

UNIVERZA V MARIBORU
FAKULTETA ZA KEMIJO IN KEMIJSKO TEHNOLOGIJO

Medved Maruška

**POVEZAVA POLIMORFIZMA -13910C>T IN
EKSPRESIJE GENA LCT S SIMPTOMI
ZNAČILNIMI ZA LAKTOZNO NETOLERANCO
IN S TVEGANJEM ZA KRONIČNO VNETNO
ČREVESNO BOLEZEN**

Diplomska naloga

Maribor, september 2011



Univerza v Mariboru

*Fakulteta za kemijo in
kemijsko tehnologijo*

Diplomsko delo univerzitetnega študijskega programa

POVEZAVA POLIMORFIZMA -13910C>T IN EKSPRESIJE GENA LCT S SIMPTOMI ZNAČILNIMI ZA LAKTOZNO NETOLERANCO IN S TVEGANJEM ZA KRONIČNO VNETNO ČREVESNO BOLEZEN

Študent: Maruška MEDVED
Študijski program: univerzitetni, Kemijska tehnologija
Smer: Biokemijska tehnika
Predvideni strokovni naslov: uni. dipl. inž. kem. tehnol.
Mentor: prof. dr. Uroš POTOČNIK

IZJAVA:

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala sama, prispevki drugih so posebej označeni.
Pregledala sem literaturo iz področja diplomskega dela po naslednjih elementih:

Vir:	PubMed, Science Direct, Nature
Gesla:	Lactose intolerance, inflammatory bowel disease, gene expression, Real Time PCR
Skupine gesel (unija itd.):	Laktozna netoleranca, kronična vnetna črevesna bolezen, genska ekspresija, PCR v realnem času
Časovno obdobje:	April 2011 – September 2011
Število referenc:	66
Število prebranih izvlečkov:	110
Število prebranih člankov:	48
Število pregledanih knjig:	3

Maribor, september 2011

_____ podpis



Univerza v Mariboru

Fakulteta za kemijo in
kemijsko tehnologijo

Številka: K-606

Datum: 25.08.2011

Na osnovi 330. člena Statuta Univerze v Mariboru (Ur. l. RS, št. 1/2010)

izdajam

SKLEP O DIPLOMSKEM DELU

Maruška Medved, študent-ka univerzitetnega študijskega programa KEMIJSKA TEHNOLOGIJA, lahko izdelata diplomsko delo pri predmetu Molekularna biologija (z gensko tehnologijo).

Mentor-ica:izr. prof. dr. Uroš Potočnik

Somentor-ica: doc.dr. Ivan Ferkolj

Naslov diplomskega dela:

POVEZAVA POLIMORFIZMA - 13910 C>T IN EKSPRESIJE GENA LCT S SIMPTOMI ZNAČILNIMI ZA LAKTOZNO NETOLERANCO TER S TVEGANJEM ZA KRONIČNO VNETNO ČREVESNO BOLEZEN

Naslov diplomskega dela v angleškem jeziku:

ASSOCIATION OF POLYMORPHISM - 13910 C>T AND LCT GENE EXPRESSION WITH SYMPTOMS CHARACTERISTIC FOR LACTOSE INTOLERANCE AND THE RISK OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Diplomsko delo je potrebno izdelati skladno z »Navodili za izdelavo diplomskega dela« in ga oddati v treh izvodih ter en izvod elektronske verzije do 26.08.2012 v referatu za študentske zadeve Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo.

Pravni pouk: Zoper ta sklep je možna pritožba na senat članice v roku 3 delovnih dni.

Obvestiti:

- kandidata -ko,
- mentorja,
- somentorja,
- odložiti v arhiv



DEKAN:
red. prof. dr. Željko Knez

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Urošu Potočniku za pomoč in vodenje pri izdelavi diplomskega dela ter somentorju doc. dr. Ivanu Ferkolju, dr. med, za koristne nasvete.

Prav tako se zahvaljujem, mladi raziskovalki Katji Repnik in asistentki Petri Perin za koristne nasvete in pomoč pri eksperimentalnem delu ter ostalemu osebju centra za Humano molekularno genetiko in farmakogenomiko Medicinske fakultete v Mariboru, še posebej Tadeju Zorjanu in Carini Kozmus za pomoč pri eksperimentalnem delu.

Posebna zahvala velja Juretu, moji družini in prijateljem za vzpodbudo in razumevanje.

POVEZAVA POLIMORFIZMA -13910C>T IN EKSPRESIJE GENA LCT S SIMPTOMI ZNAČILNIMI ZA LAKTOZNO NETOLERANCO IN S TVEGANJEM ZA KRONIČNO VNETNO ČREVESNO BOLEZEN

Povzetek: Laktozna netoleranca je avtosomno recesivna metabolna lastnost, ki je značilna za okrog 75% odraslega svetovnega prebivalstva. Posamezniki z laktozno netoleranco imajo mutacijo -13910C>T v genu LCT, ki povzroči znižano aktivnost encima laktaze, kar onemogoča popolno razgradnjo laktoze na glukozo in galaktozo v tankem črevesu, to pa povzroči neprijetne simptome, predvsem drisko, napenjanje, vetrovi neprijetnega vonja, brbotanje in bolečina v trebuhu. Raziskava opravljena na finski populaciji, je pokazala 100% povezavo med mutiranim CC genotipom in klinično dokazano laktozno netoleranco.

V raziskavi smo določili frekvenco mutacije v promotorskem delu gena LCT v slovenski populaciji. V raziskavo smo zajeli 607 naključnih posameznikov, pri katerih smo preverili pogostost posameznega genotipa polimorfizma -13910C>T v genu LCT. Nadalje smo pri naključno izbranih posameznikih s pomočjo anketnega vprašalnika, ki je zajemal 42 vprašanj, preverili prehranske navade. V raziskavi smo iskali povezavo med genotipom polimorfizma -13910C>T v genu LCT, za laktozno netoleranco, s simptomi in vnosom laktoze ter merili ekspresijo gena LCT.

Delež oseb z genotipom CC je bil 36,5%, delež oseb z genotipom CT 46,6% ter genotipom TT 16,8%. Pri preiskovancih smo preverili tedenski vnos laktoze ter primerjali vnos laktoze z posameznimi genotipi ter s pojavljanjem simptomov. Preiskovanci z genotipom CC so imeli višji vnos laktoze, kot preiskovanci z genotipoma CT in TT. Med preiskovanci, pri katerih so se simptomi pojavili po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov, je bil vnos laktoze nižji kot pri preiskovancih, pri katerih simptomi se ne pojavijo po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov ($p=0,035$, $OI=-150,8-7,273$). Med preiskovanci, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco, je vnos laktoze prav tako nižji kot pri preiskovancih, ki so mnenja, da se ti simptomi pojavijo po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov ($p=0,031$, $OI=-154,03 - -8,11$). V raziskavi smo merili tudi ekspresijo gena LCT v skupini anketiranih preiskovancev. Ekspresija gena LCT je bila med preiskovanci s simptomi bistveno nižja (27,87), kot med preiskovanci, ki nimajo simptomov značilnih za laktozno netoleranco (37,25). Primerjava se je izkazala kot statistično signifikantna ($p=0,046$).

Naša raziskava je ena izmed redkih raziskav, ki ob genotipizaciji preverjajo tudi prehranske navade preiskovancev, zato bi bilo potrebno naše ugotovitve potrditi in nadgraditi še na večjem številu vzorcev, saj bi bili rezultati tako še bolj zanesljivi. Naše ugotovitve bi lahko pomembno prispevale k razumevanju vpliva vnosa laktoze na izražanje simptomov pri osebah z bolezenskim genotipom CC polimorfizma -13910C>T v genu LCT in v prihodnosti morda prispevale delček k boljšemu poznavanju laktozne netolerance in s tem zmanjšanju težav mnogim posameznikom, ki trpijo zaradi simptomov, ki jih bolezen laktozna netoleranca povzroča.

Ključne besede: Laktozna netoleranca, LCT, kronična vnetna črevesna bolezen, genska ekspresija, PCR v realnem času

UDK:

ASSOCIATION OF POLYMORPHISM -13910C>T AND LCT GENE EXPRESSION WITH SYMPTOMS CHARACTERISTIC FOR LACTOSE INTOLERANCE AND THE RISK OF INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Abstract: Lactose intolerance is an inherited autosomal recessive metabolic characteristic that affects approximately 75% of the adult world population. Individuals with lactose intolerance have a mutation -13910C> T in the LCT gene, which causes reduced activity of the enzyme lactase, which prevents the complete degradation of lactose to glucose and galactose in the small intestine, which causes unpleasant symptoms, primarily diarrhea, bloating, flatulence odor and abdominal pain. Research carried out on a Finnish population showed a 100% link between the mutant CC genotype and clinically proven lactose intolerance.

In this study we determined the frequency of mutations in the promoter of the LCT gene in the Slovenian population. In the survey we evaluated 607 randomly chosen healthy individuals in which we examined the frequency of individual lactase genotypes. Through the questionnaire, which included 42 questions, we checked the nutritional habits of randomly selected individuals. In this study we searched for a connection between the medical, CC, genotype for lactose intolerance and the symptoms and lactose intake. We also measured the LCT gene expression.

The prevalence of the CC genotype was 36,5%, CT genotype 46,6% and the TT genotype 16,8%. We checked the weekly intake of lactose and compare the weekly intake of lactose with the genotypes and the occurrence of symptoms. Subjects with CC genotype had a higher intake of lactose, such as subjects with CT and TT genotypes. The lactose intake was among subjects with symptoms after ingestion of milk and dairy products lower, than in subjects whose symptoms do not occur after ingestion of milk and milk products ($p = 0.035$, $OR = 150.8-7.273$). The lactose intake was also lower among subjects with symptoms of lactose intolerance, than in subjects who are of the opinion that the symptoms occur after ingestion of milk and milk products ($p = 0.031$, $OR = 154.03 - 8.11$). In this study we also measured the LCT gene expression. LCT gene expression was among the subject with symptoms significantly lower (27,87) than among subjects without symptoms characteristic for lactose intolerance (37,25). The comparison has proved to be statistically significant ($p=0,046$).

Our study is one of the few studies that don't examine only the genotyping, but also the dietary habits of the subjects. Further studies and a larger number of samples are needed to confirm and to build further our findings. Our findings could have important contributions to understanding the influence of lactose on the expression of symptoms in subjects with medical, CC, genotype and may contribute in the future a fraction to a better knowledge of the lactose intolerance, thereby reducing the problem to many individuals, who suffer from symptoms of the disease lactose intolerance.

Key words: Lactose intolerance, LCT, inflammatory bowel disease, gene expression, Real Time PCR

UDK:

VSEBINA

SEZNAM SLIK	4
SEZNAM PREGLEDNIC	5
UPORABLJENE KRATICE IN OKRAJŠAVE.....	8
UPORABLJENI SIMBOLI	9
1. UVOD.....	10
1.1. Splošno o laktozni netoleranci.....	10
1.1.1. Oblike laktozne netolerance.....	12
1.1.2. Simptomi in diagnosticiranje laktozne netolerance.....	13
1.1.3. Razširjenost laktozne netolerance	14
1.2. Genetika laktozne netolerance	15
1.3. Genetske študije pri laktozni netoleranci	16
1.3.1. Analiza genetske vezave	16
1.3.2. Asociacijske študije.....	17
1.3.3. Ekspresijske študije	17
1.3.4. Orodja bioinformatike.....	18
1.4. Kronično vnetna črevesna bolezen.....	19
1.4.1. Opis bolezni.....	19
1.4.2. Klinična slika	19
1.5. Genska tipizacija	19
1.5.1. Verižna reakcija s polimerazo - PCR.....	19
1.5.2. Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov.....	21
1.6. Genska ekspresija.....	22
1.7. Namen raziskave in hipoteze	22
2. MATERIALI IN METODE	24
2.1. Preiskovanci.....	24
2.2. Materiali	24
2.2.1. Osnovne kemikalije.....	24

2.2.2. Vzorci CEPH.....	25
2.2.3. Rastopine in pufri.....	25
2.2.4. Laboratorijska oprema	26
2.3. Metode.....	26
2.3.1. Izolacije DNK, RNK in proteinov	26
2.3.2. Verižna reakcija s polimerazo	30
2.3.3. Priprava 2% agaroznega gela.....	30
2.3.4. Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov.....	31
2.3.5. Program GeneRunner	31
2.3.6. Reverzna transkripcija	31
2.3.7. PCR v realnem času.....	32
2.3.8. Interpretacija rezultatov.....	34
2.3.9. Programski paket SPSS	36
3. REZULTATI.....	37
3.1. Izbira kandidatnih genov	37
3.2. Razvoj RFLP testov za izbrane polimorfizme	37
3.3. Rezultati ekspresijske analize	39
3.3.1. Izbira kandidatnega in referenčnega gena	39
3.3.2. Optimalni reakcijski pogoji	39
3.3.3. Priprava standardne krivulje	39
3.3.4. Rezultati ekspresijske analize	40
3.4. Analiza vsebnosti laktoze v izbranih izdelkih	43
3.5. Razširjenost laktozne netolerance v slovenski populaciji.....	44
3.5.1. Pogostost polimorfizma -13910C>T v naključni slovenski populaciji	44
3.5.2. Pogostost polimorfizma -13910C>T v skupini bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo	44

3.5.3. Pogostost polimorfizma -13910C>T v skupini anketiranih preiskovancev	45
3.5.4. Statistična analiza genotipizacije polimorfizma -13910C>T.....	46
3.6. Analiza anketnega vprašalnika.....	46
3.6.1. Analiza anketnega vprašalnika s pomočjo programa Microsoft Excel	47
3.6.2. Analiza anketnega vprašalnika s pomočjo programa SPSS 19.0	48
4. DISKUSIJA	53
5. VIRI IN LITERATURA	55
6. ŽIVLJENJEPIS.....	60

SEZNAM SLIK

Slika 1.1. Prebavni sistem pri človeku.....	11
Slika.1.2: Shematski prikaz PCR reakcije.	21
Slika..2.1: Vzorec krvi na reagentu Ficoll-Paque Plus™.....	27
Slika..2.2: Vzorec krvi po centrifugiranju.	28
Slika 2.3: Krivulja pomnoževanja vzorca.....	32
Slika 2.4:Princip delovanja TaqMan® hidroliznih sond.....	33
Slika 2.5: a) Amplifikacijska krivulja b) Talilna krivulja	35
Slika 2.6: Standardna krivulja.....	36
Slika 3.1 PCR produkti gena MCM6 pri temperaturah od 53 do 63°C.....	37
Slika 3.2 Optimizacija restrikcije PCR produktov gena MCM6.....	38
Slika 3.3 Shema in slika detekcije DNA na agaroznem gelu za SNP rs4988235 na genu MCM6.....	39
Slika 3.4: Standardna krivulja.....	40
Slika 3.5: Porazdelitev preiskovancev po spolu.....	46

SEZNAM PREGLEDNIC

Preglednica 1.1 Aktivnost laktaze pri plodu.....	12
Preglednica 1.2 Pogostost posameznih laktaznih genotipov	15
Preglednica 1.3 Zbirka spletnih orodij bioinformatike	18
Preglednica 2.1 Osnovne kemikalije.	24
Preglednica 2.2 Uporabljena laboratorijska oprema.....	26
Preglednica 2.3: Reagenti za 10 μ L PCR.....	30
Preglednica 2.4: Reagenti za RFLP.	31
Preglednica 3.1 Optimalni restrikcijski pogoji za izbrane začetne oligonukleotide	38
Preglednica 3.2: Reakcijska mešanica za merjenje ekspresije.....	39
Preglednica 3.3: Priprava redčitvene vrste znanih koncentracij standarda	40
Preglednica 3.4: Rezultati analize ekspresije gena LCT z relativno kvantifikacijo.....	40
Preglednica 3.5 Ekspresija gena LCT v celotni skupini anketiranih preiskovancev glede na genotip in pojavljanje simptomov	42
Preglednica 3.6 Ekspresija gena LCT v skupini anketiranih preiskovancev z genotipom CC glede na pojavljanje simptomov	42
Preglednica 3.7 Ekspresija gena LCT v skupini anketiranih preiskovancev z genotipom CC in simptomi značilnimi za laktozno netoleranco.....	42
Preglednica 3.8 Vsebnost laktoze v izbranih živilih	43
Preglednica 3.9: Pogostost polimorfizma -13910C>T in alelna frekvenca v naključni slovenski populaciji	44
Preglednica 3.10 Pogostost polimorfizma -13910C>T in alelna frekvenca v skupini bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo.....	45

Preglednica 3.11 Pogostost polimorfizma -13910C>T v skupini anketiranih preiskovancev	45
Preglednica 3.12: Rezultati statistične analize povezave genotipov med preiskovanci s KVČB in kontrolno skupino	46
Preglednica 3.13 Delež preiskovancev, ki so pravilno odgovorili na vprašanje o vsebnosti laktoze v izbranih živilih.	47
Preglednica 3.14: Povezava genotipa in simptomov s tedenskim vnosom laktoze v celotni skupini anketiranih preiskovancev.....	49
Preglednica 3.15: Povezava genotipa in simptomov s starostjo preiskovancev v celotni skupini anketiranih preiskovancev.....	49
Preglednica 3.16: Povezava genotipa in simptomov z indeksom telesne mase (ITM) v celotni skupini anketiranih preiskovancev	49
Preglednica 3.17: Povezava genotipa in simptomov	50
Preglednica 3.18: Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka s tedenskim vnosom laktoze, v skupini preiskovancev, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco.....	50
Preglednica 3.19 Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka s starostjo preiskovancev v skupini preiskovancev, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco.....	50
Preglednica 3.20 Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka z indeksom telesne mase (ITM) v skupini preiskovancev, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco	51
Preglednica 3.21 Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka s tedenskim vnosom laktoze, v skupini preiskovancev z genotipom CC	51
Preglednica 3.22: Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka s starostjo preiskovancev, v skupini preiskovancev z genotipom CC	51
Preglednica 3.23 Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka z indeksom telesne mase (ITM), v skupini preiskovancev z genotipom CC.....	51

Preglednica 3.24 Pojavljanje simptomov po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov v skupini preiskovancev z genotipom CC52

Preglednica 3.25 Povezava simptomov, ki se pojavijo kot posledica zaužitja mleka in mlečnih izdelkov s tedenskim vnosom laktoze52

UPORABLJENE KRATICE IN OKRAJŠAVE

bp	bazni pari
CD	Crohnova bolezen
CDr	refraktorna Crohnova bolezen
CEPH	Center za študijo polimorfizmov v človeškem genomu
CLD	kongenitalna laktozna netolerance
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dNTP	deoksinukleozid trifosfat
EDTA	etilendiamin tetraacetna kislina
GWA	asociacijske študije na celotnem genomu
HCl	klorovodikova kislina
KCl	kalijev klorid
KVČB	Kronična vnetna črevesna bolezen
LOD	logaritem obetov
MgCl ₂	magnezijev klorid
mRNK	informacijska RNK
NaCl	natrijev klorid
NCBI	nacionalni center za biotehniške informacije
OR	razmerje obetov
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PLD	primarna laktozna netoleranca
RE	restrikcijski encim
RFLP	polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov
RNK	ribonukleinska kislina
SNP	polimorfizem posameznih nukleotidov
TRIS	2-amino-2-hidroksimetil-1,3-propandiol
UC	Ulcerozni kolitis

UPORABLJENI SIMBOLI

Oznaka	Veličina	Enota
M	Molska masa	g/mol
a	Dolžina	cm
T	Temperatura	°C
m	Masa	g; mg
V	Volumen	L ; mL ; μ L
γ	Masna koncentracija	mg/mL ; μ g/ μ L
c	Množinska koncentracija	mol/L; mM
f	Število obratov	vrt./min ; g
w	Masni delež	%
t	Čas	s ; min ; h
U	Napetost	V
ρ	Gostota	g/L
θ	Količnik rekombinacije	/
λ	Valovna dolžina	nm

1. UVOD

Šele pred leti so finski znanstveniki ugotovili, zakaj večina Evropejcev ni prebavljala mleka in mlečnih izdelkov. V njihovem genskem zapisu je namreč prišlo do mutacije na mestu LCT gena, zato ne proizvajajo encima laktaze, ki razgradi laktozo na glukozo in galaktozo. Posledica tega so številne prebavne motnje, med katerimi so bruhanje, diareja, napenjanje, bolečina v trebuhu, krči, vnetje dvanajsternika in drugi.

