

© Коллектив авторов, 2007

В.М. Деягин<sup>1</sup>, К.Г. Каграманова<sup>1</sup>, Е.Г. Шугурина<sup>1</sup>, И.В. Сичинава<sup>2</sup>,  
М.В. Соколова<sup>3</sup>, С.А. Боринская<sup>3</sup>, Н.К. Янковский<sup>3</sup>

## ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ЛАКТАЗЫ У ДЕТЕЙ С АТОПИЧЕСКИМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

<sup>1</sup> Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии, <sup>2</sup> Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, <sup>3</sup> Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, Москва

Обследовали 40 детей московской популяции, страдавших атопическими заболеваниями в ближайших 3 поколениях и имевших предков, происходящих из европейской части России. Генотип С/С, отвечающий за взрослый тип гиполактазии (первичной гиполактазии), отмечался у 22 детей (55%), что достоверно выше ( $p=0,039$ ), чем в московской популяции европеоидов (37%). С/Т- и Т/Т-генотипы, определяющие достаточную и высокую активность лактазы, отмечались соответственно у 14 (35%) и 4 (10%) детей. Симптомы, связанные с потреблением коровьего молока (КМ), обнаружены у 8 детей (менее чем у 40% детей с генотипом С/С). Из 14 детей без абдоминальных симптомов у 6 в возрасте до 3 лет отмечали аллергию к КМ. 3 детей без предшествовавшей аллергии к белкам КМ не употребляли молоко вообще. 5 детей употребляли КМ в достаточном объеме и не имели болей, связанных с его потреблением. Среди детей с генотипами С/Т и Т/Т абдоминальные симптомы, возможно, связанные с употреблением КМ, отмечались у 2 детей из 18 (11%). Ни у одного из детей с генотипом С/Т и Т/Т в нашей выборке не отмечалось аллергии к белкам КМ. По предварительным данным, частота генотипа С/С, определяющего непереносимость лактозы, среди детей с атопическими заболеваниями больше, чем в популяции. Сформулирована гипотеза о связи первичной гиполактазии со склонностью к атопии, что требует дальнейших исследований.

Authors examined 40 children in Moscow population with history of atopic diseases whose ancestry in 3 generations resided in European Russia. C/C genotype, responsible for adult type of hypolactasia (primary hypolactasia) occurred in 22 children (55%) of cases and its rate was significantly higher than in European Moscow population (37%). C/T- and T/T-genotypes, determined sufficient and high lactase activity, were found in 14 children (35%) and in 4 children (10%) correspondingly. Signs connected with cow milk (CM) usage were diagnosed in 8 children (less than 40% of children with C/C genotype). 6/14 children aged less than 3 years without abdominal signs had allergy to CM. 3 children without history of allergy to CM did not ever use it. 5 children without history of allergy to CM used it in normal volume and did not have abdominal pain connected with CM usage. Abdominal signs probably connected with CM usage occurred in 2 children from 18 with C/T and T/T genotypes (11%). None of the children with C/T and T/T genotype in this group did not have signs of allergy to CM. According to our preliminary data rate of C/C genotype determined lactase insufficiency is more high in children with atopic diseases than on the whole population. Authors advanced the hypothesis about connection of primary hypolactasia and predisposition to atopy, which need in further study.

Снижение активности кишечного фермента лактазы (ЕС 3.2.1.23) приводит к невозможности расщепления и, соответственно, усвоения молочного сахара – лактозы. Врожденный дефицит лактазы (первичная алактазия, MIM 223000) – жизнеугрожающее состояние новорожденного, передается по аутосомно-рецессивному типу, встречается с частотой 1:60 000, обусловлено мутациями в кодирующей части гена лактазы. Ген лактазы расположен в локусе 2q21 и альтернативно определяется как лактаз-флорезин гидралаза [1, 2].

