

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

**Význam predispozičních genetických faktorů pro
diagnostiku potravinových intolerancí.**

Diplomová práce

Bc. Žaneta Švecová

Školitelka: Mgr. Dagmar Riegert Bystřická, Ph.D.

České Budějovice 2023

Švecová, Ž., 2023: Význam predispozičních genetických faktorů pro diagnostiku potravinových intolerancí. [The importance of predisposing genetic factors for the diagnostic of food intolerances. Mgr. Thesis, in Czech] - 80 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

ANNOTATION

The aim of this master's thesis was to determine the individual genotypes of two polymorphisms C/T-13910 and G/A-22018 in the *MCM6* gene associated with lactose intolerance, five polymorphisms in the *AOC1* gene associated with histamine intolerance, two polymorphisms in the *HNMT* gene, SNP rs4263839 in the *TNF SF15* gene IBS-related and determination of HLA-DQ haplotypes associated with celiac disease. Another aim was to focus on possible associations between these disorders.

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

V Českých Budějovicích dne 13. 4. 2023

.....

Bc. Žaneta Švecová

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych poděkovala především své školitelce Mgr. Dagmar Riegert Bystřické, Ph.D. za poskytnutí cenných rad, vstřícný přístup a věnovaný čas při zpracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině, příteli a přátelům za trpělivost a podporu během celého studia.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
1.1 LAKTÓZOVÁ INTOLERANCE	2
1.1.1 Laktóza	2
1.1.2 Laktáza (laktáza-florizin hydroláza)	3
1.1.3 Typy laktózové intolerance	4
1.1.4 Fyziologie trávení laktózy.....	4
1.1.5 Příznaky laktózové intolerance.....	5
1.1.6 Genetika laktózové intolerance	6
1.1.7 Intolerance laktózy a střevní mikrobiom	7
1.1.8 Diagnostika.....	8
1.2 HISTAMINOVÁ INTOLERANCE	9
1.2.1 Histamin	9
1.2.2 Extracelulární histamin (dietní histamin).....	10
1.2.3 Metabolismus histaminu	10
1.2.4 Příčiny histaminové intolerance.....	11
1.2.5 Genové polymorfismy	12
1.2.6 Klinické příznaky.....	13
1.2.7 Snížená aktivita DAO a jiné střevní problémy.....	14
1.2.8 Diagnostika.....	15
1.2.9 Léčba HIT.....	16
1.3 INTRACELULÁRNÍ MOZKOVÝ HISTAMIN	16
1.3.1 HNMT (histamin-N-metyltransferáza)	17
1.3.2 Genové polymorfismy HNMT.....	17
1.3.3 Diagnostika.....	18
1.3.4 Léčba	18
1.4 CELIAKIE	18
1.4.1 Lepek.....	18
1.4.2 Celiakie a genetika	19
1.4.3 HLA geny	20
1.4.4 Patofyziologie celiakie.....	21
1.4.5 Celiakie a střevní mikrobiom.....	21
1.4.6 Příznaky celiakie	22
1.4.7 Diagnostika.....	23
1.5 SYNDROM DRÁŽDIVÉHO TRÁČNÍKU (IBS)	24

1.5.1	<i>FODMAP sacharidy</i>	24
1.5.2	<i>IBS a střevní mikrobiom</i>	25
1.5.3	<i>Genové varianty</i>	25
1.5.4	<i>Příznaky IBS</i>	27
1.5.5	<i>Diagnostika</i>	27
1.5.6	<i>Léčba</i>	27
2.	CÍLE PRÁCE	29
3.	MATERIÁLY A METODY	30
3.1	MATERIÁLY	30
3.2	IZOLACE DNA	30
3.3	MĚŘENÍ KONCENTRACE DNA	31
3.4	ANALÝZA POLYMORFISMŮ 13910 A 22018 V GENU <i>MCM6</i>	31
3.4.1	<i>PCR</i>	31
3.4.2	<i>Primery pro amplifikaci C/T-13910 a G/A-22018</i>	32
3.4.3	<i>Gelová elektroforéza</i>	33
3.4.4	<i>Restrikční štěpení</i>	33
3.5	REAL-TIME PCR	35
3.5.1	<i>Real-time PCR s analýzou křivek tání</i>	35
3.5.2	<i>HLA genotypizace</i>	37
3.6	STATISTICKÉ VYHODNOCENÍ DAT	38
4.	VÝSLEDKY	39
4.1	ANALÝZA POLYMORFISMŮ C/T-13910 A G/A-22018 V GENU <i>MCM6</i>	39
4.2	ANALÝZA POLYMORFISMŮ V GENU <i>AOC1</i> KÓDUJÍCÍ DAO	43
4.3	ANALÝZA POLYMORFISMŮ RS11558538 A RS1050891 V GENU <i>HNMT</i>	47
4.4	ANALÝZA HLA-DQ2 A HLA-DQ8 PRO PREDISPOZICI K CELIAKII.....	50
4.5	ANALÝZA GENU <i>TNF SF15</i> A > G (RS4263839) PRO PREDISPOZICI K IBS.....	52
4.6	MOŽNÁ ASOCIACE MEZI JEDNOTLIVÝMI INTOLERANCEMI	54
5.	DISKUSE	57
6.	ZÁVĚR	66
7.	ZDROJE	68

SEZNAM ZKRATEK

Anti – DPG	Anti-deamidated gliadin peptide
AOC1	Amine Oxidase Copper Containing 1
BMI	Body mass index
DAO	Diamine oxidase
DMSO	Dimethylsulfoxid
FODMAP	Fermentable, Oligo-, Di-, Mono-saccharides and Polyols
HBT	Hydrogen breath test
HDC	Histidine decarboxylase
HIT	Histamine intolerance
HLA	Human Leukocyte Antigens,
HNMT	Histamine N-methyltransferase
IBS	Irritable bowel syndrome
IGF-1	Inzulin like growth factor 1
IL	Interleukin
LCT	Lactase gene
LI	Lactase intolerance
LPH	Lactase-Phlorizin Hydrolase
MCM6	Minichromosome Maintenance Complex Component 6 gene
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rs	Reference SNP
SAM-e	S-adenosyl-L-methionine
SGA	Studentská grantová agentura
SNP	Single-nucleotide polymorphism
TG2	Transglutaminase 2
TL1A	Tumor necrosis factor-like cytokine 1A
TNF SF15	Tumor necrosis factor, superfamily member 15

1. Úvod

Potravinové intolerance jsou definovány jako abnormální metabolické reakce vyvolané potravinami. Mezi nejznámější patří např. citlivost na lepek nebo enzymatické defekty typu laktózové intolerance. Ve všech případech intolerancí se jedná o neimunologickou reakci, která je spuštěna složkou potravy v běžné dávce. Často se projevují zažívacími problémy, jako je nadýmání, bolest břicha, průjem nebo zácpa. V některých případech mohou být symptomy také spojeny s jinými částmi organismu, jako je kůže nebo dýchací cesty (Lomer, 2015).

I přestože jsou potravinové intolerance celosvětově rozšířeným problémem a postihují okolo 20 % populace, jejich diagnostika zůstává stále obtížná a často nejsou rozpoznány zejména z důvodu nespecifity příznaků (Tuck *et al.*, 2019). Náchylnost k potravinovým intolerancím je kromě prostředí a genetické složky ovlivněna genderem; ženy jsou postiženy intolerancí častěji než muži, ačkoli tento rozdíl není uspokojivě vysvětlen (Hrubisko *et al.*, 2021).

Mezi jedny z nejčastějších potravinových intolerancí patří intolerance laktózy, histaminu, glutenu a citlivost na FODMAP sacharidy (fermentované oligo-, di – a monosacharidy a polyoly). Laktózová intolerance je způsobena nedostatkem enzymu laktázy, který tráví laktózu obsaženou v mléčných výrobcích. Histaminová intolerance je způsobena nedostatkem enzymu diaminoxidázy (DAO), zodpovědného za odbourávání histaminu. Celiakie je autoimunitní onemocnění, které se projevuje neschopností tenkého střeva trávit gluten. Syndrom dráždivého tračníku (IBS) je běžná funkční porucha střev, která souvisí se zhoršenou absorpcí FODMAP sacharidů. Klinické projevy obvykle závisí na dávce potravin vyvolávající intoleranci (Tuck *et al.*, 2019).

Tato diplomová práce je zaměřena především na genetické predispozice asociované s potravinovými intolerancemi. Správná diagnostika je stále velice složitá, nejasná a často podceňovaná. Genetické testování by proto mohlo přispět k přesnější diagnostice a rozlišení jednotlivých intolerancí, které mohou být často zaměňovány. Hlavním cílem byla detekce konkrétních genotypů souvisejících s laktózovou intolerancí, histaminovou intolerancí, celiakií a syndromem dráždivého tračníku u jedinců trpících zejména zažívacími, ale i jinými zdravotními problémy, určení jednotlivých genotypových frekvencí v české populaci a rozpoznání možné asociace mezi výše uvedenými intolerancemi.

1.1 Laktózová intolerance

Laktózová intolerance (LI) neboli laktózová malabsorpce patří mezi jednu z nejčastějších gastrointestinálních poruch, která postihuje až 70 % celosvětové populace (Lomer *et al.*, 2008). Je charakterizována symptomy při konzumaci potravin obsahující laktózu. Laktóza je disacharid, který je za normálních podmínek rozštěpen na glukózu a galaktózu pomocí enzymu laktáza. LI nezávisí pouze na expresi laktázy, ale také na dávce konzumované laktózy, složení střevní mikroflóry či citlivosti gastrointestinálního traktu. U většiny dospělých lze příznaky připsat jednonukleotidovým polymorfismům (SNP) v genové oblasti enzymu *B-galaktosidázy*.

1.1.1 Laktóza

Laktóza (mléčný cukr) je disacharid, který je složen ze dvou monosacharidů – D – glukózy a D – galaktózy spojenými β -1-4 glykosidickou vazbou (Fassio *et al.*, 2018). Vyskytuje se ve dvou izomerních formách – α -laktóza a β -laktóza, které se od sebe liší svými chemickými a fyzikálními vlastnostmi (pH, krystalizace, teplota a rozpustnost) (Dominici *et al.*, 2022a).

Mléčný cukr slouží především jako hlavní zdroj energie mléka většiny savců, výjimku tvoří například lachtani či mroži. Poskytuje 4 kcal/g a má nízký glykemický index (Schaafsma, 2008). Proces syntézy laktózy je řízen hormonem prolaktinem, který se zvyšuje po porodu a snižuje s odstavením (Brüssow, 2013). Lidské mateřské mléko obsahuje okolo 70 g/l laktózy, která poskytuje 30-40 % kalorií novorozencům. Díky své nízké ceně a široké dostupnosti je laktóza hodně využívána jako přísada v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Vedle toho hraje také roli při vstřebávání vápníku (Deng *et al.*, 2015).

Laktóza má také zásadní vliv jako sladidlo v sladkostech a v pečivu. V potravinářství se používá se potahování bonbonů až ke zvýraznění chuti. Sladivost laktózy je rovna jedné šestině sladivosti sacharózy, a proto jí lze do potravin přidávat značné množství, čímž se zvyšuje hmotnost, aniž by se změnila sladkost (Nickerson, 1976). Díky hydroskopičnosti se používá i při pečení a zvyšuje křehkost pečených výrobků, čímž zlepšuje jejich texturu a zároveň prodlužuje trvanlivost pečiva (Facioni *et al.*, 2020).

Laktóza může být také použita jako fermentační substrát pro mikroorganismy, čehož se využívá například v uzeninách nebo kefiru. Ve farmaceutických přípravcích je díky své

chemické setrvačnosti, stability a netoxicity hojně používána jako pomocná látka, z tohoto důvodu se vyskytuje ve 20 % léků na předpis. Obsah laktózy se pohybuje okolo 100 až 200 mg na tabletu/kapsli (Dominici *et al.*, 2022b).

1.1.2 Laktáza (laktáza-florizin hydroláza)

Enzym, který umožňuje hydrolyzovat laktózu na monosacharidy, se nazývá laktáza-florizin hydroláza (LPH). Řadí se do skupiny střevních disacharidáz, které se vyskytují na kartáčkovém lemu tenkého střeva (Montgomery *et al.*, 2007). Skládá se ze dvou enzymatických míst: β -galaktosidázového místa a glykosylceramidázového místa. β -galaktosidázové místo hydrolyzuje laktózu na galaktózu a glukózu, zatímco glykosylceramidázové místo štěpí florizin na několik dietních glykolipidů (Ugidos-Rodríguez *et al.*, 2018; Forsgård, 2019).

Již v 8. týdnu těhotenství lze zaznamenat aktivitu laktázy ve střevě plodu, která se zvyšuje do 34. týdne a vrcholu dosahuje při narození (Deng *et al.*, 2015). Během kojení je laktáza klíčová pro hydrolyzu laktózy v mléce savců a hraje zásadní roli ve výživě mláďat. Po odstavení začíná její exprese klesat, a nakonec se schopnost trávit laktózu ztrácí (Szilagyi & Ishayek, 2018). Tento stav je znám pod pojmem hypolaktázie dospělého typu. Věk nástupu LI je značně individuální a liší se i mezi populacemi, přičemž u některých dětí jsou popisovány nízké hladiny laktázy již ve věku 2 let (Wang *et al.*, 1998.).

Výjimkou jsou jedinci, u kterých se vyskytují genetické mutace umožňující celoživotní perzistenci laktázy tzv. normolaktázi. Normolaktázie se vyskytuje u 30 % světové populace, ačkoli její zastoupení v regionech může být velmi rozdílné. Potomci populací, ve kterých je běžné pastevectví a domestikace dobytka, vykazují vyšší schopnost trávit mléčné výrobky po celý život. Perzistence laktázy je vysoká zejména v severoevropských populacích, naopak velmi nízká je v Asii a většině Afriky (Itan *et al.*, 2010).

Vedle endogenní aktivity laktázy v tenkém střevě vykazují stejnou aktivitu také některé mikroby tlustého střeva. Mezi tyto mikroorganismy se řadí například bakterie mléčného kvašení *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* (Forsgård, 2019).

1.1.3 Typy laktózové intolerance

Nedostatek laktázy lze rozdělit do čtyř kategorií. Prvním případem je vrozený nedostatek laktázy, kdy je tato maldigesce laktózy způsobena vzácnými recesivními genetickými mutacemi. Novorozenci nejsou schopni trávit laktózu, což má za následek výskyt klinických příznaků jako acidóza, těžké průjmy či hyperkalcémie. Tento případ intolerance je velmi vzácný a odhalí se časně se začátkem kojení. Terapií je eliminace mléka ze stravy (Saarela *et al.*, 1995; Torniainen *et al.*, 2009).

Další formou laktózové intolerance je vývojový deficit laktázy, který nastává u nedonošených novorozenců. V tomto případě mají předčasně narození novorozenci nedostatečnou střevní laktázu, což se může ale objevit i u donošených jedinců. Bylo zjištěno, že laktáza je dostupná do pěti dnů po narození (Francavilla *et al.*, 2012).

Nejběžnější nedostatkem laktázy je primární deficit laktázy u dospělých. Tento typ je spojen s několika polymorfismy v oblasti promotoru genu laktázy a jeho mechanismus je rozepsán níže (viz 1.1.6).

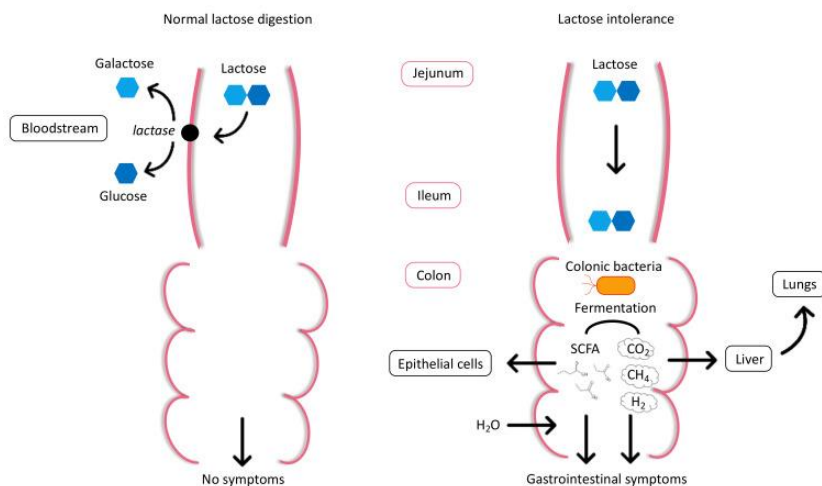
Čtvrtým případem je sekundární nedostatek laktázy způsobený atrofií střevních klků, spojené se snížením střevní laktázy a únikem laktózy do dolní části střeva. Mezi onemocnění poškozující sliznici tenkého střeva řadíme například celiakii, lymfomovou infekci, infekci rotaviry u dětí či infekci jednobuněčnými parazity (např. *Giardia*). Závažnost příznaků se liší v závislosti na postižení střeva. Pokud se nevyskytuje genetická predispozice, může se trávení laktózy po zotavení zlepšit (Szilagyi & Ishayek, 2018).

1.1.4 Fyziologie trávení laktózy

Nedostatek laktázy způsobí přítomnost neabsorbované laktózy ve střevním traktu, což vede k příznakům intolerance laktózy. Vyvolaná osmotická zátěž zvyšuje obsah vody ve střevě. Laktóza je tak snadno fermentovaná mikrobiomem tlustého střeva, a tím dochází k produkci mastných kyselin s krátkým řetězcem a plynů jako je H₂, CO₂ a methan (Misselwitz *et al.*, 2019). Princip trávení laktózy probíhající v tenkém střevě je uveden na obrázku 1.

Příznaky intolerance se nevyskytují, dokud není aktivita laktázy nižší než 50 % (Swallow, 2003). Vliv na tolerování mléčného cukru může mít také pravidelný příjem laktózy. Tato tolerance by mohla být indukovaná adaptací střevního mikrobiomu. Avšak i u lidí s non-

perzistenci laktázy může být malé množství laktózy (méně než 12 g) tolerováno, zvláště když je kombinovaná s jinými potravinami či je rozložena během dne (Deng *et al.*, 2015).



Obr. 1: Normální trávení laktózy vs. intolerance laktózy (Porzi *et al.*, 2021).

1.1.5 Příznaky laktózové intolerance

Nedostatek enzymu laktázy vede k malabsorpci laktózy, přičemž nedochází k rozštěpení tohoto disacharidu na glukózu a galaktózu, což vede k fermentaci laktózy střevním mikrobiomem. Tento proces vede k rozvoji nepříjemných klinických gastrointestinálních nebo extraintestinálních příznaků (např. únava, bolest hlavy apod.). Nejčastějšími potížemi přítomnými téměř u všech jedinců trpících laktózovou intolerancí je nadýmání, bolesti břicha a nauzea (Lomer *et al.*, 2008).

Příznaky se objevují několik hodin po konzumaci laktózy. Vzhledem k široké nabídce nemléčných potravin obsahující laktózu jako přídavnou látku není vždy jednoduché spojit příznaky LI s požitím laktózy. Problémem je také individuální citlivost jedince (Fassio *et al.*, 2018).

Intolerance malých až středních dávek laktózy může být spojena s přítomností syndromu dráždivého tračníku (IBS). V takovém případě jsou pacienti často citliví kromě laktózy i k jiným obtížně vstřebatelným cukrům označovaným jako „FODMAPs“ (Misselwitz *et al.*, 2019).

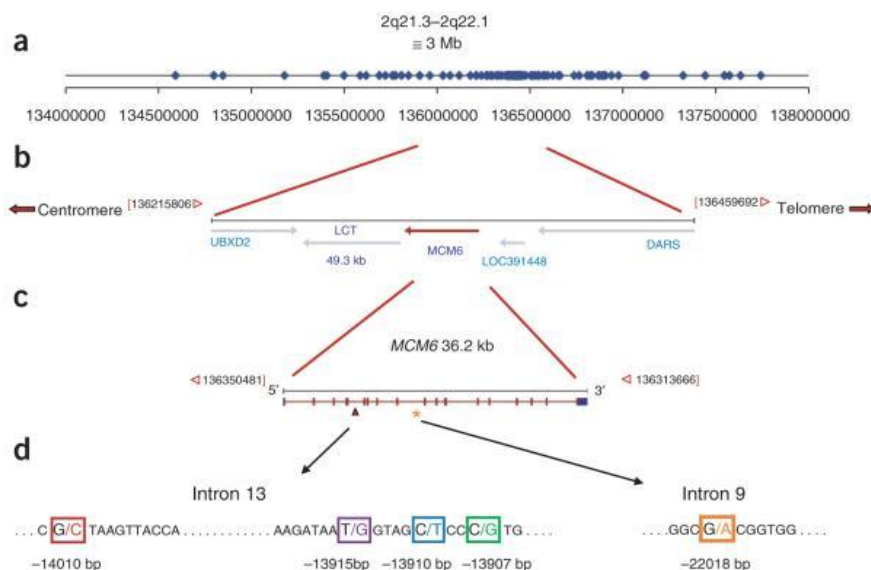
1.1.6 Genetika laktóзовé intolerance

Bylo zjištěno, že laktózová perzistence je řízena geneticky. Lidský laktázový gen o velikosti 49 kb se nachází na 2. chromozomu v oblasti 2q21. *LCT* gen obsahuje 17 exonů, což vede ke vzniku 6 kb transkripčního produktu. Od iniciačního kodonu po stop kodon kóduje *LCT* mRNA 1927 aminokyselin tvořící kompletní translační produkt (Boll *et al.*, 1991).

Exprese laktázy v kavkazské populaci je striktně spojena s jednonukleotidovým polymorfismem C/T–13910 (rs4988235). Tento polymorfismus se objevuje ve variantách CC, CT nebo TT. Genotyp CC byl prokázán jako prediktor poklesu střevní laktázy, a proto je asociován s hypolaktázií. Naopak genotyp TT je spojen s celoživotní perzistencí aktivity laktázy. Heterozygotní varianta CT je charakterizována přítomností středních úrovní exprese laktázy, které jsou obvykle dostatečné pro trávení laktózy. Většina laktázové mRNA přítomné u heterozygotní varianty s přetrvávající laktázovou aktivitou pochází pouze z jedné alely T (Fassio *et al.*, 2018; Itan *et al.*, 2010).

Jediná změna T alely na pozici 13910 v intronu 13 genu *MCM6* umožňuje syntézu laktázy. Transkripční kontrola *LCT* genu zabraňuje jeho down-regulaci. Naopak alela C v pozici 13910 je metylována a transkripce enzymu inhibována (Szilagyi & Ishayek, 2018).

Dalším významným polymorfismem souvisejícím s expresí laktázy je G/A–22018 (rs182549), ten je asociován s více než 95 % neaktivitou laktázy např. ve finské populaci. V jiných populacích je perzistence laktázy asociována s několika dalšími polymorfismy, v Saudské Arábii s polymorfismem G–13915 a u afrických kmenů s polymorfismy G–14010, G–13915 a G–13907. Tento fakt naznačuje nezávislý vývoj perzistence laktázy v různých oblastech světa (Deng *et al.*, 2015; Fassio *et al.*, 2018). Na obrázku 2 jsou vyznačeny důležité jednonukleotidové polymorfismy v genu *MCM6*.



Obr. 2: Jednonukleotidové polymorfismy asociované s laktózovou intolerancí (Tishkoff *et al.*, 2007).

1.1.7 Intolerance laktózy a střevní mikrobiom

Další významný faktor ovlivňující průběh LI je střevní mikrobiom, který ovlivňuje závažnost klinických příznaků. Lidský střevní mikrobiom a jeho geny jsou schopné fermentovat nestrávenou laktózu. Mezi jednotlivci se tato fermentační schopnost liší v závislosti na individuálním složení mikrobiomu tlustého střeva (Lomer *et al.*, 2008). Zlepšení či zhoršení příznaků LI závisí právě na množství určitých kmenů bakterií. Bakterie schopné účinně fermentovat laktózu, snižují laktózový osmotický šok vedoucí k průjmům, což může vést ke zvýšenému množství plynů. Při převládání metanogenních archebakterií se oxid uhličitý mění hlavně na metan. Střevní mikroflóra může být suplementována a byl nalezen pozitivní vztah mezi probiotiky obsahující konkrétní kmeny bakterií a intolerancí laktózy. Rozdíly ve složení mikrobiomu mohou vysvětlit různé průběhy LI u stejných fenotypů (Anguita-Ruiz *et al.*, 2020).

Interakce mezi lidskými geny a mikrobiomem již byla v odborné literatuře popsána. Je známa asociace mezi jednonukleotidovým polymorfismem C/T-13910 (rs4988235) a množstvím bakterie *Bifidobacterium*. Toto zjištění může mít praktické uplatnění pro léčbu LI, protože mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) produkované mikrobiální fermentací laktózy se účastní imunitní regulace, glukózové a lipidové homeostázy, diferenciace kolonocytů pro homeostázu a ovlivňují také modulaci střeva a mozku (Misselwitz *et al.*, 2019).

1.1.8 Diagnostika

Diagnóza LI je částečně závislá na výskytu gastrointestinálních symptomů po požití laktózy, z nichž nelze všechny objektivně posoudit z důvodu překryvu s jinými intolerancemi či onemocněními. Existuje však několik klinických diagnostických metod umožňujících určit schopnost jedince absorbovat laktózu z potravy.

Pro diagnostiku laktózové intolerance *in vitro* je využívána biopsie jejunu. Tento test lze použít také k vyloučení jiných gastrointestinálních onemocnění. Aktivita laktázy je nepravidelná a pro optimální přesnost testu je potřeba více než jedna biopsie. Tato metoda se téměř výhradně používá pro klinický výzkum z důvodu vysoké ceny, invazivity či nutnosti speciálního vybavení (Maiuri *et al.*, 1994).

Vodíkový dechový test (HBT) je založen na množství vydechovaného a znovu zachyceného vodíku každých 30 minut po podání perorální laktózy. Obvykle se jedná o dávku 25 g (přibližně 500 ml mléka). Neabsorbovaná laktóza je fermentována střevním mikrobiomem za vzniku vodíku, který je poté částečně vylučován dýchacím systémem. Za pozitivní výsledek se považuje hladina vodíku ve vydechovaném vzduchu alespoň o 20 ppm vyšší než normální hladina vodíku před požitím laktózy (Furnari *et al.*, 2013; Law *et al.*, 2010). I přestože je tento test relativně senzitivní a specifický, může poskytnout falešně negativní výsledky z důvodu nedávného podávání antibiotik či z důvodu bakteriálního přerůstání tenkého střeva. Např. metanogenní bakterie přeměňují vodík na metan v poměru 4:1, což vede k nižšímu vylučování vodíku a falešně negativním výsledkům (Misselwitz *et al.*, 2019).

