rejane; DE CAMPOS MAZO, Daniel Ferraz; CARRILHO, Flair José. 2012, Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clinical and experimental gastroenterology*, 5: 113.
31. MEGIORNI, Francesca; PIZZUTI, Antonio. 2012, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of biomedical science*, 19.1: 1-5.
32. MEGIORNI, Francesca; PIZZUTI, Antonio. 2012, HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of biomedical science*, 19.1: 1-5.
33. MENŠÍKOVÁ, A., BEHARKOVÁ, N. 2010, Život pacientů s celiakií. *Ošetřovatelství a porodní asistence*, roč. 1, č. 4, s. 139-144.
34. MISSELWITZ, Benjamin, et al. 2019, Update on lactose malabsorption and intolerance: pathogenesis, diagnosis and clinical management. *Gut*, 68.11: 2080-2091.
35. NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. 2004Klinická genetika-Thompson&Thompson. *Praha. TRITON*,
36. RASINPERÄ, Heli, et al. 2004, A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut*, 53.11: 1571-1576.
37. RIDEFELT, Peter; HÅKANSSON, Lena D. 2005, Lactose intolerance: lactose tolerance test versus genotyping. *Scandinavian journal of gastroenterology*, 40.7: 822-826.
38. Ruijter, J. M., Pfaffl, M. W., Zhao, S., Spiess, A. N., Boggy, G., Blom, J., ... &

- Derveaux, S. 2013. Evaluation of qPCR curve analysis methods for reliable biomarker discovery: bias, resolution, precision, and implications. *Methods*, 59(1), 32- 46
39. SELLESKI, Nicole, et al. 2018, Prevalence of celiac disease predisposing genotypes, including HLA-DQ2. 2 variant, in Brazilian children. *Arquivos de gastroenterologia*, 55.1: 82-85.
40. SCHULTHEIS, Patrick J.; BOWLING, Bethany V. 2011, Analysis of a SNP linked to lactase persistence: An exercise for teaching molecular biology techniques to undergraduates. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 39.2: 133-140.
41. SOLLID, L. M. Molecular basis of celiac disease. *Annual Review of Immunology*, 2000, roč. 18, č. 1, s. 53-81.
42. SOLOMONS N. W. (2002): Fermentation, fermented foods and lactose intolerance. *European Journal of Clinical Nutrition*, 56 (4), S50-S55. ISSN: 0954-3007.
43. SOUČEK, M.(ed.), ŠPINAR, J. (ed.) a VORLÍČEK, J (ed.). 2011, Vnitřní lékařství. Vyd. 1. Praha: Grada, 3 sv. ISBN 978-80-247-2110-1.
44. STOURMAN, Nina; MOORE, Jennifer. 2018, Analysis of lactase in lactose intolerance supplements. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, 46.6: 652-662.
45. SZILAGYI, Andrew; ISHAYEK, Norma. 2018 Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. *Nutrients*, , 10.12: 1994.
46. SZILAGYI, Andrew; ISHAYEK, Norma. Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. *Nutrients*, 2018, 10.12: 1994.
47. TJON, Jennifer May-Ling; VAN BERGEN, Jeroen; KONING, Frits. 2010 Celiac disease: how complicated can it get?. *Immunogenetics*, , 62.10: 641-651.
48. TONUTTI, E., BIZZARO, N. 2014, Diagnosis and classification of celiac disease and gluten sensitivity. *Autoimmunity Reviews*, roč. 13, s. 472-476.
49. USAI-SATTA P, SCARPA M, OPPIA F, CABRAS F. 2012 Lactose malabsorption and intolerance: What should be the best clinical management? *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. Jun 6;3(3):29-33. doi: 10.4292/wjgpt.v3.i3.29. PMID: 22966480; PMCID: PMC3437438.
50. VANDENPLAS, Yvan. 2015, Lactose intolerance. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 24.Supplement.

9. Zkratky

A	Adenin
C	Cytosin
CLD	Kongenitální laktázová deficience
DNA	Deoxynukleová kyselina
G	Guanin
HLA	Human leukocyte antigen
IL	Interloukin
LCT	Gen pro laktázu
LP	Laktózová persistence
MCH	Hlavní histokompatibilní komplex
NCGS	Neceliakální glutenová senzitivita
PCR	Polymerázová řetězová reakce
RFLP	polymorfismus délky restričních fragmentů
RFLP-PCR	polymerázová řetězová reakce-polymorfismus délky restričních fragmentů
SNP	single nucleotide polymorphism (jednonukleotidový polymorfismus)
T	Thimin
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor nekrotizující faktor

