

РОЗПОВСЮДЖЕННЯ ГЕНЕТИЧНО ДЕТЕРМІНОВАНОЇ ГІПОЛАКТАЗІЇ ДОРОСЛОГО ТИПУ У ХВОРИХ НА МУКОВІСЦИДОЗ, ГОМОЗИГОТ ЗА МУТАЦІЄЮ p.Phe508del

Лактаза — єдиний в організмі людини фермент, який розщеплює лактозу на глюкозу та галактозу, знаходиться на апікальній поверхні щіткової кайми ентероциту, зафіксований на його клітинній мембрані. Лактазна недостатність (ЛН) — вроджений чи набутий стан, що характеризується непереносимістю молока через відсутність або знижену активність ферменту лактази [1].

Гіполактазія дорослого типу (ГДТ) — це найбільш поширена та генетично детермінована причина непереносимості молока у дітей, підлітків та дорослих, що спричинена дефіцитом ферменту лактаза-флоризингідролази. [2]. ГДТ успадковується аутосомно-рецесивним шляхом та веде до пригнічення активності лактази на ворсинах кишківника. При гіполактазії вживання молочних продуктів призводить до здуття кишківника, порушення перистальтики, зригування, кишкових кольок, дисбактеріозу, діареї, розвитку симптомів дегідратації і недостатньої прибавки маси тіла. Поширеність ГДТ дуже різноманітна і коливається від 4% в Ірландії до майже 100% в деяких азійських популяціях [3].

Фермент лактаза-флоризингідролаза кодується єдиним геном *LCT*, що локалізується на 2 хромосомі [4–6]. ГДТ і, відповідно, здатність утилізувати лактозу повністю корелює з поліморфізмом С>Т у позиції 13910 (rs4988235) гена лактази *LCT*. Генотип С/С-13910 відповідає практично повній відсутності лактази. Генотип С/Т-13910 асоціюється зі зниженим рівнем лактази, але достатнім для нормальної дигестії. Генотип Т/Т-13910 свідчить про високу активність даного ферменту [7, 8].

Муковісцидоз (МВ) — найпоширеніше моногенне аутосомно-рецесивне захворювання осіб білої раси. За даними Modiano та ін., існує взаємозв'язок між мутаціями гена *TRBM* та розвитком лактазної недостатності [9]. Низька тривалість життя хворих на МВ стимулює до пошуку модифікуючих факторів, які можуть впливати на

покращення клінічного стану хворих. Більшість пацієнтів з МВ вимагають високої енергетичної дієти. Молочні продукти є потенційно важливим джерелом поживних речовин для цих осіб. Враховуючи зростання кількості випадків гіполактазії у дітей з муковісцидозом і можливий вплив молочних продуктів харчування на стан роботи кишково-шлункового тракту, актуальним видавалось оцінити генетичну схильність до ГДТ дітей з МВ.

Тому метою цієї роботи було встановлення частоти генотипів поліморфізму *LCT* — 13910С>Т гена *LCT* у дітей, хворих на муковісцидоз, гомозигот за мутацією F508del гена *TRBM*, і їх схильності до розвитку ГДТ.

Матеріали і методи

Матеріалом для дослідження слугувала ДНК 43 дітей з підтвердженим діагнозом МВ, гомозигот за мутацією F508del гена *TRBM*, які проходили обстеження в ДУ «Інститут спадкової патології НАМН України» та перебували на стаціонарному лікуванні в Західноукраїнському спеціалізованому дитячому медичному центрі; 25 дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності та 28 осіб контрольної групи.

Проводили виділення та очищення ДНК з лейкоцитів периферійної крові методом висолування [8]. Ампліфікацію послідовностей ДНК *in vitro* проводили, використовуючи метод полімеразної ланцюгової реакції [9]. ПЛР проводили в автоматичному режимі на термоциклері «Терцик» (ДНК-технологія, Росія). Для ідентифікації генотипів поліморфного локусу *LCT*-13910С>Т гена *LCT* застосовували метод рестрикційного аналізу продуктів ПЛР відповідних послідовностей. У роботі використовували ендонуклеазу рестрикції *Hinf* I виробництва фірми НВО «Сиб-Ензим» (Росія). Продукти ампліфікації візуалізували шляхом проведення електрофорезу в 2% агарозному гелі, який містив бромистий етидій,

та сканували на ультрафіолетовому трансільюмінаторі «ECS-15.M» (VILBER LOURMAT, Франція). Отримані сигнали порівнювали з маркерами довжин і на основі цього детектували розміри отриманих фрагментів. Результати сканування агарозних гелів знімали цифровою камерою «Gel Imager» (HELICON, Росія). Обробку зображень здійснювали на комп'ютері за допомогою програм Adobe Photoshop CS та Gel Explorer 2.0.