Sposobnost sinteze laktaze je bila velika prednost in zagotovilo za preživetje. V Afriki so posamezniki, ki so proizvajali laktazo lažje preživeli sušna obdobja, medtem ko so posamezniki, ki niso proizvajali laktaze, zaradi prebavnih težav izgubili še več vode. Hkrati so genetiki dokazali, da so posamezniki s sposobnostjo razgradnje laktoze imeli do desetkrat več potomcev, kot tisti, ki laktoze niso prebavljali.

Tako se je afriška različica gena hitro širila, vendar pa pri afriškem prebivalstvu niso našli evropskega spremenjenega gena.

Tudi evropska različica gena LCT se je hitro širila. V dedni snovi okostij iz 6. tisočletja pr. Kr. in v okrog 400 let starih kosteh so našli samo prvotno različico gena LCT. V tistem času večina Evropejcev laktoze ni prenesla.

To, da je danes ravno obratno in da večina Evropejcev brez težav prebavlja laktozo, Afričanom pa le ta povzroča veliko težav, kaže na veliko moč evolucije. Strokovnjaki trdijo, da je mutacija LCT gena najmočnejši pečat naravnega izbora, kar so ga kdaj našli pri ljudeh.¹

1.1. Splošno o laktozni netoleranci

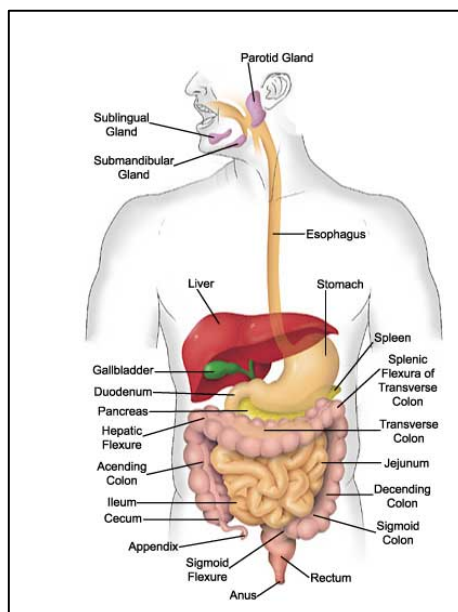
Laktozna netoleranca je avtosomno recesivna metabolna lastnost, ki prizadene okrog 75% odraslega svetovnega prebivalstva.

Povzroči jo pomanjkanje encima laktaze. Laktaza oz. s polnim imenom laktaza-florizin hidrolaza (LPH) je encim, ki hidrolizira disaharid laktozo v glukozo in galaktozo (β -galaktozidazna aktivnost).²

Pomanjkanje encima LPH onemogoča popolno razgradnjo laktoze na glukozo in galaktozo, v tankem črevesu, nerazgradnja laktoze pa povzroči neprijetne simptome, kot so driska, napenjanje, vetrovi neprijetnega vonja, brbotanje in bolečina v trebuhu, krči, vnetje dvanajsternika, sili nas na bruhanje, utrujenost, razdražljivost, potenje, izpuščaji, napetost mišic idr. Intenzivnost simptomov je odvisna od količine vnesene laktoze, od načina zaužitja laktoze (npr., če je laktoza zaužita skupaj z drugo hrano) in genetskih dejavnikov.

Laktoza, ki se pri človeku z aktivno laktazo hidrolizira do glukoze in galaktoze, se pri ljudeh z laktozno netoleranco, nespremenjena kot disaharid v veliki količini pojavi v lumnu distalnega dela tankega črevesa. Tu po principu osmoze povleče velike količine vode v črevo. Do trikrat povečana količina vode in natrijevih ionov potuje v debelo črevo. Le majhen del laktoze se s pasivno difuzijo vsrka v kri in izloči z urinom. V debelem črevesu

pa normalno prisotne črevesne bakterije fermentirajo nerazgrajeno laktozo, pri tem se sproščajo plini metan, ogljikov dioksid, vodik in hlapne kisline. Nekaj vodika se s krvjo prenese v pljuča in ga lahko določijo v izdihanem zraku. Tudi nekaj hlapnih maščobnih kislin se absorbira in v večji meri povzročijo metabolno acidozo. Ostala vsebina pa se izloči v obliki tekočega penastega in kislega blata. Plini, ki nastanejo pri fermentaciji, povzročijo krče, vetrove, napenjanje.



Slika 1.1. Prebavni sistem pri človeku

Posamezniki z laktozno netoleranco lahko prenesejo do 12g laktoze, saj se pri vnosu nad 12g lahko pojavijo simptomi. Po vnosu nad 24g laktoze, se pri posameznikih z laktozno netoleranco pojavijo simptomi v hujših oblikah, medtem ko je vnos nad 50g celo odsvetovan, saj lahko povzroči zelo hude oblike simptomov. Zaradi intenzitete simptomov je tako priporočen dnevni vnos laktoze do 24g. ³

Ljudje se zaradi neprijetnih simptomov laktozne netolerance odpovedujejo mleku in mlečnim izdelkom, kar privede do kopice drugih težav, kot so npr. pomanjkanje kalcija, magnezija in vitamina D, kar pa privede do zmanjšanega nastajanja kostnega mozga in posledično do osteoporoze, do hipokalcemije (pomanjkanje kalcija), mišičnih krčev in mnogih drugih zdravstvenih težav. ^{4,5} Magnezij, kalcij in vitamin D sodelujejo pri izgradnji kosti, zob, pri presnovi, pri uravnavanju krvnega sladkorja, odstranjevanju strupenih snovi iz telesa, krčenju mišic, uravnavanju srčnega ritma, delovanju možganov, sodelujejo pri uravnavanju prepustnosti celičnih membran, sodelujejo pri strjevanju krvi in delujejo na centralni živčni sistem, zato je njihov vnos še kako pomemben. ⁴

1.1.1. Oblike laktozne netolerance

Glede na vzrok, genetiko in čas, ko zbolimo za laktozno netoleranco, ločimo tri osnovne vrste laktozne netolerance. To so kongenitalna (prirojena), primarna in sekundarna laktozna netoleranca.

1.1.1.1 Kongenitalna (prirojena) laktozna netoleranca

Obstajata dve vrsti kongenitalne laktozne netolerance (CLD), ki imata enake simptome. Kongenitalna laktozna netoleranca se deduje avtosomno recesivno in je prisotna od rojstva. Do te oblike laktozne netolerance pride, ko otrok podeduje dve kopiji okvarjenega gena od obeh staršev. S tem je novorojenčku onemogočena sinteza laktaze, kar povzroča hudo drisko, bolečine v trebuhu, bruhanje in dehidracijo, poškodbe jeter, nastanek sive mreže. Simptomi so prisotni takoj po rojstvu, ko novorojenček prične s prehrano, ki vsebuje laktozo. Delno okrevanje je možno, če iz prehrane popolnoma odstranimo laktozo, nato pa jo pri šestih mesecih začnemo v majhnih količinah dodajati v obroke.

Druga vrsta kongenitalne laktozne netolerance imenovana FLD (Familial Lactase Deficiency) je posledica okvarjenega proteina encima laktaze. Za razliko od CLD se encim laktaza normalno proizvaja, vendar pa je encim nefunkcionalen in neučinkovit.

1.1.1.2 Primarna laktozna netoleranca

PLD se pojavi pri osebah, ki po prenehanju dojenja ne proizvajajo laktaze. Ta tip se imenuje LOD (Late Onset Lactase Deficiency) in je najpogostejša oblika laktozne netolerance, saj predstavlja več kot polovico svetovnega prebivalstva. Druga oblika se imenuje DLD (Development Lactase Deficiency). Raven encima začne kmalu po rojstvu upadati in se kljub vnosu laktoze ne zviša. Zakasneli izbruh laktozne netolerance se lahko pojavi več let po rojstvu, navadno od 5. do 7. leta.

Druga vrsta primarne laktozne netolerance, DLD, izhaja iz nizke stopnje sinteze laktaze in je značilna za nedonošenčke. Nedonošenčki rojeni med 28. in 34. tednom nosečnosti imajo zmanjšano laktazno aktivnost, kar privede do hudih krčev, bolečin v trebuhu, driske, stalnega neugodja in joka. ⁶ Aktivnost laktaze pri plodu prikazuje Preglednica 1.1⁷:

Preglednica 1.1 Aktivnost laktaze pri plodu

STAROST PLODA (TEDNI)	DELEŽ AKTIVNOSTI
23	10 %
25 - 34	30 %
34 - 35	70 %
42	100%

1.1.1.3 Sekundarna laktozna netoleranca

Sekundarna laktozna netoleranca je lahko posledica stresnih situacij, ki prizadenejo črevesje ter bolezni, ki poškodujejo črevesni epitelij (npr. nezdravljena celiakija, črevesna vnetja ...). Drugi vzrok sekundarne laktozne netolerance je lahko tudi dolgotrajno zdravljenje z antibiotiki, protivnetnimi zdravili, acetilsalicilno kislino idr. ⁶

Med boleznimi, ki privedejo do sekundarne laktozne netolerance so bakterijske in virusne okužbe črevesja, kronična vnetna črevesna bolezen, ulkusna bolezen, Crohnova bolezen, ulcerozni kolitis, gastritis, dispepsija, sindrom razdražljivega črevesja, leno črevesje, refluksna bolezen požiralnika (zgaga), celiakija idr.

1.1.2. Simptomi in diagnosticiranje laktozne netolerance

Ko neprebavljena laktoza ostaja v črevesju, nastane osmotski tlak, zaradi katerega v črevesje difundirajo soli in tekočine, kar pa povzroči hitro premikanje kaše v debelo črevo. Povečana raven soli in tekočin omogoča bakterijam ugodne razmere za fermentacijo laktoze v kratke verige maščobnih kislin, ogljikov dioksid (CO₂), metan (H₄) in vodikov sulfid (H₂S). Plini, ki se sproščajo povzročajo vetrove neprijetnega vonja. ⁶ Med simptome laktozne netolerance uvrščamo še:

- Bolečine v trebuhu
- Napenjanje
- Brbotanje in bolečina v črevesu
- Driska
- Bruhanje
- Hujšanje
- Zvijanje v trebuhu
- Krči v trebuhu
- Vnetje dvanajsternika (5cm od popka)
- Siljenje na bruhanje idr.

Laktozno netoleranco lahko diagnosticiramo z različnimi testi. Mednje spadajo laktozni test z odvzemom krvi, HBT (Hydrogen Breath Test), test kislosti blata, biopsija, genetski test in domači test.

- Laktozni test z odvzemom krvi

Pred testom se izogibamo izdelkom, ki vsebujejo laktozo. Pri samem testu spijemo koncentrat laktoze, čemur sledi večkratni odvzem krvi, vsaki dve uri. Nato vzorcem preverimo vsebnost glukoze. Če se njena koncentracija po določenem času poveča, to pomeni uspešno prebavo laktoze.

Po zaužitju laktoze se ta razgradi na glukozo in galaktozo, v jetrih pa se nato galaktoza prebavi v glukozo, ki vstopi v krvni obtok. Če se laktoza ne razgradi, se raven glukoze v krvi ne zviša in tako lahko potrdimo laktozno netoleranco.

- HBT test

Pri vodikovem testu merimo količino izdihanega vodika. Pri zdravih osebah je količina izdihanega vodika majhna, pri osebah, ki so laktozno netolerantne, pa je količina izdihanega vodika večja.

Količina vodika se poveča zaradi fermentacije bakterij, saj nastajajo različni plini, med njimi tudi vodik. Ta se absorbira v prebavilih, nato pa se preko krvnega obtoka izloča v pljučih.

Pri testu spijemo koncentrat laktoze, nato pa v presledkih merimo količino izdihanega dušika. Če se le ta zvišuje, lahko potrdimo laktozno netoleranco. Količina izdihanega vodika, ki se giblje med 10 in 20 ppm kaže na normalno stanje, medtem ko količina izdihanega vodika nad 20 ppm kaže na patogeno stanje.

- Test kislost blata

Ker sta lahko, HBT in laktozni test, zelo nevarna za osebe, ki so laktozno netolerantne, pri otrocih pogosto izvedemo test kislosti blata. Neprebavljeno laktozo bakterije fermentirajo, pri čemer nastaja mlečna kislina in druge maščobne kisline, vsebnost teh kislin pa je mogoče zaznati v blatu.

- Domači test

Tega izvedemo samostojno, tako da se čez noč postimo laktoze, nato pa zjutraj na tešče spijemo kozarec mleka. Če se simptomi pojavijo, potem lahko sumimo na laktozno netoleranco. Na simptome moramo biti pozorni dalj časa, saj se lahko pojavijo le nekaj trenutkov po zaužitju laktoze, lahko pa traja tudi več ur, da se le ti izrazijo.

Če sumimo, da nismo laktozno netolerantni, ampak nam težave povzroča alergija na mleko, test ni priporočljiv, saj lahko pride do anafilaktičnega šoka.⁶

1.1.3. Razširjenost laktozne netolerance

Asociacijske študije na temo razširjenosti laktozne netolerance smo poiskali s pomočjo spletnega iskalnika HuGENavigator in PubMed. Povzetki študij so prikazani v preglednici 1.2.

Preglednica 1.2 Pogostost posameznih laktaznih genotipov

Država / narod	n	C/C (%)	C/T (%)	T/T (%)	Vir
Brazilski Japonci		100			⁸
Indija (južna)	76	86,8	13,2	0	⁹
Brazilijski (temnopolti)		80	16	4	⁸
Afriški Američani	96	79,2	15,6	5,2	¹⁰
Indija (severna)	77	67,5	26	6,5	¹¹
Nekavkazijci	55	66	27	7	¹²
Italija	123	65			¹³
Brazilijski (belo in rjavo prebivalstvo)		57			⁸
Kanarski otoki		40			¹⁴
Slovenija	172	39	51	10	²
Madžarska		37			¹⁵
Rusija	231	35,6			¹⁶
Nemčija	58	26	48	26	¹⁷
Nemčija	187	21,4	49,7	28,9	¹⁰
Finska	938	18,1	47,5	34,3	¹⁰
Velika Britanija		14,5	39	46,5	¹⁸
Danska (osebe z črevesnimi boleznimi)	478	14	37	48	¹⁹
Kavkazijci (1983 - 1989)	635	10	41	49	¹²
Danska (naključni krvodajalci)	100	8	38	54	²⁰
Združene države Amerike (Utah)	92	7,6	35,9	56,5	¹⁰
Kavkazijci (1920 - 1932)	392	5	42	53	¹²

1.2. Genetika laktozne netolerance

Leta 2002 so odkrili polimorfizem -13910C>T, ki se 100-odstotno ujema s persistenco laktaze v odrasli dobi. Gre za spremembo C v T na mestu 13910 bp navzgor od iniciacijskega kodona ATG gena za laktazo. Alel C je povezan z nizko, alel T pa z visoko aktivnostjo laktaze v odrasli dobi. Tako imajo homozigoti CC laktozno netoleranco, homozigoti TT in heterozigoti CT pa laktozno persistenco.¹⁰

Homozigoti CC imajo približno 10 % aktivnosti laktaze homozigotov TT, heterozigoti CT imajo v povprečju nižje aktivnosti kot TT, vendar pa se aktivnosti za TT in CT prekrivajo. Pri heterozigotih CT se alel T izraža 11,5-krat bolj kot alel C in predstavlja 92 % mRNA laktaze²¹.

Polimorfizem -13910C>T se nahaja v 13. intronu gena MCM6 (*Minichromosome maintenance 6*), v regiji, ki kaže homologijo z LINE (*long interspersed nuclear element*). MCM6 se nahaja v neposredni bližini gena LCT, njegov produkt pa je regulator celičnega cikla. MCM6 verjetno ni funkcionalno povezan z laktazo, gre le za prekrivanje regulatorne regije gena LCT s koncem transkripcijske regije MCM6 gena.^{10,22}

Laktozno netoleranco v odrasli dobi povzroči zmanjšano izražanje LCT gena in se pojavi pri večini ljudi. Ekspresijo LCT gena nadzoruje del DNA, ki ga imenujemo regulatorni element DNA in se nahaja v neposredni bližini gena MCM6.²³

Genotipizacija je najzanesljivejši način diagnostike laktozne intolerance, saj s to metodo lahko odkrijemo tudi tiste laktozno intolerantne osebe, ki nimajo znakov. Hkrati pa lahko izločimo osebe z drugimi boleznimi, ki povzročajo moteno delovanje disaharidaz. S tem preprečimo nepotrebno umaknitev mleka iz prehrane in omogočimo zdravljenje morebitnih resnih obolenj. Ker so polimorfizem -13910C>T, ki se popolnoma ujema z laktazno persistenco odkrili šele pred kratkim, pa se genotipizacije še ne uporablja za rutinsko diagnostiko, temveč samo v raziskovalne namene.

1.3. Genetske študije pri laktozni netoleranci

1.3.1. Analiza genetske vezave

Namen analize genetske vezave je identifikacija genomskih regij, ki verjetno vsebujejo kandidatne gene. Analiza genetske vezave temelji na preučevanju sorodnikov. Sorodstvo je lahko omejeno, kot je to v primeru analize dvojčkov, ali pa zajema člane širše družine. Glede na model dedovanja pa ločimo parametrično vezavo, ki se nanaša na proučevanje monogenjskih bolezni in neparametrično vezavo, ki se uporablja v primeru kompleksnih bolezni. Za kvantitativno oceno genetske vezave se pogosto uporablja vrednost LOD (logaritem obetov), ki je logaritemska funkcija rekombinantnih količnikov (θ) ali genetske razdalje merjene v centimorganih (cM). Običajno velja, da je $LOD > 3$ znak signifikantne genetske povezave. Z analizo LOD vrednosti ocenimo povezavo med posameznimi genetskimi markerji in bolezenskimi regijami ali določimo položaj bolezenske regije glede na znane markerje. Genetski markerji za analizo genetske vezave so najpogosteje polimorfizmi posameznega nukleotida (SNP-ji) ali kratke tandemske ponovitve (short tandem repeats - STR). Analize genetske vezave so močno orodje pri raziskavah velikih genomskih področij, hkrati pa ne zahtevajo predhodnih hipotez o vlogi določenega gena v patogenezi bolezni. Glavna omejitev je v tem, da lahko natančno določimo genetski lokus le do reda velikosti nekaj mega bp²⁴. Princip genetske vezave temelji na težnji bolezenskih regij po ohranjanju in kopičenju iz generacije v generacijo, torej brez rekombinacije v mejozi. Dve mesti na kromosomu sta genetsko vezani, kadar je med njima verjetnost rekombinacije manjša od 50%. Z analizo genetske vezave so ugotovili, da se pomembna gena za laktozno netoleranco nahajata na lokusu 2q21.