Снижение активности лактазы у взрослых (первичная гиполактазия) также генетически

обусловлена (MIM 223100), но с известными оговорками рассматривается как вариант нормы, так как не является жизнеугрожающей. Ее следует отличать от вторичной гиполактазии – снижения активности кишечных ферментов в результате перенесенных заболеваний. Первичная гиполактазия формируется с частотой от 2–4% у народов Северо-Запада Европы до 90% и более у населения Азии. У народов России частота первичной гиполактазии варьирует от 30–40% у русских до 90% и более у коренных народов Сибири и Дальнего Востока [3–5]. Сроки манифестации первичной гиполактазии (от 5–6 лет до 20–21 года) и ее выра-

женность различаются у индивидуумов различной этнической принадлежности [6, 7]. Первичная гиполактазия и, соответственно, способность утилизировать лактозу полностью коррелируют с полиморфизмом (C>T) в позиции 13910 гена лактазы (LCT). Полиморфизм расположен выше точки начала транскрипции гена, т.е. в регуляторном участке гена лактазы. У взрослых T-аллель локуса C/T-13910 определяет на порядок более высокий уровень синтеза мРНК (78–98% от всего количества мРНК гена LCT), чем C-аллель (2–22%) [8]. Генотип C/C-13910 соответствует практически полному отсутствию лактазы. Генотип C/T-13910 ассоциируется со снижением уровня лактазы, тем не менее достаточным для нормальной дигестии. Генотип T/T-13910 свидетельствует о высокой активности фермента [8, 9]. Среди финских детей и подростков (возраст 8–20 лет) средний уровень активности лактазы при генотипе C/C соответствует 6,5 Ед/г белка, активность лактазы при генотипе C/T равна 29,9 Ед/г белка, при генотипе T/T – 50 Ед/г белка [10].

Первичная гиполактазия может быть причиной рецидивирующих болей в животе, вздутия живота, головных болей, анемии, связанных с употреблением соответствующих продуктов [11, 12]. Однако дефицит лактазы не сводится только к болям в животе, вздутию, дискомфорту. Неспособность утилизировать молочный сахар приводит к мукозиту, неспецифическому воспалению стенки кишечника [13]. В свою очередь, воспаленная стенка кишечника за счет снижения барьерной функции, нарушения биоценоза и активации местных иммунных реакций может быть одним из условий общей сенсibilизации организма [14]. Логично ожидать среди детей и подростков с атопией большей частоты случаев первичной гиполактазии по сравнению с общей популяцией.

Цель исследования – определить полиморфизм гена лактазы среди детей с атопическими заболеваниями.

#### Материалы и методы исследования

В качестве основной группы обследовали 40 детей-европеоидов московской популяции, страдавших атопическими заболеваниями и в ближайших 3 поколениях имевших предков, происходящих из европейской части России. Дети были выбраны для обследования случайно. Средний возраст пациентов составлял 12,5±5 лет. Из 40 обследованных 31 ребенок был с ведущим диагнозом бронхиальной астмы (БА), 8 пациентов – с поллинозом (сезонный аллергический ринит, конъюнктивит), один – с атопическим дерматитом.

Выделение геномной ДНК из венозной крови осуществляли методом фенольно-хлороформной экстракции.

Генотипирование аллельного состояния полиморфного локуса C/T-13910 гена лактазы проводили методом аллель-специфичной полимеразной цепной реакции

(ПЦР) «в реальном времени». Метод основан на использовании классической аллель-специфичной ПЦР, однако регистрация накопления продуктов реакции проводится непосредственно во время ПЦР. По сравнению с анализом результатов после реакции такой подход позволяет существенно упростить исследование, поскольку не требуется подбор оптимального для дифференциации аллелей числа циклов ПЦР [15].

Реакцию проводили в детектирующем амплификаторе «ДТ-322» (ЗАО «НПФ ДНК-Технология», Россия) в течение 40 циклов с температурным режимом: T<sub>1</sub>=94 °C; τ<sub>1</sub>=10 с; T<sub>2</sub>=64 °C; τ<sub>2</sub>=20 с; T<sub>3</sub>=72 °C; τ<sub>3</sub>=10 с; измерение флуоресценции проводили при 64 °C. Для ПЦР использовали праймеры: LAC-1c: GCTGGCAATACAGATAAGATAATGTAGC, LAC-1t: GCTGGCAATACAGATAAGATAATGTAGT, LAC-r: TACTCCCTTTTACCTCGTTAATACC. Для каждого аллель-специфичного праймера ПЦР проводили в отдельной пробирке в комбинации LAC-1c+LAC-r и LAC-1t+LAC-r. Каждый образец тестировали в двух повторностях. Детекцию накопления продукта реакции проводили при помощи разрушаемой олигонуклеотидной пробы: LAC-pt1: (BHQ1)-TGTTCTTTGAGCCC(FdT)GCATTCCACGAGG-(P).