Результати та обговорення

Досліджувану групу склали 43 дитини з діагнозом муковісцидоз. У цих дітей проведено двократне вимірювання концентрації іонів хлору у поті. У всіх випадках рівень хлоридів був більше 60 мекв/л (підвищений). За допомогою молекулярно-генетичної діагностики мутацій гена ТРБМ ідентифіковано мутації гена ТРБМ та підтверджено діагноз муковісцидоз. Усі особи досліджуваної групи були гомозиготами за мутацією с.1521_1523delCTT, р.Phe508del (традиційна назва — F508del) гена ТРБМ. Усім особам досліджуваних груп з лейкоцитів периферійної крові проводили виділення та очищення ДНК для подальших молекулярно-генетичних досліджень.

Проведено молекулярно-генетичне дослідження поліморфного локусу LCT-13910C>T гена лактази LCT (номер поліморфізму в базі даних NCBI — rs49882359). В результаті ПЛР реакції синтезуються T-397C генотипи: CC-генотип 201 п.н., CT-генотип 201 п.н. та 177 п.н., TT-генотип 177 п.н. відповідно. Електрофореграму молекулярно-генетичного дослідження полімор-

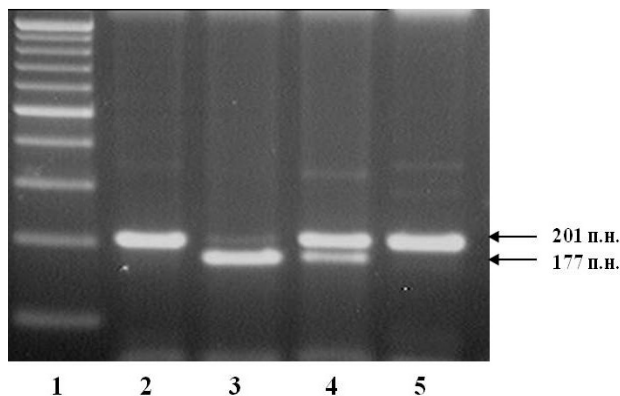


Рис. 1. Електрофореграма рестрикційного аналізу поліморфного локусу LCT — 13910C>T гена LCT (2% агарозний гель): 1 — маркери молекулярної ваги (Ladder 100 bp); 2, 5 — генотип LCT — 13910 CC; 3 — генотип LCT — 13910 CT; 4 — генотип LCT — 13910 TT

фного локусу LCT — 13910C>T гена LCT наведено на рис. 1.

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу ДНК у 43 дітей з діагнозом муковісцидоз встановлено генотип щодо поліморфного локусу LCT — 13910C>T гена LCT. Можливі генотипи були: HH, Hh, hh для Hinf I, де H позначає відсутність, а h — присутність сайту рестрикції. Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу LCT — 13910C>T гена LCT у дітей з муковісцидозом наведено у табл. 1.

Як свідчать результати, наведені в табл. 1, генотип C/C-13910 встановлено у 15 осіб, що становить 34,9%. Цей генотип відповідає практично повній відсутності лактази. Генотип C/T-13910 встановлено у 24 осіб, що становить 55,8%. Цей генотип асоціюється зі зниженим рівнем лактази. Генотип T/T-13910 встановлено у 4 осіб (9,3%), що свідчить про високу активність даного ферменту (табл. 1).

За аналізом клінічного фенотипу особи дослідницької групи було розділено на дві підгрупи за важкістю перебігу муковісцидозу. Користуючись шкалою Швахмана-Кульчицького, до першої підгрупи «важкий перебіг» віднесено 22 особи, до другої підгрупи «легкий перебіг» — 21 особу.

Встановлено розподіл генотипів/алелів за поліморфним варіантом 13910C>T гена LCT у підгрупі дітей з важким перебігом муковісцидозу та підгрупі дітей з легким перебігом муковісцидозу. Результати молекулярно-генетичного аналізу локусу 13910C>T гена LCT у досліджуваних підгрупах дітей наведено у табл. 2.