1.3.2. Asociacijske študije

Z asociacijskimi študijami skušamo najti povezavo med polimorfizmi in boleznijo pri posameznikih, ki niso v sorodu tako, da primerjamo frekvence alelov med skupino bolnikov in kontrolno skupino zdravih posameznikov (t.j. študija primeri:kontrola). V primerjavi z analizo genetske vezave, ki lahko zajema velike genomske regije, so bile asociacijske študije doslej praviloma omejene le na proučevanje nekaj kandidatnih genov. Napredek tehnologije v zadnjih letih omogoča hkratno proučevanje velikega števila SNP oziroma asociacijske študije na celotnem genomu (genome wide asociacion – GWA). GWA študije so močno orožje za odkrivanje polimorfizmov povezanih s kompleksnimi boleznimi. Pri GWA študijah hkrati analiziramo povezavo določene kompleksne bolezni z nekaj deset tisoč polimorfizmi. Vendar so ugotovljeni označevalci za posamezno bolezen pogosto samo v neravnotežju vezave z odseki genoma, ki so dejansko etiološko vpleteni v nastanek bolezni. Za natančnejšo identifikacijo gena in polimorfizma, ki je vpleten v patogenezo posamezne kompleksne bolezni, so še vedno potrebne asociacijske študije kandidatnih genov, ki pa so s pomočjo GWA študij tudi pri laktozni netoleranci lahko usmerjene v ožja področja genoma²⁵. Kandidatni geni za asociacijske študije se praviloma izbirajo na podlagi njihove biološke funkcije ali pa glede na rezultate živalskih modelov. Asociacijske študije pri laktozni netoleranci se osredotočajo predvsem na določanje deleža laktozno netolerantnih posameznikov v populacijah ali naključno izbranih skupinah.

1.3.3. Ekspresijske študije

Študije genske ekspresije temeljijo na merjenju transkriptov posameznih genov. Eksperimentalni dokazi so pokazali, da obstaja povezava med vzorci izražanja in funkcijo genov²⁶.

1.3.4. Orodja bioinformatike

Hitro naraščajoči obseg biomedicinskih znanj in odkritij ter vse bolj specializirane raziskave so privedle do razvoja množice spletnih iskalnikov oz. bioinformatičnih orodij. Leta služijo kot pomoč pri iskanju novih kandidatnih genov in razumevanju njihovih bioloških funkcij²⁷.

Preglednica 1.3 Zbirka spletnih orodij bioinformatike

Spletno orodje	Opis	Spletni naslov
Podatkovne zbirke		
AceView	Podatki o genskih izoformah	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/Acembly/
dbSNP	Podatki o polimorfizmih SNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp
Entrez Gene	Podatki o genih	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene
HapMap	Podatki o polimorfizmih SNP in obdelava SNP	http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/
HugePedia	Podatki o asociacijskih študijah	http://www.hugenavigator.net/
Nucleotide	Podatki o sekvencah	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide
UniGene	Ekspresijski podatki	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/unigene
Načrtovanje začetnih oligonukleotidov		
Primer3	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
SciTools	Načrtovanje in preverjanje začetnih oligonukleotidov	http://eu.idtdna.com/scitools/scitools.aspx
SNPcutter	Načrtovanje začetnih oligonukleotidov in RFLP testov	http://bioinfo.bsd.uchicago.edu/SNP_cutter.htm
Poravnave sekvenc		
ClustalW2	Poravnava sekvenc	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
Gensko mapiranje		
MapViewer	Mapiranje SNP, genov, markerjev	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/

1.4. Kronično vnetna črevesna bolezen

KVČB je pogosta vnetna motnja, ki prizadene vse starostne skupine, najbolj pa ljudi, stare med 15 in 35 let ter ljudi v osmi dekadi življenja. Klinični in epidemiološki podatki potrjujejo, da je kronična vnetna črevesna bolezen (KVČB) kompleksna poligenska bolezen, ki v zahodnem svetu prizadene približno 1/1000 ljudi²⁸, razširjenost pa pada od severa proti jugu Evrope²⁹.

1.4.1. Opis bolezni

Kronična vnetna črevesna bolezen je dolgotrajno vnetno obolenje črevesa, ki ga delimo v dve skupini: ulcerozni kolitis (UK) in Crohnovo bolezen (CB), v 10-15% primerov pa bolezni ne moremo uvrstiti ne v eno ne v drugo skupino in govorimo o intermediarnem kolitisu (IK). UK praviloma prizadene samo debelo črevo, vnetni proces je omejen na sluznico in podsluznico in poteka neprekinjeno brez vmesnih neprizadetih predelov sluznice. Pri CB lahko zajame vnetni proces katerikoli del prebavil od ust do zadnjične odprtine, prizadene vse sloje črevesne stene, značilno pa je tudi menjavanje vnetih in zdravih segmentov črevesne stene.

1.4.2. Klinična slika

Simptomi KVČB so odvisni od obsega vnetja, lokalizacije in izven intestinalnih manifestacij. Pri večini bolnikov s CB, vnetje zajame terminalni ileum, simptomi, ki se pojavijo, pa so vročina, bolečine v desnem spodnjem kvadrantu abdomna, diareja, ki jo lahko spremlja tudi krvava diareja in izguba telesne teže zaradi malabsorpcije in steatoreje. Zapleti, ki se lahko pojavijo pri CB so fistule, obstrukcije, perforacije, formacije abscesov, toksični megakolon, rak kolona in adenokarcinom. UC se klasično kaže s prisotno krvavo diarejo in manjšo abdominalno bolečino, kot pri CB. Zapleti, ki se lahko pojavijo pri UC, so masivne krvavitve, perforacije, toksični megakolon in rak kolona.

1.5. Genska tipizacija

Genotip določimo s procesom genske tipizacije. Izraz genotip pomeni genetsko sestavo posameznika in se lahko nanaša na celoten genom ali le na določeno področje (gen, SNP). Metode SNP genske tipizacije lahko razvrstimo glede na tehniko uporabe na: metode, ki temeljijo na hibridizaciji, encimske metode, druge post PCR metode, ki temeljijo na fizikalnih lastnostih DNK in določanje zaporedja nukleotidov. Največkrat uporabljamo pristop določanja SNP-ov z metodami, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (polymerase chain reaction – PCR). Sledita detekcija na agaroznem gelu in polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov (restriction fragment length polymorphism - RFLP)²⁷.

1.5.1. Verižna reakcija s polimerazo - PCR

PCR metodo je leta 1983 odkril Kary Mullis. Uporablja se v biokemiji in molekularni biologiji za pomnoževanje DNK fragmentov *in vitro* z encimsko reakcijo.³⁰ S PCR lahko pomnožujemo že zelo nizke koncentracije DNK in iz enega samega fragmenta DNK dobimo več milijonov kopij. Zaporedje DNK ki ga želimo pomnožiti je lahko gen, del gena

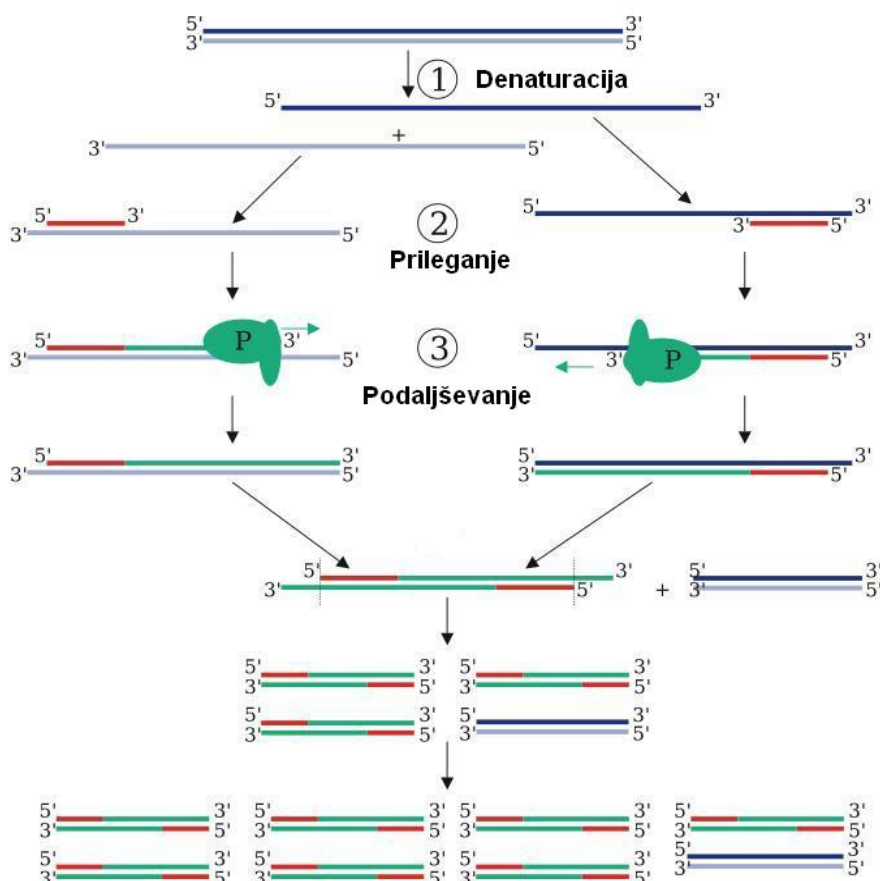
ali nekodirajoče zaporedje. Večinoma s PCR metodo pomnožujemo fragmente od velikosti nekaj bp do 40 000 bp.³¹

Za uspešno PCR potrebujemo naslednje sestavine:

- Vzorec DNK s tarčno regijo, ki jo želimo pomnožiti.
- Par začetnih oligonukleotidov (primerjev), komplementarnih na 5' in 3' koncih vzorčne DNK.
- Encim DNK polimerazo (največkrat Taq polimeraza), za sintezo kopij DNK z želeno sekvenco.
- Deoksinukleozid trifosfat (dNTP), osnovni gradniki iz katerih polimeraza gradi novo DNK.
- Pufer, ki zagotavlja optimalne pogoje za delovanje in stabilnost polimeraze.
- Divalentni kation (običajno Mg^{2+} ali Mn^{2+}), ki promovira tvorbo vezi DNK-DNK in tvori komplekse z dNTP-ji.
- Enovalentni kation (običajno K^+) za ionsko moč reakcije.

PCR se izvaja v mikrocentrifugirkah ali mikrotiterskih ploščicah z reakcijskim volumnom $V = 15 - 100 \mu L$ v cikličnem termostatu (PCR napravi). Osrednji del cikličnega termostata je termo blok, ki ima posebej oblikovane vdolbine, kamor vstavimo vzorce. Osnovni princip cikličnega termostata je, da z veliko hitrostjo in natančnostjo greje in hladi termo blok. Večina naprav ima še možnost gretja pokrova, s katerim preprečimo kondenzacijo reakcijske mešanice na pokrovčkih mikrocentrifugirk. PCR običajno poteka v 35 ciklih. Vsak cikel je sestavljen iz treh korakov, ki so prikazani na sliki 1.2.

1. Denaturacija: v začetnem koraku reakcijsko zmes segrejemo na $T = (94 - 96) ^\circ C$, kjer jo zadržujemo $t = (20 - 40)$ s. Ta korak je pomemben za denaturacijo DNK in začetnih oligonukleotidov. Zaradi visoke temperature se pretrgajo vodikove vezi med komplementarnimi bazami, posledično dobimo enoverižne DNK molekule.
 2. Prileganje: v tem koraku se temperatura zniža na $T = (50 - 64) ^\circ C$ tako, da se začetni oligonukleotidi lahko vežejo na enoverižno DNK. Stabilne vezi se tvorijo le ob ujemanju zaporedja začetnih oligonukleotidov in tarčne DNK. Čas zadrževanja v tem koraku je $t = (20 - 40)$ s.
 3. Podaljševanje: je korak, v katerem encim DNK polimeraza sintetizira novo komplementarno DNK verigo. Temperatura v tem koraku je odvisna od tipa DNK polimeraze. Optimalna temperatura najpogosteje uporabljene Taq polimeraze je $T = (75 - 80) ^\circ C$.³² Čas namenjen podaljševanju je odvisen od DNK polimeraze in velikosti fragmenta, ki ga pomnožujemo. Velja pravilo, da pri optimalni temperaturi DNK polimeraza sintetizira tisoč baznih parov na minuto. Zadnjemu ciklu sledi še končno podaljševanje, ki traja $t = (5 - 15)$ min, da se morebitni ostanki enoverižne DNK zagotovo podaljšajo²⁷.
-



Slika.1.2: Shematski prikaz PCR reakcije.

Za detekcijo PCR produkta se lahko uporablja elektroforeza na agaroznem gelu. Velikost produkta razberemo z velikostnim markerjem, ki vsebuje fragmente DNK znanih velikosti.

1.5.2. Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov

Pomnoževanju tarčne DNK lahko sledi RFLP metoda, ki je encimska reakcija z endonukleaznimi encimi oz. restrikcijskim encimom (RE). Vsak RE je specifičen in reže DNK na točno določenem restrikcijskem mestu. RE prepozna specifično zaporedje nukleotidov, ki je lahko dolgo 4 do 12 bp. Z dolžino zaporedja narašča specifičnost RE. Izbira encima je odvisna od nukleotidnega zaporedja okoli tarčnega SNP-a. Pri izbiri si pomagamo z različnimi programskimi orodji (GeneRunner) ali aplikacijami na spletu (SNPcutter), ki imajo vgrajene baze podatkov o zaporedjih za posamezen RE.³³

Za genotipizacijo SNP-ov z RFLP metodo potrebujemo PCR produkt, ki vsebuje zaporedje nukleotidov okoli tarčnega SNP-a. Dolžina zaporedja PCR produktov je običajno okoli 300 bp, saj pri daljših produktih obstaja nevarnost restrikcije na nespecifičnih mestih. Po PCR reakciji produktu dodamo pufer in RE. Mešanico nato inkubiramo približno 16 ur na temperaturi $T = (37 - 65) ^\circ\text{C}$, odvisno od vrste encima. Inkubaciji sledi ločitev na agaroznem gelu z elektroforezo ter detekcijo z UV svetlobo ($\lambda = 365 \text{ nm}$).

1.6. Genska ekspresija

S študijami genske ekspresije preučujemo kvalitativne ali kvantitativne meritve ravni mRNK (ekspresijski profili) v tkivih ali celicah bolnikov in zdravih posameznikov. Cilj študij je odkriti, kako različne celice izražajo različne gene, mehanizme genske ekspresije in ugotoviti biološke funkcije genov. Z dobljenimi ekspresijskimi profili le redko zaznamo strukturne spremembe v zaporedju DNK (mutacije, SNP).

Pri študiji ekspresije genov, ki sodelujejo pri nastanku in poteku bolezni, posamezne molekule mRNA služijo kot občutljiv marker, s katerim zaznavamo celično aktivnost in izraženost ključnih imuno-regulatornih proteinov. Velja načelo, da geni s podobnimi ekspresijskimi profili, sodelujejo v podobnih procesih. Z analizo ekspresijskih profilov dobimo vpogled v mehanizem nastanka in poteka raka, dodatno pa ekspresijska analiza glede na odziva na zdravljenje pomaga določiti, kako se bolniki odzivajo na različna zdravila.

Projekt humani genom (ang. Human Genome Project)³⁴ in sodobne podatkovne baze označevalcev izraženega zaporedja (ang. EST – expressed sequence tag) so omogočile razvoj tehnologij mikromrež, s katerimi lahko hkrati preučujemo izražanje (ekspresijo) tisočih genov³⁵. EST-i so v osnovi posnetek izraženih genov v določenem trenutku na določenem mestu. Ekspresijske študije temeljijo na dveh tehnologijah mikromrež: cDNK mikromreže, ki so jih razvili na univerzi Stanford³⁵ in oligonukleotidni genski čipi, produkt podjetja Affymetrix. Tehnologiji se razlikujeta le v tehnični izvedbi, struktura rezultatov in metode statistične obdelave podatkov pa so primerljive³⁶.

V organizmu obstaja veliko tipov celic, ki izpolnjujejo specifične vloge. Teoretično vsak tip celic vsebuje informacijo na enakih genih, vendar pa se samo nekaj teh genov izraža, odvisno od tipa celice in njene vloge v organizmu. Za merjenje ekspresije genov se lahko uporablja več pristopov, največkrat biočipi (mikromreže) in PCR v realnem času (qPCR) z revezno transkripcijo. Z metodo biočipov lahko simultano merimo ekspresijo več tisočih genov, ki se nato računalniško obdelajo³⁷.

1.7. Namen raziskave in hipoteze

V naši raziskavi bomo preverili ali je genotip CC zanesljiv pokazatelj simptomov laktozne netolerance, vendar samo pri posameznikih z velikim vnosom laktoze. Cilj je ugotoviti zanesljivost testa v odvisnosti od vnosa laktoze. Preverili bomo tudi kakšen je delež posameznikov s CC genotipom v vsej populaciji, ki imajo simptome laktozne netolerance, kateri so parametri, ki določajo prag vnosa laktoze pri posameznikih z CC genotipom ter kakšen delež posameznikov s simptomi se nahaja v posamezni starostni skupini. Ugotoviti želimo tudi, kolikšen delež preiskovancev se je pred to študijo zavedal, da uživanje mleka in mlečnih izdelkov mnogim povzroča neprijetne simptome. Preveriti bomo povezavo genotipa, izmerjene ekspresije gena LCT ter prehramenih navad pri zdravih posameznikih, ter poiskali razlike v deležu laktaznih genotipov pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo in zdravih posameznikih.

Pričakujemo, da bo med preiskovanci približno 40% posameznikov z genotipom CC na genu MCM6. Prav tako pričakujemo, da je genotip CC zanesljiv pokazatelj simptomov pri

osebah z velikim vnosom laktoze. Pričakujemo tudi, da se večina preiskovancev zaveda, da lahko mleko in mlečni izdelki povzročijo neprijetne simptome ter poznajo bolezen laktozno netoleranco.

2. MATERIALI IN METODE

2.1. Preiskovanci

V raziskavo smo vključili 140 preiskovancev. Njihova povprečna starost je bila 38,55. Sestava po spolu je bila 61,4% žensk in 38,6% moških. 25 preiskovancev je bilo družinskih članov, ostali so bili izbrani naključno.

Vsem preiskovancem je bilo odvzeto štirikrat po $V = 3$ mL krvi v sterilne epruvete, ki so vsebovale antikoagulant K-EDTA. Ob odvzemu krvi so preiskovanci izpolnili anketni vprašalnik o uživanju mleka in mlečnih izdelkov, o prehrabnenih navadah ter o znakih laktosne netolerance. Vsi preiskovanci so podpisali obveščeni pristanek.

2.2. Materiali

2.2.1. Osnovne kemikalije

Pri eksperimentalnem delu uporabljene osnovne kemikalije za izolacije, PCR in RFLP in njihovi proizvajalci so podani v preglednici 2.1.

Preglednica 2.1 Osnovne kemikalije.

