

Определение генетического полиморфизма (-13910)C>T MCM6 как диагностический инструмент для выявления непереносимости лактозы

М.А. Прасолова^{1,2}, С.Н.С.

Н.А. Вайшля¹, к.б.н., ст. микробиолог

М.К. Иванов^{1,3}, к.б.н., зав. лабораторией

¹ ЗАО «Вектор-Бест», г. Новосибирск

² Новосибирский государственный университет, г. Новосибирск

³ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск

Три четверти населения земного шара во взрослом состоянии не способны усваивать молочный сахар и могут страдать от желудочно-кишечных расстройств при потреблении молока. Результат генетического анализа на полиморфизм (-13910) C>T гена MCM6 является хорошим индикатором присутствия непереносимости лактозы. Нами проведена разработка и апробация нового набора реагентов для определения генетического полиморфизма (-13910) C>T гена MCM6 методом ПЦР с анализом кривых плавления.

Ключевые слова: полиморфизмы, непереносимость лактозы, MCM6, ПЦР-диагностика

SNP-genotyping of -13910C>T MCM6 as a diagnostic tool for lactose intolerance

M.A. Prasolova^{1,2}

N.A. Vayshlya¹

M.K. Ivanov^{1,3}

¹ Joint Stock Company «Vector-Best», Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular and Cellular Biology the Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

Three-quarters of the world's population in adulthood are not able to digest milk sugar, and may suffer from gastrointestinal disorders on the background of milk consumption. Genetic analysis of MCM6 (-13910) C>T is a good indicator for the presence of lactose intolerance. Development and validation of new reagent kit for definition of genetic polymorphism (-13910) C>T in MCM6 gene by PCR with melt curve analysis was performed.

Key words: polymorphisms, lactose intolerance, MCM6, PCR diagnostics.

Лактоза – сахар, который в большом количестве содержится в молоке и необходим для нормального роста ребёнка. После рождения и на период грудного вскармливания в кишечнике детей синтезируется фермент, лактаза, расщепляющий лактозу до глюкозы и галактозы, которые уже, в свою очередь, потребляются клетками для получения энергии. Для многих людей на земном шаре и для подавляющего большинства млекопитающих после некоторого периода (для человека обычно в возрасте от 2 до 12 лет) характерно значительное падение лактазной активности, и у взрослых лактоза практически не перерабатывается. В то же время, для части людей активность лактазы остаётся стабильно высокой на протяжении всей жизни [7, 9].

Гиполактазия (слабая активность лактазы) может в некоторых случаях никак не проявляться, но часто поступление молочного сахара может сопровождаться кишечными расстройствами и в этом случае говорят о непереносимости лактозы. Непереваренная лактоза действует на стенки кишечника, вызывая повышенное отделение воды, как при диарее, а также является пищей для кишечных бактерий, которые в качестве продуктов метаболизма могут выделять газы (H₂, CO₂, метан), вызывая вздутие живота и метеоризм. Такие симптомы могут мимикрировать под синдром раздражённого кишечника, пищевую аллергию и др.,

с которыми требуется дифференциальный диагноз. Степень проявления симптомов при непереносимости лактозы варьирует в зависимости от индивидуальных особенностей человека и от состояния кишечной микрофлоры. Обычно употребление небольшого количества молока (до стакана в день) переносится без неприятных последствий. Кисломолочные продукты при гиполактазии усваиваются нормально, так как в них весь молочный сахар уже переработан микроорганизмами. Также показано, что при употреблении молочных продуктов негативный эффект непереносимости лактозы проявляется в меньшей степени, если продукт одновременно содержит большое количество сахарозы (например, сгущённое молоко, мороженое) [7, 9]. Поскольку непереносимость лактозы у индивида обычно приводит к снижению потребления им молочных продуктов, то вместе с ними снижается и поступление кальция в организм, что, соответственно, может приводить к развитию остеопороза. Лицам с непереносимостью лактозы рекомендуется принимать препараты кальция для снижения риска остеопороза [1, 5, 9].