Pro diferenciální diagnostiku mezi primární a sekundární hypolaktázií se používá genetické testování jednonukleotidových polymorfismů (C/T–13910 a G/A–22018) zejména v kavkazské populaci. Detekce těchto polymorfismů je spojena s vysokou senzitivitou (97 %) a specifitou (95 %) v porovnání s HBT. Tento test lze provádět z bukalních stěrů či periferní krve a je proto jednoduchý a pohodlný (Fassio *et al.*, 2018). Genetika LI je ale složitější u pacientů s africkým nebo asijským původem, a proto není genetické testování u těchto populací doporučováno (Misselwitz *et al.*, 2019).

1.2 Histaminová intolerance

Histaminová intolerance (HIT) je celosvětově rozšířeným problémem, kterým trpí odhadem 1% populace, zejména ženy středního věku. Její diagnostika lékařům často uniká, a to hlavně z důvodu nestálosti a různorodosti projevů (Fuchs *et al.*, 2011). HIT vzniká v důsledku nerovnováhy mezi nahromaděným histaminem a schopností histamin odbourávat. Exogenní histamin je odbouráván pomocí enzymu diaminoxidázy (DAO), která je syntetizována enterocyty, placentou či ledvinami (Shulpekova *et al.*, 2021).

1.2.1 Histamin

Histamin (2-[4-imidazolyl] ethylamin), biogenní amin běžně přítomen v lidském těle, má mnoho fyziologických i patologických funkcí (Barger & Dale, 1910). Podílí se na kontrakcích buněk hladkého svalstva, zvýšené propustnosti cév, hojení ran, hemopoéze, je důležitým neurotransmiterem a hraje roli v regulaci rytmu dne a noci. Kromě toho způsobuje poruchy srdečního rytmu a ovlivňuje krevní tlak, zvyšuje sekreci hlenu a sekreci žaludeční kyseliny (Kovacova-Hanuszkova *et al.*, 2015; Smolinska *et al.*, 2022).

Histamin může být syntetizován nebo uvolňován velkou škálou buněk včetně žírných buněk, bazofilů, krevních destiček, dendritických buněk, T buněk, histaminergních neuronů a dalších (Panula *et al.*, 2015). Buněčnými zdroji histaminu jsou primárně žírné buňky a bazofily, u kterých je v Golgiho aparátu L-histidin dekarboxylován na histamin pomocí histidindekarboxylázy (HDC), kofaktorem je zde vitamín B6 (pyridoxalfosfát). Vznikající histamin je ukládán v cytoplazmatických granulích společně s dalšími aminy, proteázami, cytokiny a angiogenními faktory. Žírné buňky jsou přítomny ve střevech, kůži a dalších orgánech, které jsou proto bohaté na histamin (Zhao *et al.*, 2022).

Pokud jsou žírné buňky a bazofily sensibilovány a degranulovány, dochází uvolnění histaminu. K degranulaci dochází navázáním specifického antigenu na FcRI receptor a také při reakci na neimunní stimuly (neuropeptidy, cytokiny, faktor aktivace destiček a další). Histamin aktivuje čtyři receptory spřažené s G proteinem (H1R, H2R, H3R a H4R), díky kterým uplatňuje své biologické vlastnosti. Uvolňování histaminu může být způsobeno také enviromentálními: chemickými a fyzikálními faktory jako jsou extrémní teploty, trauma nebo alkohol (Borriello *et al.*, 2017; Zhang & Kurashima, 2021).

1.2.2 Extracelulární histamin (dietní histamin)

Asi 5 % celkového histaminu je přijímáno v potravě či produkováno střevními mikroorganismy (tzv. exogenní histamin). Mezi potraviny bohaté na histamin patří zejména ryby a mořské plody, zrající či fermentované potraviny (sýry, nakládané okurky) či zelenina (lilek, rajčata, špenát) (Sánchez-Pérez *et al.*, 2018). Histidin je vyráběn především bakteriálními či autolytickými procesy, proto jsou potraviny bohaté na histamin produkty bakteriální fermentace (Zhao *et al.*, 2022). K vytvoření biogenních aminů (histaminu) v potravinách je nutná přítomnost volných aminokyselin, mikroorganismů obsahující dekarboxylázu (HDC) a vhodné podmínky pro bakteriální růst a aktivitu dekarboxylázy. U mnoha gram pozitivních i gram negativních bakterií byly prokázány geny kódující HDC (Krell *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022).

Biogenní aminy mohou být přítomny ve větším či menším množství v jakékoli potravíně. Akumulace biogenních aminů se zvyšuje skladováním a je zcela závislá na mikroorganismech. Během skladování potravin se vytváří histamin zejména u těch s vysokým obsahem L-histidinu. Obecně platí, že čím čerstvější potravina, tím menší pravděpodobnost tvorby aminů (Nei, 2014). Na vliv metabolismu histaminu mají vliv diaminy, putrescin a kadaverin, které jsou štěpeny pomocí DAO přednostně. Potraviny obsahující biogenní aminy jsou rizikové a při nízkohistaminové dietě by měly být eliminovány (Comas-Basté *et al.*, 2020).

Hladiny histaminu ve střevě mohou být ovlivněny zánětlivými a alergickými reakcemi, které vedou ke změně aktivity enzymů degradujících či syntetizujících histamin (Smolinska *et al.*, 2022).

1.2.3 Metabolismus histaminu

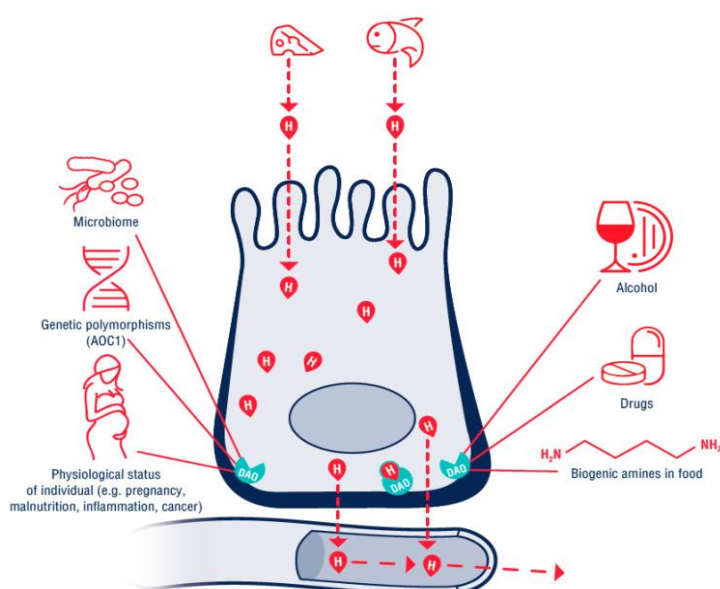
Histamin je v organismu metabolizován dvěma cestami. První klinicky významnější je enzymatická degradace pomocí enzymu diaminooxidáza (DAO). Druhá cesta degradace je pomocí histamin – N- methyltransferázy (HNMT).

Hlavní roli v metabolismu exogenního histaminu hraje DAO. Tento enzym obsahuje měď a je zodpovědný za degradaci histaminu z extracelulárního prostoru. DAO je primárně syntetizována v epitelálních buňkách tenkého střeva, placentě a ledvinách. Plní také bariérovou funkci a zamezuje tak průchodu histaminu ze střev do krve (Shulpekova *et al.*, 2021 ;Zhao *et al.*, 2022). Histamin je pomocí DAO přeměněn na kyselinu imidazoloctovou,

její 2/3 se vážou na ribózu a jsou vylučovány močí, zbytek je vyloučen ve své původní formě (Zhao *et al.*, 2022).

Během trávení je DAO stále syntetizována ve sliznici tenkého střeva. HIT nastává tehdy, pokud je histamin akumulován a následně se dostává do oběhu v důsledku snížené aktivity DAO na úrovni epitelu střeva. (Hrubisko *et al.*, 2021).

Aktivita a plazmatická hladina DAO může být ovlivněna fyziologickým stavem organismu, složením mikrobiomu, nemocemi spojenými se snížením tohoto enzymu, léky, potravinami inhibující DAO či potravinami podporujícími uvolňování histaminu a v neposlední řadě také genetickými jednonukleotidovými polymorfismy (Schnedl *et al.*, 2021; Maintz *et al.*, 2011; Comas-Basté *et al.*, 2020; Schink *et al.*, 2018). Na obrázku 3 jsou shrnuty faktory ovlivňující aktivitu DAO.



Obr. 3: Funkce DAO v enterocyty. Faktory, které přímo nebo nepřímo ovlivňují aktivitu DAO (Hrubisko *et al.*, 2021).

1.2.4 Příčiny histaminové intolerance

Patogeneze histaminové intolerance je spojena s vrozeným nebo získaným deficitem enzymu DAO. Vrozený nedostatek je způsoben zejména polymorfismy v genu *AOC1*. Tyto polymorfismy mohou snižovat (rs2052129, rs2268999, rs10156191, rs1049742) nebo naopak zvyšovat (rs2071514, rs1049748 a rs2071517) aktivitu DAO (Maintz *et al.*, 2011).

Získaný nedostatek DAO může být asociován se střevními onemocněními jako je celiakie, LI či jiné zánětlivé onemocnění. K rozvoji přispívají i léky. Okolo 20 % Evropanů užívá léky snižující hladiny DAO, a tím zvyšují riziko histaminové intolerance. Důležitou roli v rozvoji HIT hraje také složení střevního mikrobiomu (Leitner *et al.*, 2014; Maintz & Novak, 2007). Mezi další faktory zvyšující citlivost na požití histaminu řadíme alkohol, který blokuje DAO a může uvolňovat endogenní histamin nebo podvýživa vedoucí k insuficienci vitamínu C, mědi či vitamínu B6 (Hrubisko *et al.*, 2021).

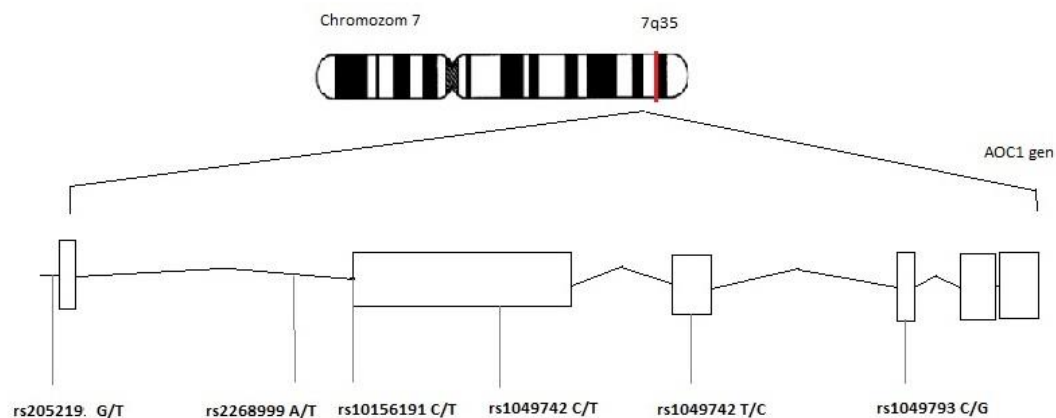
1.2.5 Genové polymorfismy

Enzym DAO je kódován genem *AOC1* (Amino Oxidase Cooper Containing 1), který se nachází na chromozomu 7q35, obsahuje pět exonů a čtyři introny o celkové velikosti přibližně 10 kb. Aktivita DAO v séru byla významně asociována několika jednonukleotidovými polymorfismy v genu *AOC1*. V tabulce I jsou uvedeny polymorfismy související s aktivitou DAO.

Tab. I: Polymorfismy v genu *AOC1* související s aktivitou DAO.

Gen	Název	SNP	Minoritní alela	Aktivita DAO
<i>AOC1</i>	DAO1	rs10156191	T	Snížená aktivita DAO
	DAO2	rs1049742	T	Snížená aktivita DAO
	DAO3	rs1049748	C	Zvýšená aktivita DAO
	DAO4	rs1049793	G	Snížená aktivita DAO
	DAO5	rs2052129	T	Snížená aktivita DAO
	DAO6	rs2268999	T	Snížená aktivita DAO

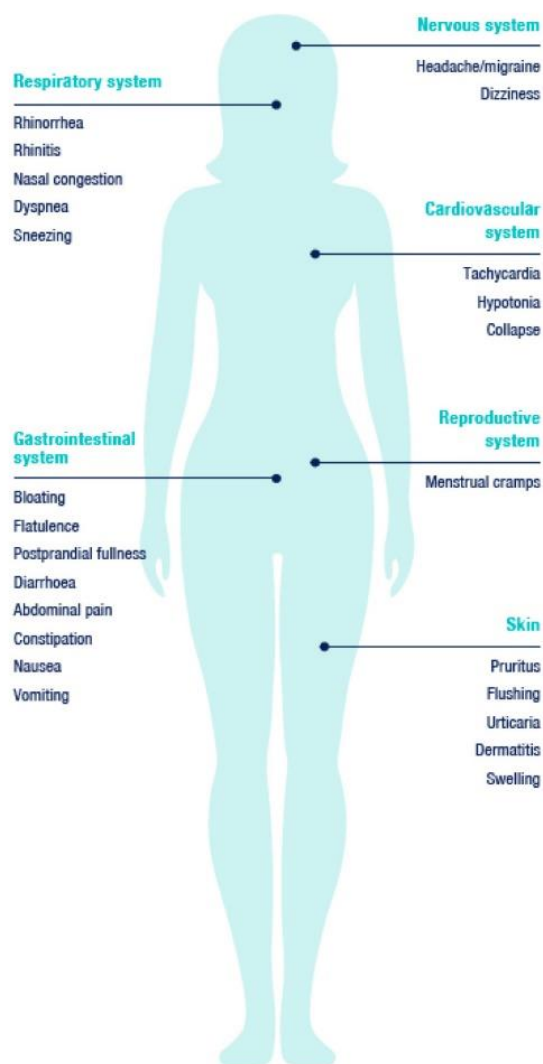
Snížená aktivita byla spojena s rs2052129, rs2268999, rs10156191 a rs1049742 a rs1049742. Na druhou stranu zvýšená aktivita byla asociována s rs104974. Promotorový polymorfismus rs2052129 a dva další polymorfismy (rs2268999, rs1015619) spolu silně korelují. Schématická organizace polymorfismů je uvedena na obrázku 4. U jedinců se dvěma minoritními alelami je riziko HIT přibližně dvojnásobné v porovnání s heterozygoty. Závěrem lze říct, že varianty genu *AOC1* silně ovlivňují expresi a aktivitu DAO, ale samy o sobě nestačí k plnému rozvinutí HIT, což naznačuje nutnou souhru genetických a environmentálních faktorů (Maintz *et al.*, 2011).



Obr. 4: Schématické zobrazení polymorfismů genu *AOC1*, (vytvořeno dle <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

1.2.6 Klinické příznaky

Vzhledem ke svým nespecifickým projevům je HIT velmi často zaměňována s jinými diagnózami jako jsou například další potravinové intolerance, syndrom dráždivého tračníku, celiakie či systémová mastocytóza. Hromadění exogenního histaminu má za následek řadu nepříjemných různorodých klinických příznaků spojovaných s distribucí čtyř typů histaminových receptorů v různých tkáních. Mezi nejčastější projevy patří projevy gastrointestinální (projevy plnosti po jídle, nadýmání, průjem, bolesti břicha), poruchy nervového a kardiovaskulární systému (migrény, bušení srdce, závratě), respirační a dermatologické příznaky (Schnedl *et al.*, 2019). Histaminová intolerance může být také základem rozvoje atopického ekzému (Maintz *et al.*, 2006). Klinické příznaky histaminové intolerance jsou shrnuty na obrázku 5.



Obr. 5: Klinické příznaky histaminové intolerance (Hrubisko *et al.*, 2021).

1.2.7 Snížená aktivita DAO a jiné střevní problémy

Primárním problémem nemusí být nutně jen samotná histaminová intolerance, může se jednat o zánětlivé onemocnění střev asociované s HIT. Např. jedinci s ulcerózní kolitidou měli ve sliznici tlustého střeva prokazatelně sníženou aktivitu DAO. Průběh ulcerózní kolitidy souvisel s přítomností jednonukleotidových polymorfismů v genu *AOC1* (Palacios *et al.*, 2009). Podobné střevní a extraintestinální symptomy jako u histaminové intolerance byly pozorovány také u neceliakální citlivosti na lepek. HIT se může velmi pravděpodobně vyskytovat také u jedinců s celiakií, kteří nereagují na léčbu (Maintz & Novak, 2007).

1.2.8 Diagnostika

Hlavním problémem diagnostiky HIT je fakt, že příznaky vyvolané histaminem jsou nespecifické a překrývají se s jinými intolerancemi či chronickými poruchami jako je například Crohnova choroba. Prvním krokem by proto mělo být vyloučení těchto chorob či IgE zprostředkovaných alergií (Hrubisko *et al.*, 2021). Diagnostika HIT je stále náročná, protože chybí standardizované diagnostické testy. HIT má sice původ ve snížené aktivitě DAO, avšak referenční hodnoty pro DAO v séru nebyly dosud stanoveny (Boehm *et al.*, 2017). Navíc naměřená hodnota DAO v séru nutně nemusí korelovat se skutečnou hladinou DAO ve střevní sliznici. Diagnostiku HIT proto mohou podpořit genetické testy.

Enzymatická aktivita DAO v séru je stále nejstudovanějším a nejčastějším diagnostickým přístupem. Testy jsou založené na měření množství histaminu rozkládajícího se v krvi po určitou dobu pomocí metody ELISA (imunoanalýza) nebo RIA (radioanalýza). Hodnota DAO rovna 10 U/ml se považuje za hraniční pro rozvoj HIT (Manzotti *et al.*, 2016). I přestože bylo prokázáno, že je ELISA schopna kvantifikovat DAO, u některých pacientů se nepotvrdil vztah mezi aktivitou DAO v séru a klinickými příznaky typickými pro histaminovou intoleranci (Boehm *et al.*, 2017). Vysvětlením tohoto jevu může být přirozeně se měnící hladina DAO v čase (Pinzer *et al.*, 2018).

Další možností je měření aktivity DAO přímo ve střevní sliznici, které lze považovat za spolehlivé. Pro toto vyšetření je ovšem nutná biopsie tlustého střeva při kolonoskopii. Význam této diagnostiky bude nutné dále zkoumat z důvodu nedostatečných údajů (Comas-Basté *et al.*, 2020).

Pro diagnostiku HIT se používají také kožní testy. Výsledky kožního prick testu jsou na rozdíl od standardního prick testu vyhodnocovány po delší době. Zarudnutí odeznívá u symptomatických pacientů ve srovnání s kontrolami později. Limitem tohoto testu je obtížné odlišení HIT od jiných alergií, navíc test nutně neodráží degradaci histaminu v tenkém střevě (Hrubisko *et al.*, 2021).

Histaminový provokační test určuje množství histaminu, kterým lze vyvolat u testovaného jedince příznaky. Hlavním omezením je neschopnost odhadnout množství histaminu v potravinách a nepřetržitý dohled specializovaného personálu po dlouhou dobu. Provokační dávka byla určena na 75 mg histaminu, což by měla být dávka neškodná pro zdravého jedince (Reese *et al.*, 2017).

Genetické testování jednonukleotidových polymorfismů v genu *AOC1* kódující DAO je neinvazivní a rychlý test, který je schopen podpořit výsledky dalších diagnostických testů a doplnit informace o genetické predispozici související s aktivitou DAO ve střevní sliznici. Je známo několik polymorfismů, které jsou spojeny s aktivitou DAO, které byly uvedeny v kapitole 1.2.5.

1.2.9 Léčba HIT

Nízkohistaminová dieta byla vyvinuta ke snížení až eliminaci příznaků HIT. Je třeba se vyhnout nejen potravinám s vysokým obsahem histaminu, ale i potravinám či lékům, které uvolňují histamin nebo inhibují DAO. Různé nízkohistaminové diety se liší, ale u všech jsou důsledně vyloučeny fermentované potraviny (Hrubisko *et al.*, 2021).

Další možností je doplnění enzymu DAO, který může být suplementován v podobě tablet. Během orálního podávání došlo ke zlepšení gastrointestinálních, respiračních, kožních a kardiovaskulárních příznaků. Ke zvýšení hladin DAO může přispět rovněž užívání vitamínu C a vitamínu B6 (Comas-Basté *et al.*, 2020).

Po požití velkého množství histaminu lze použít antagonisty H1 a H2-receptorů, které ale nejsou doporučovány k dlouhodobé léčbě HIT. Většina antihistaminik neovlivňuje aktivitu DAO, ale některé ji jsou schopny inhibovat nebo zvyšovat (Reese *et al.*, 2017).

1.3 Intracelulární mozkový histamin

Histamin působí v mozku jako neurotransmitter, podílí se na regulaci zánětu, sekrece žaludeční kyseliny a neuromodulace. Reguluje cyklus spánku – bdění, smysl pro odměnu, emoce a učení (Nuutinen & Panula, 2023).

Bylo zjištěno, že během embryonálního vývoje mozku potkana dosahuje histamin vrcholu v období diferenciaci neuronů, což naznačuje, že histamin působí jako neurogenní faktor (Molina-Hernández *et al.*, 2012). Normální bazální plazmatické koncentrace histaminu jsou stanoveny v rozmezí 0,3–1,0 ng/ml, při překročení těchto hladin dochází ke vzniku symptomů zprostředkovaných histaminem v závislosti na jeho koncentraci. Hladiny histaminu v mozku jsou mírně nižší s porovnáním s jinými biogenními aminy, avšak jejich obrat je

rychlejší. Jakmile se histamin uvolní, musí být během několika minut deaktivován pomocí HNMT (Heidari *et al.*, 2015).

1.3.1 HNMT (histamin-N-metyltrasferáza)

V mozku je histamin degradován výhradně pomocí histamin-N-metyltrasferázy (HNMT), která zde zodpovídá za ukončení neurotransmiterových procesů. Jedná se o cytoplazmatický protein patřící do superrodiny metyltransferáz. HNMT katalyzuje metylaci histaminu v přítomnosti S-adenosylmethioninu a vzniká N-tele-methylhistamin (Lindahl, 1960). Předpokládá se, že z důvodu špatně fungujícího HNMT, bude vysoká zbytková hladina histaminu v mozku, což může vést k nepříjemným klinickým příznakům jako je agresivní chování a abnormality v cyklu spánku a bdění (Naganuma *et al.*, 2017). Vedle tohoto je HNMT také klíčovým enzymem degradace histaminu v bronchiálním epitelu (Heidari *et al.*, 2015). HNMT je nejvíce exprimován v ledvinách, játrech, slezině, tlustém střevě, prostatě, vaječnících, průduškách a průdušnicích.

1.3.2 Genové polymorfismy HNMT

Lidský gen *HNMT* kóduje protein o velikosti 33 kDa skládající se z 292 aminokyselin. Bylo prokázáno, že migrény, ADHD, Parkinsonova choroba či intelektuální poruchy souvisí s jednonukleotidovými polymorfismy v genu *HNMT*. Nejvýznamnější a nejvíce prozkoumanými polymorfismy jsou rs11558538 a rs105089 (Yoshikawa *et al.*, 2019).

Jednonukleotidový polymorfismus rs11558538 v exonu 4 nahrazuje threonin za isoleucin v kodonu 105 vedoucí ke snížení enzymatické aktivity HNMT. Tento polymorfismus má za následek změnu struktury a dynamiku aktivního místa enzymu. Minoritní alela T je asociována s rozvojem migrén a zároveň by mohla mít ochrannou roli v rozvoji Parkinsonovy choroby (Jiménez-Jiménez *et al.*, 2016).

Minoritní alela G u rs1050891 zvyšuje stabilitu mRNA HNMT, čímž zvyšuje jeho enzymatickou aktivitu (Yoshikawa *et al.*, 2019). Absence minoritní alely souvisí se zvýšenou koncentrací histaminu v mozku a ten může zhoršovat chování dětí s ADHD v souvislosti s potravinovými aditivy jako je například karmosin, benzoát sodný, chinolinová žluť a další (Stevenson *et al.*, 2010). Přítomnost alely G (genotyp GG a GA) byla také spojena se

sníženým rizikem rozvoje aspirinem indukované chronické kopřivky v porovnání s genotypem AA (S. H. Kim *et al.*, 2009).

1.3.3 Diagnostika

Měření intracelulárního HNMT není možné, proto se diagnostika provádí pouze testováním jeho genetické variability, která mění jeho enzymatickou aktivitu.

1.3.4 Léčba

Ke zvýšení aktivity HNMT může přispět S-adenosyl-L-methionin (SAM-e), který během methylačních procesů daruje methylové skupiny. HNMT pak inaktivuje histamin methylací, proto SAM-e může zvýšit jeho aktivitu (Foster, 2019).

K zabránění uvolňování histaminu přispívá theanin, aminokyselina vyskytující se v zeleném nebo černém čaji. Theanin prochází hematoencefalitickou bariérou, a proto může být účinnější než ostatní přírodní antihistaminika (Kim *et al.*, 2012).

1.4 Celiakie

Celiakie neboli celiakální sprue je chronické autoimunitní onemocnění postihující zejména tenké střevo. Je charakterizována slizničními lézemi tenkého střeva, atrofií střevních klků a malabsorpcí živin. Spouštěčem celiakie je konzumace lepku ve stravě u predisponovaných nebo gluten-senzitivních jedinců. K rozvinutí onemocnění je nezbytná genetická predispozice a přítomnost lepku ve stravě. V běžné populaci má prevalenci 0,3 až 1,5 % a může se projevit v jakémkoli věku.

1.4.1 Lepek

Lepek (latinsky gluten = lepidlo) představuje nejvýznamnější protein obilného zrna. Vyskytuje se v pšenici, žitu, ječmeni, ovsu, ale i v příbuzných druzích obilovin a jejich hybridech jako je špalda, emmer a další (Akhondi & Ross., 2023). Jedná se o komplexní směs stovek příbuzných, ale i odlišných proteinů, především gliadinu a gluteninu. Souhrnně se proteiny gliadinu a gluteninu označují jako prolaminy, které jsou charakterizovány vysokým

podílem glutaminu a prolinových zbytků. Funkční vlastnosti lepku závisí právě na poměru gluteninů a gliadinů. Lepkové proteiny mohou být rozděleny dle svých primárních struktur na α , β , γ a ω gliadiny (Wieser, 2007).

Lepek působí jako pojivo, je tepelně stabilní a dodává potravinám jedinečné vlastnosti jako je zlepšení textury, chuti či udržení vlhkosti, a proto je hojně využíván jako přísada do průmyslově zpracovaných potravin. Kromě pečiva, je lepek obsažen také ve zpracovaném mase a vegetariánských náhražkách. Jako zahušťovadlo či emulgátor se lepek objevuje také v bonbonech, zmrzlinách, nádivkách, dresincích a jako plnivo se využívá v lécích či sladkostech (Kucek *et al.*, 2015).