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу за поліморфним варіантом 13910C>T гена LCT та подальших статистичних обрахунків встановлено, що відмінності у співвідношенні генотипів та алелів гена LCT між підгрупами дітей з важким перебігом муковісцидозу

Таблиця 1
Розподіл генотипів поліморфного локусу 13910C>T гена LCT у загальній групі дітей з муковісцидозом

| Генотипи/алелі LCT 13910C>T (Hinf I) | Кількість випадків, n | Частота, % |
|--------------------------------------|-----------------------|------------|
| CC (HH) | 15 | 34,9 |
| TC (Hh) | 24 | 55,8 |
| TT (hh) | 4 | 9,3 |
| C (H) | 54 | 62,8 |
| T (h) | 32 | 37,2 |

Таблиця 2

Частота генотипів поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* у досліджуваних підгрупах дітей з МВ

| Генотипи/алелі <i>LCT</i> 13910C>T (Hinf I) | Частота, % | | χ^2 | <i>p</i> | OR | |
|---|---|---|----------|----------|-------|-----------|
| | дослідна підгрупа «легкий перебіг», <i>n</i> = 21 | дослідна підгрупа «важкий перебіг», <i>n</i> = 22 | | | знач. | 95% CI |
| CC (HH) | 28,6 | 40,9 | 2,24 | 0,33 | 0,58 | 0,16–2,06 |
| TC (Hh) | 66,7 | 45,5 | | | 2,40 | 0,70–8,26 |
| TT (hh) | 4,8 | 13,6 | | | 0,32 | 0,03–3,32 |
| C (H) | 61,9 | 63,6 | 0,03 | 0,87 | 0,93 | 0,39–2,23 |
| T (h) | 38,1 | 63,6 | | | 1,08 | 0,45–2,58 |

Примітки: *n* — кількість осіб, *p* — значимість відмінностей між контрольною і дослідною групами, OR (odds ratio) — коефіцієнт відношення шансів.

Таблиця 3

Частота генотипів поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* у досліджуваних групах

| Досліджувані групи | Генотипи <i>LCT</i> 13910C>T (Hinf I), % | | | Алелі <i>LCT</i> 13910C>T (Hinf I), % | |
|------------------------|--|------|------|---------------------------------------|----------|
| | CC | CT | TT | C | T |
| МВ (загальна група) | 34,9 | 55,8 | 9,3 | 62,8 | 37,2* |
| МВ «легкий перебіг» | 28,6 | 66,7 | 4,8 | 61,9 | 38,1** |
| МВ «важкий перебіг» | 40,9 | 45,5 | 13,6 | 63,6 | 63,6*** |
| Лактазна недостатність | 48,0 | 48,0 | 4,0 | 50,0 | 50,0**** |
| МВ (E. Mądry et al.) | 36,7 | 42,2 | 21,1 | 57,8 | 42,2 |
| Контрольна група | 28,6 | 64,3 | 7,1 | 60,7 | 39,3 |

Примітки: *P* — значимість відмінностей між дослідною і контрольною групами: * — 0,8, ** — 0,9, *** — 0,77, **** — 0,22.

та легким перебігом муковісцидозу не досягнули статистично вірогідних значень ($p > 0,05$), як і показники відношення шансів OR.

Згідно з даними, наведеними у табл. 2, генотип C/C-13910, який відповідає практично повній відсутності лактази, виявлено у 40,9% дітей з важким перебігом МВ при 28,6% у групі дітей з легким перебігом МВ. Генотип C/T-13910, який асоціюється зі зниженим рівнем лактази, навпаки, виявлено у 66,7% дітей з легким перебігом МВ при 45,5% у групі дітей з важким перебігом МВ.

Актуальним видавалося порівняти розподіл генотипів поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* у дітей з муковісцидозом та осіб інших вибірок, а саме групою дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності та контрольною групою. Результати молекулярно-генетичного аналізу поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* у досліджуваних групах наведено у табл. 3.

У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу поліморфного локусу 13910C>T гена *LCT* та подальших статистичних обрахунків встановлено, що відмінності у співвідношенні генотипів гена *LCT* між групою дітей з муковісцидозом та іншими досліджуваними групами не досягнули статистично вірогідних

значень ($p > 0,05$). Згідно з даними, наведеними у табл. 3, генотип C/C-13910, що відповідає практично повній відсутності лактази, виявлено у 34,9% осіб загальної групи з МВ. Частота генотипу C/C-13910 дітей загальної групи з муковісцидозом є співмірною з частотою, встановленою E. Mądry et al. [12] в осіб з МВ польської популяції (36,7%), дещо вища, ніж у контрольній групі (28,6%), та нижча, ніж у групі дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності (48%).