Непереносимость лактозы в целом является популяционной нормой, у ¼ населения земного шара во взрослом состоянии лактаза не работает. Однако, в ряде популяций в связи с активным развитием животноводства и длительной историей использования

молочных продуктов в качестве важной части питательного рациона распространились генетические мутации, позволяющие не выключать экспрессию лактазы в течение всей жизни. Самый распространённый мутантный гаплотип содержит 2 нуклеотидные замены (-13910) C>T (rs -182549) и (-22018) G>A в регуляторной (энхансерной) области гена LCT, расположенной достаточно далеко от самого гена LCT. Данные замены попадают в 13й и 9й интроны гена MCM6. Соответственно, можно встретить варианты названия полиморфизма как (-13910) C>T LCT, так и (-13910) C>T MCM6. Две указанные замены образуют один гаплотип (т.е. наследуются всегда вместе), ассоциированный с постоянным включением гена LCT. При помощи микросателлитного анализа было показано, что соответствующий гаплотип охватывает ещё большую область хромосомы в несколько сотен тысяч пар нуклеотидов и начал распространяться среди людей около 9 тысяч лет назад. Данный гаплотип возник предположительно независимо в европейской и в африканской популяциях и широко распространился ввиду селективного преимущества при одомашнивании животных и употребления молока взрослыми [2, 4, 7, 9, 10]. В некоторых исследованиях показана значимая ассоциация аллеля (-13910) T с высоким ростом [3]. Лактоза усваивается всеми носителями мутантных аллелей, как гетерозиготных, так и гомозиготных. Однако, отмечено, что у гетерозигот повышен риск развития вторичной непереносимости лактозы. У гомозигот (-13910) T молоко усваивается хорошо [8, 9].

В африканских популяциях обнаруживаются также ещё 3 аллеля, приводящие к активации экспрессии лактазы (-14010) C, (-13907) C и (-13915)G, что демонстрирует пример конвергентной эволюции. Показано, что мутация (-13910)C>T также возникала в разных популяциях европеоидов независимо в разное время. В популяциях арабов и бедуинов Среднего Востока обнаруживается ещё 1 мутантный гаплотип (-3712)C и (-13915)G MCM6, распространение которого связано с употреблением не коровьего, а верблюжьего молока.

Первичную непереносимость лактозы, связанную с низкой активностью лактазы у взрослых, следует отличать от случаев врождённого дефицита лактазы (редкого генетического заболевания, проявляющегося сразу с рождения), а также от случаев вторичной непереносимости лактозы, вызванной например глютеновой болезнью, инфекционным энтеритом, болезнью Крона и др. [9].

Существуют прямые функциональные тесты для выявления толерантности к лактозе. Один из них – мониторинг уровня глюкозы в крови после лактозной нагрузки, его увеличение означает, что лактоза была расщеплена и усвоилась организмом, если уровень глюкозы не меняется, значит, лактоза не смогла перевариться. Другой метод основан на измерении выдыхаемого водорода после потребления лактозы, увеличение говорит об активной ферментации лактозы кишечными бактериями и, значит, сам организм её переварить не смог. Водородный тест считается более

точным, но и он имеет свои ограничения, избыточный рост бактерий может быть не связан с поступлением лактозы, не всегда в кишечнике есть водород-синтезирующие бактерии и т.д. [6, 7, 8].

Генетический тест на наличие полиморфизма (-13910) C>T MCM6 позволяет напрямую выявлять одну из наиболее распространенных причин развития лактозной непереносимости, а не её последствия. Показана хорошая корреляция наличия генотипа (-13910) CC с положительными результатами H₂-теста, предсказательная ценность генотипирования для выявления непереносимости лактозы очень высока [4, 6, 8].

Целью данной работы была разработка и апробация набора реагентов для определения генетического полиморфизма (-13910) C>T MCM6, пригодного для внедрения в клиническую практику.

Материалы и методы

Для апробации набора использовали образцы цельной крови (n=137), буккального эпителия (n=99) и слюны (n=15) добровольцев, жителей Новосибирска и Новосибирской области. Образцы цельной крови взяты из коллекции ЗАО «Вектор-Бест». Образцы слюны и буккального эпителия получены от добровольцев-сотрудников ЗАО «Вектор-Бест». Из них для 76 сотрудников проведено анкетирование на предмет их отношения к молочным продуктам.