Kemikalija	Proizvajalec
Agaroz	Sigma
EDTA	Sigma
Etanol abs.	Merck
NaCl	Merck
Kloroform	Sigma
Izopropanol	Sigma
TRI REAGENT™	Sigma
Ficoll-Paque Plus	GE Healthare
PCR pufer	Fermentas
PBS	Sigma
Taq polimeraza	Fermentas
RE in pufri za RE	Fermentas
dNTP-ji	Sigma
Etidijev bromid	Sigma
Bromfenol	Sigma
Ksilen cianol	Sigma
MgCl ₂	Fermentas

2.2.2. Vzorci CEPH

Center za študijo človeških polimorfizmov (fran.: Centre d'etude du polymorphisme humaine - CEPH), zdaj znan kot fundacija Jean Dausset - CEPH, je mednarodni raziskovalni center v Parizu, ki raziskuje človeške polimorfizme na tridesetih družinah (oče mati, otrok). V CEPH-u so iz rakastih celic in celic posameznikov razvili nesmrtno celično linijo, ki so vir DNK za genetske študije po vsem svetu.^{38,38,39} Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali CEPH vzorce kot referenčne vzorce pri genotipizacijah.

2.2.3. Raztopine in pufri

Vse raztopine so bile pripravljene s posebno čisto destilirano vodo iz naprave TKA Pacific UP – UPW water purification system.

SLB pufer:

- 10 mM TRIS/HCl, pH 7.6
- 10 mM EDTA
- 50 mM NaCl
- 0.2 % SDS

SLR pufer:

- 10 mM TRIS/HCl, pH 7.6
- 10 mM NaCl
- 2.5 mM EDTA

10 mM TRIS-HCl pufer, pH 7.6:

Za pripravo $V = 1$ L TRIS-HCl pufera smo $m = 1.21$ g TRIS baze raztopili v približno $V = 800$ mL vode. Nato smo z 10% HCl uravnali pH na 7,6 in dopolnili do $V = 1000$ mL.

TBE pufer:

TBE pufer pripravimo kot 10 x koncentrirano založno raztopino.

Sestava 10 x TBE pufera je naslednja:

- 445 mM TRIS,
- 445 mM borova kislina,
- 5 mM EDTA

Za pripravo 1 L pufera smo zatehtali $m = 108$ g TRIS, $m = 55$ g borove kisline in $m = 3,72$ g EDTA ter vse skupaj raztopili v $V = 1$ L vode. Za pripravo 1 x TBE pufera potrebujemo $V = 100$ mL 10 x TBE ter $V = 900$ mL vode.

PBS pufer:

Uporabili smo PBS v obliki tablet. Pufer smo pripravili z raztapljanjem 1 tablete v $V = 200$ mL vode.

Nanašalni pufer za gelsko elektroforezo:

Za nanašalni pufer smo uporabili 1 x TBE pufer z 0,25% ksilen-cianolom in 40% saharozo.

2.2.4. Laboratorijska oprema

Preglednica 2.2 Uporabljena laboratorijska oprema

Ciklični termostat	Biometra, T1 Thermocycler
	Biometra Professional basic gradient
Centrifuge	Biosan, CMC - 3000
	EPPENDORF Centrifuge 5415R
	TEHTNICA, Centric 322A
UV-VIS spektrofotometer	EPPENDORF BIOPHOTOMETER
Mikrovalovna pečica	ZANUSSI, ZMC 19MG
Mikropipete za nanašanje na gel	Transpipette – 12, (5 – 50) μ L
Elektroforezni sistem	BIO – RAD, POWERPAL BASIC, SUB CELL
	BIO – RAD, Standard power pack P25
	WIDE MINI - SUB [®] CELL GT
pH meter	HANNA HI 83141
Mikropipete	FINEPIPETE; 10 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L,
Digitalni fotoapar	Canon PowerShot A570 IS

Preglednica 2.2 prikazuje laboratorijsko opremo in pripadajoče proizvajalce.

2.3. Metode

2.3.1. Izolacije DNK, RNK in proteinov

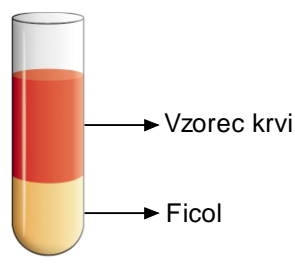
Izolacija DNK iz krvi po standardnem postopku

Kri $V = 3$ mL, ki je bila odvzeta v epruveto z EDTA, smo prenesli v $V = 15$ mL centrifugirko in centrifugirali $t = 10$ min pri $f = 4\ 000$ vrt./min. Nato smo odesali zgornjo fazo (krvno plazmo) in jo prenesli v mikrocentrifugirko z $V = 2$ mL z oznako serum, ostanek pa smo prenesli v centrifugirko z $V = 50$ mL ter jo dopolnili do $V = 25$ mL s pufrom SLR in premešali. Raztopino smo nato hladili v ledeni kopeli $t = 20$ min, da je potekla liza eritrocitov. Po končani lizi je sledilo centrifugiranje $t = 10$ min pri $f = 3\ 000$ vrt./min. Zgornjo, bistro, fazo smo odlili ter peletu dodali $V = 50$ mL pufra SLR in močno premešali na vibracijskem mešalniku. Zmes smo ponovno hladili v ledeni kopeli $t = 10$ min in

ponovno centrifugirali $t = 10$ min pri $f = 3\ 000$ vrt./min, odlili zgornjo bistro fazo ter peletu dodali $V = 20$ mL SLR in močno premešali. Zmes smo dali ponovno na led, tokrat za $t = 5$ min. Centrifugirali $t = 5$ min pri $f = 3\ 000$ vrt./min, odlili zgornjo bistro fazo ter peletu (levkocitom) dodali $V = 1$ mL SLR pufra in premešali na vibracijskem mešalniku. Nato smo dopolnili do $V = 5$ mL s pufrom SLB in dodali $V = 250\ \mu\text{L}$ proteinaze K ($c = 1$ mg/mL). Po dodatku proteinaze smo rahlo mešali, tako da pelet ni bil viden. Nato smo zmes preko noči inkubirali v vodni kopeli pri $T = 42\ ^\circ\text{C}$, da je potekla liza levkocitov. Proteine in ostanke membrane smo oborili z nasičeno raztopino NaCl (1/3 volumna raztopine) in močno premešali ter centrifugirali $t = 30$ min pri $f = 3\ 000$ vrt./min. Nato smo zgornjo bistro fazo prenesli v novo centrifugirko in DNK oborili z dvema volumnoma etanola in sicer tako, da smo etanol previdno zlivali ob steni centrifugirke. DNK se je oborila v obliki tankih nitk (meduze). Oborjeno DNK smo s pomočjo pipete prenesli v mikrocentrifugirko $V = 1,5$ mL. Nato smo DNK dvakrat izpirali z $V = 1,5$ mL 70 % etanola in jo raztopili v $V = 100\ \mu\text{L}$ vode. Po vsakem spiranju smo DNK centrifugirali pri $f = 4\ 000$ vrt./min, $t = 5$ min. Raztopljeno in prečiščeno DNK smo spravili v hladilnik na $T = 4^\circ\text{C}$.

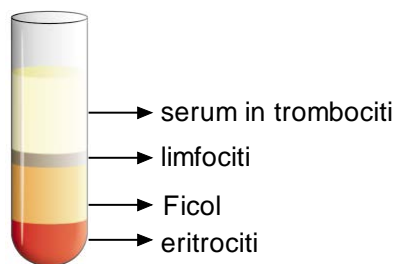
Izolacija limfocitov iz krvi z reagentom Ficoll-Paque Plus™

Priprava vzorca za izolacijo je potekala tako, da smo $V = 9$ mL krvi iz epruvete z EDTA prenesli v novo sterilno $V = 50$ mL centrifugirko, dodali $V = 9$ mL pufra PBS (skupni volumen $V = 18$ mL) in premešali. Nato smo v dve novi sterilni $V = 18$ mL centrifugirki odpipetirali $V = 4,5$ mL reagenta Ficoll in previdno nanесли $V = 9$ mL suspenzije krvi in PBS pufra. Kri smo nalivali zelo počasi ob steni ter pazili da se ne pomeša s Ficoll-om, kot kaže slika 2.1.



Slika..2.1: Vzorec krvi na reagentu Ficoll-Paque Plus™.

Kri in Ficoll smo centrifugirali pri $f = 1\ 800$ vrt./min, $t = 30$ min. Prvo fazo (serum in trombocite) smo odsesali, ter prelili v novo centrifugirko in shranili na $T = 4^\circ\text{C}$. Serum $V = 5$ mL smo prenesli v novo centrifugirko $V = 15$ mL in označili kot serum + PBS z ustrezno oznako vzorca ter shranili na $T = -20\ ^\circ\text{C}$. Drugo fazo z limfociti $V = 1$ mL smo prenesli s pipeto v novo sterilno centrifugirko $V = 15$ mL. Vsebina centrifugirke po centrifugiranju prikazuje slika 2.2.



Slika..2.2: Vzorec krvi po centrifugiranju.

Limfocitom smo nato dodali $V = 7$ mL PBS pufra in centrifugirali pri $f = 1\,400$ vrt./min, $t = 15$ min. Po centrifugiranju smo zgornjo bistro fazo odsesali, dodali $V = 4$ mL PBS pufra ter ponovno centrifugirali pri $f = 1\,400$ vrt./min, $t = 15$ min in ponovno v celoti odsesali zgornjo bistro fazo. Tako izolirane limfocite smo nato uporabili za izolacijo DNK, RNK in proteinov. Eritrocite smo shranili za nadaljnje raziskave na $T = -20$ °C.

Izolacija DNK iz limfocitov s TRI REAGENT™-om

TRI reagent se uporablja v hkratni enostopenjski izolaciji RNK, DNK in proteinov iz tekoče faze. Učinkovito izolacijo lahko dosežemo iz človeških, živalskih, rastlinskih, glivnih, bakterijskih in virusnih vzorcev. Reagent je mešanica gvanidinijevega tiocianata in fenola v enofazni raztopini, ki učinkovito raztopi DNK, RNK in proteine pri homogenizaciji ali lizi tkivnega vzorca. Po dodatku kloroforma in centrifugiranju se mešanica loči v 3 faze: vodna faza vsebuje RNK, vmesna faza vsebuje DNK in organska (kloroformska) faza vsebuje proteine. Vsako komponento lahko nato izoliramo iz posamezne faze. $V = 1$ mL TRI REAGENT-a zadostuje za izolacijo RNK, DNK in proteinov iz $m = (50 - 100)$ mg tkiva, $(5 - 10) \times 10^6$ celic ali 10 cm² enoslojne celične kulture.

Ta metoda je ena izmed najbolj učinkovitih za izolacijo celotne RNK in je končana v 1 uri. Izolirana RNK je nepoškodovana ter zelo malo ali nič kontaminirana z DNK ali proteini. Takšna RNK se lahko uporablja za Northern blotting, izolacijo mRNA, *in vitro* translacijo, metodo RNAze protection, kloniranje in PCR.

DNK se nahaja v vmesnem sloju, fenolna faza se tvori po dodatku kloroforma k TRI reagentu v drugem koraku priprave vzorca. Po obarjanju in večkratnem spiranju DNK raztopimo v NaOH. S tem raztopino nevtraliziramo, izolirana DNK pa je primerna za PCR, presnovo z restrikcijskimi encimi in Southern blotting. Po obarjanju z etanolom (prvi korak izolacije DNK) lahko proteine odstranimo iz fenol-etanolnega supernatanta. Izoliran material lahko analiziramo na specifične proteine z Western blottingom.

Limfocitom smo dodali $V = 1\,500$ µL TRI reagenta in celice razbili s pomočjo pipete tako, da ni bilo več vidnih večjih koščkov, ter inkubirali $t = 5$ min na sobni temperaturi. Zmes smo nato prenesli v $V = 2$ mL mikrocentrifugirke in dodali $V = 300$ µL kloroforma ter $t = 15$ mešali na vibracijskem mešalniku. Vzorce smo nato inkubirali na sobni temperaturi $t = (2 - 15)$ min. Po inkubaciji je sledilo centrifugiranje na $f = 12\,000g$, $t = 15$ min pri $T = 4$ °C, da smo dobili tri faze: spodnja rdeča – proteini, vmesna bela – DNK, in zgornja prozorna – vodna raztopina RNK.

Vodno fazo smo prenesli v svežo mikrocentrifugirko za izolacijo RNK, preostanek pa uporabili za izolacijo DNK in proteinov.

V mikrocentrifugirko z DNK smo dodali $V = 450 \mu\text{L}$ 100 % etanola, da se je še bolj oborila, nato premešali z obračanjem in pustili $t = (2 - 3)$ min na sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje pri $f = 2000g$, $t = 5$ min pri $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nato smo odstranili zgornjo tekočo fazo in jo shranili pri $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ za izolacijo proteinov. Pelet DNK smo dvakrat sprali v $V = 1500 \mu\text{L}$, $c = 0.1 \text{ M}$ natrijevem citratu v 10% etanolu. Med vsakim spiranjem je pelet DNK stal (z občasnim mešanjem) najmanj $t = 30$ min. Nato smo centrifugirali pri $f = 2000g$, $t = 5$ min pri $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ in peletu DNK dodali $V = 1500 \mu\text{L}$ 75 % etanola ter inkubirali $t = (10 - 20)$ min na sobni temperaturi. Sledilo je še zadnje centrifugiranje pri $f = 2000g$, $t = 5$ min pri $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$. Tekočino nad DNK smo odlili, DNK pa posušili na zraku in jo raztopili v $V = 400 \mu\text{L}$ destilirane vode.

Izolacija RNK

Predhodno izolirani vodni raztopini RNK smo dodali $V = 700 \mu\text{L}$ izopropanola, premešali z obračanjem in vzorec inkubirali $t = (5 - 10)$ min na sobni temperaturi. Nato smo ga centrifugirali na $f = 12000g$, $t = 10$ min pri $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$, da je nastala vidna usedlina na dnu mikrocentrifugirke. Tekočino smo odlili ter dodali $V = 1250 \mu\text{L}$ 75% etanola. Sledilo je mešanje na vibracijskem mešalniku in centrifugiranje na $f = 12000g$, $t = 5$ min pri $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$. Tekočino smo odlili in vzorec posušili na zraku ter raztopili v $V = 60 \mu\text{L}$ vode in shranili na $T = -70 \text{ }^\circ\text{C}$.

Izolacija proteinov

Vzorec proteinov, ki smo jih predhodno že ločili od DNK in RNK smo najprej razdelili na dva dela v 2 mL epicr. Vsakemu delu smo dodali $V = 125 \mu\text{L}$ izopropanola. Tako pripravljeni vzorci so stali najmanj $t = 10$ min na sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje pri $f = 12000g$, $t = 5$ min pri $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$ in izpiranje usedline v $V = 1 \text{ mL}$, $c = 0.3 \text{ M}$ gvanidinijevega hidroklorida v 95% etanolu. Izpiranje smo ponovili trikrat. Med vsakim spiranjem smo vzorce inkubirali $t = 20$ min na sobni temperaturi. Sledilo je centrifugiranje pri $f = 7500g$, $t = 5$ min pri $T = 4 \text{ }^\circ\text{C}$. Po treh pranjih smo vsakemu od obeh delov vzorca proteinov dodali $V = 1 \text{ mL}$ 100% etanola in jih shranili na $T = -20 \text{ }^\circ\text{C}$.

2.3.2. Verižna reakcija s polimerazo

PCR smo uporabljali za kontrolo kvalitete izolirane DNK in za genotipizacijo z metodo RFLP. V mikrocentrifugirko $V = 0,2$ mL ali $V = 0,5$ mL smo dodali reagente v vrstnem redu razvidnem iz preglednice 2.3.

Preglednica 2.3: Reagenti za 10 μ L PCR.

Komponenta	Volumen / μ L
DNK	2
H ₂ O	a
mešanica dNTP	0,2
10 x PCR pufer	1
MgCl ₂	b
Začetni oligonukleotid(1)	c
Začetni oligonukleotid(2)	d
<i>Taq</i> polimeraza	0,05

V preglednici 2.3 so volumni nekaterih komponent označeni s črkami a,b,c,d, saj so odvisni od vrste para začetnih oligonukleotidov. Reakcijsko mešanico smo premešali na vibracijskem mešalniku in kratko centrifugirali, tako da so se vse komponente združile na dnu reakcijske posodice. V novo mikrocentrifugirko smo na dno odpipetirali DNK, dodali reakcijsko mešanico, ponovno premešali ter centrifugirali. Nato smo reakcijsko mešanico prenesli v PCR napravo in glede na začetne oligonukleotide izbrali ustrezne pogoje.

Vse reakcije smo izvajali po naslednjem programu:

- Začetna denaturacija: $T = 95$ °C, $t = 5$ min
- Denaturacija: $T = 95$ °C, $t = 1$ min
- Prileganje začetnih oligonukleotidov: $T = (55 - 63)$ °C, $t = 30$ s
- Podaljševanje: $T = 72$ °C, $t = 30$ s
- Končno podaljševanje: $T = 72$ °C, $t = 5$ min
- Shranjevanje $T = 5$ °C, $t = 24$ h
- Število ciklov: 40

Pomnoženo DNK smo ločili na agaroznem gelu z elektroforezo. Analiza je potekala na UV transiluminatorju. Agarozni gel smo pripravljali na nosilcu z dimenzijami $a = 7$ cm, $b = 8$ cm, da smo dobili gel debeline $d = 0,7$ cm, oz. prostornine $V = 40$ mL.

2.3.3. Priprava 2% agaroznega gela

Za 2% agarozni gel smo zatehtali $m = 0,8$ g agaroze in jo raztopili v $V = 40$ mL 1 x TBE pufru v erlenmajerici. Nato smo zmes segrevali v mikrovalovni pečici, da se je agaroz popolnoma raztopila. Dodali smo $V = 3$ μ L etidijevega bromida, ter tako pripravljeno raztopino vlili na nosilec z glavnički. Etidijev bromid se vrine med bazne pare DNK in

povzročča, da le-ta fluorescira v oranžnem delu spektra pod UV svetlobo ($\lambda = 365$ nm). Ko se je gel strdil, smo odstranili glavniček. Tako pripravljen gel je bil nared za nanos vzorcev. Gel smo potopili v 1 x TBE pufer. V žepke smo vzorce nanesli tako, da smo predhodno premešali $V = 10 \mu\text{L}$ vzorca s $5 \mu\text{L}$ barvila (0,25 % ksilen-cianol s 40 % saharozo ali bromfenol) in previdno nanesli na dno žepka. Elektroforeza je tekla pri konstantni napetosti $U = 150$ V, $t = (10 - 20)$ min.

2.3.4. Polimorfizem dolžin restrikcijskih fragmentov

PCR produkt smo razredčili z vodo, dodali pufer in restrikcijski encim. Mešanico smo premešali na vibracijskem mešalniku, kratko centrifugirali, nato inkubirali približno 16 ur na temperaturi $T = (37 - 65)^\circ\text{C}$, odvisno od vrste encima. Pogosti parametri za reakcijsko mešanico so razvidni iz preglednice 2.5.

Preglednica 2.4: Reagenti za RFLP.

Komponenta	Volumen / μL
PCR produkt	10
H ₂ O	18 – (0,5 do 3)
10 x pufer	2
RE	(0,5 do 3)

Produkte smo po delovanju restrikcijskega encima ločili na agaroznem gelu z elektroforezo. Slike smo analizirali na transiluminatorju (vir UV svetlobe, $\lambda = 365$ nm) ter jih posneli z digitalnim fotoaparatom.