Результаты обработаны статистически с использованием критерия Манна–Уитни.

#### Результаты

Генотип C/C, отвечающий за взрослый тип гиполактазии (первичной гиполактазии), отмечался у 22 детей (55%), что достоверно выше (p=0,039), чем в московской популяции (37%) [3, 5]. C/T- и T/T-генотипы, определяющие нормальную (достаточную и высокую) активность лактазы, отмечались соответственно у 14 (35%) и 4 (10%) детей.

При детальном изучении группы детей с генотипом C/C выявлено, что симптомы, связанные с потреблением коровьего молока (КМ), обнаружены у 8 детей (менее чем у 40% детей с генотипом C/C). Из 14 детей без абдоминальных симптомов у 6 в возрасте до 3 лет отмечали аллергию к белкам КМ, подтвержденную скарификационными аллергопробами и/или титром специфических IgE-антител. 3 детей без предшествовавшей аллергии к КМ не употребляли его вообще. 5 детей употребляли КМ в достаточном объеме и не имели болей, связанных с его потреблением. Среди детей с генотипами C/T и T/T абдоминальные симптомы, возможно, связанные с потреблением КМ, отмечались у 2 детей из 18 (11%).

Ни у одного из детей с генотипом C/T и T/T в нашей выборке не отмечалось аллергии к белкам КМ. То есть все дети с аллергией к белкам КМ в нашей группе обследованных сконцентрировались среди носителей гена C/C (первичная гиполактазия).

#### Обсуждение

Дисахарид лактоза, присутствующая в молоке, расщепляется ферментом лактазой. Лактаза находится в щеточной каемке эпителия тонкой

кишки. Лактаза гидролизует лактозу на моносахариды глюкозу и галактозу, которые активно всасываются в кровь. В норме активность лактазы максимальна у новорожденных и постепенно снижается к зрелому возрасту, что клинически проявляется достаточно частыми жалобами пожилых людей на непереносимость КМ. Скорость и степень снижения активности лактазы (первичная гиполактазия) определяются генетически. Первичная гиполактазия является едва ли не наиболее частым ферментодefицитным состоянием у детей и ведущей причиной непереносимости КМ [16]. Обычно гиполактазию связывают с болями в животе, вздутием, осмотической диареей, что связано с ферментацией негидролизованного дисахарида и его поступлением в толстую кишку [12].

Однако клиническое значение первичной гиполактазии может оказаться значительно шире. Показано, что избыток лактозы в просвете кишки, а в нашем случае – неспособность ее ассимиляции и, соответственно, повышенная концентрация в кишечнике, приводят к воспалительной реакции слизистой оболочки кишечника. Это проявляется гиперплазией бокаловидных клеток, отеком слизистой оболочки, инфильтрацией собственной пластинки полиморфноядерными клетками, дезинтеграцией слизистой оболочки и мышечного слоя [13].

В то же время внимание исследователей привлекает т.н. слизисто-ассоциированная лимфоидная ткань, наиболее полно представленная в кишечнике [17]. Воспаление облегчает сенсибилизацию

лимфоцитов в слизисто-ассоциированной лимфоидной ткани с последующим развитием аллергических реакций в слизистой оболочке других органов или коже, так как Т- и В-лимфоциты, исходящие из слизисто-ассоциированной ткани кишечника, излюбленно фиксируются в слизистой оболочке других органов. Это положение делает понятным «аллергический марш», кожные и другие аллергические реакции после употребления «конфликтных» пищевых продуктов, вызвавших сенсибилизацию организма.