Образцы буккального эпителия предварительно ресуспендировали в 300 мкл транспортного раствора (ЗАО «Вектор-Бест»). Образцы цельной крови подвергали предварительной обработке с помощью набора «РеалБест Гемолитик». Далее выделение нуклеиновых кислот проводили с помощью набора реагентов «РеалБест Экстракция 100» (ЗАО «Вектор-Бест») из 100 мкл слюны или суспензии клеток буккального эпителия, либо из осадка ядер, полученных после обработки цельной крови гемолитиком.

Готовую реакционную смесь, содержащую все необходимые компоненты для проведения ПЦР, подвергали лиофильному высушиванию. Для предупреждения внутрилабораторной контаминации в смесь вводили дезоксиурацил и фермент урацил-ДНК-гликозилазу. С помощью программ *Visual OMP (DNA Software, Inc.)* и *OligoAnalyzer (IDT, Inc., <http://eu.idtdna.com>)* осуществляли дизайн олигонуклеотидов, подбирая их таким образом, чтобы они не образовывали стабильных димеров между собой и с другими последовательностями исследуемых локусов, а также не имели гомологии с другими участками генома человека.

Принцип анализа, применяемый в наборе реагентов «РеалБест-Генетика MCM6» (ЗАО «Вектор-Бест»), аналогичен описанному нами ранее [11]. Определение генетического полиморфизма, присутствующего в исследуемом образце НК, проводится путём измерения температуры плавления дуплексов флуорогенных зондов и продуктов амплификации целевого участка гена.

Амплификацию и детекцию проводили на термодинамическом циклере с оптическим модулем «CFX-96» («Bio-Rad», США) и на приборе «ДТпрайм». Температурный режим:

50 °С 2 мин.; 95 °С 2 мин.; 50 циклов: 94 °С 10 сек., 60 °С 20 сек.; плавление – изменение температуры от 27 до 75 °С с шагом в 1 °С, на каждом шаге инкубация 5 сек. и регистрация флуоресценции. Обработку полученных результатов выполняли с использованием сервисной программы «РеалБест-Генетика» (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск).

Для определения генетического полиморфизма (-13910) С>Т МСМ6 с помощью набора реагентов «Генетика Метаболизм лактозы» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва) применяли образцы ДНК, выделенные из цельной крови и из буккального эпителия с использованием набора «Проба-Рapid-Генетика», прибор «ДТ-96» и программу «RealTime PCR v7.5», разработанные этой компанией.

Секвенирование участка 9-ого интрона гена МСМ6, содержащего область (-13910), в ДНК из образцов буккального эпителия (n=10) и цельной крови (n=10) выполняли в Центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия). Распределение генотипов в исследуемой выборке проверяли на соответствие равновесию Харди-Вайнберга, применяя программу *Hardy-Weinberg Equilibrium Calculator for 2 Alleles* (<http://www.had2know.com/academics/hardy-weinberg-equilibrium-calculator-2-alleles.html>). Отношение шансов (OR) и 95% доверительный интервал (CI) в группах с СС-генотипом и СТ+ТТ-генотипами считали с помощью онлайн-калькулятора (<http://medstatistic.ru/calculators/calcodds.html>).

Результаты и обсуждение

В результате тестирования олигонуклеотидов и проведения оптимизации по составу реакционной смеси был выбран вариант, для которого при анализе гомо-

зиготных образцов (-13910) СС для зонда получался пик плавления при температуре 48 °С, при анализе гомозиготы (-13910) ТТ – 56 °С. Для гетерозиготного образца характерно наличие обоих пиков. Пример получаемых на разных приборах графиков кривых плавления представлен на рис. 1.

Для 24 образцов цельной крови и 16 образцов буккального эпителия провели параллельное тестирование с помощью разработанного нами набора реагентов и зарегистрированного в РФ набора «Генетика Метаболизм лактозы» (ООО «НПО ДНК-Технология», Москва), все результаты полностью совпали. Ещё для 10 образцов цельной крови и 10 образцов буккального эпителия правильность определения генотипа (-13910) С/Т МСМ6 с использованием нового набора «РеалБест-Генетика МСМ6» была подтверждена секвенированием соответствующих локусов ДНК.