2.3.5. Program GeneRunner

Program smo uporabljali za načrtovanje začetnih oligonukleotidov za PCR, iskanje restrikcijskih mest endonukleaznih encimov, analizo DNK zaporedij kot ugotavljanje njihovih fizikalnih in kemijskih lastnosti. Zaporedja nukleotidov tarčnega DNK fragmenta, ki smo ga želeli pomnožiti, smo poiskali na spletnih straneh ameriškega Nacionalnega centra za biotehnoške informacije (NCBI) v podatkovni bazi dbSNP⁴⁸. Program GeneRunner ima integriran iskalnik začetnih oligonukleotidov, najbolj optimalnega pa izbere uporabnik sam. Za iskanje restrikcijskih mest smo za posamezen SNP zagnali programsko aplikacijo 'restriction sites'. Kot rezultat smo dobili seznam encimov in restrikcijskih mest za dano zaporedje nukleotidov. Aplikacijo smo zagnali za vsak alel posebej in tako preverjali ali pride do spremembe na restrikcijskem mestu.

2.3.6. Reverzna transkripcija

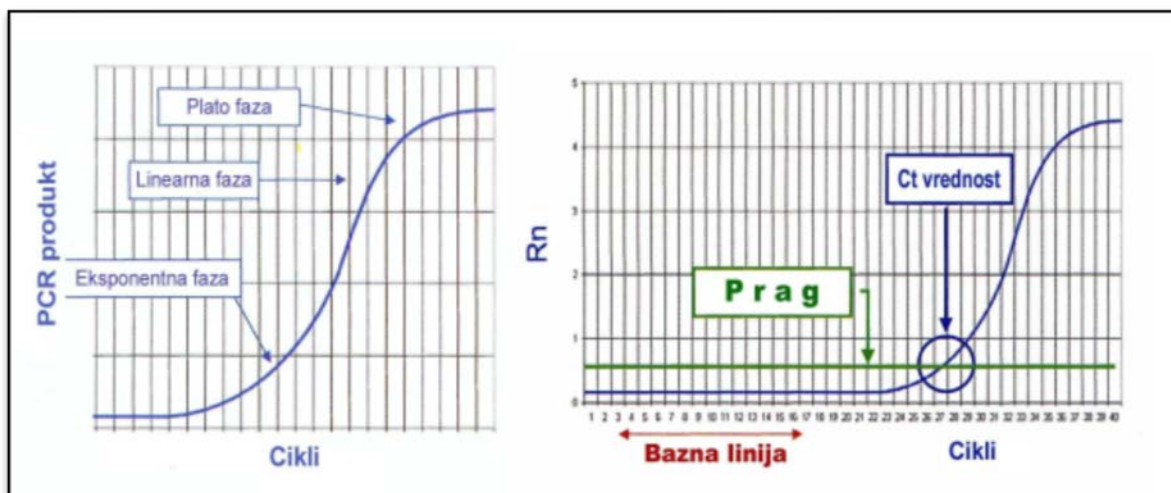
Reverzna transkripcija je proces prepisovanja v nasprotno smer tj. reverzno, iz RNK v DNK, pri čemer dobimo komplementarne DNK (ang. cDNA – complementary DNA) verige. Količina dobljene cDNK je analogna količini prisotne RNK v vzorcu. Reverzno transkripcijo smo izvedli s kompletom za reverzno transkripcijo proizvajalca Applied Biosystems. Reverzno transkripcijo smo izvedli po protokolu, ki ga priporoča proizvajalec. Najprej smo v mikrocentrifugirko napipetirali z mikropipeto $10 \mu\text{L}$ RT reakcijske mešanice in ji dodali $10 \mu\text{L}$ RNK, ki smo jo izolirali po že opisanih postopkih. Mikrocentrifugirko smo nato

premešali in jo centrifugirali. Po centrifugiranju smo mikrocentrifugirko namestili v termični ciklizator in ga zagnali po naslednjem programu:

- Korak 1: T = 25 °C, t = 10 min
- Korak 2: T = 37 °C, t = 120 min
- Korak 3: T = 85 °C, t = 5 min
- Korak 4: hlajenje, T = 4 °C.

2.3.7. PCR v realnem času

PCR v realnem času (ang. Real Time - PCR) predstavlja nadgradnjo običajnega PCR. Omogoča merjenje količine produkta v vsakem ciklu med samo reakcijo. Pomnoževanje in zaznavanje potekata sočasno. PCR lahko razdelimo v štiri faze: začetno, zgodnjo eksponentno, eksponentno in fazo platoja (Slika 2.3). Med začetno fazo (prvih 10 do 15 ciklov) je fluorescenca produkta nižja od fluorescence ozadja. V tej fazi določimo bazno linijo. V zgodnji eksponentni fazi fluorescenca produkta preseže fluorescenco ozadja. Tu določimo linijo prazne vrednosti (ang. threshold), ki predstavlja intenziteto fluorescence, ki je značilno različna od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko krivulja preseže linijo prazne vrednosti (Ct vrednost). Med eksponentno fazo je pomnoževanje optimalno in z vsakim ciklom se v idealnih reakcijskih pogojih količina produkta podvoji (pri 100 % učinkovitosti pomnoževanja). Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Po končanem pomnoževanju nam na osnovi izmerjenih vrednosti računalnik poda amplifikacijsko krivuljo, ki prikazuje odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov. V zadnjem platoju faze pa se pomnoževanje prekine, zaradi porabe reagentov in upada aktivnosti encima. Na tem nivoju podatki o fluorescenci niso več uporabni za kvantitativno analizo.

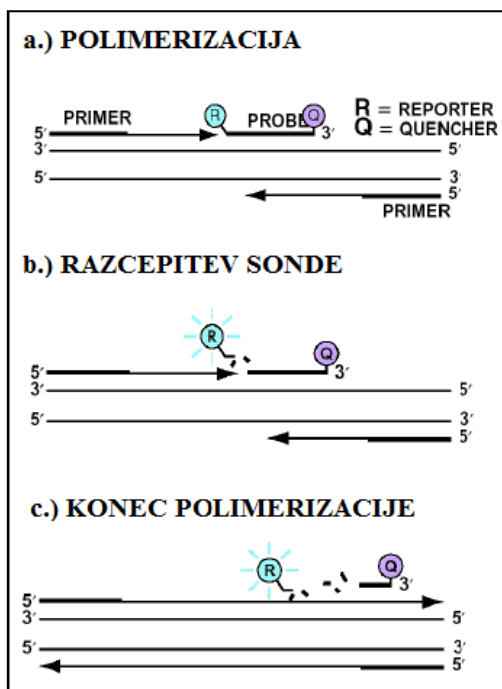


Slika 2.3: Krivulja pomnoževanja vzorca

Z absolutno kvantifikacijo lahko iz standardne krivulje s primerjavo Ct vrednosti vzorca s Ct vrednostmi standardov z znano količino kopij molekul, določimo absolutno število kopij matrice v vzorcu.

2.3.7.1. Analiza PCR produktov

Za analizo PCR produktov smo uporabili TAQMAN sonde. Na Sliki 2.4. je prikazan princip delovanja hidroliznih sond TAQMAN®.



Slika 2.4:Princip delovanja TaqMan® hidroliznih sond

Sonda je sestavljena iz specifične sekvence, ki je komplementarna s tarčno DNK sekvenco. Sonda je sestavljena iz reporterja in tako imenovanega dušilca (Q - quencherja), ki inhibira fluorescenco reporterja (R). V prvem koraku poteče hibridizacija sonde na specifičen del DNK sekvence, kar imenujemo tudi polimerizacija (Slika 2.4 a). V fazi podaljševanja (Slika 2.4 b, 2.4 c), polimeraza razgradi sondo, kar dušilcu prepreči nadaljnjo inhibicijo fluorescence reporterja. Posledica razgradnje sonde je oddajanje fluorescence reporterja in zaznava fluorescence s qPCR.

PCR lahko razdelimo v štiri faze: začetno, zgodnjo eksponentno, eksponentno in fazo platoja. Med začetno fazo je fluorescenca produkta nižja od fluorescence ozadja. V tej fazi določimo bazno linijo. V zgodnji eksponentni fazi fluorescenca produkta preseže fluorescenco ozadja. Tu določimo linijo prazne vrednosti (threshold), ki predstavlja intenziteto fluorescence, ki je značilno različna od fluorescence ozadja. Nato za vsak vzorec določimo cikel, ko krivulja preseže linijo prazne vrednosti imenovane Ct ali Cp vrednost. Med eksponentno fazo je pomnoževanje optimalno in z vsakim ciklom se v idealnih reakcijskih pogojih količina produkta podvoji. Kontinuirano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu nam omogoči, da izmerimo količino produkta, ko je reakcija še v eksponentni fazi. Po končanem pomnoževanju nam na osnovi izmerjenih vrednosti računalnik poda krivuljo pomnoževanja, ki prikazuje odvisnost jakosti fluorescence posameznih vzorcev od števila ciklov.⁴⁰

2.3.7.2. Analiza podatkov z relativno absolutno kvantifikacijo

Rezultate qPCR lahko določamo na dva načina, z absolutno ali z relativno kvantifikacijo. Relativna kvantifikacija opisuje spremembe v izražanju tarčnega gena glede na referenčni gen ali kalibrator. Relativno kvantifikacijo uporabljamo, kadar nas zanima relativna sprememba v izražanju genov. Z absolutno kvantifikacijo pa dobimo količino vhodnih kopij produktov iz primerjave s standardno krivuljo, katero smo izračunali iz vzorcev z znanimi količinami cDNA. Za analizo podatkov relativne kvantifikacije se pogosto uporablja $\Delta\Delta Ct$ ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) metoda. Da je $-\Delta\Delta Ct$ metoda veljavna, moramo zadostiti pogoju enake učinkovitosti med tarčnimi in referenčnimi vzorci. Pri $-\Delta\Delta Ct$ metodi vrednost tarčnega gena normaliziramo glede na referenčni gen in jo izrazimo relativno na vrednost kalibratorja. $-\Delta\Delta Ct$ izračunamo po naslednji enačbi:

$$-\Delta\Delta Ct = -(\Delta Ct_{\text{vzorec}} - \Delta Ct_{\text{kalibrator}}),$$

pri čemer ΔCt vzorca in kalibratorja izračunamo sledeče:

$$\Delta Ct_{\text{vzorec / kalibrator}} = Ct_{\text{tarčni gen}} - Ct_{\text{referenčni gen}},$$

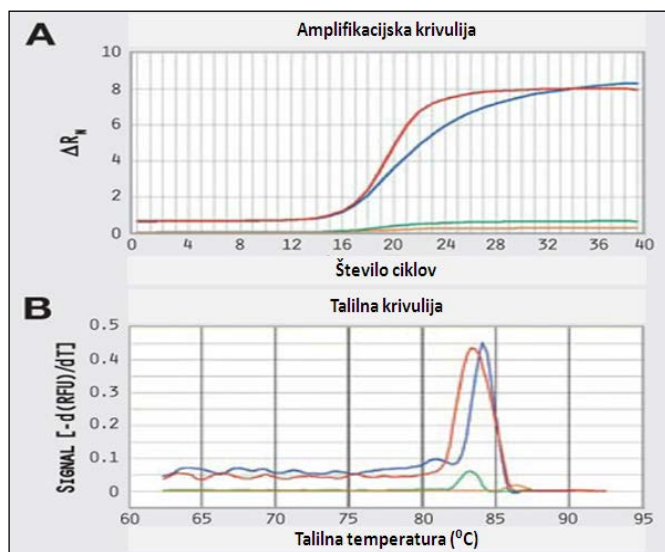
Izbira kalibratorja je zmeraj odvisna od planiranega eksperimenta. Kalibrator je lahko vrednost izražanja enake mRNK v drugem tkivu, v enakem tkivu ob različnih časovnih obdobjih ali pa vrednost izražanja enake mRNK v kontrolah. Končna količina izražanja tarčnega gena pa je podana kot:

$$\text{količina tarčnega gena} = 2^{-\Delta\Delta Ct},$$

ki je relativna na izbrani kalibrator.⁴¹

2.3.8. Interpretacija rezultatov

Med procesom pomnoževanja smo spremljali nastajanje produkta z merjenjem fluorescenčnega signala. S programsko opremo nato podatke in potek reakcije analiziramo v grafični obliki. Amplifikacijska krivulja (krivulja pomnoževanja) (Slika 2.5 a) nam prikazuje podatke o kinetiki pomnoževanja tarčne sekvence, talična krivulja (Slika 2.5 b) pa podatke o lastnostih končnega produkta pomnoževanja. Surove podatke smo nato obdelali glede na naše potrebe.

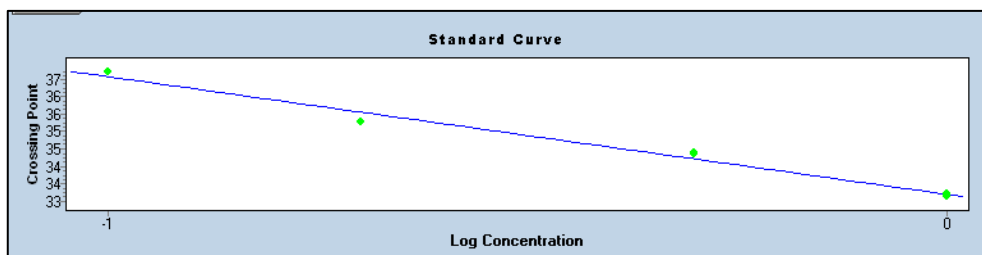


Slika 2.5: a) Amplifikacijska krivulja b) Talilna krivulja

Na sliki 2.5 a je predstavljena amplifikacijska krivulja (ang. amplification plot) z vrisano linijo fluorescentnega praga. Na Sliki 2.5 b je predstavljena talilna krivulja (ang. dissociation curve) za dva različna pomnožena odseka (amplikona).

Za interpretacijo surovih podatkov moramo poznati naslednje parametre:

- bazna linija: število ciklov reakcije, pri katerih jakost fluorescence še ne doseže praga detekcije. Bazna linija mora odstraniti fluorescenco ozadja, ne sme pa biti na področju, kjer se amplifikacijski signal začne dvigati nad njo. Računalnik jo avtomatično nastavi 1-2 cikla pred prvo amplifikacijsko krivuljo, lahko pa jo ročno spremenimo.
- ΔR_n : R_n je normaliziran reporterski signal in predstavlja razmerje med signalom reporterskega barvila in pasivne reference. Pasivna referenca se uporablja za normalizacijo signala reporterskega barvila. Z njo korigiramo nihanja fluorescentnega signala, ki ne izvira iz PCR ampak iz fluorescence ozadja (komponente reakcije, plastika, prašni delci...). Najpogosteje se uporablja barvilo ROX. ΔR_n je razlika med emisijo fluorescence produkta (R_n) in fluorescentnim signalom bazne linije. Tako R_n kot ΔR_n se povečujeta tekom reakcije dokler ta ne doseže plato faze.
- Pražna vrednost (threshold): je vrednost, pri kateri amplifikacijski signal preseže signal ozadja. Nastavljena mora biti na spodnjem delu eksponentnega dela krivulje. Avtomatsko jo izračuna računalnik kot 10-kratno standardno deviacijo povprečnega signala bazne linije, lahko pa jo nastavimo tudi ročno.
- C_t vrednost (threshold cikel): je cikel v katerem fluorescenca vzorca preseže linijo prazne vrednosti. Na osnovi C_t vrednosti primerjamo podatke med seboj, uporabimo pa jih tudi za nadaljnjo obdelavo podatkov. C_t vrednost je obratnosorazmerna z začetnim številom kopij matrice, torej več začetnega vzorca pomeni nižji cikel pri katerem fluorescenca vzorca preseže fluorescenco ozadja. C_t se vedno nahaja na spodnjem eksponentnem delu krivulje, ko še ni omejitev pomnoževanja zaradi pomanjkanja reagentov in zmanjšanja aktivnosti polimeraze.
- Standardna krivulja (Slika 2.6): podana je kot log začetne količine vzorca v odvisnosti od C_t . Pripravimo jo z redčitveno vrsto znanih koncentracij standarda. Iz nje dobimo mnoge podatke o poteku PCR reakcije, kot so naklon krivulje, Y-presek in korelacijski koeficient. Iz naklona krivulje lahko določimo učinkovitost.



Slika 2.6: Standardna krivulja

- Korelacijski koeficient (R^2) je mera prileganja. Pove nam, kako dobro se meritve prilegajo idealni krivulji (idealni je 1), ki je v tem primeru premica. Y-presek je točka, v kateri standardna krivulja seka y os. Odraža teoretično mejo zaznave. Teoretično lahko s to metodo zaznamo tudi eno samo kopijo gena, v praksi pa je najnižja vrednost, ki jo zanesljivo določimo 5 kopij (Roche Biosystems Protocol, 2009).

2.3.9. Programski paket SPSS

SPSS je programski paket za statistično obdelavo podatkov pridobljenih iz raziskav. Z njim lahko opravljamo standardne statistične analize z metodami kot so: opisno statistične metode, razne korelacije in regresijske metode, splošno linearno modeliranje (tudi ANOVA) ipd. SPSS je organiziran v večje število modulov in dodatnih aplikacij, odvisno od potreb uporabnika. Pri obdelavi podatkov iz genotipizacij smo uporabljali različico SPSS 19.0, v kateri smo izvajali χ^2 (hi-kvadrat) test t.j. Fisher exact test. Za vsak SNP smo izračunali razlike med frekvenca alelov in genotipov pri preiskovancih, njihovo značilnost in razmerja obetov s 95% intervalom zaupanja (odds ratio – OR with 95% confidence interval – CI). Vpliv genotipa na posamezne klinične in laboratorijske parametre, ki imajo naravo numerične spremenljivke (število eozinofilcev, PC_{20} , Cel IgE, $F_{E}NO$, FEV1 in dFEV1) pa smo izračunali s pomočjo t-testa za dva neodvisna vzorca. Ker vrednosti PC_{20} v populaciji niso normalno porazdeljene, smo za statistično analizo uporabili tudi njihov desetiški logaritem – $\log PC_{20}$. Kot statistično značilno smo smatrali p vrednost manjšo od 0,05.

3. REZULTATI

3.1. Izbira kandidatnih genov

Kandidatne gene iz asociacijskih študij smo izbrali z internetnim orodjem HuGENavigator, ki je namenjeno ugotavljanju vplivov mutacij v človeškem genomu na zdravje ljudi. V asociacijskih študijah sta bila v povezavi z laktozno netoleranco omenjena dva gena.

Po pregledu literature in vseh virov smo se odločili za analizo polimorfizma -13910C/T na genu regulatornem delu LCT gena (rs4988235). Študij, ki povezujejo gen LCT z laktozno netoleranco smo našli 38, medtem ko sta študiji, ki povezujeta MCM6 z laktozno netoleranco le dve. Za analizo izbranega gena smo se odločili, ker nismo našli veliko asociacijskih študij, ki bi povezovala gen LCT z ekspresijo in prehranskimi navadami.