При порівнянні розподілу генотипу C/C-13910 у підгрупах з важким та легким перебігом муковісцидозу (табл. 3) встановлено, що даний генотип у підгрупі дітей з легким перебігом МВ виявлено у 28,6% осіб, що є ідентичним виявленому генотипу у контрольній групі (28,6%). Генотип C/C-13910 виявлено у 40,9% дітей з важким перебігом МВ при 48% у групі дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності та вищою, ніж у контрольній групі. Звідси випливає, що особи з важким перебігом муковісцидозу мають більш високу генетичну схильність до розвитку гіполактазії дорослого типу (ГДТ), ніж особи з легким перебігом МВ. При генотипі C/C-13910, який відповідає практично повній відсутності лактази, вплив молочних продуктів

харчування може суттєво впливати на стан роботи кишково-шлункового тракту осіб з муковісцидозом. Тому молекулярно-генетичні дослідження поліморфного варіанту 13910C>T гена *LCT* у дітей з МВ є актуальними і необхідними, особливо з метою вибору високоенергетичної дієти у цій когорті осіб.

Отже, у результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу за поліморфним варіантом 13910C>T гена *LCT* встановлено розподіл генотипів поліморфізму 13910C>T гена *LCT* у дітей з діагнозом МВ гомозигот за мутацією F508del. Генотип С/С-13910 встановлено у 34,9% осіб. Цей генотип відповідає практично повній відсутності лактази. Генотип С/Т-13910 встановлено у 55,8% осіб, що асоціюється зі зниженим рівнем лактази. Генотип Т/Т-13910 встановлено у 9,3% хворих на МВ, що характеризується високою активністю даного ферменту. У групі дітей з важким перебігом муковісцидозу та групі дітей з легким перебігом муковісцидозу не виявлено вірогідних відмінностей у розподілі генотипів поліморфним варіантом 13910C>T гена *LCT*. Генотип С/С-13910 у підгрупі дітей з легким перебігом МВ виявлено у 28,6% осіб, що є ідентичним виявленому генотипу у контрольній групі (28,6%). Генотип С/С-13910 виявлено у 40,9% дітей з важким перебігом МВ при 48% у групі дітей з клінічними ознаками лактазної недостатності, що є вищим, ніж у контрольній

групі. Тому особи з важким перебігом муковісцидозу мають більш високу генетичну схильність до розвитку гіполактазії дорослого типу (ГДТ), ніж особи з легким перебігом МВ. Припускаємо, що важкість захворювання може бути зумовлена у них в тому числі й присутністю генотипу С/С-13910, який зумовлює порушення засвоєння молочних продуктів, зниження нутритивного статусу, який у свою чергу є одним із визначальних показників перебігу МВ.

Висновки

1. Встановлено розподіл генотипів поліморфізму 13910C>T гена *LCT* у дітей з муковісцидозом гомозигот за мутацією с.1521_1523delCTT (р.Phe508del).

2. У досліджуваній групі генотип С/С-13910, який відповідає практично повній відсутності лактази, встановлено у 34,9% осіб; генотип С/Т-13910 — у 55,8% осіб, генотип Т/Т-13910, який характеризується високою активністю даного ферменту, — у 9,3%.

3. У результаті проведеного молекулярно-генетичного аналізу за поліморфним варіантом 13910C>T гена *LCT* у групі дітей з важким перебігом муковісцидозу встановлено тенденцію до зростання частоти гіполактазії дорослого типу (ГДТ) у порівнянні з групою дітей з легким перебігом муковісцидозу.