Gliadin obsahuje mnoho aminokyselin (např. prolin a glutamin), které mnoho proteáz neumí štěpit, a proto vznikají zbytky bohaté na prolin vytvářející těsné a kompaktní struktury, které se podílí na imunitních reakcích u celiakie. Reakci zprostředkovanou T buňkami spouští až několik stovek lepkových peptidů, které jsou tzv. imunogenní. Ze všech peptidů stimulující odpověď T-buněk, může pacient s celiakií reagovat pouze na několik. Nejvíce problematický imunodominantní T-buněčný epitop vzniká z α gliadinu (Biesiekierski, 2017).

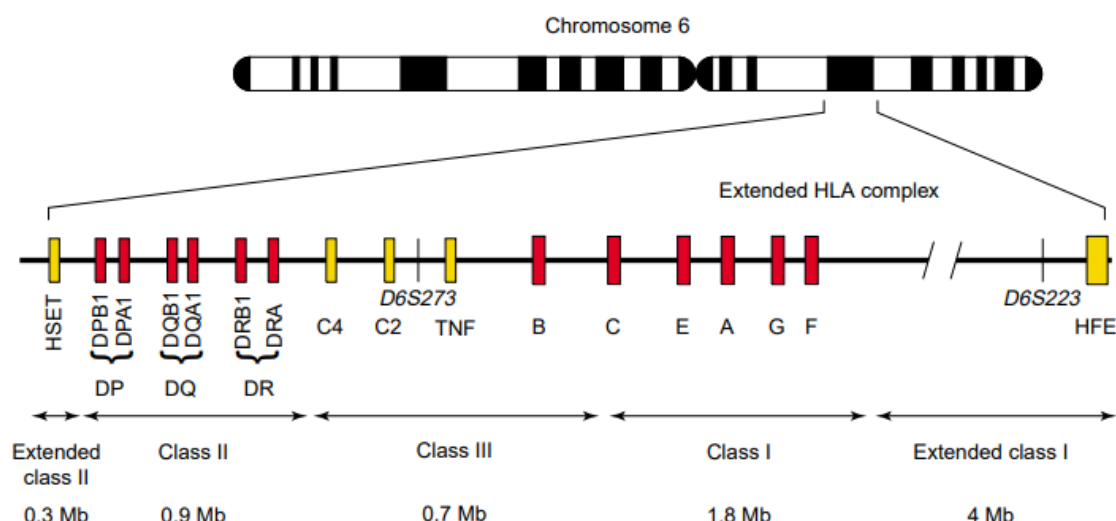
1.4.2 Celiakie a genetika

Celiakie má multifaktoriální dědičnost, proto nejde jen o konkrétní mutaci jednoho genu, ale jejich kombinaci. Specifické alely hlavního histokompatibilního komplexu HLA-DQ2 a HLA-DQ8 (označované také jako CELIAC1) umístěné na chromozomu 6p21 jsou jedním z nejdůležitějších dědičných faktorů vedoucí k rozvoji celiakie. Jedná se o molekuly třídy HLA II, jež jsou zodpovědné za prezentaci glutenových peptidů T buňkám specifickým pro lepek (Megiorni & Pizzuti, 2012).

HLA oblast je zřejmě zodpovědná jen za 40 % dědičnosti, což naznačuje, že se na rozvoji celiakie podílí i další geny, a to konkrétně tři chromozomální oblasti: CELIAC2 (5q31-q33), CELIAC3 (2q33) a CELIAC4 (19p13.1). Mezi další geny přispívající ke zvýšenému riziku celiakie patří geny kódující cytokiny, chemokiny, jejich receptory či aktivátory T- a B-buněk (Sahin & Mermer, 2022).

1.4.3 HLA geny

HLA I. a II. třídy kódují buněčné glykoproteiny, které hrají klíčovou roli při prezentaci antigenu. HLA systém je asociován s rozvojem mnoha autoimunitních chorob včetně celiakie. Heterodimery HLA II. třídy jsou specifikované geny v oblasti HLA-D zahrnující HLA-DP (DPA1 a DPB1), DR (DRB1 a DRA) a DQ (DQA1 a DQB1) (Thorsby, 2009). Organizace HLA genů je popsána na obrázku 6.



Obr. 6: HLA komplex a některé jeho geny (Undlien *et al.*, 2001).

Kolem 90 % pacientů trpící celiakií je nositelem heterodimeru HLA-DQ2 kódovaného genovými alelami DQA1*05 a DQB1*02, které mohou být zděděny společně na stejném chromozomu (cis konfigurace) nebo na dvou homologních chromozomech odděleně (trans konfigurace). Bylo zjištěno, že dvojitá dávka DQB1*02 vede ke zvýšenému riziku a agresivnější formě celiakie. Pacienti, kteří nenesou heterodimer DQ2 (5-10 %), jsou nositeli heterodimeru DQ8, který je kódován alelami DQB1*03:02 a DQA1*03. DQ2.5/DQ8-negativní celiaci nesou molekulu DQ2.X, která je kódována alelou DQB1*02 v nepřítomnosti DQA1*05. Velmi malé množství pacientů s celiakií nese DQX.5 kódované alelou DQA1*05 v nepřítomnosti variant DQB1*02 nebo *03:02 (Helene Arentz-Hansen *et al.*, 2000; Megiorni & Pizzuti, 2012).



Obr. 7: Rizikové DQ heterodimery asociované s celiakií (Megiorni & Pizzuti, 2012).

1.4.4 Patofyziologie celiakie

Po konzumaci lepku jsou gliadinové peptidy deaminovány střevními transglutaminázami 2 (TG2). Vzniká gliadinem modifikovaný epitop, který má vysokou afinitu k HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 na buňkách prezentující antigen (APC). Prezentace gliadinových peptidů CD4⁺ T lymfocytům, zprostředkovaná díky HLA-DQ, stimuluje imunitní a humorální reakce a dochází k uvolnění cytokinů (především TNF- α , IFN- γ , IL-2) a metaloproteináz (MMP). Tato kaskáda vede k atrofii střevních klků, aktivaci B lymfocytů, produkci protilátek proti lepku a autoproti látek namířených proti TG2 a TG2-gluten. Gluten specifické paměťové buňky CD4 reagují na příjem lepku do 6 hodin uvolněním zánětlivých mediátorů (Dieckman *et al.*, 2022). Gliadin urychluje rozklad mezibuněčných funkčních proteinů. Ztráta střevní bariéry je pak doprovázena propustností střeva pro molekuly, které se dostanou do krevního řečiště (Giuffrè *et al.*, 2022; Megiorni & Pizzuti, 2012).

1.4.5 Celiakie a střevní mikrobiom

Rozvoj a průběh celiakie by mohl být asociován se střevním mikrobiomem a dle současných důkazů se bakterie *Lactobacillus* a *Bifidobacterium* přímo podílí na rozkladu lepku (Caminero *et al.*, 2014). V porovnání se zdravými jedinci byl u pacientů s celiakií

zaznamenám nárůst potenciálně patogenních gramnegativních druhů bakterií (*Bacteroides*, *E. coli*) a naopak snížení přínosných grampozitivních bakterií (*Lactobacillus* a *Bifidobacterium*). Změny střevního mikrobiomu mohou souviset s permeabilitou střevní bariéry (Nadal *et al.*, 2007).

Lactobacily by mohly mít využití v budoucí léčbě díky své schopnosti hydrolyzovat toxický gliadinový peptid. Přidáním *Laktobacilů* do kvásku pro fermentaci došlo k lýze lepkového peptidu a tím došlo ke snížení imunotoxicity. Z pilotní studie vyplývá, že byl tento chléb dobře tolerován pacienty s celiakií (Francavilla *et al.*, 2017).

Předpokládá se, že alely HLA-DQA1 a HLA-DQB1 ovlivňují složení mikrobiomu a bylo zjištěno, že předpovídají příznivou odpověď na bezlepkovou dietu také u pacientů s IBS (Ivanova *et al.*, 2023).

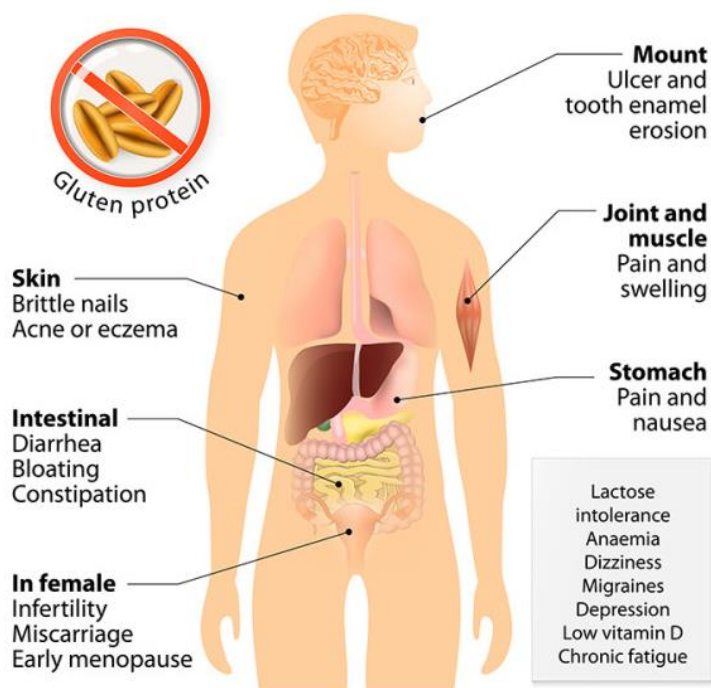
1.4.6 Příznaky celiakie

Symptomy celiakie jsou často prezentovány „modelem ledovce“, kde hrot prezentuje pacienty s klasickou malabsorpcí, naopak netypické symptomy jsou zahrnuty do jeho větší „neviditelné“ části (Megiorni & Pizzuti, 2012).

Dříve byla celiakie považována za vzácné onemocnění postihující převážně děti, nyní je uváděna prevalence onemocnění u 1-2 % celosvětové populace. Klinický obraz je variabilní a zahrnuje širokou škálu příznaků. Nástup onemocnění bývá spojen s postupným ubýváním svalové hmoty, tuku a syndromem malabsorpce. U pacientů se mohou vyskytovat základní komplikace jako neprospívání, malý vzrůst, únava a ztráta hmotnosti. Např. průměrný BMI pacientů účastníků se studie Alizadeg *et al.* (2022) byl $15,43 \pm 4,35$. Dále se mohou vyskytovat různé gastrointestinální potíže jako je průjem, křeče, nadýmání či nevolnost. Objevuje se také osteoporóza a dyspepsie. U dívek může být neléčená celiakie doprovázená také neplodností (Alizadeh *et al.*, 2022).

Složení krevního obrazu je také viditelně změněno, 65 % pacientů s celiakií trpí anémií z nedostatku železa. Vedle anémie jsou pozorovány změny endokrinního systému a snížená sekrece IGF-1 (insulinu podobný růstový faktor 1) při expozici lepku, což vede ke snížení rychlosti růstu (Cornean *et al.*, 2018).

Neurotické symptomy se u dětí příliš nevyskytují, avšak u 36 % dospělých celiaků se objevují již se začátkem onemocnění. Nejčastějšími neurologickými projevy jsou cerebelární ataxie („glutenová ataxie“). Může se vyskytovat bolest hlavy a mírné kognitivní symptomy označované jako „mozková mlha“. Problémy se obvykle zlepší zahájením bezlepkové diety (Giuffrè *et al.*, 2022). Souhrn příznaků je uveden na obrázku 8.



Obr. 8: Klinické příznaky celiakie (Cole, 2017).

1.4.7 Diagnostika

Diagnóza celiakie je stále poměrně náročná a často není vůbec zvažována z důvodu nespecifity klinických symptomů. Správná diagnóza se opírá o klinické symptomy, hladiny protilátek, přítomnost HLA-DQ2 nebo HLA-DQ8 a histologické změny, zjištěné při biopsii tenkého střeva (Kaswala *et al.*, 2015).

Prvním krokem při podezření na celiakii jsou sérologické testy, kdy lze použít protilátky jako anti-tkáňová transglutamináza (Anti-tTG), anti-endomysální (EMA) a anti-deamidované gliadinové peptidy (Anti-DGP), IgA a IgG protilátky. U pacientů starších dvou let jsou protilátky IgA -tTG preferovaným diagnostickým sérologickým testem. Avšak u 2-3 % pacientů s celiakií se vyskytuje deficit IgA, což může vést k falešně negativním výsledkům. Při nedostatku IgA by měly být použity testy IgG protilátek (Rostom *et al.*, 2005).

Za definitivní diagnostiku celiakie se i přes citlivé sérologické testy považuje biopsie tenkého střeva. Histologické změny zahrnují atrofii klků, hyperplazii krypt, praskání slizničních záhybů a zvýšený počet intraepiteliálních lymfocytů.

HLA DQ2 a DQ8 jsou nejdůležitějšími genetickými rizikovými faktory pro rozvoj celiakie a lze je nalézt až u 40 % běžné populace, avšak jen u 3 % jedinců se toto onemocnění vyvine. Z tohoto důvodu je prediktivní hodnota tohoto testu nízká. Na druhou stranu má HLA typizace více jak 98 % negativní prediktivní hodnotu, a proto je přínosným testem pro vyloučení celiakie (Kaswala *et al.*, 2015).

1.5 Syndrom dráždivého tračníku (IBS)

IBS je běžná funkční porucha střev a je jedním z nejčastěji diagnostikovaných gastrointestinálních onemocnění, IBS trpí 10–20 % populace. Běžně se objevuje břišní diskomfort, nadýmání či přehnaný reflux. Příznaky souvisí se zhoršenou absorpcí sacharidů – fermentovaných oligo-, di- a monosacharidů a polyolů (FODMAP). Toto onemocnění je často zaměňované s jinými potravinovými intolerancemi a vyskytuje se častěji u žen a u jedinců mladších 50 let (Longstreth *et al.*, 2006). Příčina tohoto onemocnění není stále zcela jasná, ale pravděpodobně se jedná o souhru genetických, enviromentálních a psychologických faktorů. IBS může být rozdělen do podskupin v závislosti na podpurných příznacích. Dělí se na IBS s průjmem (IBS-D), IBS se zácpou (IBS-C), smíšené IBS (IBS-M) nebo nesubtypové IBS (IBS-U) (Nanayakkara *et al.*, 2016).

1.5.1 FODMAP sacharidy

Většina pacientů s IBS vnímá své gastrointestinální symptomy v souvislosti s jídlem. Neúplně vstřebatelné sacharidy (FODMAP potraviny), tučná jídla, káva a alkohol vyvolávají nebo zhoršují symptomy (Simrén *et al.*, 2001).

Fermentované oligosacharidy, disacharidy, monosacharidy a polyoly (FODMAP) jsou typy sacharidů, které jsou špatně vstřebatelné v tenkém střevě. Odcházejí do tlustého střeva, kde mohou fermentovat, což způsobuje nadýmání, plynatost a další příznaky. Mezi FODMAP potraviny se řadí frukto-oligosacharidy (pšenice, cibule, luštěniny), laktóza (mléko, zmrzlina),

fruktóza (jablka, med), galaktany (luštěniny) a sorbitol (peckoviny, umělé sladidlo) (Gearry *et al.*, 2009).

Tzv. low FODMAP dieta zahrnuje omezení potravin bohatých na FODMAP. Dieta s nízkým obsahem FODMAP snižuje celkové množství bakterií, ale nemá žádný vliv na relativní množství bakterií domněle spojovaných se zdravím tlustého střeva. Po ukončení diety lze určité potraviny s vysokým obsahem FODMAP opět zařadit v malých množstvích, aby se zjistilo, které konkrétní typy FODMAP způsobují příznaky u jednotlivých pacientů. Jakmile jsou identifikovány vyvolávající potraviny, může být vytvořen více personalizovaný a méně restriktivní jídelníček pro řízení příznaků (Halmos *et al.*, 2015).

1.5.2 IBS a střevní mikrobiom

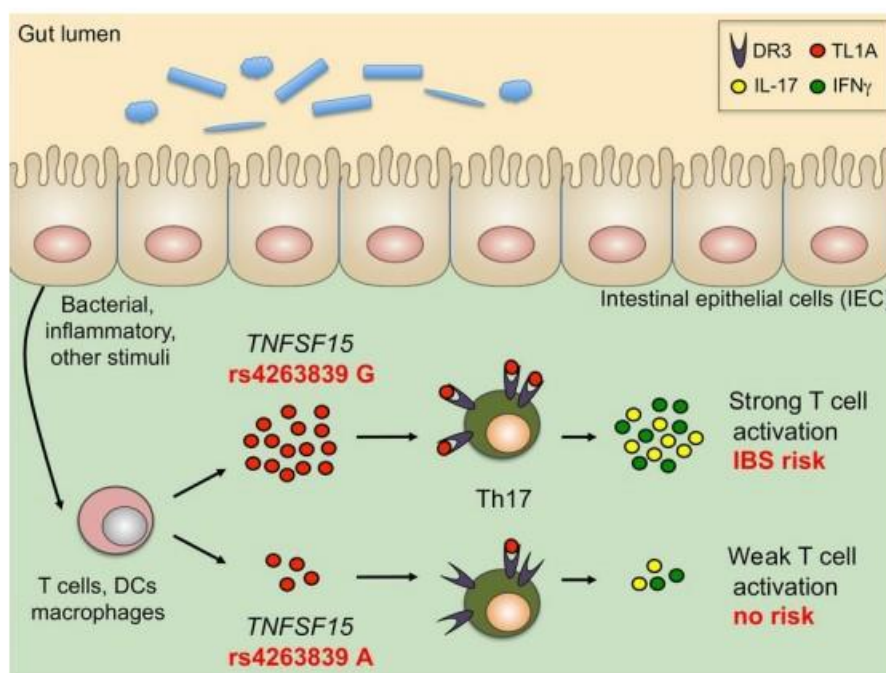
Lidé s IBS mají často odlišné složení střevního mikrobiomu ve srovnání se zdravou populací. Vyskytuje se u nich nerovnováha mezi patogenními a potencionálně patogenními bakteriemi, které indukují abnormální imunitní odpověď. U těchto pacientů je rovněž zvýšený bakteriální metabolit tryptamin, který stimuluje sekreci sliznice tlustého střeva a imunitní aktivaci prostřednictvím zánětlivých drah (Ivanova *et al.*, 2023).

Existuje mnoho různých mikrobiálních druhů spojených s rozvojem IBS, nejčastější jsou *Prevotella*, *Firmicutes*, *Ruminococcus*, *Akkermansia muciniphila*. Tyto druhy mohou být asociovány s různými formami IBS a také s různými příznaky, jako jsou bolesti břicha, nadýmání, průjem nebo zácpa. U IBS byl zaznamenán pokles populace *Lactobacillus* a *Bifidobacteria* (Bhattarai *et al.*, 2016).

1.5.3 Genové varianty

Jedním z faktorů ovlivňujících rozvoj IBS je genetická predispozice. Dosud bylo popsáno několik jednonukleotidových polymorfismů, které se mohou účastnit rozvoje IBS. Jedná se o polymorfismy cytokinových genů, které mohou představovat dysregulaci imunitního systému. Riziko IBS zvyšují polymorfismy rs4263839 a rs6478108 v genu *TNF SF15*. *TNF SF15* kóduje protein TL1A (Tumor necrosis factor-like cytokine 1A), který může pomocí Th17 vyvolat imunitní odpověď a může být důležitý pro rozvoj mnoha autoimunitních a zánětlivých onemocnění (Zhu *et al.*, 2019).

Alela G u rs4263839 zvyšuje riziko IBS, přičemž byla nalezena u různých podtypů IBS. Kromě toho je tato alela asociována s rizikem rozvoje Crohnovy choroby (Zhu *et al.*, 2019; Zucchelli *et al.*, 2011). Riziková alela G je spojena s vyššími hladinami mRNA TNFSF15 v leukocytech periferní krve i v biopsii rektální sliznice zdravých jedinců. Imunitní aktivace tak může hrát roli u geneticky predisponovaných jedinců při modulaci zánětlivé a neuroimunitní reakce po infekci, dietních spouštěcích nebo stresu (Zucchelli *et al.*, 2011). Hypotetický mechanismus zesílení imunitní reakce v závislosti na polymorfismu rs4263839 je zobrazen na obrázku 9.



Obr. 9: Mechanismus zesílení imunitní reakce v závislosti na polymorfismu rs4263839 v genu *TNF SF15* (Henström, 2018).

Alela T u rs6478108 v genu *TNF SF15* rovněž zvýšila riziko IBS, ale při analýze podskupin se neprojevovala žádná souvislost. Dalšími polymorfismy, které by mohly být asociovány s IBS jsou rs1800795 v genu *IL6*, kde je alela G spojena s vyššími plazmatickými hladinami IL6 během imunitní aktivace, a tím zvyšuje riziko IBS u kavkazských pacientů. Naopak genotyp GG u polymorfismu rs1800896 v genu *IL10* je spojován se sníženým rizikem IBS (Zhu *et al.*, 2019).

1.5.4 Příznaky IBS

Příznaky IBS se u jednotlivých pacientů liší, ale nejčastější jsou bolesti břicha, změny stolice (průjem, zácpa nebo střídání průjmu a zácpy), nadýmání, pocit nevyprázdnění střev a nechut' k jídlu. Vedle zmíněných gastrointestinálních příznaků se mohou objevovat bolesti hlavy, zad či svalů (Drossman, 2016).

U IBS je zvláště důležitá modulace osy mozek – střevo, protože psychologická komorbidita je zcela běžná. Psychický stres může vyvolat posuny v bakteriálním složení střeva, které se vyznačují systémovou cytokinovou odpovědí a zvýšenou propustností střeva (Simreň *et al.*, 2013).

Tyto příznaky bývají velmi obtěžující a ovlivňují kvalitu života. U některých pacientů mohou být příznaky spojeny s konkrétními situacemi nebo potravinami, zatímco u jiných se mohou objevit spontánně. Příznaky mohou být mírné a krátkodobé nebo vážné a trvalé.

1.5.5 Diagnostika

IBS může být často zaměňováno s jinými nemocemi či potravinovými intolerancemi, z důvodu podobnosti symptomů. Jedná se například o celkovou citlivost na potraviny, celiakii, laktózovou intoleranci, Crohnovu chorobu či infekci střev, a proto je nutné stanovit diagnózu IBS s vyloučením jiných zánětlivých onemocnění. Například pacienti s celiakií, u kterých se vyskytuje průjem, nadýmání, bolesti břicha bez projevů malabsorpce, jsou často nesprávně diagnostikováni se syndrom dráždivého tračníku, dokud nejsou vyšetřeni na celiakii (Singh *et al.*, 2022).

Diagnostika IBS je založena na kritériích ROME IV, která zahrnují opakované bolesti břicha po dobu alespoň 6 měsíců, bolesti spojené se změnou stolice, symptomy bývají zhoršeny stresem nebo jídlem, kdy úlevu přináší defekace. Kromě tohoto je možné doplnit vyšetření o krevní testy, testy ze stolice, kolonoskopii nebo testy na potravinové intolerance (Drossman, 2016).

1.5.6 Léčba

V poslední době se zkoumají možnosti léčby IBS prostřednictvím úpravy střevního mikrobiomu, čímž se mohou zmírnit jeho symptomy či navodit remise. Jednou z možností je podávání probiotik, živých mikroorganismů (*Lactobacillus* a *Bifidobakterie*), které mají

prospěšné účinky pro střevní mikrobiom a mohou snižovat příznaky IBS. Možnou terapií je fekální transplantace od zdravého dárce. Zlepšení symptomů bylo dosaženo také při pravidelné konzumaci kefiru obsahujícího *Laktobacily* (Silaghi *et al.*, 2022).

2. Cíle práce

- Vypracování odborné rešerše.
- Zvládnutí laboratorní praxe v genetické laboratoři – izolace DNA, PCR, gelová elektroforéza, PCR RFLP, real-time PCR.
- Analýza dat získaných testováním genů asociovaných s laktózovou intolerancí, histaminovou intolerancí, predispozicí pro celiakii a onemocněním dráždivého tračníku.
- Zjištění populačního rizika pro jednotlivé potravinové intolerance v české populaci.
- Zjištění možné asociace mezi jednotlivými intolerancemi a frekvence možného souběhu více intolerancí v české populaci.

3. Materiály a metody

Práce byla vykonávána v laboratoři GENLABS s.r.o. v Českých Budějovicích.

3.1 Materiály

Vzorky byly získány z bukalního stěru či periferní krve. V případě bukalního stěru byly odběrové sady (Isohelix™ SK2 Buccal Swab, Isohelix) odeslány poštou klientům, kteří dle přiloženého návodu provedli odběr a následně byl tento vzorek odeslán zpět do laboratoře společně s žádankou a informovaným souhlasem s genetickým vyšetřením. V případě periferní krve byla krev odebrána v některé z EUC klinik a tyto vzorky byly po odběru odeslány do laboratoře, kde byly dále zpracovány. Volba vzorku však nebyla pro vyšetření zásadní. Všechny vzorky byly získány během let 2020 až 2022 napříč celou Českou republikou.

V případě laktózové intolerance bylo vyšetřeno 2510 vzorků (88, 5 % bukalní stěr, 11,5 % periferní krev). Stanovení predispozice pro celiakii (HLA alely) bylo testováno u 643 vzorků, z toho 77, 1 % z bukalního stěru a 22,9 % z periferní krve. U syndromu dráždivého tračníku bylo vyšetřeno 394 vzorků (73,4 % bukalní stěr, 26,6 % periferní krev) a pro predispozici histaminové intolerance – sníženou aktivitu DAO bylo použito 233 vzorků získaných z bukalních stěrů (67,8 %) nebo periferní krve (32,2 %). V rámci SGA projektu bylo také otestováno 100 pacientů na predispozici snížené aktivity enzymu HNMT. V rámci celkové analýzy všech intolerancí současně (LI, celiakie, IBS, HIT i aktivita HNMT) bylo hodnoceno celkem 99 vzorků (53,5 % bukalní stěr, 46,5 % periferní krev).

3.2 Izolace DNA

Před samotnou izolací DNA bylo ke každému vzorku přiřazeno laboratorní číslo (LIČ), pod kterým je vzorek jednoduše dohledatelný. Následovala izolace DNA z primárních vzorků. Pro izolaci byl použit komerční kit GeneAll ExGene™ Clinic SV mini (GeneAll Biotechnology) a bylo postupováno dle doporučení výrobce s mírnými rozdíly v objemech reagií. Pro dosažení vyšší koncentrace DNA bylo v elučním kroku přidáno 50 µl AE pufru na rozdíl od výrobcem doporučovaných 200 µl a eluční krok byl opakován napipetováním eluátu zpět na kolonku. Rozpis a objem reagií pro izolaci DNA z bukalního stěru je uveden v tabulce II.