3.2. Razvoj RFLP testov za izbrane polimorfizme

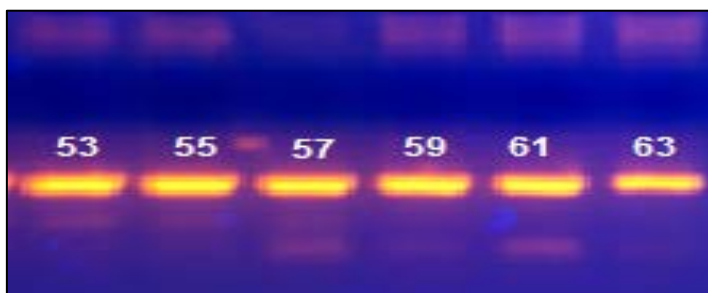
Prvi korak pri razvoju RFLP testov je načrtovanje začetnih oligonukleotidov, ki smo jih dimenzionirali s pomočjo spletnih aplikacij SNPcutter in Primer3 ter preverili v programu GeneRunner. Pri načrtovanju smo upoštevali naslednje kriterije:

- Dolžina začetnih oligonukleotidov je 18 – 25 bp,
- Zaporedje začetnih nukleotidov je od SNP oddaljeno vsaj 10 bp v obeh smereh zaporedja.
- PCR produkti, ki jih dobimo z uporabo začetnih nukleotidov imajo velikost 100 – 300 bp.

S pomočjo spletne aplikacije SNPcutter in programa GeneRunner smo izbrali ustrezne restrikcijske encime.

Drugi korak v razvoju RFLP testov je optimizacija PCR na izbranih nukleotidih. S spreminjanjem reakcijskih pogojev kot so temperatura prileganja, volumen začetnih oligonukleotidov in volumen MgCl₂, smo iskali presek optimalnih pogojev za izbrano reakcijo. PCR produkte smo detektirali na 2% agaroznih gelih z etidijevim bromidom.

Najprej smo z uporabo gradientnega termociklizatorja določili optimalno temperaturo pri maksimalnih vrednostih preostalih spremenljivk. Na sliki je prikazan PCR produkt gena MCM6 pri različnih temperaturah.



Slika 3.1 PCR produkti gena MCM6 pri temperaturah od 53 do 63°C

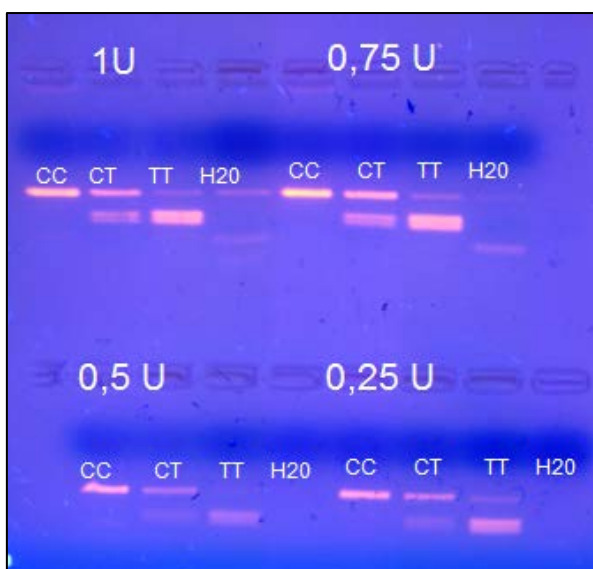
Na sliki 3.1 je prikazana ena najpogostejših težav PCR reakcij, t.j. pomnoževanje nespecifičnih produktov, ki onemogoča nadaljnje analize DNK. Nespecifični produkti so vidni kot bolj ali manj izstopajoče lise pod želenim PCR produktom. Pomnoževanje nespecifičnih produktov lahko odpravimo z višanjem temperature prileganja. V tem primeru so nespecifični produkti izginili pri PCR produktu pri najvišji temperaturi 63 °C.

Optimizacijo smo nadaljevali pri izbrani temperaturi in spreminjali ostali dve spremenljivki. Preglednica 3.1 podaja optimalne restriksijske pogoje za izbrane začetne oligonukleotide. Volumnu MgCl₂ in začetnih oligonukleotidov zadostujejo za V = 10 µL reakcijo za en vzorec.

Preglednica 3.1 Optimalni restriksijski pogoji za izbrane začetne oligonukleotide

Reaktant	Količina v µL
DNA	1
H ₂ O	5.15
pufer	1
MgCl ₂	0.6
dNTP	0.2
primer 1	1
primer 2	1
TAQ	0.05
	10

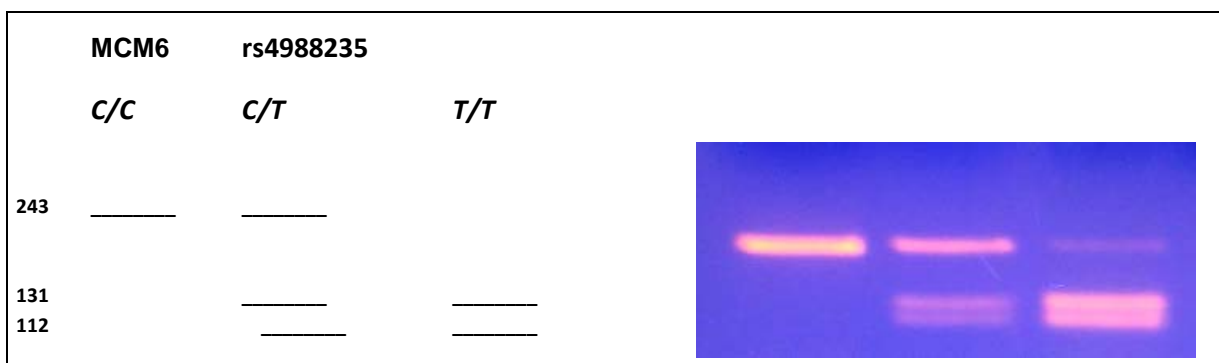
Tretji korak razvoja RFLP testov je optimizacija restrikcije, pri kateri smo izbranim PCR produktom dodali različne koncentracije restriksijskih encimov (RE), kot to prikazuje slika 3.2:



Slika 3.2 Optimizacija restrikcije PCR produktov gena MCM6

Na sliki 3.2 je prikazana optimizacija restrikcije za začetni oligonukleotid MCM6_rs4988235 z encimom FagI. V originalnem protokolu proizvajalca je priporočena količina encima za V = 10µL reakcijo 2U. Če upoštevamo, da je količina encima 2U/µL, bi to pomenilo, da za V= 10µL potrebujemo V= 0,2µL encima. Z optimizacijo smo ugotovili, da encim uspešno reže PCR produkte tudi pri 0,25U oz, pri V = 0,05µL za V= 10µL.

Optimizacijam začetnih oligonukleotidov in restrikcij je sledila genotipizacija bolnikov in kontrolne skupine. Slika prikazuje shematski prikaz detekcije DNA na agaroznem gelu za polimorfizem po restrikciji.



Slika 3.3 Shema in slika detekcije DNA na agaroznem gelu za SNP rs4988235 na genu MCM6

3.3. Rezultati ekspresijske analize

3.3.1. Izbira kandidatnega in referenčnega gena

S pomočjo bioinformatičnih orodij smo na osnovi podatkov v znanstveni literaturi in podatkovnih zbirkah izbrali kandidatni gen za analizo genske ekspresije med preiskovanci, ki smo jih anketirali. Za kandidatni gen smo izbrali gen LCT, za referenčnega pa 18sRNA.

3.3.2. Optimalni reakcijski pogoji

Po navodilih proizvajalca smo pripravili reakcijsko mešanico. Sestavo reakcijske mešanice prikazuje Preglednica 3.1:

Preglednica 3.2: Reakcijska mešanica za merjenje ekspresije

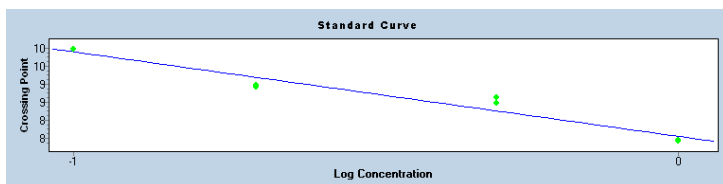
Reaktant	Količina v μL
DNA	2
Light Cycler-master mix	5
Primer probe	0,25
H ₂ O	2,75
total	10

3.3.3. Priprava standardne krivulje

S pomočjo standardne krivulje smo določili Ct vrednosti. Pripravili smo redčitveno vrsto znanih koncentracij standarda. Iz nje dobimo mnoge podatke o poteku PCR reakcije, kot so naklon krivulje, Y-presek in korelacijski koeficient. Iz naklona krivulje lahko določimo učinkovitost. Preglednica 3.3. prikazuje pripravo redčitvene vrste znanih koncentracij, Slika pa prikazuje standardno krivuljo:

Preglednica 3.3: Priprava redčitvene vrste znanih koncentracij standarda

Faktor redčitve	H ₂ O	Količina vzorca	Skupaj 1	Skupaj 2
1 : 1	0	15	15	7,5
1 : 2	7,5	7,5	15	9
1 : 5	9	6	15	7,5
1 : 10	7,5	7,5	15	7,5
1 : 20	7,5	7,5	15	7,5
1 : 40	7,5	7,5	15	7,5



Slika 3.4: Standardna krivulja

3.3.4. Rezultati ekspresijske analize

Kvantitativni PCR v realnem času (qPCR) smo izvedli na napravi LightCycler 480 (Roche Diagnostics). Vsak vzorec smo analizirali v duplikatih v primeru vsakega gena. Izražanje kandidatnih genov smo relativno kvantificirali glede na stabilno izražanje gena 18sRNA. Dobljene rezultate smo analizirali s pomočjo relativne kvantifikacije. Končne rezultate prikazuje Preglednica 3.4.:

Preglednica 3.4: Rezultati analize ekspresije gena LCT z relativno kvantifikacijo

GENOTIP	C _p (LCT)	C _p (18sRNA)	Δ Ct	$\Delta\Delta$ Ct	$2^{-\Delta\Delta$ Ct}
CC	36,03	10,21	25,82	4,22	0,054
CC	36,91	12,06	24,85	3,25	0,105
CC	38,15	13,38	24,77	3,17	0,111
CC	34,71	10,95	23,76	2,16	0,223
CC	34,52	10,97	23,55	1,95	0,258
CC	38,58	15,37	23,21	1,61	0,327
CC	36,85	13,67	23,18	1,58	0,334
CC	32,81	9,69	23,12	1,52	0,348
CC	35,06	11,99	23,07	1,47	0,360
CC	35,85	12,83	23,02	1,42	0,373
CC	35,9	13,58	22,32	0,72	0,605
CC	34,04	11,93	22,11	0,51	0,700
CC	33,08	11	22,08	0,48	0,715
CC	34,08	12,19	21,89	0,29	0,816
CC	32,64	10,98	21,66	0,06	0,957
CC	31,61	10,04	21,57	-0,03	1,018
CC	33,12	11,56	21,56	-0,04	1,025
CC	32,18	10,83	21,35	-0,25	1,186
CC	32,14	10,99	21,15	-0,45	1,362

CC	34,13	13,7	20,43	-1,17	2,244
CC	32,44	12,39	20,05	-1,55	2,920
CC	35,51	16,67	18,84	-2,76	6,755
CC	33,78	14,97	18,81	-2,79	6,897
CC	36,94	18,84	18,1	-3,50	11,282
CC	34,95	17,31	17,64	-3,96	15,519
CC	31,88	17,7	14,18	-7,42	170,781
CT	40,25	13,07	27,18	5,58	0,021
CT	40,71	13,58	27,13	5,53	0,022
CT	38,53	13,39	25,14	3,54	0,086
CT	34,86	10,19	24,67	3,07	0,119
CT	34,92	10,52	24,4	2,80	0,143
CT	33,11	9,29	23,82	2,22	0,214
CT	35,04	11,5	23,54	1,94	0,260
CT	33,76	10,6	23,16	1,56	0,338
CT	34,99	12,01	22,98	1,38	0,383
CT	34,84	11,88	22,96	1,36	0,389
CT	33,14	10,49	22,65	1,05	0,482
CT	34,01	11,75	22,26	0,66	0,631
CT	41,81	19,58	22,23	0,63	0,644
CT	33,71	11,48	22,23	0,63	0,644
CT	32,85	10,7	22,15	0,55	0,681
CT	32,74	10,8	21,94	0,34	0,788
CT	33,77	11,88	21,89	0,29	0,816
CT	32,71	10,83	21,88	0,28	0,821
CT	36,1	14,33	21,77	0,17	0,886
CT	32,66	11,03	21,63	0,03	0,977
CT	32,41	10,89	21,52	-0,08	1,054
CT	32,91	11,54	21,37	-0,23	1,170
CT	32,84	11,68	21,16	-0,44	1,353
CT	32,8	12,45	20,35	-1,25	2,372
CT	34,88	14,82	20,06	-1,54	2,900
CT	34,07	15,58	18,49	-3,11	8,610
CT	32,96	16,34	16,62	-4,98	31,472
CT	32,81	16,3	16,51	-5,09	33,966
CT	37,23	24,35	12,88	-8,72	420,511
TT	34,7	12,14	22,56	0,96	0,513
TT	33,5	12,77	20,73	-0,87	1,823
TT	31,95	11,38	20,57	-1,03	2,036
TT	31,99	11,52	20,47	-1,13	2,183
TT	31,96	14,24	17,72	-3,88	14,682
TT	42,16	27,16	15	-6,60	96,737

Rezultate ekspresijske analize smo analizirali s pomočjo programa SPSS 19.0, kjer smo uporabili neparametrični Mann-Whitney-jev test. Analizirali smo ekspresijo v celotni skupini anketiranih preiskovancev. Primerjali smo ekspresijo na podlagi genotipov, pojavljanja simptomov značilnih za laktozno netoleranco ter pojavljanja simptomov po uživanju mleka in mlečnih izdelkov. Rezultate analize prikazuje Preglednica 3.5.

Preglednica 3.5 Ekspresija gena LCT v celotni skupini anketiranih preiskovancev glede na genotip in pojavljanje simptomov

	N	Mean rank	Sum of Ranks	
CC	26	32,21	837,50	p=0,918
CT+TT	38	32,70	1242,50	
Simptomi DA	38	27,87	1059,00	p=0,046
Simptomi NE	24	37,25	894,00	
Simpt po mleku DA	15	28,37	425,50	p=0,508
Simpt po mleku NE	46	31,86	1465,50	

Analizo smo ponovili tudi v skupini preiskovancev z genotipom CC. Primerjali smo ekspresijo na podlagi pojavljanja simptomov značilnih za laktozno netoleranco ter pojavljanja simptomov po uživanju mleka in mlečnih izdelkov. Rezultate prikazuje Preglednica 3.6.

Preglednica 3.6 Ekspresija gena LCT v skupini anketiranih preiskovancev z genotipom CC glede na pojavljanje simptomov

	N	Mean rank	Sum of Ranks	
Simptomi DA	13	11,69	152,00	p=0,355
Simptomi NE	12	14,42	177,00	
Simpt po mleku DA	5	15,6	78,00	p=0,377
Simpt po mleku NE	20	12,35	247,00	

Analizo smo izvedli tudi v skupini preiskovancev z genotipom CC in s simptomi značilnimi za laktozno netoleranco. Primerjali smo ekspresijo na podlagi pojavljanja simptomov po uživanju mleka in mlečnih izdelkov. Rezultate prikazuje Preglednica 3.7.

Preglednica 3.7 Ekspresija gena LCT v skupini anketiranih preiskovancev z genotipom CC in simptomi značilnimi za laktozno netoleranco

	N	Mean rank	Sum of Ranks	
Simpt po mleku DA	5	9,2	46,00	p=0,107
Simpt po mleku NE	8	5,63	45,00	

3.4. Analiza vsebnosti laktoze v izbranih izdelkih

S pomočjo izbrane literature in drugih virov smo poiskali podatke o vsebnosti laktoze v izbranih izdelkih. Z uporabo programa Microsoft Excel smo filtrirali podatke in tako določili vsebnost laktoze v izbranih izdelkih. Vsebnost laktoze v izbranih izdelkih prikazuje preglednica 3.2:

Preglednica 3.8 Vsebnost laktoze v izbranih živilih

živilo	g/100g
polnomastno mleko	4,6
posneto mleko	5
čokoladno mleko	9,1
človeško mleko	6,1
polnomastno mleko v prahu	37,9
posneto mleko v prahu	51,3
kozje mleko	4
mlečni riž	18
špageti carbonara	7
jogurt z malo maščobe	6,1
navadni jogurt	3,6
ovčji sir	0,1
ementaler	0.1
edamec 45%	2
gauda	v sledeh
mocarela	v sledeh
parmezan	1,4
švicarski sir	1
sveži sir	2,3
feta	0,5
kisla smetana	3,7
smetana	4,0
maslo	0,8
skuta	2,7
sirotka	4,8
sladoled	6

3.5. Razširjenost laktozne netolerance v slovenski populaciji

3.5.1. Pogostost polimorfizma -13910C>T v naključni slovenski populaciji

V skupini naključnih preiskovancev je imelo 36,5% preiskovancev genotip CC, ki je povezan z laktozno netoleranco. 46,6% preiskovancev je imelo genotip CT in 16,8% preiskovancev genotip TT. Genotipa CT in TT sta povezana s sposobnostjo razgradnje laktoze. Natančnejše rezultate z alelno frekvenco prikazuje Preglednica 3.9.

Preglednica 3.9: Pogostost polimorfizma -13910C>T in alelna frekvenca v naključni slovenski populaciji

Genotip	Število oseb n=607	Odstotek oseb	Alel	Alelna frekvenca
CC	222	36,5%	C T	0,6496 0,3504
CT	283	46,6%		
TT	102	16,8%		

3.5.2. Pogostost polimorfizma -13910C>T v skupini bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo

V skupini preiskovancev s KVČB je imelo 32,28% preiskovancev genotip CC, ki je povezan z laktozno netoleranco. 49,21% preiskovancev je imelo genotip CT in 18,50% preiskovancev genotip TT. Genotipa CT in TT sta povezana s sposobnostjo razgradnje laktoze.

Preiskovance s KVČB smo razdelili na tri skupine in sicer na bolnike z Ulceloznim kolitisom (UC), bolnike s Crohnovo boleznijo (CD) ter na bolnike z refraktorno Crohnovo boleznijo (CDr).

Med bolniki z UC je bilo 31,82% preiskovancev z genotipom CC, 50% preiskovancev z genotipom CT in 15,91% preiskovancev z genotipom TT.

Med bolniki s CD je genotip CC imelo 37,08% preiskovancev, genotip CT 50,56% ter genotip TT 13,48% preiskovancev. Med bolniki z refraktorno Crohnovo boleznijo pa je bilo preiskovancev z genotipom CC 27,10%, preiskovancev z genotipom CT 50,47% in preiskovancev z genotipom TT 22,43%.

Natančnejše rezultate z alelno frekvenco prikazuje Preglednica 3.10.

Preglednica 3.10 Pogostost polimorfizma -13910C>T in alelna frekvenca v skupini bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo

	Genotip	Število oseb n=254	Odstotek oseb	Alel	Alelna frekvenca
bolniki s KVČB	CC	82	32,28%	C T	0,5689 0,4311
	CT	125	49,21%		
	TT	47	18,50%		
bolniki z UC	CC	14	31,82%	C T	0,5814 0,4186
	CT	22	50,00%		
	TT	7	15,91%		
bolniki s CD	CC	33	37,08%	C T	0,6167 0,3833
	CT	45	50,56%		
	TT	12	13,48%		
bolniki s CDr	CC	29	27,10%	C T	0,5234 0,4766
	CT	54	50,47%		
	TT	24	22,43%		

3.5.3. Pogostost polimorfizma -13910C>T v skupini anketiranih preiskovancev

Pogostost polimorfizma -13910C>T smo preverili tudi v skupini anketiranih posameznikov. Med preiskovanci je imelo genotip CC 42,14% preiskovancev, genotip CT je imelo 45% preiskovancev ter genotip TT 12,86% preiskovancev. Natančnejše rezultate prikazuje Preglednica 3.11.