В результате апробации набора реагентов «РеалБест-Генетика МСМ6» на 251 клиническом образце было показано, что частота встречаемости аллеля 13910Т в исследованной группе жителей г. Новосибирска и Новосибирской области составила 0,37. Это больше, чем в среднем в мире, но меньше, чем в среднем для европеоидов (таблица 1). Встречаемость аллеля 13910Т заметно варьирует между разными европейскими популяциями, например, у британцев в Англии и Шотландии она составляет 0,72, а для тосканцев в Италии – 0,09 (по данным базы *Ensembl*, <http://grch37.ensembl.org>). Наблюдаемое для обследованной группы людей распределение генотипов соответствовало ожидаемому при соблюдении равновесия Харди-Вайнберга (p=0,588).

Для части людей из выборки был проведён опрос, сколько молока они пьют и испытывали ли они при потреблении молочных продуктов неприятные ощу-

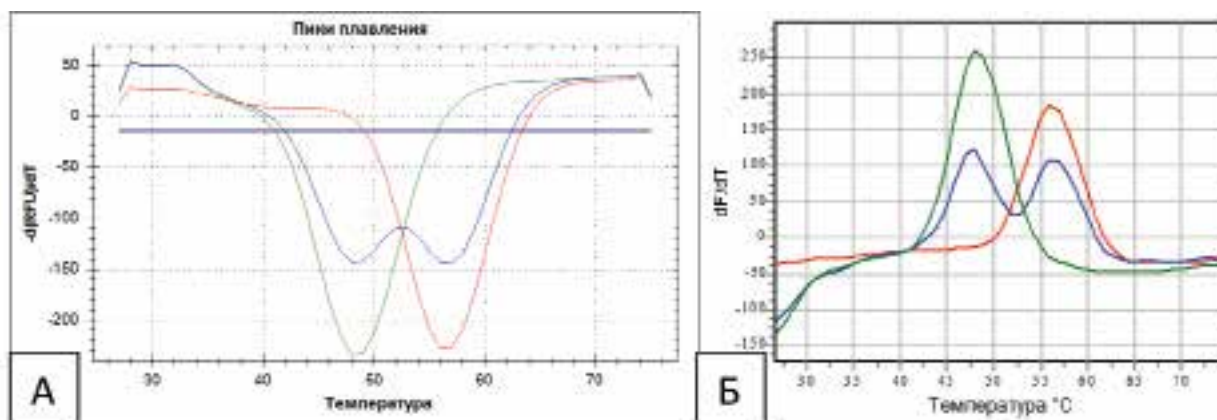


Рис. 1. Графики пиков плавления при анализе на приборах CFX96 (а) и ДТпрайм (б). Образец с генотипом (-13910) СС обозначен зелёным цветом, СТ – синим, ТТ – красным.

Таблица 1. Распределение аллелей и генотипов -13910С>Т МСМ6 в исследованной выборке

Количество людей с данным генотипом, n (%)			Частоты аллелей в выборке		Соответствие соотношению Харди-Вайнберга	Встречаемость аллеля (-13910) Т	
СС	СТ	ТТ	С	Т		европеоиды	в мире
91 (39,4)	111 (48,1)	29 (12,6)	0,63	0,37	p = 0,588	0,74	0,16

щения в животе, вздутие, диарею. Все респонденты были поделены на 3 группы по количеству потребляемого молока: 1) пьют много – более стакана в день в чистом виде; 2) пьют мало – менее стакана в день и в основном в составе каш, пюре, с чаем/кофе и проч.; 3) не потребляют совсем. Также опрашивали, употребляют ли респонденты сладкие молочные продукты (мороженое, сгущенное молоко). Результаты опроса и генотипы для обследованной выборки сведены в таблице 2.

Видно, что в группе людей с генотипом СС значительно больше доля людей, не пьющих молоко совсем (OR=24,0; CI=6,1–95,0), и людей с фенотипом непереносимости лактозы, для которых употребление молока приводит к кишечным расстройствам (OR=17,6; CI=5,0–61,8). Часть людей с генотипом СС с непереносимостью лактозы (но не все), тем не менее, могут потреблять молочные продукты с сахаром. Это согласуется с литературными данными, согласно которым, кишечная микрофлора менее бурно реагирует на лактозу в присутствии других источников питания [9]. В группах с генотипами СТ и ТТ больше людей потребляют много молока (OR=14,2; CI=4,3–47,6), и они реже имеют проблемы с пищеварением или неприятные ощущения в животе при приеме молочных продуктов, все хорошо усваивают молоко с сахаром.