Tab. II: Objem reagensií pro bukalní stěr na jednu izolaci.

Reagencie	Objem (μl)
Proteináza K	30
BL pufr	300
Ethanol (96 %)	300
BW pufr	600
TW pufr	700
AE pufr	50

V případě periferní krve bylo postupováno obdobně s rozdílným objemem proteinázy K, BL pufru a ethanolu. Rozpis reagensií a jejich objem pro izolaci DNA z periferní krve je zaznamenán v tabulce III.

Tab. III: Objem reagensií pro periferní krev na jednu izolaci.

Reagencie	Objem (μl)
Proteináza K	20
BL pufr	200
Ethanol (96 %)	200
BW pufr	600
TW pufr	700
AE pufr	50

3.3 Měření koncentrace DNA

Po izolaci byla vždy změřena koncentrace DNA na přístroji Quibit Fluorometr 2.0 (Invitrogen-Thermo Fisher Scientific). Pro měření bylo použito 198 μl kvantifikačního roztoku (AccuGreen™ Quantitation Solution), které bylo smícháno s 2 μl vyizolované DNA. Zkumavka se směsí byla vložena do fluorometru a výsledná koncentrace DNA byla odečtena a zaznamenána do sešitu. Vzorek s izolovanou DNA byl skladován při -20 °C, dokud nebyl dále zpracováván.

3.4 Analýza polymorfismů 13910 a 22018 v genu *MCM6*

3.4.1 PCR

Polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018 byly amplifikovány pomocí PCR, prováděné v termocycleru (MultiGene, Labnet). Reakce byly míchány na mrazících stojácích

v laminárním boxu (ESCO PCR Cabinet) a reakce probíhaly v 0,2 ml zkumavkách. Reakční směs pro jednu reakci PCR v objemu 50 µl se skládala z deionizované vody, reakčního pufru, forward a reverse primerů, MyTaq Polymerase a DNA. Pro stabilizaci a větší výtěžek reakce byl přidán DMSO (dimethylsulfoxid). Následně byly vzorky zvortexovány a stočeny. Součástí každé analýzy byly pozitivní a negativní kontroly. V případě pozitivní kontroly byl použit vzorek se známým genotypem a u negativní kontroly byla namísto vzorku přidána voda. Reakční mix pro jednu reakci je uveden v Tab. IV.

Tab. IV: Složení a množství komponent v závislosti na jednu reakci.

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)/ LAC 22018 G/A_for (20 pmol)	0,5
LAC 13910 C/T_rev (20 pmol)/ LAC 22018 G/A_rev (20 pmol)	0,5
Celkem	48
DNA	2

3.4.2 Primery pro amplifikaci C/T-13910 a G/A-22018

Pro amplifikaci byly použity primery uvedené níže (Tab. V) Primery pro 13910 byly převzaty z publikace Mattar *et al.* (2008) a pro polymorfismus 22018 z Coelho *et al.* (2005).

Tab. V: Sekvence primerů pro C/T-13910 a G/A-22018.

Primery	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'

PCR amplifikace byla prováděna v gradientovém PCR termocycleru (MultiGene, Labnet). PCR profily pro jednotlivé polymorfismy jsou uvedeny v tabulce VI.

Tab. VI: PCR profil pro amplifikaci polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018.

	Počet cyklů	C/T-13910		G/A-22018	
		Teplota (°C)	Čas (min)	Teplota (°C)	Čas (min)
Denaturace	1	95	5	95	5
Denaturace	35	95	1	95	1
Annealing		57,4	1	60,3	1
Elongace		72	1	72	1
Postelongace	1	72	5	72	5

3.4.3 Gelová elektroforéza

Úspěšnost PCR amplifikace byla následně ověřena pomocí gelové elektroforézy, která umožní vizualizovat PCR produkt a určit délku jednotlivých fragmentů. Pro elektroforézu byl použit 4 % gel, který byl připraven z 2 g agarózy v tabletkách (FastGene Agarose Tablets, Nippon Genetics) a 50 ml TBE pufru (Thermo Scientific). Roztok byl zahříván v mikrovlnné troubě po dobu 2 minut, dokud nevznikl tekutý gel. Následně k němu bylo napipetováno 5,5 µl fluorescenční barvy (Midori Green Advanced DNA Stain, Nippon Genetics) a gel byl nalit do formy s hřebínky, které po zatuhnutí vytvořily jamky. Do jamek bylo nanášeno 4 µl velikostního markeru FastGene 100 bp DNA Ladder (Nippon Genetics) a 5 µl PCR produktu. Elektroforéza trvala 25-30 minut při 135 V. Výsledné PCR produkty měly velikost 201 bp v případě polymorfismu C/T-13910 a 271 bp v případě polymorfismu G/A-22018.

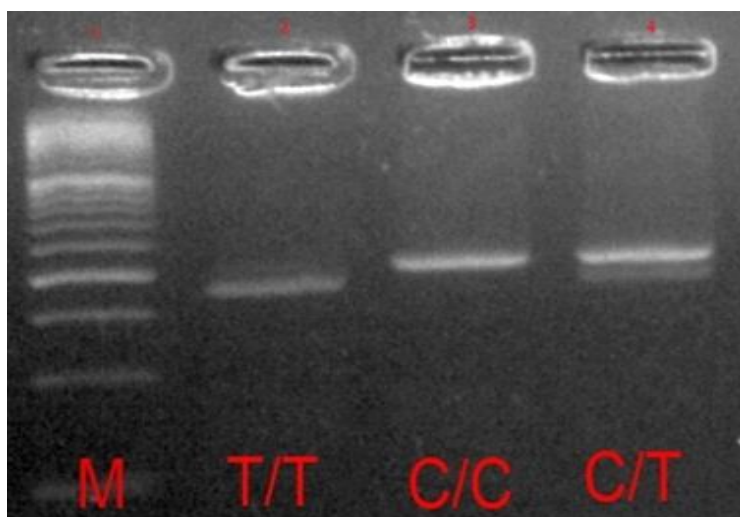
3.4.4 Restrikční štěpení

Pro restrikci byly použity komerčně dostupné restrikční endonukleázy vyizolované z bakterie *Haemophilus Influenzae*. Na mrazícím stojánku bylo smícháno 5 µl restrikčního pufru (10x CutSmart™ buffer) a 1 µl (10 U) příslušného restrikčního enzymu. K PCR produktu polymorfismu C/T-13910 byl přidán restrikční enzym HinfI (10 U/ µl, ThermoScientific) a k PCR produktu odpovídající polymorfismu G/A-22018 Hinf6 (10 U/ µl, ThermoScientific). Poté byly tyto vzorky inkubovány po dobu alespoň jedné hodiny při teplotě 37 °C v miniinkubátoru (Mini Incubator, Labnet). V tabulce VII jsou uvedeny oblasti restrikčního štěpení pro jednotlivé endonukleázy.

Tab. VII: Místa restrikčního štěpení u použitých enzymů.

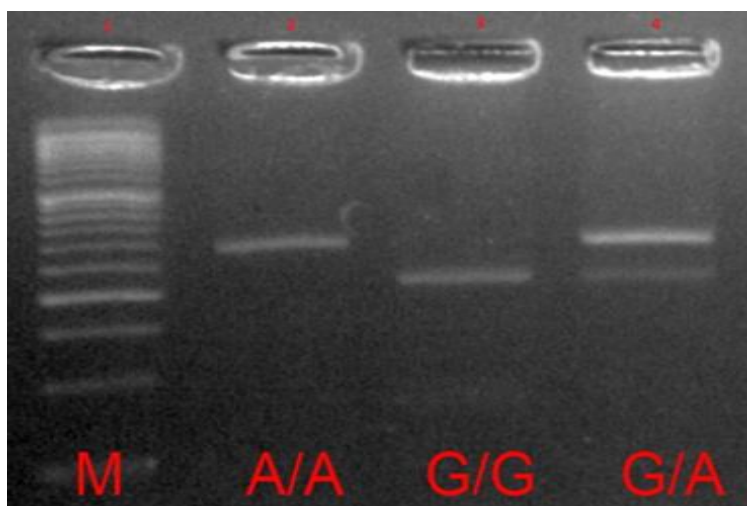
Restrikční enzym	Místo štěpení
HinfI	5'...G↓ANTC...3'
	3'...CTNA↑G...5'
Hin6I	5'...G↓CGC...3'
	3'...CGC↑G...5'

Po inkubaci byly fragmenty restrikčního štěpení vizualizovány pomocí gelové elektroforézy (postup viz 3.4.3). U polymorfismu C/T-13910 došlo v přítomnosti mutované alely T k rozštěpení PCR produktu na fragmenty o velikosti 177 bp a 24 bp. U heterozygotního genotypu CT došlo k částečnému rozštěpení za vzniku 3 fragmentů o délkách 201 bp, 177 bp a 24 bp. Wild type genotyp CC nebyl rozštěpen, velikost restrikčního fragmentu zůstává 201 bp. Výsledky restrikčního štěpení polymorfismu C/T-13910 jsou uvedeny na obrázku 10.



Obr. 10: Restrikční fragmenty polymorfismu C/T-13910. M – velikostní marker (FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU; *Nippon Genetics*), TT – mutovaný homozygot, CC – wild type, CT – heterozygot.

V případě polymorfismu G/A-22018 byl PCR produkt rozštěpen pomocí enzymu Hinf6 pouze v přítomnosti wild type alely G. U genotypu GG dochází k úplnému rozštěpení PCR produktu na fragmenty o velikosti 196 bp a 75 bp. Heterozygotní genotyp GA je částečně rozštěpen a viditelné jsou tři fragmenty o velikosti 271 bp, 196 bp a 75 bp. V případě mutovaného genotypu AA není produkt rozštěpen a jeho velikost je 271 bp. Na obrázku 11 jsou výsledky restrikčního štěpení polymorfismu G/A-22018.



Obr. 11: Restrikční fragmenty polymorfismu G/A-22018. M – velikostní marker (FastGene 100 bp DNA Ladder H3 RTU; Nippon Genetics), AA – mutovaný homozygot, GG – wild type, GA – heterozygot.

3.5 Real-time PCR

3.5.1 Real-time PCR s analýzou křivek tání

Pro vyšetření pěti polymorfismů (rs10156191, rs1049742, rs1049748, rs1049793, rs2052129 a rs2268999) v genu *AOC1* související s predispozicí k histaminové intoleranci, dvou polymorfismů (rs11558538 a rs1050891) v genu kódující enzym *HNMT* a ke stanovení jednonukleotidového polymorfismu (rs4263839) v genu *TNF SF15* asociovaného se syndromem dráždivého tračníku byla použita metoda real-time PCR s analýzou křivek tání. Pro vyšetření všech výše uvedených polymorfismů byly použity komerčně připravené detekční soupravy LightSNiP assay (TIB MOLBIOL). Reakce byly připraveny v chladicím stojánku v laminárním boxu (ESCO PCR Cabinet) a reakce probíhaly ve skleněných kapilárách. Složení reakčního mixu včetně jednotlivých objemů je uvedeno v tabulce VIII. Ke každému běhu byla přidána vždy pozitivní a negativní kontrola. V případě negativní kontroly

byla přidána do reakčního mixu voda. Pro pozitivní kontrolu byl použit vzorek se známým genotypem.

Tab. VIII: Složení reakčního mixu na jednu reakci.

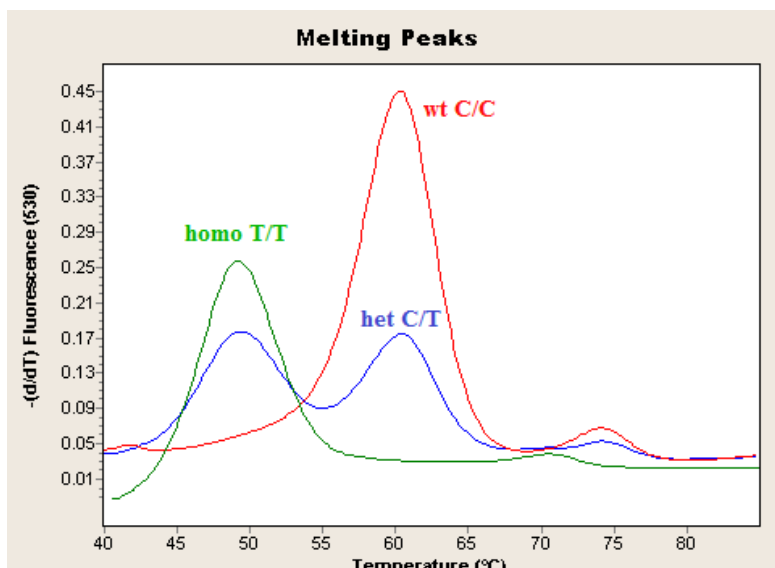
	Množství [μl]
H₂O	14,4 - 10,4
LightSNiP Reagent Mix (TIB MOLBIOL)	1
FastStart DNA Master (Roche Diagnostics)	2
MgCl₂ (25mM)	1,6
DNA	1-5
Celkem	20

Amplifikace byla provedena v přístroji LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) dle doporučení od výrobce. Firma TIB MOLBIOL používá pro všechny detekční soupravy LightSNiP Reagent Mix stejný PCR profil, který je zaznamenán níže (Tab. IX). Výhodou je možnost vyšetření různých SNP v rámci jednoho běhu.

Tab. IX: PCR profil a reakční podmínky pro LightSNiP assay.

Krok programu	Denaturace	Amplifikace			Annealing			Chlazení
Parametr								
Mód analýzy	Žádný	Kvantifikace			Křivka tání			Žádný
Počet cyklů	1	45			1			1
Teplota [°C]	95	95	60	72	95	40	85	40
Trvání [hh:mm:ss]	0:10:00	0:00:05	0:00:10	0:00:15	0:00:20	0:02:00	0:00:00	0:00:30
Změna teploty [°C/s]	20	20	20	20	20	20	0,2	20
Akviziční mód	Žádný	Žádný	Jednotlivý	Žádný	Žádný	Žádný	Kontinuální	Žádný

Výsledky analýz byly hodnoceny ve fluorescenčním kanále FAM (530 nm). Příklad melting – curve analýzy pro rs11558538 je zobrazen na obrázku 12.



Obr. 12: Příklad real – time PCR analýzy na přístroji LightCycler 2.0. pro jednotlivé genotypy rs11558538. wt C/C –wild type genotyp C/C, het C/T – heterozygotní genotyp C/T, homo T/T –mutovaný homozygotní genotyp T/T.

3.5.2 HLA genotypizace

Pro detekci HLA alel byl použit komerční kit EliGene® Coeliac 3.0 RT (Elisabeth Pharmacon) dle doporučení výrobce. Tato souprava byla použita ke genotypizaci HLA-DQ2.5 (DQA1*05/DQB1*02), HLA-DQ2.2 (DQA1*02/DQB1*02) a HLA-DQ8 (DQA1*03/DQB1*0302). Před prvním použitím byly ke každému mastermixu přidány 3 μ l Eliblockeru, který umožnil průběh reakce ve skleněných kapilárách (kit je navržen pro plastové zkumavky). Komerční kit obsahoval celkem 3 mastermixy označené HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 a HLA-DQ8. Jednotlivé mastermixy byly rozpipetovány v laminárním boxu po 18 μ l do označených kapilár, následně byly ke každému mixu přidány 2 μ l DNA (3 reakce pro 1 vzorek). S každým během byla testována také pozitivní a negativní kontrola. V případě negativní kontroly byla přidána místo DNA do reakce voda, pozitivní kontroly byly součástí komerčního kitu. PCR profil je zaznamenán v tabulce X a reakce probíhaly v přístroji LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics). Výsledné křivky byly vyhodnoceny v kanálu FAM a HEX.

Tab. X: PCR profil pro genotypizaci HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 a HLA-DQ8.

Krok programu	Počet cyklů	Teplota [°C]	Trvání [hh:mm:ss]	Akviziční mód
Denaturace	1	95	0:03:00	žádný
PCR	40	95	0:00:15	žádný
		61	0:00:40	jednotlivý

3.6 Statistické vyhodnocení dat

Získaná data byla vyhodnocena v programech MS Excel a Canoco 5 (ter Braak & Smilauer, 2012). Data v programu Canoco 5 byla analyzována pomocí metody Detrended Canonical Correspondence Analysis (nepřímá metoda DCA).

4. Výsledky

4.1 Analýza polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018 v genu *MCM6*

Pro intoleranci laktózy bylo vyšetřeno celkem 2 510 jedinců, kteří byli vyšetřeni na 2 jednonukleotidové polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018 v genu *MCM6*. Vzorky byly získány během let 2020 až 2022. Většina vzorků byla získána z bukalního stěru (88,5 %) a zbytek z periferní krve (11,5 %). Koncentrace DNA se pohybovala od 1,05 do 384 ng/μl.

V tabulce XI je zobrazen podíl vyšetřených mužů a žen na laktózovou intoleranci.

Tab. XI: Počet vyšetřených jedinců v závislosti na pohlaví s uvedeným průměrným věkem pro danou skupinu.

Pohlaví	Počet	%	Průměrný věk
Žena	1827	72,8	37,6
Muž	683	27,2	37,6

Z tabulky XI vyplývá, že o vyšetření LI má zájem více žen než mužů. Průměrný věk byl u obou skupin stejný, z čehož vyplývá, že zaživačí problémy začínají řešit obě pohlaví ve stejném věku.

V grafu na obr. 13 je zobrazeno rozložení věkových kategorií všech jedinců vyšetřených na laktózovou intoleranci.



Obr. 13: Četnost vyšetření laktózové intolerance v jednotlivých věkových skupinách.

Z obrázku 13 je patrné, že největší zájem o vyšetření mají jedinci středního věku (31-50 let), z čehož můžeme vyvodit, že nejčastěji se problémy s trávením laktózy objevují v této věkové skupině.

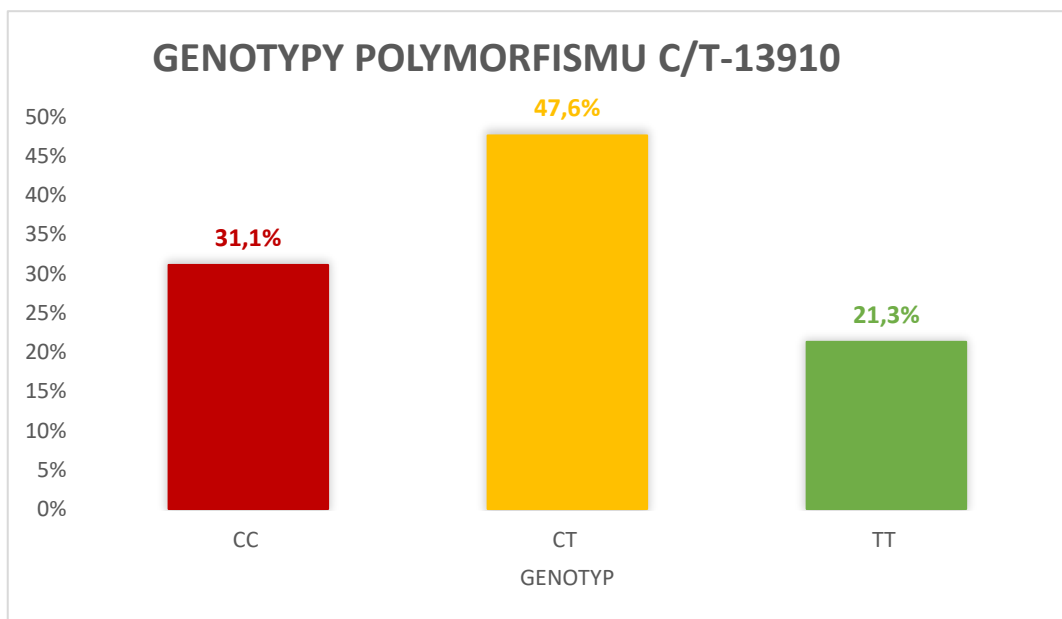
V tabulce XII jsou uvedeny četnosti různých genotypů pro polymorfismus C/T-13910 v genu *MCM6* asociovaného s laktózovou intolerancí.

Tab. XII: Četnost jednotlivých genotypů pro polymorfismus C/T-13910 v genu *MCM6* v testovaném souboru.

Genotyp	Počet jedinců	%	Výsledek
CC	781	31,1	Laktózová intolerance
CT	1195	47,6	Částečná laktózová intolerance
TT	534	21,3	Laktózová tolerance

Z tabulky XII vyplývá, že 31,1 % testovaných jedinců nese genotyp CC, který souvisí s intolerancí laktózy a poklesem aktivity laktázy. Téměř polovině (47,6 %) jedinců byla diagnostikována částečná intolerance laktózy s genotypem CT. 21,3 % jedinců má mutovaný genotyp TT, který je spojován s celoživotní aktivitou laktázy, a tedy s laktózovou tolerancí.

Na obrázku 14 je grafické zobrazení jednotlivých genotypů polymorfismu C/T-13910.



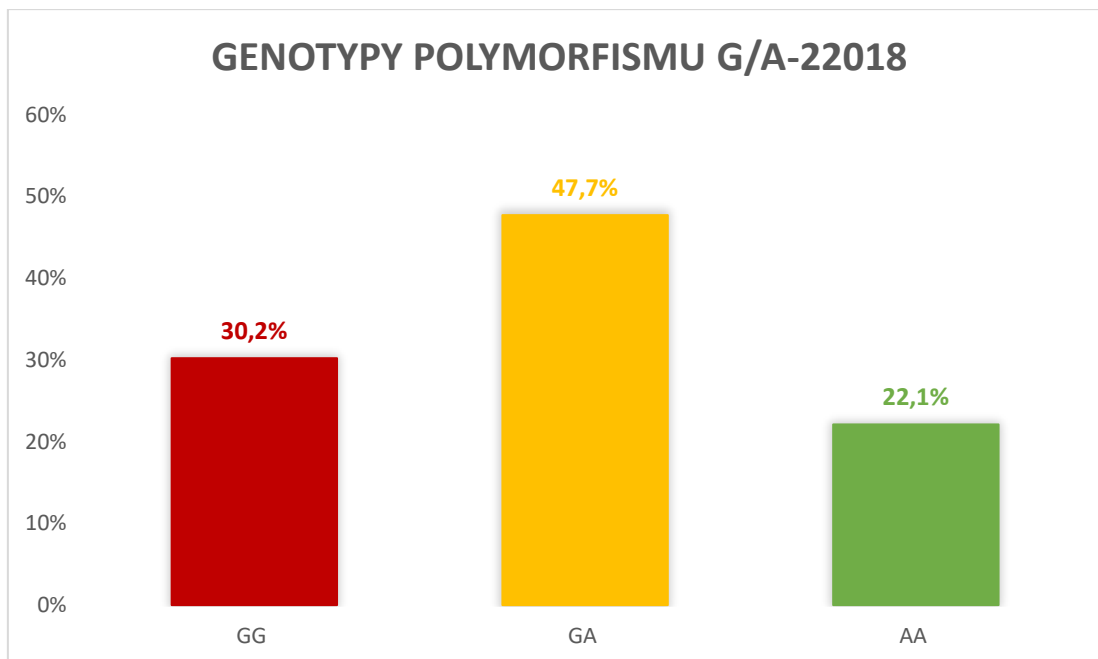
Obr. 14: Četnost jednotlivých genotypů pro polymorfismus C/T-13910 v genu *MCM6* v testovaném souboru.

V tabulce XIII jsou zobrazeny četnosti genotypů pro polymorfismus G/A-22018 v genu *MCM6* související s laktózovou intolerancí.

Tab. XIII: Četnost jednotlivých genotypů pro polymorfismus G/A-22018 v genu *MCM6* v testovaném souboru.

Genotyp	Počet jedinců	%	Výsledek
GG	759	30,	Laktózová intolerance
GA	1196	47,7	Částečná laktózová intolerance
AA	555	22,1	Laktózová tolerance

Z tabulky XIII je patrné, že četnosti jednotlivých genotypů polymorfismu G/A-22018 vykazují jen mírné odchylky od četností polymorfismu C/T-13910 (tab. XI). Téměř polovina jedinců je nositelem heterozygotního genotypu GA souvisejícího s částečnou intolerancí. 30,2 % jedinců má genotyp GG související s úplnou laktózovou intolerancí. Nejméně jedinců (22,1 %) se vyznačuje genotypem AA, který je charakterizován celoživotní perzistencí laktázy. Grafické znázornění frekvence genotypů je uvedeno na obrázku 15.



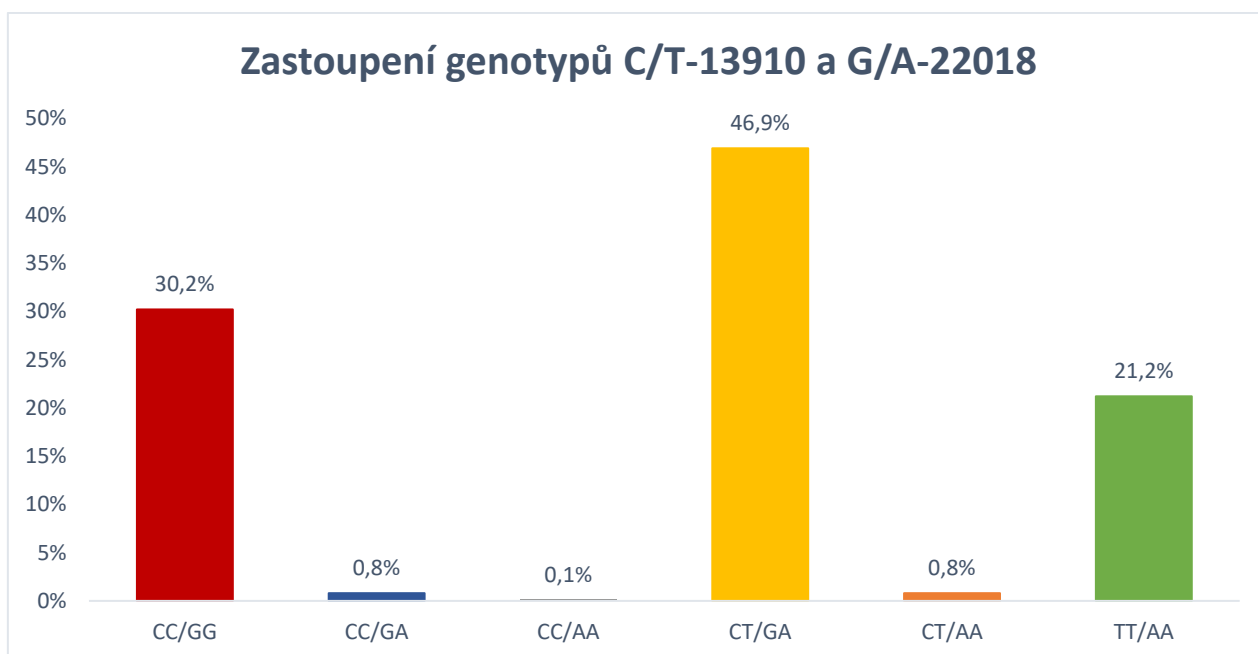
Obr. 15: Četnost jednotlivých genotypů pro polymorfismus G/A-22018 v genu *MCM6* v testovaném souboru.