Таким образом, концентрация среди пациентов с атопией носителей генотипа первичной гиполактазии служит основанием для соответствующих дифференциально-диагностических поисков при наличии синдрома рецидивирующих болей в животе. Одновременно возникает мысль о неслучайности совпадения таких явлений, как первичная гиполактазия и атопия. В пользу этого предположения свидетельствует и концентрация детей с аллергией на белки КМ в группе детей-носителей гена С/С, определяющего первичный (взрослый) тип гиполактазии.

### Заключение

Таким образом, по предварительным данным, частота генотипа С/С, определяющего непереносимость лактозы, среди детей с атопическими заболеваниями значительно больше, чем в целом в популяции. Сформулирована гипотеза о связи первичной гиполактазии со склонностью к атопии, что требует дальнейших исследований.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Краснополская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ. Справочное пособие для врачей. М.: ООО «Центр социальной адаптации и реабилитации детей «Фохат», 2005: 263–264.
2. Kuokkanen M, Kokkonen J, Enattah N et al. Mutations in the Translated Region of the Lactase Gene (LCT) Underlie Congenital Lactase Deficiency. *Am. J. of Human Genetic.* 2006; 78: 339–344.
3. Козлов А.И. Гиполактазия: распространенность, диагностика, врачебная тактика. М.: АрктАн-С, 1996.
4. Kozlov A, Lisitsyn D. «The Milk habit» (hypolactasia) in Finno-Ugrian peoples: A crossroad of physical anthropology, ethnology and linguistics. *Finnisch-Ugrische Mitteilungen.* 1996; 18/19: 67–81.
5. Козлов А.И., Балановская Е.В., Нурбаев С.Д., Балановский О.П. Геногеография первичной гиполактазии в популяциях Старого Света. *Генетика.* 1998; 34: 551–561.
6. Nose O, Iida Y, Kai H et al. Breath hydrogen test for detecting lactose malabsorption in infants and children. Prevalence of lactose malabsorption in Japanese children and adults. *Archiv. Dis. Child.* 1979; 54: 436–440.
7. Sahi T, Launiala K. Manifestation and occurrence of selective adult-type lactose malabsorption in Finnish teenagers: a follow-up study. *Am. J. Digestive Dis.* 1978; 23: 699–704.
8. Kuokkanen M, Enattah NS, Oksanen A et al. 2003. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut.* 2003; 52: 647–652.
9. Enattah N, Sahi T, Savilahti E et al. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia. *Nat. Genetic.* 2002; 30: 233–237.
10. Rasinpera H, Salivahti E, Enattah N et al. A genetic test which can be used to diagnose adult-type hypolactasia in children. *Gut.* 2004; 53: 1571–1576.
11. Rasinpera H, Saarinen K, Pelkonen A et al. Molecularly defined adult-type hypolactasia in school-aged children with a previous history of cow's milk allergy. *World J. of Gastroenterology.* 2006; 12: 2264–2268.
12. Goodmand-Hoyer E. The clinical significance of disaccharide maldigestion. *Am. J. of Clin. Nutrition.* 1994; 59: 735–741.
13. Mitra S, Ashisha S, Udupa V, Sheshadri S. Histological changes in intestine in semichronic diarrhea induced lactose enriched diet in rats: effect of Diarex Vet. *Ind. J. of Exp. Biol.* 2003; 41: 211–215.
14. Хавкин А.И. Микрофлора пищеварительного тракта. М.: Фонд социальной педиатрии, 2006.
15. Кофиади И.А., Ребриков Д.В. Методы детекции однонуклеотидных полиморфизмов: аллель-специфичная ПЦР и гибридизация с олигонуклеотидной пробой. *Генетика.* 2006; 42 (1): 22–32.
16. Semenza G, Auricio S, Mantei N. Small-intestinal disaccharidases. In: *The metabolic and molecular basis of inherited diseases.* Eds. Scriver C, Beaudet A, Sly D, Valle D. New York, McGraw-Hill, 2001: 1623–1650.
17. Pabst R, Tschernig T. Lokalisation von organisiertem Lymphatischem Gewebe im Kehlkopf und in der Lunge bei Kindern. In: *Padiatrische Pneumologie.* Eds. Rieger C, von der Hardt H, Sennhauser F, Wahn U, Zach M. Springer Verlag, Berlin, 1999: 97–100.