В нашей выборке встретились люди с СС-генотипом, но употребляющие молоко и/или не испытывающие при этом дискомфорта. По данным литературы случаи, когда у носителей генотипа СС лактоза действительно усваивается (положительный глюкозный тест и отрицательный H₂-тест), довольно редки. Более типична ситуация, когда человека, не переваривающего лактозу, не беспокоят симптомы непереносимости. Это может быть связано с психосоматическими особенностями человека (насколько человек обращает внимание на происходящее внутри организма и чувствительность к дискомфорту) [7]. Так, в нашей выборке из 12 человек с СС генотипом,

пьющих молоко, 6 никогда не задумывались, были ли у них какие-то неприятные ощущения в животе на фоне потребления молочных продуктов, ещё 3 – замечали время от времени признаки кишечного расстройства, но пить молоко продолжали. Также для разных людей разные дозы лактозы могут оказаться критичными для развития симптомов непереносимости [9]. В нашей выборке из 4 человек с СС генотипом, которые заявили, что никогда не имели проблем с усвоением молока, 2 обычно совсем не пьют молоко как самостоятельный продукт, ещё 2 пьют время от времени не каждый день.

Не все носители «благоприятного» аллеля (-13910) Т употребляют молоко, что не говорит, однако, о его непереносимости: некоторым просто не нравится его вкус, у кого-то в семье традиционно не пьют молоко. Несколько респондентов отмечали неприятные ощущения в животе при потреблении молока, но это могло быть связано не с лактозой, а, например, с молочными жирами (отмечено, что хуже переносилось цельное деревенское коровье молоко, но не пастеризованное с пониженным содержанием жира). Также похожий на непереносимость лактозы фенотип может проявляться независимо от потребления молочных продуктов и отражать в большей степени состояние микрофлоры кишечника. Так, в работе Kerber *et al.* [8] среди носителей аллеля (-13910) Т также встречались пациенты с положительным результатом H₂-теста, но из них у части людей с СТ и всех людей с ТТ генотипом при подробном исследовании был выявлен синдром избыточного роста бактерий тонкой кишки, что могло явиться причиной вторичной лактозной непереносимости. При этом отмечено, что число случаев вторичной непереносимости лактозы среди носителей генотипа СТ зависит от возраста и заметно выше в группе людей старше 30 лет по сравнению с более молодыми.

В целом, корреляция результатов функциональных тестов на непереносимость лактозы и ДНК-тестирования довольно высока. Позитивная предсказательная ценность (соответствие выявления СС-генотипа

Таблица 2. Отношение к молочным продуктам по данным опроса добровольцев – жителей Новосибирской области в зависимости от их генотипа по полиморфизму (-13910) С>Т МСМ6

	Генотип					
	Группа С/С		Группа С/Т		Группа Т/Т	
	n	%	n	%	n	%
Всего	30	37%	40	49%	11	14%
Количество потребляемого молока:						
Пьют молоко, много	4	13,3%	28	70,0%	7	63,6%
Пьют молоко, мало	8	26,7%	9	22,5%	4	36,4%
Не пьют молоко	18	60,0%	3	7,5%	0	0,0%
Наблюдались ли расстройства кишечника от потребления молока:						
Да	18	60,0%	3	7,5%	1	9,1%
Не обращали внимания	8	26,7%	4	10,0%	1	9,1%
Нет	4	13,3%	33	82,5%	9	81,8%
Употребляют сладкие молочные продукты:	24	80,0%	40	100%	11	100%

и положительных результатов H₂-теста) по данным литературы 97% [6, 8] – 100% [4]; негативная предсказательная ценность для переносимости лактозы (корреляция наличия СТ или ТТ генотипов и отрицательного H₂-теста) – 72% [8], 86% [6], 100% [4]. Таким образом, генетический анализ на полиморфизм (-13910) С/Т МСМ6 является хорошим и удобным инструментом в клинической практике для диагно-

стики лактозной непереносимости как в качестве самостоятельного теста, так и в дополнение к функциональным тестам. При этом ДНК-тестирование имеет невысокую стоимость, высокую пропускную способность, менее громоздко и более удобно в исполнении, пациенту не надо тратить много времени на исследование и не требуется особая подготовка перед взятием анализа.