V následující tabulce (tab. XIV) jsou výsledky genetické analýzy pro oba polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018.

Tab. XIV: Zastoupení genotypů pro polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018 asociovaných s laktózovou intolerancí ve studovaném souboru.

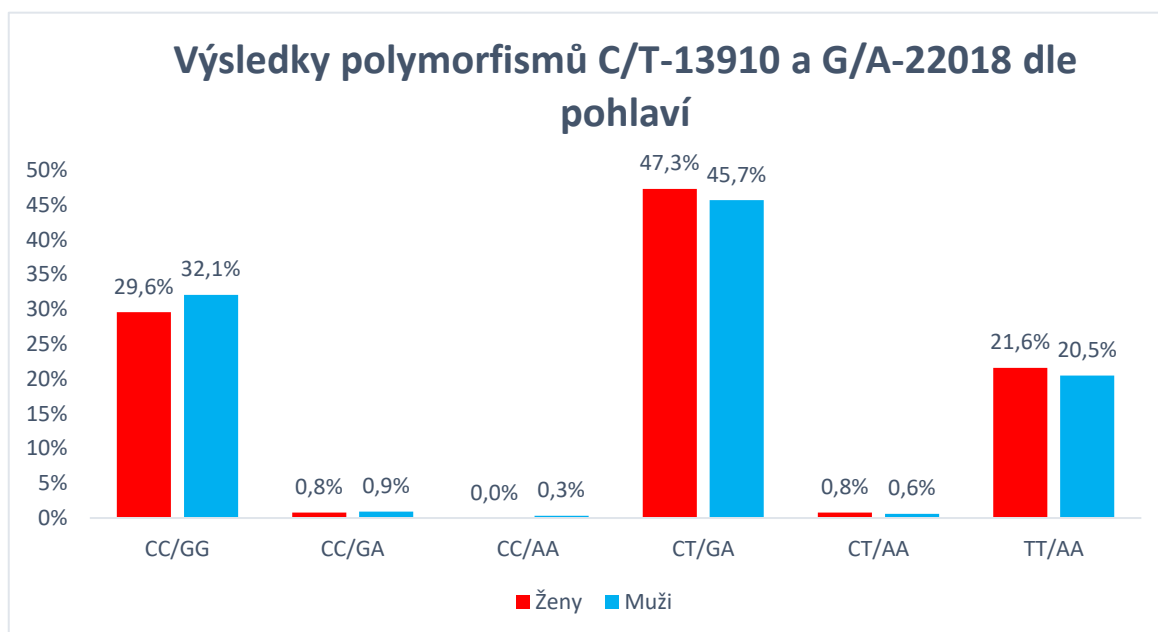
C/T-13910 \ G/A-22018	GG	GA	AA
CC	759 (30,2 %)	20 (0,8 %)	2 (0,1 %)
CT	0 (0 %)	1176 (46,9 %)	19 (0,8 %)
TT	0 (0 %)	0 (0 %)	534 (21,2 %)

Z tabulky XIV je možné vyčíst, že četnosti obou polymorfismů (C/T-13910 a G/A-22018) spolu souvisí. Pokud byl u jednoho polymorfismu zjištěn heterozygot, byl zjištěn i v druhém polymorfismu (tzn. CT/GA). V několika málo případech byly zjištěny také variantní genotypy (CC/GA, CC/AA, CT/AA), které nejsou v odborné literatuře zatím popsány. Pro lepší orientaci byl vytvořen graf (obr. 16).



Obr. 16: Zastoupení obou genotypů pro polymorfismy C/T-13910 a G/A-22018 asociovaných s laktózovou intolerancí ve studovaném souboru.

V grafu na obrázku 17 je zobrazen rozdíl mezi ženami a muži v četnosti genotypů u obou studovaných polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018.



Obr. 17: Genderový rozdíl výskytu polymorfismů C/T-13910 a G/A-22018 asociovaných s laktózovou intolerancí ve vyšetřovaném souboru.

Z obrázku 17 vyplývá, že rozdíly frekvencí genotypů v závislosti na genderu nejsou zásadně rozdílné a pohlaví jako takové neovlivňuje výskyt predispozice pro laktózovou intoleranci.

4.2 Analýza polymorfismů v genu *AOC1* kódující DAO

V případě predispozice k histaminové intoleranci bylo otestováno 5 polymorfismů. Čtyři polymorfismy (rs10156191, rs1049793, rs2052129 a rs2268999) jsou asociovány se sníženou aktivitou DAO a jeden polymorfismus (rs1049748) je asociován s její zvýšenou aktivitou. Celkem bylo otestováno 233 vzorků, které byly získány z bukalních stěrů (67,8 %) nebo z periferní krve (32,2 %). Vzorky byly získány v průběhu let 2021 a 2022, koncentrace DNA se pohybovala od 2,2 do 228 ng/μl.

V tabulce XV je zaznamenán počet vyšetření v závislosti na genderu a průměrný věk pro obě skupiny.

Tab. XV: Počet vyšetření v závislosti na genderu a průměrný věk těchto skupin.

Pohlaví	Počet	%	Průměrný věk
Žena	158	67,8	35,6
Muž	75	32,2	35,5

Z tabulky XV vyplývá, že častěji se nechávají vyšetřit ženy. Průměrný věk obou skupin je téměř totožný.

V tabulce XVI jsou přehledně uvedeny jednotlivé genotypy pro rs10156191, rs1049793, rs1049748, rs2052129 a rs2268999 související s aktivitou DAO.

Tab. XVI: Frekvence genotypů pro rs10156191, rs1049793, rs1049748, rs2052129 a rs2268999. *červeně jsou zvýrazněny alely snižující aktivitu DAO, zeleně alely zvyšující aktivitu DAO.

DAO								
rs10156191 (DAO1)			rs1049748 (DAO3)			rs1049793 (DAO4)		
Genotyp	Počet	%	Genotyp	Počet	%	Genotyp	Počet	%
CC	109	46,8	TT	78	33,5	CC	112	48,1
CT	101	43,3	TC	114	48,9	CG	94	40,3
TT	23	9,9	CC	41	17,6	GG	27	11,6
rs2052129 (DAO5)			rs2268999 (DAO6)					
Genotyp	Počet	%	Genotyp	Počet	%			
GG	125	53,6	AA	112	48,1			
GT	93	39,9	AT	98	42,1			
TT	15	6,4	TT	23	9,9			

Z tabulky XVI plyne, že nejvíce mutací se vyskytuje u rs1049748, kde je mutovaná alela zodpovědná za zvýšenou aktivitu DAO. Naopak nejméně mutací se vyskytuje u rs2052129. U většiny polymorfismů (kromě rs1049748) jsou nejvíce zastoupeny nemutované genotypy.

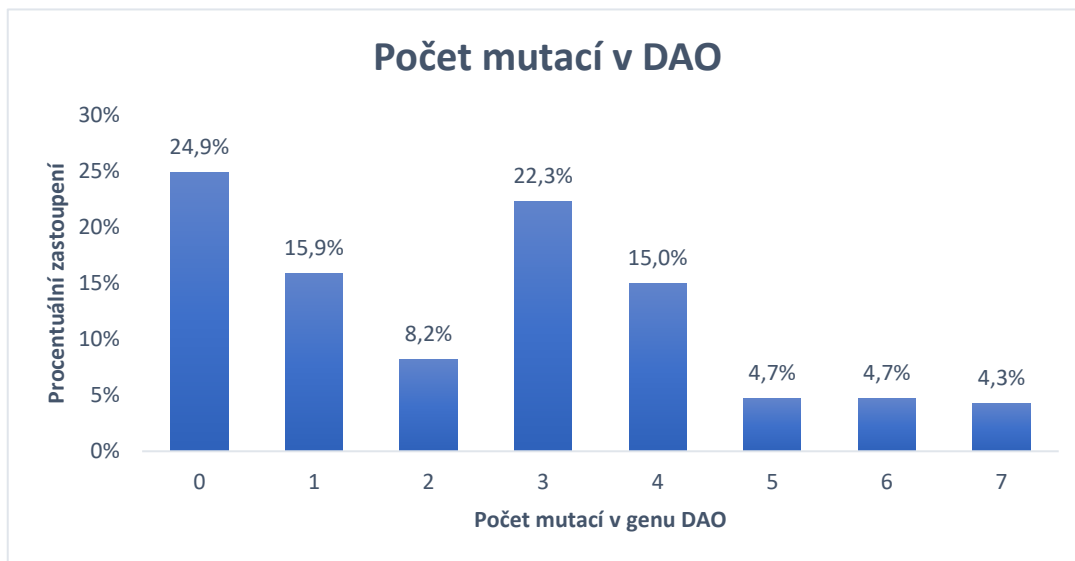
Výsledné haplotypové frekvence asociované se sníženou aktivitou DAO (rs10156191/rs1049793/rs2052129/rs2268999) spolu s četností mutací u jednotlivých haplotypů jsou zobrazeny v tabulce XVII.

Tab. XVII: Četnosti jednotlivých haplotypů pro DAO asociovaných se sníženým odbouráváním histaminu (rs10156191/rs1049793/rs2052129/rs2268999) v testovaném souboru.

Haplotypy DAO	Počet jedinců	Četnost %	Počet mutací	Četnost (%) v závislosti na počtu mutací
CC/CC/GG/AA	58	24,9	0	24,9 %
CT/CC/GG/AA	1	0,4	1	15,9 %
CC/CG/GG/AA	34	14,6		
CC/CC/GT/AA	2	0,9		
CT/CG/GG/AA	2	0,9	2	8,2 %
CT/CC/GG/AT	2	0,9		
CC/CG/GG/AT	1	0,4		
CC/CG/GG/AA	9	3,9		
CC/CG/GT/AA	4	1,7		
CC/CC/GT/AT	1	0,4		
CT/CG/GT/AA	1	0,4	3	22,3 %
CT/CC/GT/AT	39	16,7		
CT/CG/GG/AT	11	4,7		
CT/GG/GG/AA	1	0,4		
CT/CG/GT/AT	30	12,9	4	15,0 %
CT/GG/GG/AT	4	1,7		
CT/CC/TT/AT	1	0,4		
TT/CC/GT/TT	2	0,9	5	4,7 %
CT/GG/GT/AT	9	3,9		
TT/CC/TT/TT	6	2,6	6	4,7 %
TT/GG/GG/TT	2	0,9		
TT/CG/GT/TT	3	1,3		
TT/CG/TT/TT	8	3,4	7	4,3 %
TT/GG/GT/TT	2	0,9		

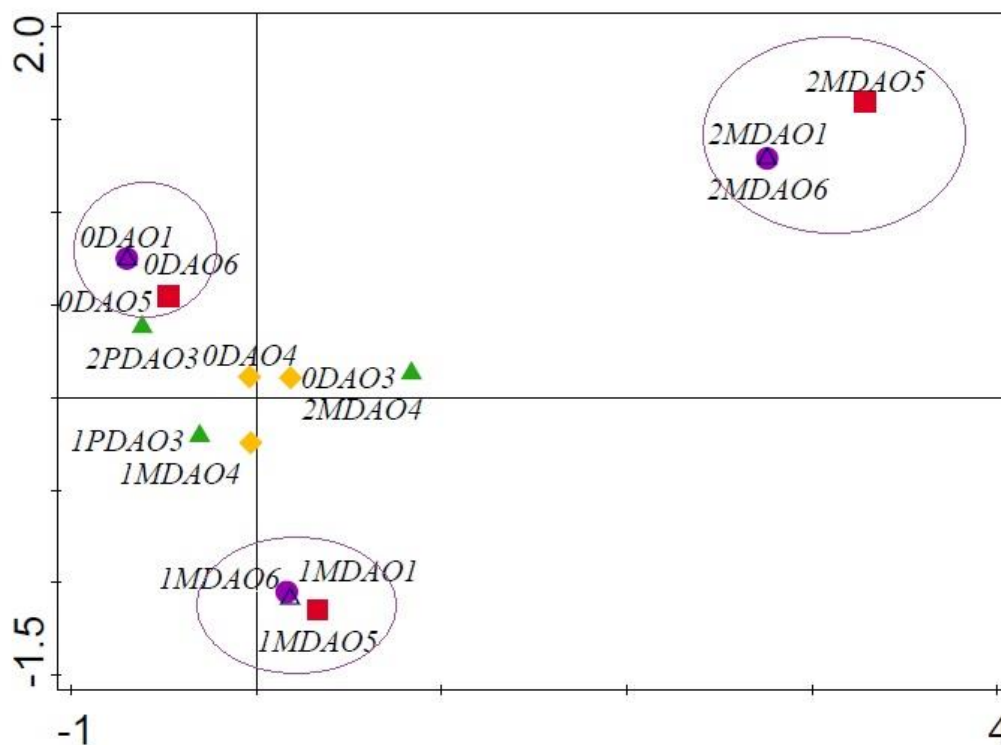
Z tabulky XVII vyplývá, že nejvíce zastoupeným haplotypem je CC/CC/GG/AA, tzn. haplotyp bez mutace, který se vyskytuje u 24,9 % jedinců. Tito jedinci nejsou geneticky náchylní ke snížené aktivitě DAO a není u nich genetický předpoklad k rozvoji HIT. Následují jedinci nesoucí 3 mutace (22,3 %), kteří mají predispozici k histaminové intoleranci. Celkem bylo stanoveno 24 různých haplotypů a u 28,7 % jedinců se vyskytovaly čtyři nebo více mutací v genu *AOC1*, což naznačuje sníženou aktivitu DAO a snížené odbourávání histaminu vedoucí k možnému rozvoji HIT.

Pro přehlednost byl vytvořen graf na základě počtu mutací v genu *AOC1* asociovaných se sníženou aktivitou DAO (obr. 18).



Obr. 18: Celkový počet jednotlivých mutací v genu *AOC1* ve vyšetřovaném souboru.

Na obrázku 19 je zobrazena distribuce genotypů polymorfismů v genu *AOC1* kódující DAO vyhodnocená pomocí DCA analýzy.



Obr. 19: Distribuce genotypů polymorfismů v genu *AOC1* související s aktivitou DAO. (DCA, první osa vysvětluje 29,2 %, druhá 53,0 %).

Z grafu na obrázku 19 plyne, že polymorfismy rs10156191 (DAO1), rs2052129 (DAO5) a rs2268999 (DAO6) se vyskytují nejčastěji společně (společný výskyt vyznačen ve fialových kruzích). Pokud byl zjištěn wild-type homozygot (0 mutací) u jednoho polymorfismu, byl zjištěn i u dalších dvou polymorfismů. Hodnota Explained variation udává 29,2 % variability první osy a 53,0 % variability 2. osy.

4.3 Analýza polymorfismů rs11558538 a rs1050891 v genu *HNMT*

Bylo vyšetřeno 100 pacientů na polymorfismy rs11558538 a rs1050891 v genu *HNMT*. Jako vzorky byly použity bukalní stěry (54 %) nebo vzorky periferní krve (46 %). Vzorky byly získány během let 2021 a 2022 a pocházejí z celé České republiky. Koncentrace DNA se pohybovaly od 5,65 do 206 ng/μl.

V tabulce XVIII je zaznamenán věkový průměr a počet vyšetření dle genderu.

Tab. XVIII: Počet vyšetření polymorfismů v *HNMT* genu v závislosti na genderu a průměrný věk těchto skupin.

Pohlaví	Počet	%	Průměrný věk
Žena	60	60	34,6
Muž	40	40	34,4

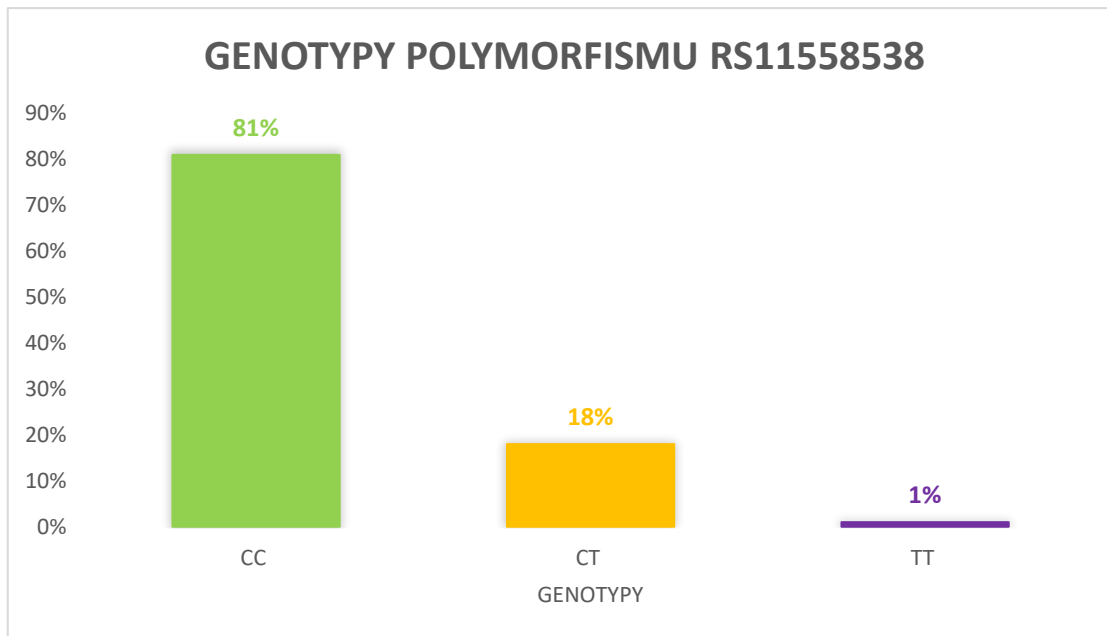
Bylo vyšetřeno více žen (60 %) ve srovnání s muži (40 %). Průměrný věk obou pohlaví byl téměř stejný.

V tabulce XIX je zobrazena četnost polymorfismu rs11558538 související s predispozicí pro vyšší hladinu histaminu v mozku a migrénami.

Tab. XIX: Četnost jednotlivých genotypů pro polymorfismus rs11558538 v genu *HNMT* ve vyšetřovaném souboru.

Genotyp	Počet	Četnost	Výsledek
CC	81	81 %	Normální hladina HNMT.
CT	18	18 %	Heterozygot, snížená hladina HNMT.
TT	1	1 %	Snížená hladina HNMT, zvýšený výskyt migrén.

Z tabulky XIX vyplývá, že většina jedinců nese genotyp související s normální hladinou HNMT. U 1 % jedinců byl nalezen mutovaný genotyp, který souvisí se sníženou hladinou HNMT. Grafické znázornění četnosti jednotlivých genotypů je zobrazen v grafu (obr. 20).



Obr. 20: Četnost jednotlivých genotypů pro polymorfismus rs11558538 v genu *HNMT* ve vyšetřovaném souboru.

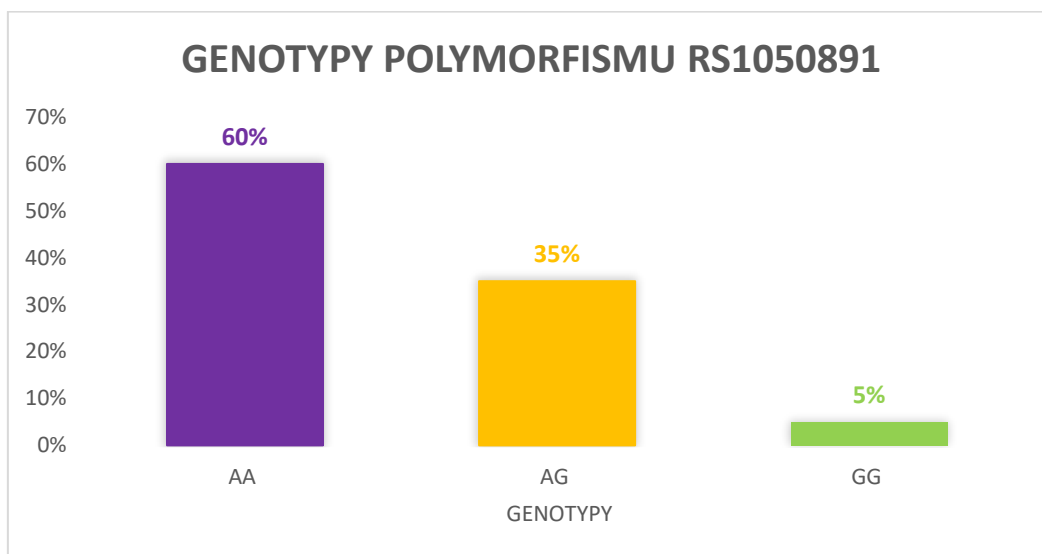
V tabulce XX jsou zobrazeny četnosti genotypů pro polymorfismus rs1050891 kódující HNMT. Absence minoritní alely vede k vyšší citlivosti k potravinářským barvivům u pacientů s ADHD.

Tab. XX: Četnosti jednotlivých genotypů pro polymorfismu rs1050891 v genu *HNMT* v testovaném souboru.

Genotyp	Počet	Četnost	Výsledek
AA	60	60 %	Nízká hladina HNMT, vyšší citlivost k potravinářským barvivům
AG	35	35 %	Heterozygot, snížená hladina HNMT
GG	5	5 %	Vysoká hladina HNMT.

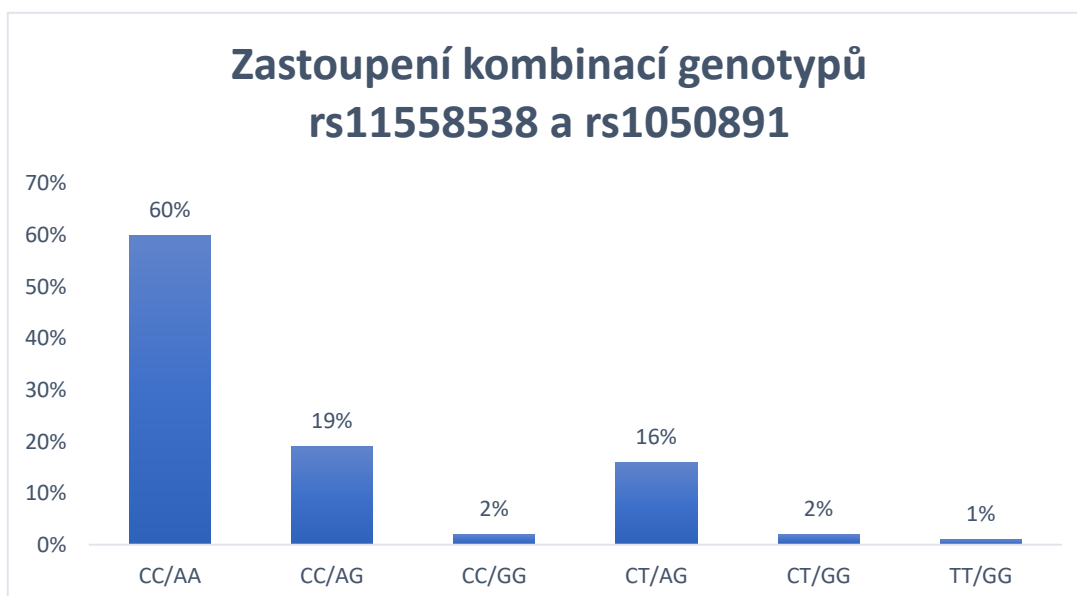
Z tabulky XX je patrné, že 60 % testovaných jedinců má vyšší citlivost k potravinářským barvivům a tento genotyp souvisí s nižší aktivitou HNMT, a tedy s vyšší hladinou histaminu v mozku. 5 % testovaných jedinců má dvě alely, které souvisí s vysokou

aktivitou HNMT a 35 % jedinců má heterozygotní genotyp. Stejné údaje jsou graficky zobrazeny na obrázku 21.



Obr. 21: Četnosti jednotlivých genotypů pro polymorfismu rs1050891 v genu *HNMT* v testovaném souboru.

V dalším grafu na obrázku 22 jsou uvedeny výsledky genetické analýzy pro oba polymorfismy rs11558538 a rs1050891 v genu *HNMT*.



Obr. 22: Výsledky genetické analýzy pro polymorfismy rs11558538 a rs1050891 v testovaném souboru.

Nejvíce zastoupeným haplotypem je CC/AA, který je z části asociován se sníženou aktivitou HNMT. Jen 2 % pacientů mají haplotyp (CC/GG) s vysokou aktivitou HNMT.

4.4 Analýza HLA-DQ2 a HLA-DQ8 pro predispozici k celiakii

Pro genotypizaci haplotypů HLA-DQ2.5, HLA-DQ2.2 a HLA-DQ8 asociovaných s predispozicí k celiakii bylo vyšetřeno 643 vzorků, které byly získány z bukalního stěru (77,1 %) nebo periferní krve (22,9 %). Koncentrace DNA se pohybovala od 1, 56 do 356 ng/μl. Vzorky byly získány od klientů v letech 2020 až 2022.

V tabulce XXI je zobrazena četnost vyšetření mezi muži a ženami včetně jejich průměrného věku.

Tab. XXI: Počet vyšetření v závislosti na pohlaví a průměrný věk pro obě skupiny.

Pohlaví	Počet	%	Průměrný věk
Žena	418	65	35,7
Muž	225	35	35,8

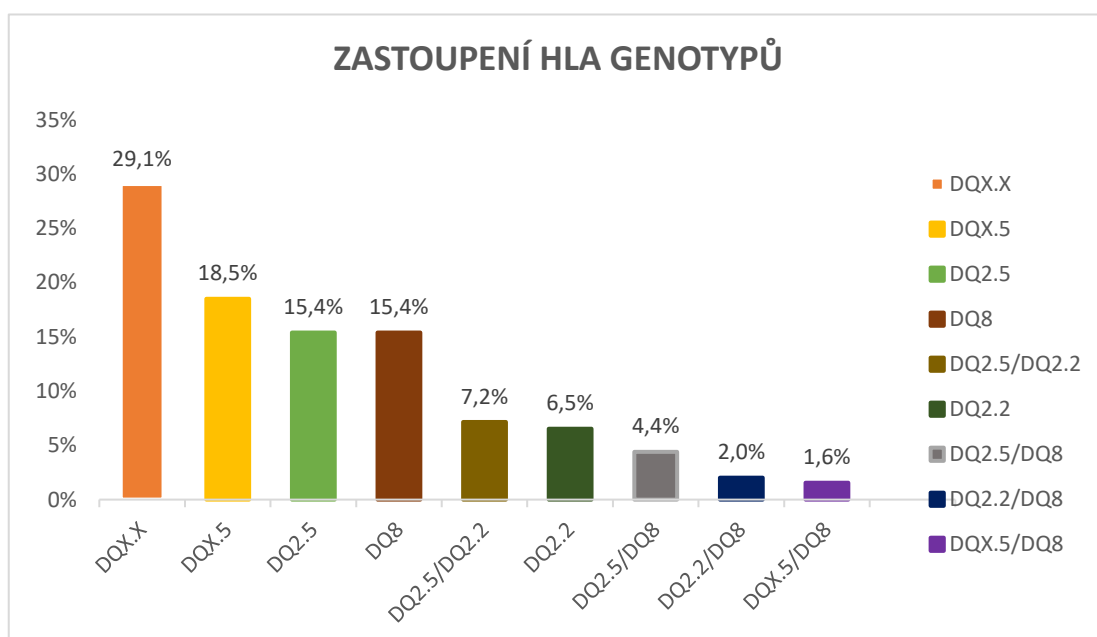
Z tabulky opět vyplývá, že více testovanou skupinou jsou ženy než muži, a to v poměru 65 % ku 35 %. Průměrný věk těchto skupin se neliší.