Preglednica 3.11 Pogostost polimorfizma -13910C>T v skupini anketiranih preiskovancev

Genotip	Število oseb n=140	Odstotek oseb	Alel	Alelna frekvenca
CC	59	42,14%	C T	0,6464 0,3536
CT	63	45,00%		
TT	18	12,86%		

3.5.4. Statistična analiza genotipizacije polimorfizma -13910C>T

S pomočjo programskega paketa SPSS 19.0 smo statistično analizirali povezavo genotipov med preiskovanci s KVČB in kontrolno skupino (CON). Rezultate prikazuje Preglednica 3.12.

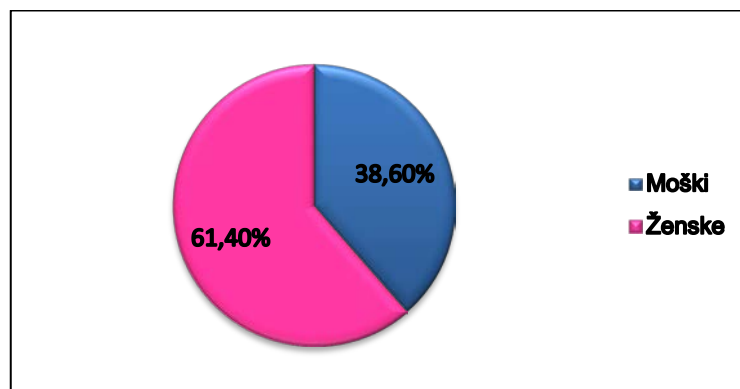
Preglednica 3.12: Rezultati statistične analize povezave genotipov med preiskovanci s KVČB in kontrolno skupino

	CON	UC	Skupaj	p=0,731 OR=0,874 CI=0,406 - 1,883
CC	28	17	45	
CT+TT	49	26	75	
Skupaj	44	43	120	
	CON	KVČB	Skupaj	p=0,406 OR=1,252 CI=0,737 - 2,128
CC	29	83	112	
CT+TT	48	172	220	
Skupaj	77	255	332	
	CON	CDr	Skupaj	p=0,105 OR=1,683 CI=0,895 - 3,165
CC	29	28	57	
CT+TT	48	78	126	
Skupaj	77	106	183	
	CON	CD	Skupaj	p=0,820 OR=1,076 CI=0,572-2,025
CC	29	32	61	
CT+TT	48	57	105	
Skupaj	77	89	166	

3.6. Analiza anketnega vprašalnika

Analizo anketnega vprašalnika smo opravili s pomočjo programa Microsoft Excel ter programa SPSS 19.0.

V raziskavo je bilo zajetih 60 preiskovancev. Od tega je bilo v raziskavo vključenih 38,6% moških in 61,4% žensk. Porazdelitev preiskovancev po spolu prikazuje Slika 3.5.:



Slika 3.5: Porazdelitev preiskovancev po spolu

3.6.1. Analiza anketnega vprašalnika s pomočjo programa Microsoft Excel

Preiskovanci so po odvzemu krvi rešili anketne vprašalnike. V raziskavi nas je zanimalo, ali preiskovanci poznajo bolezen laktozno netoleranco in kako dobro jo poznajo. Velik delež preiskovancev (76,74%) je vedel, da uživanje mleka in mlečnih izdelkov povzroča težave, prav tako je večina preiskovancev (62,53%) že slišala za bolezen imenovano laktozna netoleranca. Večina (61,63%) je vedela, da na intenzivnost simptomov vpliva količina zaužite laktoze, prav tako pa preiskovanci vedo, da na tržišču obstaja veliko izdelkov brez laktoze. Večina preiskovancev (53,5%) ni vedela, da jogurt vsebuje bakterijske kulture, ki razgradijo laktozo, prav tako pa velik delež preiskovancev (67,44%) ni vedel, da je laktozna netoleranca dedna bolezen. Delež anketiranih, ki se zaveda, da je laktozna netoleranca lahko prisotna že ob rojstvu je 56,97%.

Pri preiskovancih smo preverili ali vedo, kateri izdelki vsebujejo laktozo. Rezultate prikazuje Preglednica 3.13.

Preglednica 3.13 Delež preiskovancev, ki so pravilno odgovorili na vprašanje o vsebnosti laktoze v izbranih živilih.

Izdelek	Izdelek vsebuje laktozo	Delež preiskovancev, ki so odgovorili pravilno
Mleko	DA	96%
Jogurt	DA	94%
Sir	DA	94%
Svinjsko meso	NE	100%
Pica	DA	27%
Francoski rogljiček	DA	25%
Sladoled	DA	75%
Jajca	NE	88%
Majoneza	DA	35%
Solatni preliv	DA	33%
Čokolada	DA	55%
Tuna	NE	100%
Corn flakes	DA	6%
Margarina	NE	53%
Pašteta	DA	6%
Palačinke	DA	32%

V raziskavi smo skušali ugotoviti povezavo med genotipom CC ter simptomi in vnosom laktoze, zato smo naredili primerjavo med genotipi in simptomi ter simptomi in vnosom laktoze. Z genotipom CC je bilo 59 preiskovancev, od tega jih je imelo simptome 29 (49,1%), 30 (50,8%) pa ne. Preiskovancev, pri katerih se simptomi pojavijo po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov je bilo le šest (20,7%). Z genotipom CT je bilo 63 preiskovancev, od tega jih je imelo 42 (66,67%) simptome značilne za laktozno netoleranco, 21 (33,33%) pa ne. Takih preiskovancev, pri katerih se simptomi pojavijo po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov je bilo devet (21,95%). Z genotipom TT je bilo 18 preiskovancev, od tega jih je imelo 6 (33,33%) simptome, 12 (66,67%) pa ne. Mnenja, da simptomi pojavijo po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov je bil le en preiskovanec.

V raziskavi smo podrobneje preučili vnos laktoze preiskovancev ter njihove argumente, zakaj je njihov vnos laktoze majhen. Vnos mleka in mlečnih izdelkov je pri 15 (28,8%) majhen, pri 11 (20,4%) srednji, pri 28 (51,9%) pa velik. Malo mleka in mlečnih izdelkov uživa 32 (53%) preiskovancev, od tega 9 (28,1%), ker menijo, da mleko in mlečni izdelki slabo vplivajo na njihovo počutje oz. mu celo škodujejo. Od tega je 33,3% takih z genotipom CC in 66,7% takih z genotipom CT. Le dva (6,3%) preiskovanca ne uživata mleka in mlečnih izdelkov, ker jima ne odgovarja okus le teh. Malo mleka in mlečnih izdelkov brez posebnih razlogov uživa 21 (65,6%) preiskovancev, od tega 8 (38,1%) takih z genotipom CC, 10 (47,6%) takih z genotipom CT in trije (14,3%) preiskovanci z genotipom TT.

Zanimal nas je tudi natančen tedenski vnos laktoze in količina laktoze, ki preiskovancem povzroča neprijetne simptome, ki se pojavijo kot posledica laktozne netolerance. Vnos laktoze preiskovancev se giblje med 0g laktoze tedensko do 800g laktoze. Večina preiskovancev (58,68%) zaužije nad 100g laktoze, od tega 30 (42,2%) z genotipom CC, 34 (47,88%) z genotipom CT in 7 z genotipom TT (9,86%). Vnos laktoze, ki povzroča težave, je pri večini (77,27%) preiskovancev okrog 10g laktoze pri enem obroku. Pri omenjeni količini se težave pojavijo petim (31,25%) preiskovancem z genotipom CC in devetim (56,25%) z genotipom CT ter dvema (12,5%) preiskovancema z genotipom TT.

V raziskavi smo prav tako preverili potrjenost laktozne netolerance med preiskovanci ter njihov obisk pri zdravniku in specialistu gastroenterologu zaradi pojava simptomov, ki kažejo na laktozno netoleranco. Le 9 (6,42%) preiskovancev je zaradi simptomov obiskalo zdravnika, od tega dva preiskovanca z genotipom TT, dva z genotipom CT in pet preiskovancev z genotipom CC. Le štirje preiskovanci, ki so zaradi simptomov obiskali zdravnika so bili napoteni k specialistu gastroenterologu. Pri le treh (2,14%) preiskovancih z genotipom CC je bila laktozna netoleranca potrjena s kliničnim testom.

3.6.2. Analiza anketnega vprašalnika s pomočjo programa SPSS 19.0

S pomočjo programa SPSS 19.0 smo izvedli statistično analizo v celotni skupini anketiranih preiskovancev. Povezavo genotipov in simptomov s količino vnesene laktoze, starostjo in indeksom telesne mase v skupini anketiranih preiskovancev predstavljajo Preglednica 3.14., Preglednica 3.15. , Preglednica 3.16 .

Preglednica 3.14: Povezava genotipa in simptomov s tedenskim vnosom laktoze v celotni skupini anketiranih preiskovancev

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
CC	51	180,05	172,05	24,09	p=0,459
CT+TT	71	158,15	143,06	16,97	OI=-34,722 - 78, 52
simptomi DA	80	171,7069	147,849	16,53	p=0,704
simptomi NE	45	160,178	165,516	24,6737	OI=-45,62-68,27
Simpt. po mleku DA	17	106,191	116,8789	28,3473	p=0,035
Simpt. po mleku NE	107	177,958	157,65	15,2406	OI=-150,80-7,273
Simptomi tedensko	31	159,52	119,799	21,516	p=0,606
Simptomi mesečno	38	176,54	152,92	24,807	OI=-82,57 - 48,526

Preglednica 3.15: Povezava genotipa in simptomov s starostjo preiskovancev v celotni skupini anketiranih preiskovancev

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
CC	59	204,66	554,616	72,205	p=0,433
CT+TT	81	136,58	430,086	47,787	OI=-96,506 - 232,66
simptomi DA	81	36,65	14,269	1,585	p=0,162
simptomi NE	51	79,78	276,277	38,687	OI=-03,853-17,593
Simpt. po mleku DA	17	30,53	13,616	3,302	p=0,561
Simpt. po mleku NE	114	56,84	185,242	17,35	OI=-115,53 - 62,905

Preglednica 3.16: Povezava genotipa in simptomov z indeksom telesne mase (ITM) v celotni skupini anketiranih preiskovancev

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
CC	54	24,4	4,84	0,6588	p=0,343
CT+TT	77	25,2	4,66	0,531099	OI=-0,8053 - 0,805
simptomi DA	81	25,1501	5,1609	0,57343	p=0,255
simptomi NE	51	24,177	3,9204	0,5544	OI=-0,7094 - 2,6555
Simpt. po mleku DA	17	25,409	5,0006	1,2128	p=0,584
Simpt. po mleku NE	113	24,7316	4,7027	0,4424	OI=-1,7624 - 3,1182

Povezavo genotipov in simptomov v celotni skupini anketiranih preiskovancev predstavlja Preglednica 3.17.

Preglednica 3.17: Povezava genotipa in simptomov

	simptomi DA	simptomi NE	skupaj	
CC	29	24	53	p=0,291 OR=0,680 CI=0,332-1,393
CT+TT	48	27	75	
skupaj	77	51	128	
	simpt. po mleku DA	Simpt. po mleku NE	skupaj	
CC	6	47	53	p=0,563 OR=0,731 CI=0,252-2,119
CT+TT	11	63	74	
skupaj	17	110	127	
	simptomi DA	simptomi NE	skupaj	
Simpt. po mleku DA	16	64	80	p=0,003 OR=12,5 CI=1,603-97,476
Simpt. po mleku NE	1	50	51	
skupaj	17	114	131	

Prav tako smo izvedli statistično analizo v skupini anketiranih preiskovancev s simptomi značilnimi za laktozno netoleranco. Povezavo genotipov in simptomov s količino vnesene laktoze, starostjo in indeksom telesne mase v skupini anketiranih preiskovancev predstavljajo Preglednica 3.18., Preglednica 3.19. , Preglednica 3.20.

Preglednica 3.18: Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka s tedenskim vnosom laktoze, v skupini preiskovancev, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
CC	29	183,7279	159,627	29,642	p=0,651 OI=-54,802-87,131
CT+TT	47	167,5635	145,2135	21,1816	
Simpt. po mleku DA	16	107,9937	120,4679	30,1169	p=0,031 OI=-154,028-(-8,11)
Simpt po mleku NE	63	189,0623	151,1882	19,0479	

Preglednica 3.19 Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka s starostjo preiskovancev v skupini preiskovancev, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
CC	29	32,45	14,594	2,71	p=0,072 OI=-12,834 - 0,564
CT+TT	48	38,58	14,118	2,038	
Simpt po mleku DA	16	31,13	13,832	3,458	p=0,090 OI=-14,911 - 1,161
Simpt po mleku NE	64	38,00	14,258	1,782	

Preglednica 3.20 Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka z indeksom telesne mase (ITM) v skupini preiskovancev, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
CC	29	24,1494	5,4843	10,184	p=0,156
CT+TT	48	25,9508	5,0504	0,7289	Ol=-04,246 - 0,643
Simpt po mleku DA	16	25,569	5,1197	1,2799	p=0,765
Simpt po mleku NE	64	25,1355	5,1969	0,6496	Ol=-2,533 - 3,400

Statistično analizo smo izvedli tudi v skupini anketiranih preiskovancev z genotipom CC, značilnim za laktozno netoleranco. Povezavo simptomov v omenjeni preiskovalni skupini s količino vnesene laktoze, starostjo in indeksom telesne mase predstavljajo Preglednica 3.21., Preglednica 3.22. , Preglednica 3.23.

Preglednica 3.21 Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka s tedenskim vnosom laktoze, v skupini preiskovancev z genotipom CC

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
Simptomi DA	29	183,7279	159,627	29,642	p=0,866
Simptomi NE	22	175,208	190,959	40,7126	Ol=-90,199-107,239
Simpt po mleku DA	6	184,058	158,776	64,82006	p=0,950
Simpt po mleku NE	45	179,5186	175,4208	26,1601	Ol=-162,04 - 171,12

Preglednica 3.22: Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka s starostjo preiskovancev, v skupini preiskovancev z genotipom CC

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
Simptomi DA	29	32,45	14,594	2,71	p=0,043
Simptomi NE	24	42,04	18,174	3,71	Ol=-18,853-(-0,333)
Simpt po mleku DA	6	29,5	14,937	6,098	p=0,253
Simpt po mleku NE	47	37,72	17	2,48	Ol=-23,897 - 7,45

Preglednica 3.23 Povezava genotipa in simptomov po zaužitju mleka z indeksom telesne mase (ITM), v skupini preiskovancev z genotipom CC

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
Simptomi DA	29	24,1494	5,4842	1,0184	p=0,803
Simptomi NE	24	24,4774	4,008	0,8181	Ol=-2,9514 - 2,2954
Simpt po mleku DA	6	23,3759	2,4763	1,0109	p=0,423
Simpt po mleku NE	47	24,4156	5,057	0,7377	Ol=-3,7827 - 1,7033

V skupini anketiranih preiskovancev z genotipom CC, smo preverili tudi, kako pogosto se pojavijo simptomi, ki so posledica uživanja mleka in mlečnih izdelkov. Rezultate prikazuje Preglednica 3.24.

Preglednica 3.24 Pojavljanje simptomov po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov v skupini preiskovancev z genotipom CC

	simpt po mleku DA	simpt po mleku NE	Skupaj	
Simptomi DA	6	23	29	p=0,018 OR=0,793 CI=0,659-0,955
Simptomi NE	0	24	24	
Skupaj	6	47	53	

Statistično analizo smo izvedli tudi v skupini anketiranih preiskovancev z genotipom CC in s simptomi značilnimi za laktozno netoleranco. Povezavo simptomov, ki se pojavijo kot posledica zaužitja mleka in mlečnih izdelkov s tedenskim vnosom laktoze predstavlja Preglednica 3.25.

Preglednica 3.25 Povezava simptomov, ki se pojavijo kot posledica zaužitja mleka in mlečnih izdelkov s tedenskim vnosom laktoze

	N	Mean	Std.Dev	Std.Error Mean	
Simpt po mleku DA	17	106,1917	116,8789	28,3473	p=0,075 OI=-150,81-(-5,642)
Simpt po mleku NE	107	177,9589	157,65	15,240	

4. DISKUSIJA

V naši raziskavi nas je zanimala pogostost posameznih laktaznih genotipov v slovenski populaciji. Delež oseb z nizko laktazno aktivnostjo, torej genotipom CC je bil 36,5%, delež oseb z genotipom CT 46,6%, ter delež oseb z genotipom TT 16,8%. Rezultate smo primerjali s študijami opravljenimi na drugih populacijah in ugotovili da je delež oseb z genotipom CC najbolj podoben tistemu v madžarski, nemški in ruski populaciji.⁴²⁻⁴⁴ Ugotovili smo tudi, da je delež oseb z genotipom CC precej višji, kot pri skandinavskih populacijah, kjer se ta giblje okrog 5%⁴⁵, ter precej nižji kot pri afriških populacijah, kjer se ta giblje okrog 80%, pri nekaterih populacijah celo do 100%.^{10,46,47}

V raziskavi smo preverili pogostost posameznih genotipov pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo in kontrolni skupini. Med bolniki z Ulceloznim kolitisom je bil delež oseb z genotipom CC 31,82%, z genotipom CT 50% in z genotipom TT 15,91%, med bolniki s Crohnovo boleznijo je bil delež oseb z genotipom CC 37,08%, z genotipom CT 50,56% in TT 13,48% ter med bolniki z refraktorno Crohnovo boleznijo 27,10% oseb z genotipom CC, 50,47% oseb z genotipom CT in 22,43% oseb z genotipom TT. V kontrolni skupini je bilo oseb z genotipom CC 41,13%, oseb z genotipom CT 44,91% ter oseb z genotipom TT 13,96%. Povezava med genotipi bolnikov s kronično vnetno črevesno boleznijo se ni izkazala kot statistično signifikantna pri nobeni od oblik kronično vnetnih črevesnih bolezni, s čemer smo potrdili dosedanje opravljene analize.⁴⁸⁻⁵²

Dolgo časa so si bila poročila o ravni laktazne mRNA nasprotujoča⁵³⁻⁵⁵, vendar pa je danes splošno znano, da imajo posamezniki z laktozno netoleranco nižjo stopnjo mRNA⁵⁶⁻⁵⁸. Neposredna primerjava med ravno mRNA in ekspresijo gena LCT namreč potrjuje, da je gen LCT odgovoren za raven laktazne mRNA^{56,59}. Razlike v ravni mRNA so v nekaterih študijah izrazitejše kot v drugih^{57,60}. Razlike v ravni mRNA smo iskali tudi v naši raziskavi, zato smo s izmerili ekspresijo gena LCT pri preiskovancih. Izmerjeno ekspresijo smo primerjali med preiskovanci, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco. Ekspresija gena LCT je bila med preiskovanci s simptomi bistveno nižja (27,87), kot med preiskovanci, ki nimajo simptomov značilnih za laktozno netoleranco (37,25). Primerjava se je izkazala kot statistično signifikantna ($p=0,046$). Tako smo tudi v naši raziskavi pokazali razliko v ekspresiji gena LCT med preiskovanci s simptomi značilnimi za laktozno netoleranco in preiskovanci ki teh simptomov nimajo.