Заключение

В результате проведенных исследований разработан и апробирован новый набор реагентов «РеалБест-Генетика МСМ6», предназначенный для определения однонуклеотидного полиморфизма (-13910) С>Т МСМ6. Испытания набора показали, что он обеспечивает точное определение всех генотипов полиморфизма (-13910) С>Т МСМ6 в различных типах клинических образцов, а полученные при этом экспериментальные данные хорошо совпадают с литературными данными по связи генотипов с непереносимостью лактозы.

Набор реагентов «РеалБест-Генетика МСМ6» может применяться в клинической практике для выявления лактозной непереносимости; даёт легко интерпретируемые результаты и обладает высокой производительностью. Данный набор может быть успешно использован в лабораториях, оснащённых амплификаторами с детекцией результатов в режиме реального времени, такими как «CFX96 Real-Time PCR Detection System» («Bio-Rad», США) или «ДТпрайм» (ООО «НПО ДНК-Технология», г. Москва). В настоящее время набор проходит государственную регистрацию.

Литература

1. Bácsi K., Kósa J.P., Lazáry A., et al. LCT 13910 C/T polymorphism, serum calcium, and bone mineral density in postmenopausal women // *Osteoporosis International*. – 2009. - V. 20. - P. 639-645.
2. Bernardes-Silva C.F., Pereira A.C., Alves da Mota G.A., Krieger J.E., Laudanna A.A. Lactase persistence/non-persistence variants, C/T_13910 and G/A_22018, as a diagnostic tool for lactose intolerance in IBS patients // *Clinica Chimica Acta*. – 2007. - V. 386. - P. 7-11.
3. Campbell C.D., Ogburn E.L., Lunetta K.L., Lyon H.N., Freedman M.L., Groop L.C., Altshuler D., Ardlie K.G., Hirschhorn J.N. Demonstrating stratification in a European American population // *Nature Genetics*. – 2005. – V. 37. – P. 868-872.
4. Enattah N.S., Sahi T., Savilahti E., Terwilliger J.D., Peltonen L., Jarvela I. Identification of a variant associated with adult-type hypolactasia // *Nature Genetics*. – 2002. - V. 30. - P. 233-237.
5. Enattah N.S., Sulkava R., Halonen P., Kontula K., Jarvela I. Genetic variant of lactase-persistent C/T-13910 is associated with bone fractures in very old age // *Journal of the American Geriatrics Society*. – 2005. - V. 53. - P. 79-82.
6. Högenauer C., Hammer H.F., Mellitzer K., Renner W., Krejs G.J., Toplak H. Evaluation of a new DNA test compared with the lactose hydrogen breath test for the diagnosis of lactase non-persistence // *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*. – 2005. - V. 17. - P. 371-376.
7. Ingram C.J.E., Mulcare C.A., Itan Y., Thomas M.G., Swallow D.M. Lactose digestion and the evolutionary genetics of lactase persistence // *Human Genetics*. – 2009. - V. 124. - P. 579-591.
8. Kerber M., Oberkanins C., Kriegshäuser G., Kollerits B., Dossenbach-Glaninger A., Fuchs D., Ledochowski M. Hydrogen breath testing versus LCT genotyping for the diagnosis of lactose intolerance: A matter of age? // *Clinica Chimica Acta*. – 2007. - V. 383. - P. 91-96.
9. Mattar R., de Campos Mazo D.F., Carrilho F.J. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. // *Clinical and Experimental Gastroenterology*. – 2012. - V. 5. - P. 113-121.
10. Olds L.C., Sibley E. Lactase persistence DNA variant enhances lactase promoter activity in vitro: functional role as a cis regulatory element // *Human Molecular Genetics*. – 2003. - V. 12. - N. 18. - P. 2333-2340.
11. Прасолова М.А., Щепотина Е.Г., Дымшиц Г.М. Разработка высокопроизводительного флуоресцентного метода определения полиморфизмов в генах гемостаза и фолатного цикла для клинического использования // *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. – 2013. - №1. - с.23-29.