V tabulce XXII jsou zobrazeny možné haplotypy HLA asociované s rizikem vzniku celiakie.

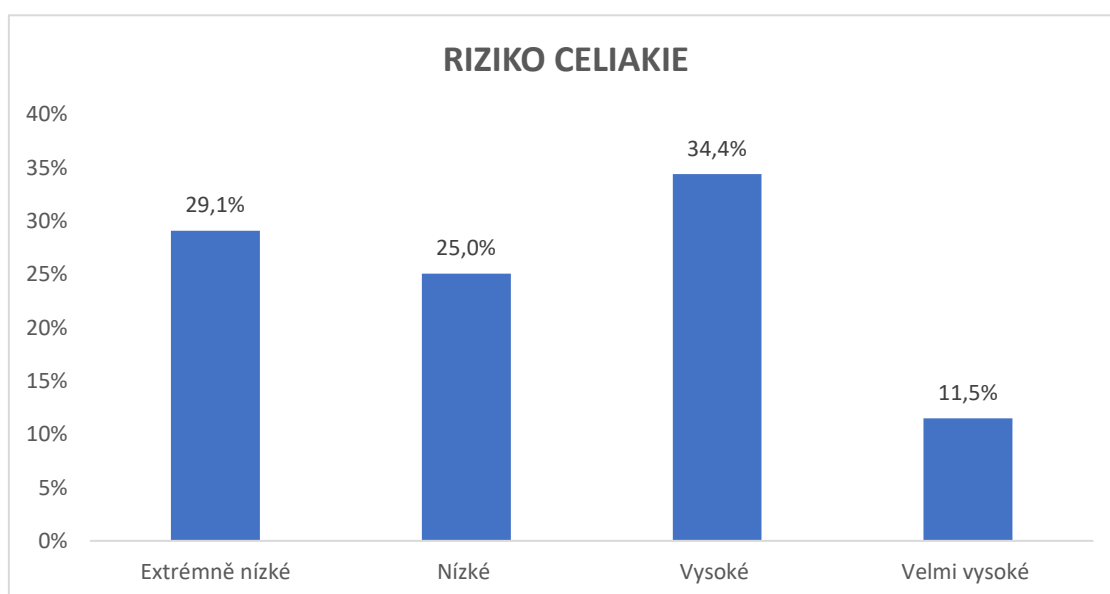
Tab. XXII: HLA haplotypy a riziko vzniku celiakie v testovaném souboru.

HLA haplotypy	Počet	Četnost	Riziko celiakie (dle Megiorni & Pizzuti, 2012)
DQX.x	187	29,1 %	Extrémně nízké
DQX.5	119	18,5 %	Nízké
DQ2.2	42	6,5 %	Nízké
DQ2.5	99	15,4 %	Vysoké
DQ8	99	15,4 %	Vysoké
DQX.5/DQ8	10	1,6 %	Vysoké
DQ2.2/DQ8	13	2,0 %	Vysoké
DQ2.5/DQ8	28	4,4 %	Velmi vysoké
DQ2.5/DQ2.2	46	7,2 %	Velmi vysoké

Z tabulky XXII vyplývá, že téměř 30 % testovaných jedinců nemá predispozici k celiakii (HLA-DQX.x) a je téměř nemožné, aby se u nich projevilo toto onemocnění. 25 % jedinců je nositelem haplotypu DQ 2.2 nebo DQX.5, který je asociován s nízkým rizikem vzniku celiakie. Téměř 45 % jedinců nese alely asociované s rozvojem celiakie. Pro lepší přehlednost byl vytvořen graf se zastoupením jednotlivých haplotypů (obr. 23) a další graf (obr. 24) zobrazuje četnost rizik pro vznik celiakie.



Obr. 23: Jednotlivé zastoupení HLA genotypů ve vyšetřovaném vzorku.



Obr. 24: Četnost jednotlivých rizik u testovaných pacientů s prokázanou predispozicí pro celiakii v testovaném vzorku.

4.5 Analýza genu *TNF SF15* A > G (rs4263839) pro predispozici k IBS

Pro polymorfismus rs4263839 v genu *TNF SF15* bylo vyšetřeno celkem 394 pacientů, z toho bylo 73, 4 % vzorků získáno z bukalního stěru a 26,6 % z periferní krve. Koncentrace DNA se pohybovala od 2,2 do 280 ng/μl. Vzorky byly získány během let 2020 až 2022.

V tabulce XXIII je zobrazen podíl vyšetřených žen a mužů a jejich průměrný věk.

Tab. XXIII: Podíl vyšetřených žen a mužů a jejich průměrný věk.

Pohlaví	Počet	%	Průměrný věk
Žena	257	65,2	35,3
Muž	137	34,8	35,3

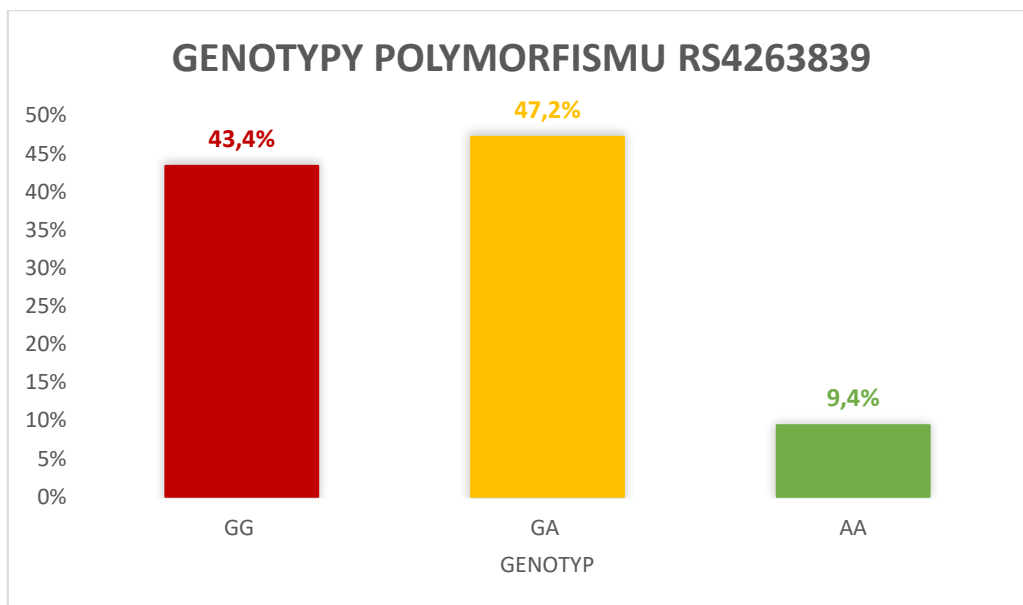
Jak už bylo uvedeno u předchozích intolerancí, ženy projevují o vyšetření větší zájem než muži. Průměrný věk u obou skupin je totožný (35,3 let).

V tabulce XXIV jsou uvedeny výsledky vyšetření polymorfismu rs4263839 v genu *TNF SF15*.

Tab. XXIV: Výsledky vyšetření polymorfismu rs4263839 v genu *TNF SF15* asociované se syndromem dráždivého tračníku v testovaném vzorku.

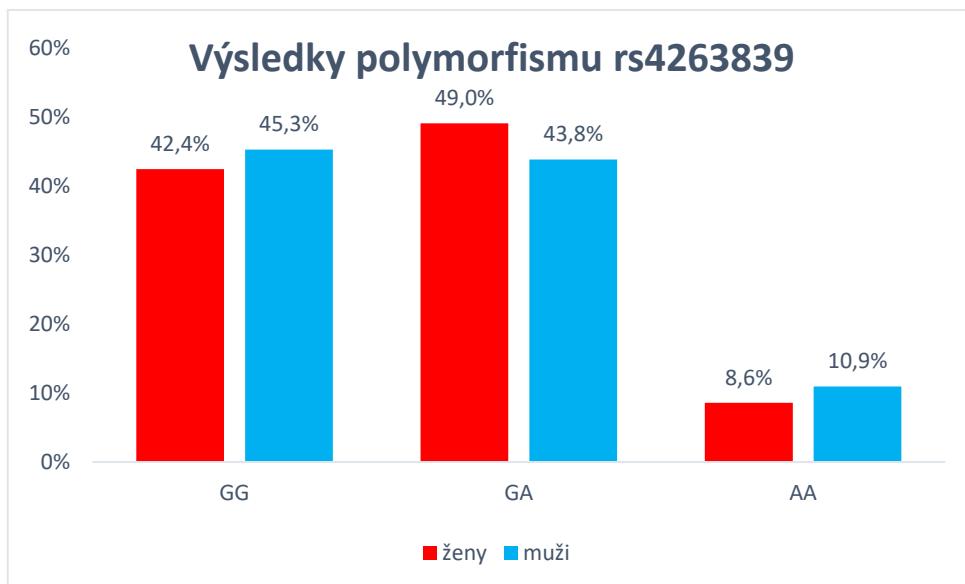
Genotyp	Počet jedinců	Četnost	Výsledek
GG	171	43,4 %	Riziko asociované s IBS
GA	186	47,2 %	Částečné riziko asociované s IBS
AA	37	9,4 %	Žádné riziko asociované s IBS

Z tabulky XXIV je patrné, že 43,4 % jedinců nese mutovaný genotyp, který souvisí s rozvojem IBS. Heterozygotní genotyp (tzn. 1 mutovanou alelu) nese 47,2 % jedinců. Pouze 9,4 % jedinců je nositelem genotypu AA, který není asociován s IBS. V grafu (obr. 25) je zobrazeno zastoupení jednotlivých genotypů.



Obr. 25: Výsledky vyšetření polymorfismu rs4263839 v genu *TNF SF15* asociované se syndromem dráždivého tračníku v testovaném vzorku.

Následně byla porovnána četnost jednotlivých genotypů pro polymorfismu rs4263839 v souvislosti s genderem (obr. 26).



Obr. 26: Genderový rozdíl v četnosti polymorfismu rs4263839 asociovaného se syndromem dráždivého tračníku v testovaném vzorku.

Na obrázku 26 lze vidět, že se nevyskytují velké rozdíly v genotypch mezi muži a ženami. Avšak u mužů se o 2,9 % častěji vyskytuje mutovaný genotyp GG, na druhou stranu

se u nich také častěji vyskytuje nemutovaný genotyp AA (o 2,3 %) než u opačného pohlaví. Ženy jsou o 5,2 % častějšími nositelkami heterozygotního genotypu (GA) než muži.

4.6 Možná asociace mezi jednotlivými intolerancemi

Součástí této studie bylo zjištění možné asociace mezi jednotlivými intolerancemi (laktózová intolerance, histaminová intolerance, celiakie a syndrom dráždivého tračníku). Bylo vybráno 99 pacientů, kteří podstoupili všechna výše uvedená vyšetření.

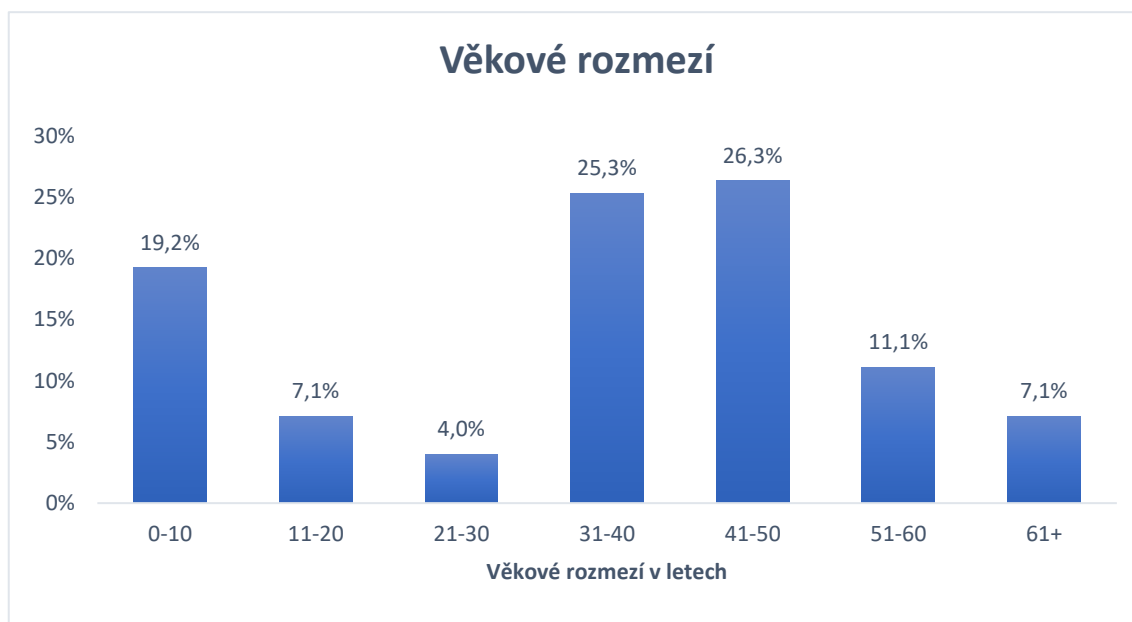
V tabulce XXV je uvedeno genderové zastoupení a průměrný věk testovaných jedinců.

Tab. XXV: Počet vyšetřených jedinců dle genderu a průměrný věk pro jednotlivé skupiny.

Pohlaví	Počet	%	Průměrný věk
Žena	59	59,6	34,7
Muž	40	40,4	34,4

Z tabulky XXV je opět patrné, že ženy mají o vyšetření větší zájem a průměrný věk oproti jednotlivým potravinovým intolerancím se nemění.

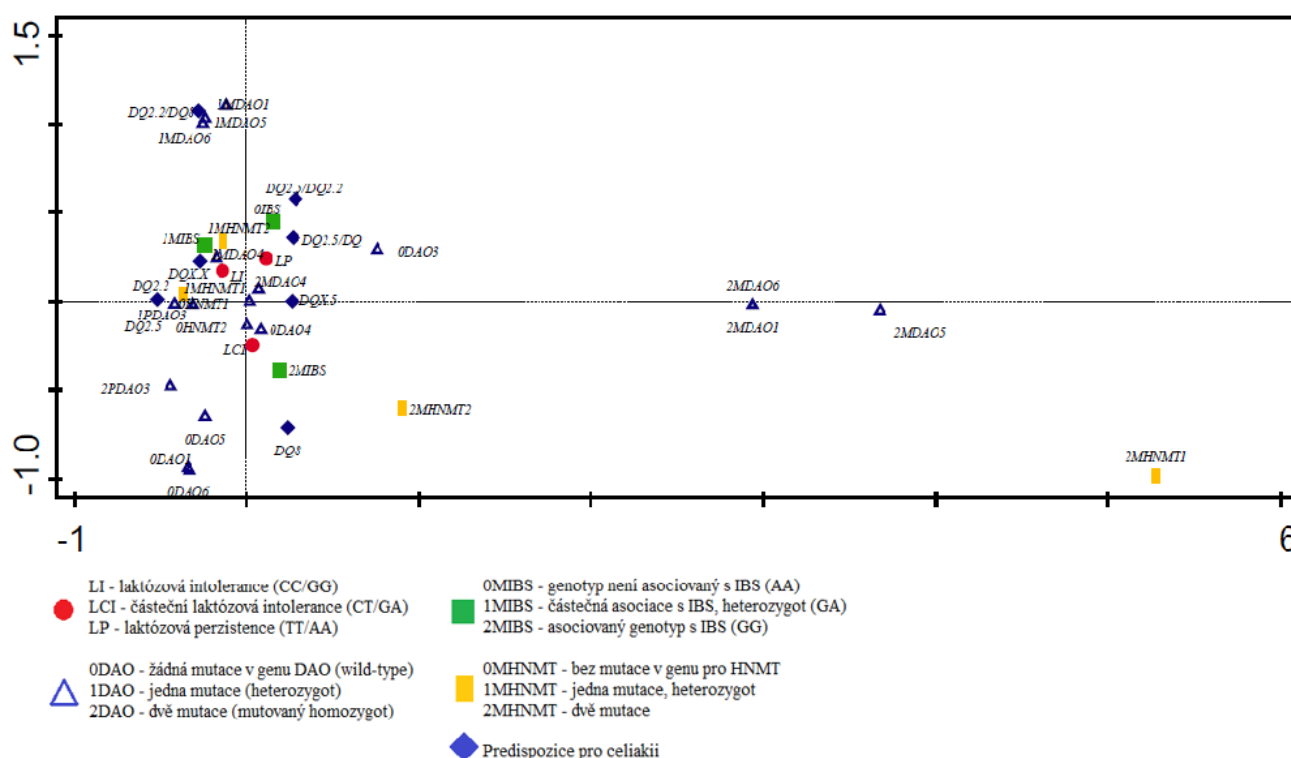
V grafu na obrázku 27 je zobrazeno věkové rozložení vyšetřených jedinců.



Obr. 27: Znázornění počtu vyšetřených jedinců v jednotlivých věkových kategoriích v testovaném souboru.

Nejvíce klientů se nechalo otestovat ve středním věku tzn. ve věku 31 až 50 let, což naznačuje, že se první klinické příznaky spojené se zažíváním vyskytují právě v této části života.

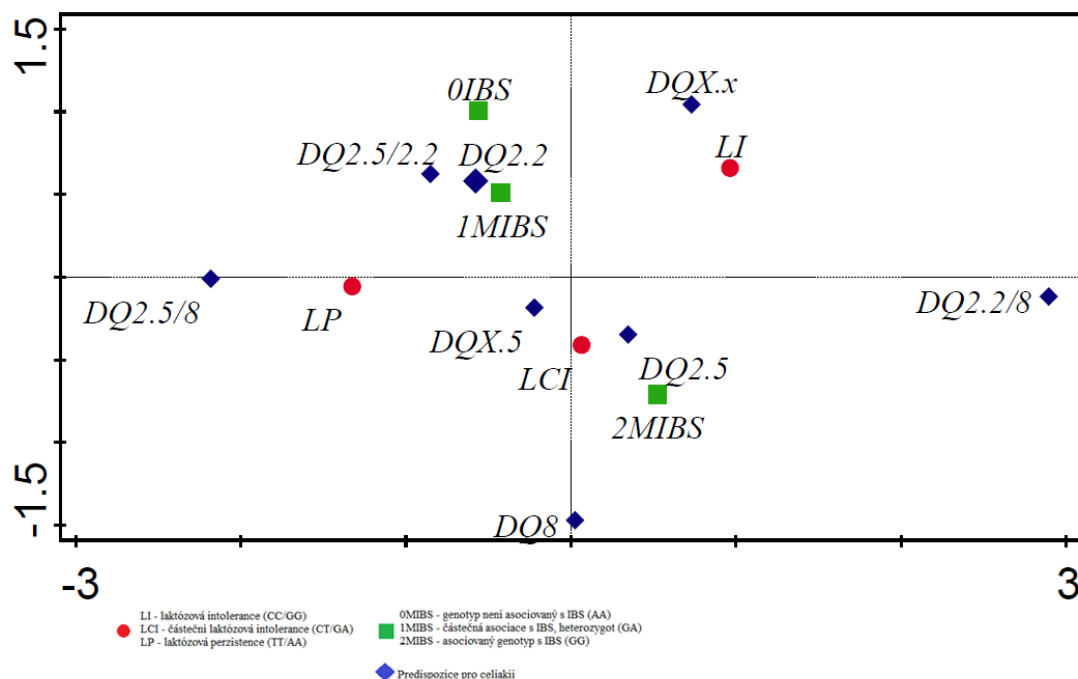
Společný výskyt genotypů související s predispozicí k LI, HIT, snížené aktivitě HNMT, IBS a celiakii je znázorněn na obrázku 28 a byl vyhodnocen pomocí DCA analýzy.



Obr. 28: Grafické znázornění analýzy laktózové, histaminové intolerance, IBS, celiakie a HNMT dohromady (DCA, první osa vysvětluje 12,9 %, druhá 24,6 %). Výsledky analýzy jsou pouze ilustrativní, nebyla zaznamenána žádná průkazná souvislost mezi jednotlivými intolerancemi.

Z obrázku 28 je patrné, že nebyla zaznamenána viditelná souvislost mezi jednotlivými genotypy. Z grafu vyplývá již prokázaná souvislost mezi DAO1 (rs10156191), DAO5 (rs2052129) a DAO6 (rs2268999), která je zobrazena na obrázku 19.

Pro lepší přehlednost byl vytvořen graf (obr. 29) společného výskytu LI, IBS a celiakie.



Obr. 29: Grafické znázornění analýzy LI, IBS a celiakie (DCA, první osa vysvětluje 13,7 %, druhá 26,6 %). Výsledky analýzy jsou pouze ilustrativní, nebyla zaznamenána žádná průkazná souvislost mezi jednotlivými intolerancemi.

Z ilustrativních výsledků (obr. 29) je patrný společný výskyt laktózové intolerance (LI) a haplotypu DQX.x vylučující celiakii. Dále je zde patrný společný výskyt částečné laktózové intolerance (LCI), mutovaného genotypu GG souvisejícího s IBS a haplotypu HLA-DQ2.5 souvisejícího s rozvojem celiakie. Získaná hodnota Explained variation vyjadřuje variabilitu 13,7 % první osy a 26,6 % druhé osy.

5. Diskuse

V posledních letech došlo k poměrně významnému zlepšení povědomí o potravinových intolerancích, ovšem jejich specifikace zůstává stále obtížná vzhledem k překrývajícím se příznakům. Chybí specifické diagnostické markery a ve většině případů se spoléhá na subjektivní symptomy a na testy, které mají často diagnostická úskalí. Pomoci by mohlo testování genetických predispozic, které by se mohlo stát automatickou součástí diagnostiky. V současnosti jsou známy konkrétní genetické predispozice asociované s různými potravinovými intolerancemi či gastrointestinálními onemocněními.

V rámci praktické části diplomové práce byli vyšetřeni klienti laboratoře GENLABS na genové predispozice k několika potravinovým intolerancím či gastrointestinálním onemocněním. Konkrétně k laktózové intoleranci (2510 jedinců), histaminové intoleranci (233 jedinců), genu HNMT zodpovědného za odbourávání histaminu v mozku (100 jedinců), predispozici pro celiakii (643 jedinců) a IBS (394 jedinců). Protože se jednalo o genetické testy, bylo nutné nejprve získat DNA, která byla izolována převážně z bukálních stěrů, ale i z periferní krve. Typ primárních vzorků nijak neovlivnil výsledky genetických testů. Stejně jako v případě izolace DNA z periferní krve, kdy jsou jejím zdrojem lymfocyty, i v případě izolace z bukálních stěrů je DNA izolována z lymfocytů a z epitelálních buněk bukální sliznice. Dle studie Theda *et al.* (2018) vyplývá, že až 74 % DNA z bukálních stěrů pochází z bílých krvinek, které obsahují velké množství kvalitní DNA. Bukální stěry proto poskytují stejné množství a kvalitu DNA pro genetická vyšetření jako periferní krev. Výhoda bukálních stěrů spočívá v jeho neinvazivním odběru, který je výhodný zejména u dětských pacientů. Navíc tento typ „samplingu“ si každý může provést sám, bez nutnosti návštěvy zdravotnického zařízení.

Genové polymorfismy zodpovědné za laktózovou intoleranci byly stanoveny pomocí PCR-RFLP. Další intolerance byly stanoveny pomocí real-time PCR. PCR-RFLP je metoda poměrně jednoduchá na přípravu, ale časově náročnější (skládá se ze dvou kroků: PCR a RFLP) a méně citlivá ve srovnání s real-time PCR. Finální odečítání výsledků je zásadně ovlivněno koncentrací a kvalitou DNA (což může ovlivnit také real-time PCR) a vyžaduje určitou zkušenost. I přes tato úskalí je tato metoda spolehlivá a dostačující pro získání potřebných výsledků. Výhodou real-time PCR je naopak jednoduchá příprava, rychlost a snadné odečítání výsledků bezprostředně po dokončení běhu. Naopak nevýhodou je vyšší cena reagentů a nákladnější vybavení laboratoře ve srovnání s PCR-RFLP. Metoda

PCR-RFLP patří mezi tzv. in-house metody, které si validuje laboratoř sama. V případě real-time PCR metod byly použity komerčně připravené detekční kity validované výrobcem.

Uvedená data byla získána testováním samoplátců, tzn. jejich diagnóza nebyla pro laboratoř známá. Ačkoli můžeme říci, že naprostá většina testovaných jedinců si testy objednala na základě potíží s trávením a nespecifickou bolestí břicha nebo plynatostí, v některých případech šlo o bolesti hlavy nebo ekzémy. Největší poptávka byla po testech na laktózovou intoleranci, následovala predispozice pro celiakii, IBS a histaminovou intoleranci. U všech testovaných intolerancí měly o vyšetření výrazně vyšší zájem ženy. To může být důsledkem toho, že ženy jsou obecně intolerancemi postiženy častěji (Hrubisko *et al.*, 2021), anebo se více zajímají o svůj zdravotní stav. Průměrný věk mužů a žen se také příliš nelišil, pohyboval se kolem 35 let. Nejčastěji testovanou skupinou byli pacienti ve věku 31-50 let. Můžeme tedy předpokládat, že klinické symptomy se u pacientů začínají vyskytovat ve středním věku. Získaná data byla analyzována v programu Canoco pomocí CCA analýzy (ter Braak & Smilauer, 2012), ovšem ani vliv pohlaví a věku se v tomto případě nepodařilo tímto multivariátním testem prokázat. Naše výsledky byly porovnány s evropskou populací získanou z databáze Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022).