ЛІТЕРАТУРА

1. Basso M. S., Luciano R., Ferretti F., Muraca M., Panetta F., Bracci F., Ottino S., Diamanti A. Association between celiac disease and primary lactase deficiency // *Eur J Clin Nutr.* — 2012. — 66, N 12. — P. 1365.
2. Semenza G., Auricchio S., Mantei N. Small-intestinal disaccharidases; in Scriver CR (eds): *The Metabolic and Molecular Basis of Inherited Disease* // McGraw-Hill: New York. — 2001. — P. 1623–1650.
3. Itan Y., Jones B. L., Ingram C. J., Swallow E. D. M., Thomas M. G. A worldwide correlation of lactase persistence phenotype and genotypes // *BMC Evol Biol.* — 2010. — 9. — P. 10–36.
4. Heyman M. B. Lactose intolerance in infants, children and adolescents // *Pediatrics.* — 2006. — 118, N 3. — P. 1279–1286.
5. Usai-Satta P., Scarpa M., Oppia F., Cabras F. Lactose malabsorption and intolerance: What should be the best clinical management? // *World J Gastrointest Pharmacol Ther.* — 2012. — 6, N 3. — P. 29–33.
6. Mascarenhas J. D., Leite J. P., Lima J. C., Heinemann M. B., Oliveira D. S., Araújo I. T., Soares L. S., Gusmão H. P., Gabbay Y. B., Linhares A. C. Detection of a neonatal human rotavirus strain with VP4 and NSP4 genes of porcine origin // *J. Med. Microbiol.* — 2007. — 56, N 4. — P. 524–532.
7. Делягин В. М., Каграманова К. Г., Шугурина Е. Г., Сичинава И. В., Соколова М. В., Боринская С. А., Янковский Н. К. Полиморфизм гена лактазы у детей с атопическими заболеваниями // *Педиатрия.* — 2008. — 87, № 4. — С. 15–18.
8. Соколова М. В., Васильев Е. В., Козлов А. И. Полиморфизм С/Т 13910 регуляторного участка гена лактазы *LCT* и распространенность гиполлактазии в популяциях Евразии // *Экологическая генетика.* — 2002. — 4, № 3. — С. 25–34.
9. Modiano G., Ciminelli B. M., Pignatti P. F. Cystic fibrosis and lactase persistence: a possible correlation // *Eur J Hum Genet.* — 2007. — 15. — P. 255–259.

10. Макух Г. В., Заставна Д. В., Тиркус М. Я., Третяк Б. І., Чорна Л. Б. Спосіб виділення ДНК з лейкоцитів периферійної крові. Патент № u200801896 від 14.02.2008. Бюл. № 8.
11. Mc. Pherson M. J., Quirke P., Taylor G. R. PCR a Practical Approach. Oxford University press. — New York: Oxford University press, 1993. — 253 p.
12. Mądry E., Fidler E., Sobczyńska-Tomaszewska A., Lisowska A., Krzyżanowska P., Pogorzelski A., Minarowski L., Oralewska B., Mojs E., Sapiejka E., Marciniak R., Sands D., Korzon-Burakowska A., Kwiecień J., Walkowiak J. Mild *CFTR* mutations and genetic predisposition to lactase persistence in cystic fibrosis // European Journal of Human Genetics. — 2011. — 19. — P. 748–752.

TYRKUS M.¹, MAKUKH H.¹, BOBER L.², ROHOVYK N.², HNATEYKO O.¹

¹ Institute of Hereditary Pathology of the Ukrainian National Academy of Medical Sciences, Ukraine, 79000, Lviv, Lysenko str., 31-a, e-mail: tyrkus.m@ihp.lviv.ua

² Western Ukrainian Specialized Children's Medical Centre, Ukraine, Lviv, Dnisterska str., 27

THE FREQUENCY GENETICALLY DETERMINED ADULT-TYPE HYPOLACTASIA IN CYSTIC FIBROSIS PATIENTS HOMOZYGOTES FOR P.PHE508DEL

Aims. Adult-type hypolactasia (ATH) is the genetically determined most common cause of milk intolerance in children, adolescents and adults and the most common enzyme deficiency in humans. Adult-type hypolactasia is associated with the LCT-13910C/T polymorphism. Estimation of genetic predisposition to ATH of children with CF is primarily question.

Methods. DNA from probands blood samples was isolated using a modified salting out method. The PCR products were digested with the restriction enzyme Hinf I and analysed by electrophoresis in a 2% agarose gel. **Results.** It was carried out the distribution of 13910C>T of LCT gene in children who were diagnosed CF, homozygous for p.Phe508del. Genotype C/C-13910 is found at 34.9% of individuals. This genotype cause the complete absence of lactase. Genotype C/T-13910 was indentificated at 55.8% of people and is associated with low levels of lactase. Genotype T/T-13910 characterized of high activity of the enzyme was detected in 9.3% of patients. **Conclusions.** The frequency of adult-type hypolactasia (ATH) associated with polymorphic variant 13910C>T of LCT gene in the group of children with severe cystic fibrosis tends to increase compared with the group of children with mild cystic fibrosis.

Keywords: adult-type hypolactasia, cystic fibrosis, genotype, primary lactase deficiency.