V naši raziskavi smo iskali povezavo bolezenskega, CC, genotipa za laktozno netoleranco s simptomi in vnosom laktoze. Ugotovili smo, da ima velik delež preiskovancev (55%) simptome, ki kažejo na laktozno netoleranco. Med preiskovanci s simptomi značilnimi za laktozno netoleranco jih je imelo genotip CC le 37,66%, medtem ko je imelo genotip CT 54,54% preiskovancev in genotip TT 7,79% preiskovancev. Rezultati se razlikujejo od rezultatov že opravljene raziskave na slovenski populaciji. Ta navaja, da je med preiskovanci s simptomi takih z genotipom CC 63%.² Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, da je diagnosticiranje laktozne netolerance na podlagi simptomov težko. Simptomi, ki se pojavijo kot znaki laktozne netolerance so precej splošni in se pojavijo pri večini bolni prebavil. Zato sklepamo, da je za učinkovito diagnostiko laktozne netolerance potrebna kombinacija poznavanja simptomov in rezultatov testa, bodisi genetskega, bodisi katerega drugega testa, ki potrjuje laktozno netoleranco.

Montgomery, Büller in Rings s sodelavci so ugotovili, da na intenzivnost simptomov vplivajo, poleg genotipa še črevesna flora, hormoni, količina zaužite laktoze in subjektivno doživljanje simptomov.⁵³ Pri preiskovancih smo preverili tedenski vnos laktoze ter primerjali vnos laktoze z posameznimi genotipi ter s pojavljanjem simptomov. Preiskovanci z genotipom CC so imeli višji vnos laktoze, kot preiskovanci z genotipoma CT in TT. Med preiskovanci, pri katerih so se simptomi pojavili po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov, je bil vnos laktoze nižji kot pri preiskovancih, pri katerih se simptomi ne pojavijo po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov ($p=0,035$, $OR=-150,8-7,273$). Med preiskovanci, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco, je vnos laktoze prav tako nižji pri preiskovancih, ki so mnenja, da se ti simptomi pojavijo po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov ($p=0,031$, $OR=-154,03 - -8,11$). Preiskovanci, pri katerih se simptomi značilni za laktozno netoleranco pojavljajo pogosteje zaužijejo nižje količine laktoze kot preiskovancih pri katerih se simptomi pojavljajo manj pogosto.

V raziskavi smo preverili tudi, ali je genotip CC zanesljiv pokazatelj simptomov pri osebah z visokim vnosom laktoze. Med osebami z visokim vnosom laktoze je bilo 45 (64,28%) preiskovancev s simptomi, od tega jih je imelo 18 (50%) genotip CC. Oseb z visokim vnosom laktoze in brez simptomov je bilo 25 (35,17%). 12 (%) oseb z visokim vnosom laktoze in genotipom CC ni imelo simptomov, ki kažejo na laktozno netoleranco. Na podlagi rezultatov smo sklepali, da genotip CC ni zanesljiv pokazatelj simptomov. Svoje ugotovitve lahko pojasnimo s študijami predhodnikov, ki predpostavljajo, da so težave, ki se pojavijo kot posledica laktozne netolerance odvisne od naselitve bakterijske flore v črevesju.^{52,61,62}

V skupini preiskovancev, ki imajo simptome značilne za laktozno netoleranco smo preverili, kako pogosto je vzrok simptomov uživanje mleka in mlečnih izdelkov. Med preiskovanci s simptomi je bilo takih, ki menijo, da se simptomi pojavijo po zaužitju mleka in mlečnih izdelkov šest (20,7%), takih ki menijo da simptomi niso vzrok uživanja mleka in mlečnih izdelkov pa 23 (79,3%). Povezava se je izkazala kot statistično signifikantna ($p=0,018$, $OR=0,793$).

V naši raziskavi smo prav tako preverili potrjenost laktozne netolerance med preiskovanci ter njihov obisk pri zdravniku in specialistu gastroenterologu zaradi pojava simptomov. Ugotovili smo, da večina preiskovancev s simptomi ni obiskala zdravnika in specialista gastroenterologa, posledična pa je ugotovitev, da ima le 2,14% preiskovancev z genotipom CC potrjeno bolezen laktozno netoleranco. Na rezultat bi lahko vplivalo predvsem nepoznavanje same bolezni, kar smo v raziskavi tudi skušali ugotoviti. Izkazalo se je, da je laktozna netoleranca dokaj dobro poznana bolezen, vendar pa se preiskovanci najverjetneje ne zavedajo, da so tudi sami potencialni kandidati, da zbolijo.

Nekatere študije navajajo, da pogostost znakov laktozne netolerance narašča s starostjo, saj se z leti niža aktivnost encima laktaze^{2,63}, medtem ko druge navajajo, da izražanje simptomov, značilnih za laktozno netoleranco, ni odvisno od starosti⁶⁴. Razlike v pogostosti izražanja simptomov so bolj očitne med odraslimi in otroci^{65,66}. V naši raziskavi je v skupini preiskovancev z genotipom CC in s simptomi starost nižja, kot pri preiskovancih z genotipom CC in brez simptomov ($p=0,043$, $OR=-23,897 - 7,45$).

Naša raziskava je ena izmed redkih tovrstnih raziskav, saj je večina raziskav opravljena v klinični praksi, prav tako pa večina raziskav preverja zanesljivost HBT testa in laktoznega

testa z odvzemom krvi. Zato bi bilo potrebno naše ugotovitve potrditi in nadgraditi še na večjem številu vzorcev, saj bi bili rezultati tako še bolj zanesljivi. Naše ugotovitve bi lahko pomembno prispevale k razumevanju vpliva vnosa laktoze na izražanje simptomov pri osebah z bolezenskim, CC, genotipom in v prihodnosti morda prispevale delček k boljšemu poznavanju laktozne netolerance in s tem zmanjšanju težav mnogim posameznikom, ki trpijo zaradi simptomov, ki jih bolezen laktozna netoleranca povzroča.

5. VIRI IN LITERATURA

1. Tishkoff S.A. et al. Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature genetics* 39, 31-40. 2006.
-

2. Nataša Karas Kuželički, J. L. B. Genetika laktozne netolerance in pogostost polimorfizma -13910C>T v slovenski populaciji. *Farmaceutski vestnik*, 183-187. 2005.
3. Wilt, T. J. *et al.* Lactose intolerance and health. *Evid. Rep. Technol. Assess. (Full Rep.)* 1-410 (2010).
4. Sonja Rupret, m. f. s. Minerali. www.ce-lekarne.si/upload/File/.../minerali.doc . 4.5.2011.
5. Buchowski, M. S., Semanya, J. & Johnson, A. O. Dietary calcium intake in lactose maldigesting intolerant and tolerant African-American women. *J. Am. Coll. Nutr.* 21, 47-54 (2002).
6. Lactose intolerance. <http://www.foodreactions.org/intolerance/lactose/prevalence.html> . 6.7.2011.
7. Jana Lukač Bajalo. DODACI U PREHRANI - LIJEKOVI ILI HRANA
Primjer: LAKTOZNA INTOLERANCIJA. Vir:
http://www.kbsm.hr/klinkemija/HDMB/Kongresi/4HKMBZadar2003/4.kongres.hdmb.hr/4_HKMB_kbsm.hr/PDF/Lukac_Bajalo_Jana.pdf . 25.8.2011.
8. Mattar, R. *et al.* Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. *Nutr. J.* 8, 46 (2009).
9. Babu, J., Kumar, S., Babu, P., Prasad, J. H. & Ghoshal, U. C. Frequency of lactose malabsorption among healthy southern and northern Indian populations by genetic analysis and lactose hydrogen breath and tolerance tests. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 140-146 (2010).
10. Enattah, N. S. *et al.* Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat. Genet.* 30, 233-237 (2002).
11. Babu, J., Kumar, S., Babu, P., Prasad, J. H. & Ghoshal, U. C. Frequency of lactose malabsorption among healthy southern and northern Indian populations by genetic analysis and lactose hydrogen breath and tolerance tests. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 140-146 (2010).
12. Almon, R., Engfeldt, P., Tysk, C., Sjostrom, M. & Nilsson, T. K. Prevalence and trends in adult-type hypolactasia in different age cohorts in Central Sweden diagnosed by genotyping for the adult-type hypolactasia-linked LCT -13910C > T mutation. *Scand. J. Gastroenterol.* 42, 165-170 (2007).
13. Ghidini, C. *et al.* Adult-type hypolactasia genotyping in Northern Italy: prevalence of C/T-13910 polymorphism and questions after comparison with existing data. *Minerva Gastroenterol. Dietol.* 56, 19-23 (2010).
14. Almon, R. *et al.* Associations between lactase persistence and the metabolic syndrome in a cross-sectional study in the Canary Islands. *Eur. J. Nutr.* 49, 141-146 (2010).

-
15. Nagy, D. *et al.* Prevalence of adult-type hypolactasia as diagnosed with genetic and lactose hydrogen breath tests in Hungarians. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 909-912 (2009).
 16. Khabarova, Y. A. *et al.* Prevalence of lactase persistent/non-persistent genotypes and milk consumption in a young population in north-west Russia. *World J. Gastroenterol.* 15, 1849-1853 (2009).
 17. Krawczyk, M. *et al.* Concordance of genetic and breath tests for lactose intolerance in a tertiary referral centre. *J. Gastrointest. Liver Dis.* 17, 135-139 (2008).
 18. Waud, J. P., Matthews, S. B. & Campbell, A. K. Measurement of breath hydrogen and methane, together with lactase genotype, defines the current best practice for investigation of lactose sensitivity. *Ann. Clin. Biochem.* 45, 50-58 (2008).
 19. Jorgensen, M. K., Thode, J., Davidsen, B., Gerner, C. & Bathum, L. [Diagnosing lactose intolerance in adults]. *Ugeskr. Laeger* 170, 3309-3312 (2008).
 20. Jorgensen, M. K., Thode, J., Davidsen, B., Gerner, C. & Bathum, L. [Diagnosing lactose intolerance in adults]. *Ugeskr. Laeger* 170, 3309-3312 (2008).
 21. Kuokkanen M, Enattah NS & Oksanen A *et al.* Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut* 52, 647-652. 203.
 22. Harvey CB, W. Y. D. D. e. *al.* Characterisation of a homologue of a yeast cell division cycle gene on chromosome 2q21. *FEBS Letters* 398, 135-140. 1996.
 23. LCT. Genetics Home Reference. <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/LCT> . 4.6.2011.
 24. Peddle L & Rahman P. Genetic epidemiology of complex phenotypes. *Methods Mol Biol* , 709-717. 2009.
 25. Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. *Nature* 447, 661-678. 2007.
 26. Brown, PO, Botstein & D. Exploring the new world of genome with DNA microarrays. *Nature genetics* 21, 33-37. 1999.
 27. Mitrovič Mitja. Asociacijska analiza nekaterih kandidatnih genov izbranih z orodji bioinformatike pri bolnikih s kronično vnetno črevesno boleznijo. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo . 2008.
 28. Hampe, J., Shaw, S.H., Saiz & R. Linkage of Inflammatory Bowel Disease to Human Chromosome 6p. *Am.J.Hum.Genet.* (65), 1647-1677. 1999.
 29. Karban A., Eliakim, R., Brant & S.R. Genetics of Inflammatory Bowel Disease. *IMAJ* (4), 798-802. 2002.
 30. Cheng S, Fockler C, Barnes WM & Higuchi R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 91, 5695-5699. 1994.
-

-
31. Chien A, Edgar DB & Trela JM. Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *J Bacteriol* 127, 1550-1557. 1976.
 32. Pavlov A.R., Pavlova N.V., Kozyavkin S.A. & , S. A. I. Recent developments in the optimization of thermostable DNA polymerases for efficient applications. *Trends Biotechnol.* 22, 253-260. 2004.
 33. Chang, H. W. Y. C. H. C. P. L. C. Y. H. C. L. Y. SNP-RFLPing: restriction enzyme mining for SNPs in genomes. *BMC Genomics*. *BMC Genomics* , 17-30. 2006.
 34. Baumgart DC & Carding SR. *Gastroenterology* 1 - Inflammatory bowel disease: cause and immunobiology. *Lancet* (369), 1627-1640. 2007.
 35. Anderson CA, Boucher G, Lees CW & et.al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nature genetics* (43), 246-294. 2011.
 36. Hugot JP, C. M. Z. H. L. S. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* (411), 599-603. 2001.
 37. Nannini M, P. M. M. A. A. A. F. S. B. G. Gene expression profiling in colorectal cancer using microarray technologies: Results and perspectives. *Cancer Treatment Reviews* (35), 201-109. 2009.
 38. Genomics of Cardiovascular Development, A. a. R. N. P. f. G. A. H. M. S. <http://www.cardiogenomics.org> . 30.7.2011.
 39. The Coriell Cell institute for medical reserarch. <http://ccr.coriell.org/Sections/Collections/NIGMS/CEPHFamilies.aspx?PgId=49&coll=GM> . 20.7.2011.
 40. Wong ML, M. JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* (39), 75-85. 2005.
 41. Arya M, S. I. W. M. G. L. A. N. P. H. Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnostics* (5), 209-219. 2005.
 42. Khabarova, Y. A. *et al.* Prevalence of lactase persistent/non-persistent genotypes and milk consumption in a young population in north-west Russia. *World J. Gastroenterol.* 15, 1849-1853 (2009).
 43. Krawczyk, M. *et al.* Concordance of genetic and breath tests for lactose intolerance in a tertiary referral centre. *J. Gastrointestin. Liver Dis.* 17, 135-139 (2008).
 44. Nagy, D. *et al.* Prevalence of adult-type hypolactasia as diagnosed with genetic and lactose hydrogen breath tests in Hungarians. *Eur. J. Clin. Nutr.* 63, 909-912 (2009).
 45. Jorgensen, M. K., Thode, J., Davidsen, B., Gerner, C. & Bathum, L. [Diagnosing lactose intolerance in adults]. *Ugeskr. Laeger* 170, 3309-3312 (2008).
-

-
46. Babu, J., Kumar, S., Babu, P., Prasad, J. H. & Ghoshal, U. C. Frequency of lactose malabsorption among healthy southern and northern Indian populations by genetic analysis and lactose hydrogen breath and tolerance tests. *Am. J. Clin. Nutr.* 91, 140-146 (2010).
 47. Mattar, R. *et al.* Frequency of LCT -13910C>T single nucleotide polymorphism associated with adult-type hypolactasia/lactase persistence among Brazilians of different ethnic groups. *Nutr. J.* 8, 46 (2009).
 48. Buning, C. *et al.* The C/C(-13910) and G/G(-22018) genotypes for adult-type hypolactasia are not associated with inflammatory bowel disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 38, 538-542 (2003).
 49. Kirschner, B. S., DeFavaro, M. V. & Jensen, W. Lactose malabsorption in children and adolescents with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 81, 829-832 (1981).
 50. Ginard, D. *et al.* [Lactose malabsorption in ulcerative colitis. A case-control study]. *Gastroenterol. Hepatol.* 26, 469-474 (2003).
 51. Gudmand-Hoyer, E. & Jarnum, S. Incidence and clinical significance of lactose malabsorption in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* 11, 338-343 (1970).
 52. Mishkin, S. Dairy sensitivity, lactose malabsorption, and elimination diets in inflammatory bowel disease. *Am. J. Clin. Nutr.* 65, 564-567 (1997).
 53. Montgomery, R. K., Buller, H. A., Rings, E. H. & Grand, R. J. Lactose intolerance and the genetic regulation of intestinal lactase-phlorizin hydrolase. *FASEB J.* 5, 2824-2832 (1991).
 54. Escher JC *et al.* Molecular basis of lactase levels in adult humans. *Journal of Clinical Invest.* 89, 480-483. 2011.
 55. Sebastio G *et al.* Control of lactase in human adult-type hypolactasia and in weaning rabbits and rats. *Am.J.Hum.Genet.* (9), 1-73. 2011.
 56. Fajardo, L. F., Naim, H. Y. & Lacey SW. The polymorphic expression of lactase in adults is regulated at the messenger RNA level. *Gastroenterology* (106), 1233-1241. 1994.
 57. Rossi M *et al.* Lactase persistence versus decline in human adults: Multifactorial events are involved in downregulation after weaning. *Gastroenterology* (112), 1506-1514. 1997.
 58. Wang, Y., Harvey CB, Rousset M & Swallow, D. Expression of human intestinal mRNA transcripts during development: analysis by semiquantitative RNA polymerase chain reaction method. *Pediatr.Res.* (36), 514-521. 1994.
 59. Harvey CB *et al.* Studies in the expression of intestinal lactase in different individuals. *Gut* (36), 28-33. 1995.
 60. Wang, Y. *et al.* The lactase persistence/non-persistence polymorphism is controlled by a cis-acting element. *Hum. Mol. Genet.* 4, 657-662 (1995).
-

-
61. Ledochowski, M. B. H. F. D. Lactoseintoleranz. *Journal für Ernährungsmedizin* (5), 7-14. 2003.
 62. Scholl, O. Symptome von Kohlenhydratmalabsorptionssyndromen bei Erwachsenen. (Dissertation). Universität Innsbruck. 2003.
 63. Rodney Boyer *Temelji biokemije*. Študentska založba, (2002).
 64. Jussila, J., Isokoski, M. & Launiala, K. Prevalence of lactose malabsorption in a Finnish rural population. *Scand. J. Gastroenterol.* 5, 49-56 (1970).
 65. Caskey, D. A. *et al.* Effects of age on lactose malabsorption in Oklahoma Native Americans as determined by breath H₂ analysis. *Am. J. Dig. Dis.* 22, 113-116 (1977).
 66. Welsh, J. D., Poley, J. R., Bhatia, M. & Stevenson, D. E. Intestinal disaccharidase activities in relation to age, race, and mucosal damage. *Gastroenterology* 75, 847-855 (1978).

6. ŽIVLJENJEPIS



Europass življenjepis

Osebni podatki

Priimek / Ime

Medved Maruška

Naslov

Starše 10a, 2205 Starše, Slovenija.

E-pošta

medved.maruska@gmail.com

Državljanstvo

slovensko

Datum rojstva

1.8.1988

Spol

Ž

Zaželena zaposlitev / zaželeno poklicno področje

Humana genetika, biomedicina

Izobraževanje in usposabljanje

Obdobje

2007-2011

Naziv izobrazbe in / ali nacionalne
poklicne kvalifikacije

Univerzitetni diplomirani inženir kemijske tehnologije

Glavni predmeti / pridobljeno znanje in
kompetenceBiokemijsko inženirstvo, anorganska in organska kemija, molekularna biologija;
veščine laboratorijskega dela.Naziv in status ustanove, ki je podelila
diplomo, spričevalo ali certifikat

Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, univerza v Mariboru

Znanja in kompetence

Materni jezik(i)

slovenski

Drug(i) jezik(i)

Samovrednotenje

Evropska raven ()*

Angleščina

Nemščina

Razumevanje		Govorjenje		Pisanje	
Slušno razumevanje	Bralno razumevanje	Govorno sporazumevanje	Govorno sporočanje		
C1	C1	C1	B2	C1	
B1	B1	B1	A2	A2	

(*) Skupni evropski referenčni okvir za jezike

Računalniška znanja in kompetence

Vozniško dovoljenje

Dobro poznavanje programskih orodij MS Office, osnove programiranja, SPSS
A, B, G, H