K určení LI byly testovány dva SNP C/T-13910 a G/A-22018 v genu *MCM6*. Tyto polymorfismy lze použít k diagnostice laktózové intolerance u kavkazské populace a jejich detekce je v tomto případě vysoce specifická (95 %) a senzitivní (97 %) ve srovnání s často používaným vodíkovým dechovým testem (Fassio *et al.*, 2018). Problém nastává u pacientů s asijským nebo africkým původem, u kterých tyto polymorfismy nejsou asociované s rozvojem LI, a proto u nich není tato diagnostika doporučována (Misselwitz *et al.*, 2019).

Soubor vyšetřených pro laktózovou intoleranci se skládal z 2 510 vzorků získaných od klientů laboratoře GENLABS. Většina klientů začala pátrat pomocí testu na laktózovou intoleranci po příčině svých trávicích obtíží, a proto je tento soubor na počet provedených testů ve srovnání s ostatními intolerancemi největší. V případě polymorfismu C/T-13910 bylo nalezeno 31,1 % pacientů s genotypem CC, který je zodpovědný za úplný pokles enzymu laktázy v dospělosti a je asociovaný s rozvojem laktózové intolerance a nemožností trávit mléčný cukr laktózu. V daném souboru byl zastoupen nejvíce heterozygotní genotyp CT (47,6 %), který souvisí s částečnou intolerancí laktózy. Tento genotyp je charakterizován středními hodnotami laktázy, které ale obvykle stačí k trávení laktózy. Výskyt symptomů se neprojeví, pokud aktivita laktázy neklesne pod 50 %. Genotyp charakterizovaný celoživotně vysokou aktivitou laktázy (TT) se vyskytoval u 21,3 % jedinců, kteří by neměli mít problém

tento disacharid trávit. Je důležité si uvědomit, že tolerance laktózy může být velmi individuální a je ovlivněna nejen vrozenými dispozicemi, ale také souběžnou přítomností jiných intolerancí, složením mikrobiomu apod. Většina pacientů s vrozenou LI laktózu v malých dávkách toleruje (obvykle 12 g laktózy), pokud je rozložena v průběhu dne (Deng *et al.*, 2015).

Testováním polymorfismu C/T13910 v české populaci se zabývala např. práce Hubáček *et al.* (2017), kde se neperzistentní genotyp CC vyskytoval u 23,6 % jedinců, heterozygotní genotyp CT u 50,7 % a genotyp TT související s perzistencí laktázy v 25,7 %. Frekvence genotypů jsou ve srovnání s našimi daty více méně podobné, ale v našem vzorku se vyskytuje o 7,5 % více neperzistentního genotypu CC. Vyšší zastoupení genotypu zodpovědného za intoleranci laktózy v námi vyšetřovaném souboru můžeme vysvětlit tím, že pozitivní jedinci se nechali testovat cíleně na základě podezření na laktózovou intoleranci. Ovšem v takovém případě by zastoupení genotypu CC mělo být logicky ještě významnější. Důvodem může být zaměňování jednotlivých intolerancí z hlediska překrývajících se příznaků, které jsou subjektivně velmi těžko rozpoznatelné. Tzn. klient si myslí, že trpí LI a přitom ho trápí např. celiakie, IBS nebo kombinace obou. Vysoký počet testovaných osob formou samoplátectví může být způsoben i tím, že tento genetický test není lékařem nabídnut v rámci služeb hrazených ze zdravotního pojištění. V mnoha případech přitom lékař informuje pacienta o možné laktózové intoleranci a doporučí bezlaktózovou dietu (pouze na základě symptomů). Proto se pacienti obrací přímo na laboratoře a jejich komerční služby a testy si raději zaplatí.

V případě analýzy druhého polymorfismu G/A-22018 v *MCM6* genu byly pozorovány téměř totožné frekvence obou homozygotních i heterozygotních genotypů jako u C/T-13910, z čehož plyne, že tyto dva polymorfismy jsou v genové vazbě. Genová vzdálenost mezi oběma SNPs je okolo 8 kb, a proto se rekombinace vyskytuje jen zřídka (Deng *et al.*, 2015). Celkem 30,2 % jedinců mělo genotyp CC/GG asociovaný s laktózovou intolerancí, 46,9 % heterozygotní genotyp CT/GA a 21,2 % jedinců genotyp TT/AA charakterizovaný celoživotní laktózovou perzistencí. V 1,7 % případů byly nalezeny variantní genotypy CC/GA, CC/AA a CT/AA, které nejsou obstojně popsány v odborné literatuře a nebyly provedeny ani potřebné srovnávací nebo funkční testy např. s dechovým testem. Variantní genotypy byly interpretovány jako intolerantní, a to dle genotypu CC pro polymorfismus C/T-13910, který se jeví jako funkčně významnější. Vzhledem k získaným výsledkům, kdy bylo vyšetřeno více než 2500 vzorků, se jeví vyšetření druhého polymorfismu G/A-22018 jako nadbytečné.

Pro analýzu vrozených predispozic pro histaminovou intoleranci bylo otestováno celkem 233 vzorků na pět různých SNPs v genu *AOC1* souvisejících s aktivitou DAO. Funkční studie prokázaly, že minoritní alely u rs10156191 (DAO1), rs1049793 (DAO4), rs2052129 (DAO5) a rs2268999 (DAO6) vykazují sníženou aktivitu enzymu DAO a byly spojeny se symptomy histaminové intolerance. Naopak minoritní alela rs1049748 (DAO3) mírně zvyšuje aktivitu DAO a má spíše ochranný účinek před HIT. K rozvinutí příznaků HIT je nutný výskyt více minoritních alel souvisejících se sníženou aktivitou DAO (Maintz *et al.*, 2011). Proto byly vybrány a otestovány právě tyto nejvýznamnější SNPs. Nejčastěji je HIT diagnostikována sérologickým testem, avšak ten nemusí být vždy přesný a hladiny DAO v séru nemusí korelovat s aktivitou tohoto enzymu ve střevě. Genetické testování těchto jednonukleotidových polymorfismů by mohlo být užitečným doplněním diagnostiky histaminové intolerance (Hrubisko *et al.*, 2021).

Z výsledků genetického testování pro rs10156191 (DAO1) vyplývá, že 46,6 % jedinců má tzv. wild-type genotyp (CC) zajišťující normální aktivitu DAO. Heterozygotní genotyp (CT) byl nalezen u 43,3 % jedinců a mutovaný genotyp (TT) nese 9,9 % jedinců. Výskyt minoritní alely, a tedy mutace v tomto polymorfismu souvisí kromě klasických symptomů HIT také s výskytem migrén. Výsledné genotypy byly porovnány s frekvencemi genotypů v evropské populaci získanými z databáze Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022). Frekvence genotypů pro evropskou populaci jsou následující CC 54,3 %, CT 38,4 % a TT 7,4 %. Minoritní alela T je tedy více zastoupená v našem souboru (31,5 %) než v evropském (26,5 %).

V případě polymorfismu rs1049748 (DAO3) byl wild-type genotyp TT nalezen u 33,5 % jedinců (data pro evropskou populaci uvádí 37 %). Tento genotyp je charakterizován normální aktivitou DAO. Nejvíce byl zastoupen heterozygotní genotyp CT u 48,9 % testovaných jedinců (evropská populace – 48,5 %). Mutovaný genotyp CC asociovaný se zvýšenými hladinami DAO se vyskytoval u 17,6 % (evropská populace 14,5 %). Alela C je tedy protektivní a v námi testovaném souboru se vyskytovala v 42 % a byla zastoupena více než v evropské populaci (38,8 %).

V případě polymorfismu rs1049793 (DAO4) se wild-type genotyp CC vyskytoval u 48,1 % jedinců, heterozygotní genotyp CG u 40,3 % a homozygotní genotyp GG u 11,6 % jedinců (evropská populace: CC 52,5 %, CG 41,1 %, GG 6,4 %). Minoritní alela G související se sníženou aktivitou byla zastoupená v našem vzorku (31,7 %) více než v evropském (26,9 %).

Frekvence genotypů u polymorfismu rs2052129 (DAO5) byla v testovaném souboru následující: GG 53,6 %, GT 39,9 %, TT 6,4 %. Data pro evropskou populaci uvádí: GG 55,7 %, GT 38,8 %, TT 5,5 %. Minoritní alela T byla zastoupena v našem vzorku v 26,3 % a evropském v 25,0 %, z čehož plyne, že mírně vyšší zastoupení se vyskytuje v našem vzorku.

Polymorfismus rs2268999 (DAO6) se vyskytoval v následujících frekvencích: AA 48,1 %, AT 42,1 %, TT 9,9 % (evropská populace: AA 53,5 %, AT 38,8 %, TT 7,7 %). V tomto případě je minoritní alela T v našem souboru (30,9 %) zastoupena o 3,8 % více než v evropském (27,1 %).

Ze získaných dat vyplývá, že se u pacientů laboratoře GENLABS v případě všech testovaných polymorfismů vyskytuje více mutovaných alel v porovnání s evropskou populací. Důvodem vyššího výskytu mutovaných alel v testovaném souboru může být fakt, že jedinci trpěli příznaky HIT jako jsou ekzémy, migrény apod. a nechali se testovat cíleně. Skutečná a také společná (haplotypová) frekvence uvedených SNPs v české populaci zatím nebyla popsána.

Protože bylo testováno u každého jedince současně více SNPs v genu *AOC1*, bylo možné určit haplotypové frekvence a celkové zastoupení minoritních alel asociovaných s HIT. Tato data nebyla dosud s vysokou pravděpodobností publikována ani pro českou, ani jinou populaci. Celkem bylo stanoveno 24 různých haplotypů asociovaných se sníženou aktivitou DAO uvedených v tab. XVI. Nejvíce zastoupeným haplotypem byl haplotyp CC/CC/GG/A, tedy bez mutace, a to u 24,9 % jedinců. V tomto případě nebyla prokázána genetická predispozice ke snížené aktivitě enzymu DAO a není zde předpoklad pro rozvoj HIT. V takové situaci mohou být příznaky histaminové intolerance vysvětleny nevhodnou stravou (potraviny s vysokým obsahem histaminu), konzumací alkoholu a léků snižující DAO či složením mikrobiomu.

U 51 % testovaných jedinců byl detekován některý z haplotypů se 3 a více mutacemi v genu *AOC1*. Je vysoce pravděpodobné, že pro rozvoj symptomů HIT má význam současná přítomnost více mutací, a tedy přítomnost více rizikového haplotypu. Navíc 15 % jedinců mělo haplotyp obsahující genotyp se dvěma minoritní alelami v jednom SNP. Literatura v tomto případě uvádí dvojnásobné riziko pro HIT v porovnání s heterozygoty. Bylo prokázáno, že přítomnost mutací ovlivňuje hladinu DAO a predisponování jedinci budou mít velmi pravděpodobně předpoklady k nižšímu odbourávání histaminu a možnému

rozvoji histaminové intolerance. Důležité je však zmínit, že je HIT multifaktoriální stav, na kterém se kromě genetiky podílí další environmentální faktory či stav mikrobiomu.

Z grafu (obr. 19) vyplývá, že genotypy pro rs10156191 (DAO1), rs2052129 (DAO5) a rs2268999 (DAO6) a jejich minoritní alely se vyskytují současně. To potvrzuje i fakt, že druhým nejzastoupenějším haplotypem (16,7 %) je CT/CC/GT/AT. Možná genová vazba mezi těmito polymorfismy byla naznačena i v publikaci (Maintz *et al.*, 2011).

V rámci SGA projektu bylo vyšetřeno 100 pacientů na 2 polymorfismy (rs11558538 a rs1050891) související se sníženou aktivitou HNMT, asociovanou se zvýšenou hladinou histaminu v mozku, který může vést k různým mozkovým poruchám či migrénám. Příčinou je jeho snížené odbourávání. Minoritní alela T u polymorfismu rs11558538 je asociována se sníženou aktivitou HNMT, a tedy se zvýšeným rizikem migrén. Na druhou stranu tato alela může souviset se sníženým rizikem rozvoje Parkinsonovy choroby (Jiménez-Jiménez *et al.*, 2016). Genotyp CC zodpovědný za normální hladinu HNMT se vyskytoval u 81 % jedinců, heterozygotní genotyp CT byl detekován u 18 % jedinců a pouze 1 % mělo mutovaný genotyp TT, který souvisí se sníženou hladinou HNMT. Dříve byla alela T u tohoto polymorfismu spojována s výskytem astmatu u dětí, ale tento fakt byl již vyvrácen (Sasaki *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2005). V evropské populaci je frekvence genotypu CC v 79,7 %, heterozygotní genotyp se vyskytuje v 19,7 % a mutovaný genotyp TT v 0,6 %, z čehož vyplývá, že se četnosti alel v našem a evropském vzorku významně neliší.

Minoritní alela G u polymorfismu rs1050891 stabilizuje HNMT a jeho enzymatickou aktivitu. Absence této alely vede ke snížené aktivitě HNMT, a tedy zvýšené hladině histaminu. Dle studie Stevenson *et al.* (2010) vede absence minoritní alely G ke zvýšení rizika ADHD při konzumaci potravinářských barviv jako karmoisin, tartrazin, chinolinová žlut' či benzoát sodný. Alela G je také asociována se sníženým rizikem vzniku aspirinem indukované chronické kopřivky v porovnání s genotypem AA. U 60 % námi vyšetřených jedinců se vyskytoval genotyp AA, tito jedinci mohou být náchylnější k potravinářským barvivům a aspirinu. 35 % nese heterozygotní genotyp a jen 5 % je nositelem dvou minoritních alel souvisejících s vysokou aktivitou HNMT v mozku. U evropské populace se frekvence genotypů liší jen v rámci desetin procent (AA – 61,4 %, AG – 34,2 %, GG – 4,4 %).

Hlavní genetickou predispozicí k celiakii představují rizikové haplotypy HLA-DQ2 a HLA-DQ8, které jsou nezbytné pro rozvoj celiakie. Absence těchto rizikových haplotypů vylučuje z 98 % rozvoj celiakie z důvodu nevnímavosti lepku. Přibližně 90 % pacientů

s celiakií nese heterodimer HLA DQ2.5 (Sahin & Mermer, 2022). U pacientů nesoucí HLA DQ2.5 i HLA DQ 2.2 se vyskytuje zvýšené riziko a agresivnější průběh celiakie. Pacienti s celiakií (10 %) negativní pro HLA DQ2.5 jsou pozitivní pro heterodimer HLA-DQ8.

V genetické laboratoři GENLABS bylo v letech 2020 až 2022 vyšetřeno celkem 643 jedinců, kteří nebyli diagnostikováni lékařem a vyšetření si hradili sami pouze na základě subjektivně vyhodnocených příznaků. Naprostá většina z nich si nechala otestovat prioritně LI. U 29,1 % jedinců nebyl identifikován rizikový faktor (DQX.x), a proto je u nich rozvoj celiakie téměř vyloučen. U 70,9 % testovaných byla přítomna některá z alel souvisejících s možným rozvojem celiakie a 45 % jedinců bylo nositeli alel spojených s vysokým rizikem rozvoje celiakie. V námi testovaném souboru jsme našli podstatně vyšší zastoupení HLA DQ8 (15,4 %) než je běžně uváděno, a navíc odpovídalo výskytu HLA DQ2.5 (15,4 %). Oba haplotypy samostatně přinášejí vyšší riziko pro celiakii a pokud jsou přítomny současně, riziko se ještě zvyšuje (výskyt HLA DQ2.5/DQ8 se vyskytuje v našem souboru u 4,4 % jedinců). Přitom výskyt DQ2.5 je při diagnostice celiakie běžně odhaleno u 90 % pacientů a DQ8 pouze u 8 % pacientů s celiakií. Odborná literatura uvádí, že se intolerance lepku projeví pouze u 3 % jedinců nesoucích rizikový haplotyp. HLA typizace proto není diagnostickým standardem, ale zůstává spolehlivým testem k vyloučení celiakie a je stále více využívána klinickými lékaři pro podporu diagnózy nebo při pochybných případech celiakie (Megiorni & Pizzuti, 2012).

Syndrom dráždivého tračníku je multifaktoriální onemocnění, na jehož rozvoji se podílí také genetické predispozice. Důležitými se ukázaly polymorfismy cytokinových genů, které souvisí s dysregulací imunitního systému a rozvojem IBS. Přítomnost SNPs v genu *TNFSF15*, které vyvolávají imunitní odpověď pomocí Th17 buněk, mohou hrát roli v autoimunitních a zánětlivých onemocněních (Zhu *et al.*, 2019). Jako nejdůležitější se jeví polymorfismus rs4263839, kdy alela G zvyšuje riziko IBS a byla prokázána u všech podtypů IBS (IBS-C, IBS – D, IBS-U). Mimo to je tato alela spojována s rozvojem Crohnovy choroby. Celkově bylo vyšetřeno 394 jedinců se subjektivními příznaky vedoucími k IBS, jednalo se tedy o nediodagnostikovaný soubor jedinců. Celkem 90,6 % vyšetřených neslo alespoň jednu rizikovou alelu G, jednalo se o 47,2 % heterozygotů GA a 43,4 % homozygotů GG s možnou náchylností k rozvoji IBS. Jen 9,4 % vyšetřených jedinců neslo nerizikový genotyp AA. Frekvence jednotlivých genotypů v evropské populaci získaných z databáze Ensembl (Cunningham *et al.*, 2022) se lišily jen v rámci jednotek procent (evropská populace: GG 45,9 %, GA 43,7 %, AA 10,3 %). Největší rozdíl byl zaznamenán ve výskytu

heterozygotního genotypu, a to s rozdílem 3,5 %. Ze získaných dat i populačních frekvencí jasně vyplývá, že značná část populace nese vrozené riziko pro IBS.

Dosud zřejmě nebyla publikována práce, která by se zabývala souběžným výskytem genetických predispozic pro více potravinových intolerancí. Na tuto problematiku jsme se proto zaměřili. Potravinové intolerance se v symptomech většinou překrývají, a proto je obtížné je od sebe navzájem odlišit na základě subjektivních příznaků pacienta, které často bývají u intestinálních problémů primárním diagnostickým kritériem.

Bylo vybráno 99 pacientů, u kterých byly vyšetřeny všechny výše zmíněné intolerance, a proto bylo možné porovnat souběžný výskyt genetických predispozic, které byly porovnány multivariátní analýzou ve statistickém programu Canoco (ter Braak & Smilauer, 2012). Data byla hodnocena pomocí metody CCA (Canonical Correspondenc Analysis). Závislými proměnnými byly výsledné genotypy pro geny související s predispozicemi k potravinovým intolerancím (LI, HIT, HNMT, IBS, celiakie) a jako vysvětlující proměnné sloužili věk a pohlaví. Výsledky analýzy ovšem neprokázaly žádný vliv věku ani pohlaví na rozložení testovaných genotypů (P nejméně 0,234), proto byla pro vizualizaci dat provedena DCA (Detrended Correspondenc Analysis) analýza.

Ačkoli vyšetření jedinci nebyly diagnostikováni, přesto se u nich vyskytovaly nepříjemné zdravotní problémy. Nejčastěji se jednalo o bolesti břicha, nadýmání, ucpaný nos, či bolesti hlavy. Z výsledků CCA analýzy (graf 28) neplyne žádná průkazná souvislost, že by spolu měly intolerance a jejich jednotlivé genotypy souviset. V praxi se ale často vyskytují intolerance společně (např. sekundární LI se vyskytuje společně s celiakií). Rozvinutí jedné intolerance, může vést k poškození střevního mikrobiomu a střevní výstelky, a tím spustit jinou intoleranci.

U jedinců, kteří byli vyšetřeni na všechny výše zmíněné intolerance, mohou výsledky genetických testů přinést informace o pravděpodobné příčině a nastavit tak personalizovanou eliminační dietu. Např. pokud má jedinec laktózovou perzistenci (TT/AA) s vysokou pravděpodobností mu laktóza nebude působit potíže a nepříjemné zdravotní symptomy budou způsobeny jinou intolerancí nebo gastrointestinálním onemocněním, jehož predispozici odhalí další genetický test. Pak může být zvolena adekvátní dieta vedoucí ke zmírnění či vymizení příznaků.

Současný výskyt intolerancí pomocí Canoco nebyl průkazný, a proto byly vytvořeny ilustrativní grafy pomocí metody DCA. Z grafu (obr. 29), který porovnává souběžný výskyt

predispozice k LI, celiakii a IBS, je patrný souběžný výskyt LI (CC/GG) spolu s nerizikovým haplotypem pro rozvoj celiakie (HLA-DQX.x). U těchto pacientů je proto velmi pravděpodobné, že příčinou problémů je laktóza a jejím vyřazením by měly nepříjemné příznaky vymizet. Dále je zde naznačen souběžný výskyt 3 různých intolerancí, částečné laktózové intolerance (CT/GA), rizikového haplotypu HLA-DQ2.5 asociovaného s rozvojem celiakie a mutovaného genotypu GG, který je rizikový pro rozvoj IBS. Výskyt těchto tří rizikových faktorů pak může s přehledem vysvětlit skrytou příčinu zdravotních potíží, kdy vnějším spouštěčem onemocnění bývá stres nebo těžká viróza. Tolerance laktózy je pak spojena spíše s rizikem pro celiakii. Rizikové haplotypy pro celiakii jsou v blízkosti rizikových genotypů pro IBS (IBS GA s mírně rizikovým DQ2.2 a nerizikový IBS AA s vysoce rizikovým DQ2.5/DQ2.2). Souběžný výskyt několika vrozených rizik pro různé intolerance není vůbec vzácný a preventivní eliminace lepku i laktózy je tedy vhodná pro celiaki, LI i IBS.

Získané výsledky jsou pouze ilustrativní a pro jejich ověření by byl vhodný přesný odběr anamnézy pacienta a objektivní vyhodnocení zdravotních obtíží doplněné o biochemické a imunologické testy. Pomohlo by také dotazníkové šetření, které by sbíralo informace především o subjektivních pocitech pacienta, reálných klinických příznacích, složení jídelníčku a potenciálních potravinách vyvolávajících problémy či o souběžné přítomnosti jiných autoimunitních onemocnění. Následně by bylo vhodné tyto informace statisticky zpracovat a dát do souvislosti se zjištěnými genetickými predispozicemi.

Nesmíme zapomenout na to, že zdravotní problémy mají vždy multifaktoriální charakter a genetické pozadí nemusí být jejich hlavní příčinou. Nezanedbatelný je pak vliv prostředí, životního stylu, pracovního i osobního stresu, dalších komorbidit apod. Genetická vyšetření jsou velmi exaktní. Znalost genových predispozic přináší tedy přesnější a ucelenější obraz o charakteru onemocnění jako v mnoha dalších zdravotních oborech (onkologie, prenatální diagnostika, kardiologie, farmakologie apod.). Dokážeme pak lépe pochopit skutečnou příčinu potíží, zmírnit jejich dopady, popř. je zcela vyřešit.

6. Závěr

Protože jsou potravinové intolerance celosvětově rozšířeným problémem, zájem o tuto problematiku neustále roste nejen ze strany odborné, ale i laické veřejnosti. V teoretické části byly přehledně shrnuty aktuální poznatky o LI, HIT, snížené aktivitě HNMT, celiakii a IBS. Jedná se o nejvíce prozkoumané potravinové intolerance z genetického hlediska, kdy jsou jasně známy rizikové genotypy. Protože symptomatika intolerancí je velmi podobná, jsou často zaměňovány mezi sebou nebo za jiná obdobně probíhající onemocnění. Diagnostické testy jsou často nejednoznačné, a proto i genetické testování jasně přispívá k vyloučení nebo určení správné diagnózy. Každý nový diagnostický přístup je zde žádoucí.

Pro identifikaci rizikových genotypů byly použity dvě metody založené na analýze DNA: PCR RFLP a real-time PCR. V rámci praktické části diplomové práce byly zvládnuty základní metody molekulární biologie, jako je izolace DNA z bukových stěrů nebo periferní krve, příprava a provedení PCR nebo real-time PCR, provedení gelové elektroforézy, restriční štěpení a odečet získaných výsledků. V metodice jsou popsány konkrétní postupy použité pro identifikaci rizikových haplotypů. Výběr primárního vzorku výsledky testů nijak neovlivnil.

Celkem bylo vyhodnoceno více než 4000 genetických testů. Pro jednotlivé potravinové intolerance, tedy pro LI, celiakii, IBS i HIT, byly stanoveny genotypové frekvence odpovídající nediagnostikované české populaci. Výsledky byly následně porovnány s daty uváděnými pro evropskou populaci (databáze Ensembl). Přestože se frekvence rizikových haplotypů v námi testovaném souboru významně nelišila, byly nalezeny některé rozdíly jako např. vyšší procento jedinců s úplnou intolerancí laktózy (30 %), rizikové haplotypy pro celiakii byly nalézány velmi často a vyskytovaly se u cca 70 % testovaných, rizikový genotyp GG v homozygotním stavu asociovaný s IBS byl detekován u 43 % jedinců. V případě HIT byl nalezen souběžný výskyt 3 a více minoritních alel dokonce u 51 % jedinců. Vysoká aktivita HNMT byla prokázána pouze u 2 % jedinců. Téměř všichni testovaní jedinci vykazovali subjektivní příznaky typické pro některou z uvedených intolerancí (pouze u malého procenta šlo o čistě preventivní testování). Na základě genetických testů se u mnoho z nich podařilo prokázat, které potraviny jsou pro ně nejméně vhodné a na základě toho mohla být doporučena příslušná dieta. Pomocí multivariačních statistických analýz jsme se také u 99 jedinců pokusili najít souvislosti mezi výskytem jednotlivých genetických rizik asociovaných s intolerancemi. Získané výsledky byly sice neprůkazné, ale byly vytvořena zajímavá ilustrativní data spojující

např. laktózovou intoleranci (genotyp CC/GG) s nerizikovým haplotypem HLA DQX.x pro celiakii, a naopak laktózovou perzistenci s přítomností rizikových alel pro celiakii. Naopak tolerance laktózy (LP) se vyskytuje spíše v blízkosti rizikových haplotypů pro celiakii a ty zase v blízkosti rizika pro IBS. V případě HIT byla nalezena viditelná vazba mezi SNPs v této práci pracovně označovanými jako DAO1, DAO5 a DAO6. Získané výsledky by si zasloužily rozšíření o diagnostická data, která by do problematiky potravinových intolerancí přinesla nový vhled. Je známo, že se potravinové intolerance mohou objevit kdykoli během života, přičemž nepůsobí pouze na gastrointestinální trakt, ale podílejí se logicky také na stavu imunity a psychiky a tím mohou zásadně ovlivňovat kvalitu života, pracovní výkonnost apod. Poměrně elegantním řešením je pak eliminační dieta bez nutnosti užívání léků či jiných invazivních zákroků.

7. Zdroje

- Alizadeh, M., Casella, G., Brianza, A., Francesco Tovoli, I., Jabeen, S., M-u-D, A., Abdulmonem, A. W., Faridi, A. T., Shah, A. S., Copyright, fnut, Abdulmonem, A., Faridi, A., Shah, A., Ullah Khan, A., Ahmed, W., Ahmad, M.-D., Ahmad Jafri, S., Bacha, U., Ali, A., ... Ur-Rehman, H. (n.d.). *OPEN ACCESS EDITED BY Disease specific symptoms indices in patients with celiac disease-A hardly recognised entity*.
- 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. In *Nutrients* (Vol. 12, Issue 9, pp. 1–20). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu12092689>
- Barger, B. G., & Dale, H. H. (n.d.). *CHEMICAL STRUCTURE AND SYMPATHOMIMETIC ACTION OF AMINES*.
- Bhattarai, Y., Muniz Pedrego, D. A., & Kashyap, P. C. (2016). Irritable bowel syndrome: a gut microbiota-related disorder? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 312(1), G52–G62. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00338.2016>
- Biesiekierski, J. R. (2017). What is gluten? In *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* (Vol. 32, pp. 78–81). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/jgh.13703>
- Boehm, T., Pils, S., Gludovacz, E., Szoelloesi, H., Petroczi, K., Majdic, O., Quaroni, A., Borth, N., Valent, P., & Jilma, B. (2017). Quantification of human diamine oxidase. *Clinical Biochemistry*, 50(7), 444–451. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.12.011>
- Boll, W., Wagner, P., & Mantei, N. (1991). Structure of the Chromosomal Gene and cDNAs Coding for Lactase-Phlorizin Hydrolase in Humans with Adult-Type Hypolactasia or Persistence of Lactase Introduction Lactase-Phlorizin Hydrolase (LPH). In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 48).
- Borriello, F., Iannone, R., & Marone, G. (2017). Histamine Release from Mast Cells and Basophils. In Y. Hattori & R. Seifert (Eds.), *Histamine and Histamine Receptors in Health and Disease* (pp. 121–139). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/164_2017_18

- Brüssow, H. (2013). Nutrition, population growth and disease: A short history of lactose. In *Environmental Microbiology* (Vol. 15, Issue 8, pp. 2154–2161). <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12117>
- Caminero, A., Herrán, A. R., Nistal, E., Pérez-Andrés, J., Vaquero, L., Vivas, S., Ruiz de Morales, J. M. G., Albillos, S. M., & Casqueiro, J. (2014). Diversity of the cultivable human gut microbiome involved in gluten metabolism: isolation of microorganisms with potential interest for coeliac disease. *FEMS Microbiology Ecology*, 88(2), 309–319. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1574-6941.12295>
- 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. <https://doi.org/10.1007/s00439-005-1322-z>
- Comas-Basté, O., Sánchez-Pérez, S., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M., & Vidal-Carou, M. D. C. (2020). Histamine intolerance: The current state of the art. In *Biomolecules* (Vol. 10, Issue 8, pp. 1–26). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/biom10081181>
- Cornean, R. E., Gheban, D., Simionescu, B., & Margescu, M. (2018). Celiac Disease among Adolescents. Poor Growth and Delayed Puberty. *International Journal of Celiac Disease*, 6(2), 52–57. <https://doi.org/10.12691/ijcd-6-2-1>
- Cunningham, F., Allen, J. E., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Amode, M. R., Armean, I. M., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bignell, A., Billis, K., Boddu, S., Brooks, L., Charkhchi, M., Cummins, C., Da Rin Fioretto, L., ... Flicek, P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Research*, 50(D1), D988–D995. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1049>
- Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N., & Fox, M. (2015). Lactose Intolerance in Adults: Biological Mechanism and Dietary Management. *Nutrients*, 7(9), 8020–8035. <https://doi.org/10.3390/nu7095380>
- Dieckman, T., Koning, F., & Bouma, G. (2022). Celiac disease: New therapies on the horizon. *Current Opinion in Pharmacology*, 66, 102268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coph.2022.102268>
- Dominici, S., Marescotti, F., Sanmartin, C., Macaluso, M., Taglieri, I., Venturi, F., Zinnai, A., & Facioni, M. S. (2022a). Lactose: Characteristics, Food and Drug-Related Applications,

- and Its Possible Substitutions in Meeting the Needs of People with Lactose Intolerance. *Foods*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/foods11101486>
- Dominici, S., Marescotti, F., Sanmartin, C., Macaluso, M., Taglieri, I., Venturi, F., Zinnai, A., & Facioni, M. S. (2022b). Lactose: Characteristics, Food and Drug-Related Applications, and Its Possible Substitutions in Meeting the Needs of People with Lactose Intolerance. *Foods*, 11(10). <https://doi.org/10.3390/foods11101486>
- Drossman, D. A. (2016). Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV. *Gastroenterology*, 150(6), 1262-1279.e2. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.02.032>
- Facioni, M. S., Raspini, B., Pivari, F., Dogliotti, E., & Cena, H. (2020). Nutritional management of lactose intolerance: The importance of diet and food labelling. In *Journal of Translational Medicine* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12967-020-02429-2>
- Fassio, F., Facioni, M. S., & Guagnini, F. (2018). Lactose maldigestion, malabsorption, and intolerance: a comprehensive review with a focus on current management and future perspectives. In *Nutrients* (Vol. 10, Issue 11). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu10111599>
- Forsgård, R. A. (2019). Lactose digestion in humans: Intestinal lactase appears to be constitutive whereas the colonic microbiome is adaptable. In *American Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 110, Issue 2, pp. 273–279). Oxford University Press. <https://doi.org/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*, 23(5), 420–427. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1399-3038.2012.01286.x>
- Francavilla, R., De Angelis, M., Rizzello, C. G., Cavallo, N., Dal Bello, F., & Gobbetti, M. (2017). Selected probiotic lactobacilli have the capacity to hydrolyze gluten peptides during simulated gastrointestinal digestion. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(14). <https://doi.org/10.1128/AEM.00376-17>

- Fuchs, M., Švarcová, I., Macková, L., & Mynaříková, H. (2011). Histaminová intolerance, snížená aktivita diaminoxidázy. *Alergie*, 13(3), 229–233.
- 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).
https://journals.lww.com/jcge/Fulltext/2013/02000/A_Comparison_Between_Lactose_Breath_Test_and_Quick.14.aspx
- Gearry, R. B., Irving, P. M., Barrett, J. S., Nathan, D. M., Shepherd, S. J., & Gibson, P. R. (2009). Reduction of dietary poorly absorbed short-chain carbohydrates (FODMAPs) improves abdominal symptoms in patients with inflammatory bowel disease—a pilot study. *Journal of Crohn's and Colitis*, 3(1), 8–14.
<https://doi.org/10.1016/j.crohns.2008.09.004>
- Giuffrè, M., Gazzin, S., Zoratti, C., Llido, J. P., Lanza, G., Tiribelli, C., & Moretti, R. (2022). Celiac Disease and Neurological Manifestations: From Gluten to Neuroinflammation. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 24). MDPI.
<https://doi.org/10.3390/ijms232415564>
- H. Akhondi, & AB. Ross. (2023). *Gluten Associated Medical Problems* (Updated 2022 Oct 31). StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Halmos, E. P., Christophersen, C. T., Bird, A. R., Shepherd, S. J., Gibson, P. R., & Muir, J. G. (2015). Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. *Gut*, 64(1), 93–100. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-307264>
- Heidari, A., Tongsook, C., Najafipour, R., Musante, L., Vasli, N., Garshasbi, M., Hu, H., Mittal, K., McNaughton, A. J. M., Sritharan, K., Hudson, M., Stehr, H., Talebi, S., Moradi, M., Darvish, H., Rafiq, M. A., Mozhdehipanah, H., Rashidinejad, A., Samiei, S., ... Vincent, J. B. (2015). Mutations in the histamine N-methyltransferase gene, HNMT, are associated with nonsyndromic autosomal recessive intellectual disability. *Human Molecular Genetics*, 24(20), 5697–5710. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv286>
- Helene Arentz-Hansen, B., Körner, R., Molberg, Ø., Quarsten, H., Vader, W., Kooy, Y. M., Lundin, K. E., Koning, F., Roepstorff, P., Sollid, L. M., & McAdam, S. N. (2000). The Intestinal T Cell Response to-Gliadin in Adult Celiac Disease Is Focused on a Single

- Deamidated Glutamine Targeted by Tissue Transglutaminase. In *J. Exp. Med* (Vol. 191, Issue 4). <http://www.jem.org>
- Hrubisko, M., Danis, R., Huorka, M., & Wawruch, M. (2021). *Histamine Intolerance — The More We Know the Less We Know*. 1–21.
- Hubáček, J. A., Adámková, V., Šedová, L., Olišarová, V., Adámek, V., & Tóthová, V. (2017). Frequency of adult type-associated lactase persistence LCT-13910C/T genotypes in the Czech/Slav and Czech Roma/Gypsy populations. *Genetics and Molecular Biology*, 40(2), 450–452. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0071>
- 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(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-36>
- Ivanova, M., Bottiglieri, L., Sajjadi, E., Venetis, K., & Fusco, N. (2023). Malignancies in Patients with Celiac Disease: Diagnostic Challenges and Molecular Advances. In *Genes* (Vol. 14, Issue 2). MDPI. <https://doi.org/10.3390/genes14020376>
- Jiménez-Jiménez, F. J., Alonso-Navarro, H., García-Martín, E., & Agúndez, J. A. G. (2016). Thr105Ile (rs11558538) polymorphism in the histamine N -methyltransferase (HNMT) gene and risk for Parkinson disease. *Medicine (United States)*, 95(27). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000004147>
- Kaswala, D., Veeraraghavan, G., Kelly, C., & Leffler, D. (2015). Celiac Disease: Diagnostic Standards and Dilemmas. *Diseases*, 3(2), 86–101. <https://doi.org/10.3390/diseases3020086>
- Kim, N. H., Jeong, H. J., & Kim, H. M. (2012). Theanine is a candidate amino acid for pharmacological stabilization of mast cells. *Amino Acids*, 42(5), 1609–1618. <https://doi.org/10.1007/s00726-011-0847-9>
- Kim, S. H., Kang, Y. M., Kim, S. H., Cho, B. Y., Ye, Y. M., Hur, G. Y., & Park, H. S. (2009). Histamine N-methyltransferase 939A>G polymorphism affects mRNA stability in patients with acetylsalicylic acid-intolerant chronic urticaria. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 64(2), 213–221. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2008.01795.x>

- Kovacova-Hanuszkova, E., Buday, T., Gavliakova, S., & Plevkova, J. (2015). Histamine, histamine intoxication and intolerance. In *Allergologia et Immunopathologia* (Vol. 43, Issue 5, pp. 498–506). Elsevier Doyma. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2015.05.001>
- Krell, T., Gavira, J. A., Velando, F., Fernández, M., Roca, A., Monteagudo-Cascales, E., & Matilla, M. A. (2021). Histamine: A bacterial signal molecule. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22126312>
- Kucek, L. K., Veenstra, L. D., Amnuaycheewa, P., & Sorrells, M. E. (2015). A Grounded Guide to Gluten: How Modern Genotypes and Processing Impact Wheat Sensitivity. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(3), 285–302. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12129>
- Law, D., Conklin, J., & Pimentel, M. (2010). Lactose Intolerance and the Role of the Lactose Breath Test. *Official Journal of the American College of Gastroenterology | ACG*, 105(8). https://journals.lww.com/ajg/Fulltext/2010/08000/Lactose_Intolerance_and_the_Role_of_the_Lactose.3.aspx
- Leitner, R., Zoernpfenning, E., & Missbichler, A. (2014). Evaluation of the inhibitory effect of various drugs / active ingredients on the activity of human diamine oxidase in vitro . *Clinical and Translational Allergy*, 4(S3). <https://doi.org/10.1186/2045-7022-4-s3-p23>
- Lindahl, K. M. (1960). The Histamine Methylating Enzyme System in Liver. *Acta Physiologica Scandinavica*, 49(2–3), 114–138. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1960.tb01936.x>
- Lomer, M. C. E. (2015). Review article: the aetiology, diagnosis, mechanisms and clinical evidence for food intolerance. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 41(3), 262–275. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/apt.13041>
- 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. <https://doi.org/https://doi.org/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. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.11.061>

- Maintz, L., Benfadal, S., Allam, J. P., Hagemann, T., Fimmers, R., & Novak, N. (2006). Evidence for a reduced histamine degradation capacity in a subgroup of patients with atopic eczema. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(5), 1106–1112. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.11.041>
- Maintz, L., & Novak, N. (2007). Histamine and histamine intolerance2. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 85(5), 1185–1196. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1185>
- Maintz, L., Yu, C. F., Rodríguez, E., Baurecht, H., Bieber, T., Illig, T., Weidinger, S., & Novak, N. (2011). Association of single nucleotide polymorphisms in the diamine oxidase gene with diamine oxidase serum activities. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 66(7), 893–902. <https://doi.org/10.1111/j.1398-9995.2011.02548.x>
- Maiuri, L., Rossi, M., Raia, V., Paparo, F., Coletta, S., Mazzeo, F., Breglia, A., & Auricchio, S. (1994). Morphological method for the diagnosis of human adult type hypolactasia. In *Gut* (Vol. 35).
- Manzotti, G., Breda, D., Di Gioacchino, M., & Burastero, S. E. (2016). Serum diamine oxidase activity in patients with histamine intolerance. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 29(1), 105–111. <https://doi.org/10.1177/0394632015617170>
- Mattar, R., do Socorro 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), 628–630. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.01.006>
- Megiorni, F., & Pizzuti, A. (2012). HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: Practical implications of the HLA molecular typing. In *Journal of Biomedical Science* (Vol. 19, Issue 1). <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-88>
- Misselwitz, B., Butter, M., Verbeke, K., & Fox, M. R. (2019). Update on lactose malabsorption and intolerance: Pathogenesis, diagnosis and clinical management. In *Gut* (Vol. 68, Issue 11, pp. 2080–2091). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-318404>

- Molina-Hernández, A., Díaz, N. F., & Arias-Montaña, J. A. (2012). Histamine in brain development. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 122, Issue 5, pp. 872–882). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2012.07863.x>
- Montgomery, R. K., Krasinski, S. D., Hirschhorn, J. N., & Grand, R. J. (2007). Lactose and Lactase—Who Is Lactose Intolerant and Why? *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 45. https://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2007/12002/Lactose_and_Lactase_Who_Is_Lactose_Intolerant_and.10.aspx
- Nadal, I., Donant, E., Ribes-Koninckx, C., Calabuig, M., & Sanz, Y. (2007). Imbalance in the composition of the duodenal microbiota of children with coeliac disease. *Journal of Medical Microbiology*, 56(12), 1669–1674. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47410-0>
- Naganuma, F., Nakamura, T., Yoshikawa, T., Iida, T., Miura, Y., Kárpáti, A., Matsuzawa, T., Yanai, A., Mogi, A., Mochizuki, T., Okamura, N., & Yanai, K. (2017). Histamine N-methyltransferase regulates aggression and the sleep-wake cycle. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16019-8>
- Nanayakkara, W. S., Skidmore, P. M., O'Brien, L., Wilkinson, T. J., & Gearry, R. B. (2016). Efficacy of the low FODMAP diet for treating irritable bowel syndrome: The evidence to date. In *Clinical and Experimental Gastroenterology* (Vol. 9, pp. 131–142). Dove Medical Press Ltd. <https://doi.org/10.2147/CEG.S86798>
- Nei, D. (2014). Evaluation of Non-bacterial factors contributing to histamine accumulation in fish fillets. *Food Control*, 35(1), 142–145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.06.037>
- Nickerson, T. A. (1976). Use of Milk Derivative, Lactose, in Other Foods. *Journal of Dairy Science*, 59(3), 581–587. [https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(76\)84242-7](https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(76)84242-7)
- Nuutinen, S., & Panula, P. (n.d.). *Histamine in Neurotransmission and Brain Diseases*.
- Palacios, N. L., Agúndez, J. A. G., Mendoza, J. L., García-Martín, E., Martínez, C., Fuentes Ferrer, M. E., Ladero, J. M., Taxonera, C., & Díaz-Rubio, M. (2009). Analysis of a non-synonymous single nucleotide polymorphism of the human diamine oxidase gene (ref. SNP ID: rs1049793) in patients with Crohn's disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 44(10), 1207–1212. <https://doi.org/10.1080/00365520903171250>

- Panula, P., Chazot, P. L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W. L. S., Stark, H., Thurmond, R. L., & Haas, H. L. (2015). International union of basic and clinical pharmacology. XCVIII. histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 67(3), 601–655. <https://doi.org/10.1124/pr.114.010249>
- Pinzer, T. C., Tietz, E., Waldmann, E., Schink, M., Neurath, M. F., & Zopf, Y. (2018). Circadian profiling reveals higher histamine plasma levels and lower diamine oxidase serum activities in 24% of patients with suspected histamine intolerance compared to food allergy and controls. *Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 73(4), 949–957. <https://doi.org/10.1111/all.13361>
- Porzi, M., Burton-Pimentel, K. J., Walther, B., & Vergères, G. (2021). Development of Personalized Nutrition: Applications in Lactose Intolerance Diagnosis and Management. In *Nutrients* (Vol. 13, Issue 5). NLM (Medline). <https://doi.org/10.3390/nu13051503>
- Reese, I., Ballmer-Weber, B., Beyer, K., Fuchs, T., Kleine-Tebbe, J., Klimek, L., Lepp, U., Niggemann, B., Saloga, J., Schäfer, C., Werfel, T., Zuberbier, T., & Worm, M. (2017). Leitlinie zum vorgehen bei verdacht auf unverträglichkeit gegenüber oral aufgenommenem histamin: Leitlinie der deutschen gesellschaft für allergologie und klinische immunologie (DGAKI), der gesellschaft für pädiatrische allergologie und umweltmedizin (GPA), des ärzteverbandes deutscher allergologen (AeDA) und der schweizerischen gesellschaft für allergologie und immunologie (SGAI). *Allergo Journal*, 26(2), 51–61. <https://doi.org/10.1007/s40629-017-0011-5>
- Rostom, A., Dubé, C., Cranney, A., Saloojee, N., Sy, R., Garritty, C., Sampson, M., Zhang, L., Yazdi, F., Mamaladze, V., Pan, I., Macneil, J., Mack, D., Patel, D., & Moher, D. (2005). The diagnostic accuracy of serologic tests for celiac disease: A systematic review. *Gastroenterology*, 128(4 SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.028>
- Saarela, T., Similä, S., & Koivisto, M. (1995). Hypercalcemia and nephrocalcinosis in patients with congenital lactase deficiency. *The Journal of Pediatrics*, 127(6), 920–923. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(95\)70028-5](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(95)70028-5)
- Sahin, Y., & Mermer, S. (2022). Frequency of celiac disease and distribution of HLA-DQ2/DQ8 haplotypes among siblings of children with celiac disease. *World Journal of Clinical Pediatrics*, 11(4), 351–359. <https://doi.org/10.5409/wjcp.v11.i4.351>
- Sánchez-Pérez, S., Comas-Basté, O., Rabell-González, J., Veciana-Nogués, M. T., Latorre-Moratalla, M. L., & Vidal-Carou, M. C. (2018). Biogenic amines in plant-origin foods:

- Are they frequently underestimated in low-histamine diets? In *Foods* (Vol. 7, Issue 12). MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/foods7120205>
- Sasaki, Y., Ihara, K., Ahmed, S., Yamawaki, K., Kusuhara, K., Nakayama, H., Nishima, S., & Hara, T. (2000). Lack of association between atopic asthma and polymorphisms of the histamine H1 receptor, histamine H2 receptor, and histamine N-methyltransferase genes. *Immunogenetics*, 51(3), 238—240. <https://doi.org/10.1007/s002510050037>
- Schaafsma, G. (2008). Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. *International Dairy Journal*, 18(5), 458–465. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2007.11.013>
- Schink, M., Konturek, P. C., Tietz, E., Dieterich, W., Pinzer, T. C., Wirtz, S., Neurath, M. F., & Zopf, Y. (2018). Microbial patterns in patients with histamine intolerance. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 69(4), 579–593. <https://doi.org/10.26402/jpp.2018.4.09>
- Schnedl, W. J., Lackner, S., Enko, D., Schenk, M., Holasek, S. J., & Mangge, H. (2019). Evaluation of symptoms and symptom combinations in histamine intolerance. *Intestinal Research*, 17(3), 427–733. <https://doi.org/10.5217/ir.2018.00152>
- Schnedl, W. J., Mangge, H., Schenk, M., & Enko, D. (2021). Non-responsive celiac disease may coincide with additional food intolerance/malabsorption, including histamine intolerance. *Medical Hypotheses*, 146, 110404. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.110404>
- Sharma, S., Mann, D., Singh, T. P., & Ghosh, B. (2005). Lack of association of histamine-N-methyltransferase (HNMT) polymorphisms with asthma in the Indian population. *Journal of Human Genetics*, 50(12), 611—617. <https://doi.org/10.1007/s10038-005-0302-4>
- Shulpekova, Y. O., Nechaev, V. M., Popova, I. R., Deeva, T. A., Kopylov, A. T., Malsagova, K. A., Kaysheva, A. L., & Ivashkin, V. T. (2021). Food intolerance: the role of histamine. *Nutrients*, 13(9), 1–18. <https://doi.org/10.3390/nu13093207>
- Simreñ, M., Barbara, G., Flint, H. J., Spiegel, B. M. R., Spiller, R. C., Vanner, S., Verdu, E. F., Whorwell, P. J., & Zoetendal, E. G. (2013). Intestinal microbiota in functional bowel disorders: A Rome foundation report. In *Gut* (Vol. 62, Issue 1, pp. 159–176). <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2012-302167>

- Simrén, M., Månsson, A., Langkilde, A. M., Svedlund, J., Abrahamsson, H., Bengtsson, U., & Björnsson, E. S. (2001). Food-Related Gastrointestinal Symptoms in the Irritable Bowel Syndrome. *Digestion*, 63(2), 108–115. <https://doi.org/10.1159/000051878>
- Singh, P., Singh, A. D., Ahuja, V., & Makharia, G. K. (2022). Who to screen and how to screen for celiac disease. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 28, Issue 32, pp. 4493–4507). Baishideng Publishing Group Inc. <https://doi.org/10.3748/wjg.v28.i32.4493>
- Smolinska, S., Winiarska, E., Globinska, A., & Jutel, M. (2022). Histamine: A Mediator of Intestinal Disorders—A Review. In *Metabolites* (Vol. 12, Issue 10). MDPI. <https://doi.org/10.3390/metabo12100895>
- Stevenson, J., Sonuga-Barke, E., McCann, D., Grimshaw, K., Parker, K. M., Rose-Zerilli, M. J., Holloway, J. W., & Warner, J. O. (2010). The Role of Histamine Degradation Gene Polymorphisms in Moderating the Effects of Food Additives on Children's ADHD Symptoms. *American Journal of Psychiatry*, 167(9), 1108–1115. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.2010.09101529>
- Swallow, D. (2003). Genetics of Lactase Persistence and Lactose Intolerance. *Annual Review of Genetics*, 37, 197–219. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.37.110801.143820>
- Szilagyi, A., & Ishayek, N. (2018). Lactose intolerance, dairy avoidance, and treatment options. In *Nutrients* (Vol. 10, Issue 12). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/nu10121994>
- ter Braak, C. J. F., & Smilauer, P. (2012). *Canoco Reference Manual and Users Guide: Software for Ordination (version 5.0)*. 496.
- Theda, C., Hwang, S. H., Czajko, A., Loke, Y. J., Leong, P., & Craig, J. M. (2018). Quantitation of the cellular content of saliva and buccal swab samples. *Scientific Reports*, 8(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25311-0>
- Thorsby, E. (2009). A short history of HLA. In *Tissue Antigens* (Vol. 74, Issue 2, pp. 101–116). <https://doi.org/10.1111/j.1399-0039.2009.01291.x>
- 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., Ghorri, 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. <https://doi.org/10.1038/ng1946>

- 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. <https://doi.org/10.1186/1471-230X-9-8>
- Tuck, C. J., Biesiekierski, J. R., Schmid-Grendelmeier, P., & Pohl, D. (2019). Food intolerances. *Nutrients*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/nu11071684>
- Ugidos-Rodríguez, S., Matallana-González, M. C., & Sánchez-Mata, M. C. (2018). Lactose malabsorption and intolerance: a review. *Food Funct.*, 9(8), 4056–4068. <https://doi.org/10.1039/C8FO00555A>
- Undlien, D. E., Lie, B. A., & Thorsby, E. (2001). HLA complex genes in type 1 diabetes and other autoimmune diseases. Which genes are involved? *Trends in Genetics*, 17(2), 93–100. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(00\)02180-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0168-9525(00)02180-6)
- Wang, Y., Harvey, C. B., Hollox, E. J., Phillips, A. D., Poulter, M., Clay, P., Walker-Smith, J. A., & Swallow, D. M. (n.d.). *The Genetically Programmed Down-regulation of Lactase in Children*.
- Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiology*, 24(2), 115–119. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.07.004>
- Yoshikawa, T., Nakamura, T., & Yanai, K. (2019). Histamine N-Methyltransferase in the Brain. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030737>
- Zhang, Z., & Kurashima, Y. (2021). Two sides of the coin: Mast cells as a key regulator of allergy and acute/chronic inflammation. *Cells*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/cells10071615>
- Zhao, Y., Zhang, X., Jin, H., Chen, L., Ji, J., & Zhang, Z. (2022). Histamine Intolerance—A Kind of Pseudoallergic Reaction. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12030454>
- 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). <https://doi.org/10.1186/s12876-019-1084-z>
- Zucchelli, M., Camilleri, M., Andreasson, A. N., Bresso, F., Dlugosz, A., Halfvarson, J., Törkvist, L., Schmidt, P. T., Karling, P., Ohlsson, B., Duerr, R. H., Simren, M., Lindberg,

G., Agreus, L., Carlson, P., Zinsmeister, A. R., & D'Amato, M. (2011). Association of TNFSF15 polymorphism with irritable bowel syndrome. *Gut*, 60(12), 1671–1677. <https://doi.org/10.1136/gut.2011.241877>

INTERNETOVÉ ZDROJE:

COLE, Timothy (2017): Celiac Disease Symptoms Checklist [online]. GLUTEN FREE & FOOD ALLERGIES, UNIVERSITY HEALTH NEWS. [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://universityhealthnews.com/daily/gluten-free-food-allergies/celiac-disease-symptoms/#celiac-disease-symptoms-list>

FOSTER, Jasmine (2019): Are You Genetically Vulnerable to High Brain Histamine, Migraines, or ADHD? (HNMT), SelfDecode [cit. 2023-03-31]. Dostupné z: <https://selfdecode.com/app/article/brain-histamine-hnmt/#histamine-in-the-brain>

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. 2023-03-31]. ISBN 978-91-7676-958-4. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10616/46291>.

National Center for Biotechnology Information (NCBI) [online]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.