

## Intoleranța la lactoză la copiii și adolescenții din Republica Moldova: studiu translațional

Alexandru Voloc<sup>1\*</sup>, Valentin Țurea<sup>1</sup>, Frédéric Jehan<sup>2</sup>, Michèle Garabédian<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departamentul de pediatrie, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova;

<sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche 1132, Hôpital Lariboisière, Paris, France;

<sup>3</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 561, Hôpital St Vincent de Paul, Paris, France.

### Autor corespondent:

Alexandru Voloc, dr. șt. med.

Departamentul de pediatrie, Cursul de pediatrie, semiologie și puericultură Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, Chișinău, Republica Moldova, MD-2004  
e-mail: voloc@mail.ru

## Lactose intolerance in children and adolescents in the Republic of Moldova: a translational study

Alexandru Voloc<sup>1</sup>, Valentin Țurea<sup>1</sup>, Frédéric Jehan<sup>2</sup>, Michèle Garabédian<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of pediatrics, Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy, Chisinau, Republic of Moldova;

<sup>2</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité Mixte de Recherche 1132, Hôpital Lariboisière, Paris, France;

<sup>3</sup>Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 561, Hôpital St Vincent de Paul, Paris, France.

### Corresponding author:

Alexandru Voloc, MD, PhD

Department of pediatrics, Course of pediatrics, semiology and puericulture Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy 165, Ștefan cel Mare si Sfânt ave., Chisinau, Republic of Moldova, MD-2004  
e-mail: voloc@mail.ru

### Ce nu este cunoscut, deocamdată, la subiectul abordat

Fenotipul lactaz-nonpersistent, dat de polimorfismul nucleotidelor unice al genelor lactazei (*LCT*), proteinei transmembranare de tip I, asociată cu  $\beta$ -glucuronidaza (*klotho*) și a receptorului pentru vitamina D (*VDR*) poate explica simptomatologia, asociată cu consumul de lapte și produse lactate. Fenotipele genelor menționate, rolul aportului de calciu și al vitaminei D în menținerea calcemiei și asigurării sănătății osoase nu este cunoscută pentru populația din Republica Moldova.

#### Ipoteza de cercetare

Polimorfismul genetic, care stă la baza intoleranței la lactoză a copiilor și adolescenților din Republica Moldova, este sau nu similar cu cel din Franța. Interrelația dintre fenotip, aportul de calciu și nivelul de vitamină D<sub>3</sub> sunt determinanții de bază ai simptomatologiei intoleranței la lactoză.

#### Noutatea adusă literaturii științifice din domeniu

Este primul studiu din Republica Moldova, care determină polimorfismul genetic, legat de intoleranța la lactoză și determinanții de bază ai simptomatologiei respective la populația autohtonă.

### What is not known yet, about the topic

Lactase-nonpersistent phenotype, caused by the unique nucleotides of the lactase gene (*LCT*), transmembranar protein of type I, associated with  $\beta$ -glucuronidase (*klotho*) and the vitamin D receptor (*VDR*) can explain the symptoms linked with the consumption of milk and dairy products. The phenotypes of the mentioned genes, the role of calcium and vitamin D in maintaining of the calcemia and providing healthy bones is not known yet for the population from the Republic of Moldova.

#### Research hypothesis

The genetic polymorphism that causes lactose intolerance in children and teenagers from the Republic of Moldova is or is not similar with the polymorphism from France. Interrelation between phenotype, calcium intake and levels of vitamin D<sub>3</sub> determine the symptoms of lactose intolerance.

#### Article's added novelty on this scientific topic

It is the first study in the Republic of Moldova that determines the genetic polymorphism, correlated to the lactose intolerance and the main determinants of the symptoms in local population.

### Rezumat

**Introducere.** Copilăria și adolescența sunt perioade importante pentru sănătatea oaselor. Interesul pentru consumul produselor lactate și aportul de vitamină D (25-OH D<sub>3</sub>) se datorează acțiunii lor reparatorii și protective asupra ma-

### Abstract

**Introduction.** Childhood and adolescence are critical periods in bone health. The interest for dairy products and vitamin D (25-OH D<sub>3</sub>) status is due to their restorative and protective action on the bone mass and density. The existence of

sei și densității osoase. Existența variațiilor genetice asociate hipolactaziei ([-13910 bp] a genei de lactază, *LCT*), ar putea influența consumul de lapte, precum și mineralizarea osoasă.

**Material și metode.** Un lot de 297 de adolescenți și copii (34 de fete și 37 de băieți din Chișinău, 97 de fete și 129 de băieți din Orhei), a fost studiat referitor la intoleranța la lactoză. ADN-ul lor a fost extras din sânge și analizat la polimorfisme în genele lactazice (*LCT*), *klotho* (proteină membranară tip I, asociată cu  $\beta$ -glucuronidaza) și *VDR* (receptorul pentru vitamina D). A fost dozată vitamina D (25-OH D<sub>3</sub>) din ser. Analiza statistică:  $\chi^2$ , testul Mann-Whitney U și analiza de variație (ANOVA).

**Rezultate.** Polimorfismul genetic (în special, varianta CC a genei lactazei), care stă la baza intoleranței la lactoză a copiilor și adolescenților din Republica Moldova este similar cu cel din Franța. Există o interrelație strânsă dintre fenotip, aportul de calciu și nivelul de vitamină D<sub>3</sub> în sânge, care sunt și determinanții de bază ai simptomatologiei și consecințelor intoleranței la lactoză.

**Concluzii.** (1) La copii, flatulența, voma și episoadele de diaree în urma consumului de lapte sunt cele mai frecvente simptome care ar putea reflecta intoleranța la lactoză. (2) Frecvența polimorfismului nucleotidelor unice, asociate cu gena lactazei, gena *klotho* și cea a receptorului pentru vitamina D este similar la copiii și adolescenții din Republica Moldova și cei din Franța. (3) Fenotipul lactaz-nonpersistent, pe fundalul unui aport insuficient de calciu cu alimentele (în special, lapte și produse lactate), este dependent, în mare măsură, de vitamina D pentru menținerea în limite fiziologice a calcemiei.

**Cuvinte cheie:** produse lactate, calciu, polimorfismul genei lactazei, gena *LCT*, polimorfismul genei *klotho*, vitamina D, insuficiență lactazică.

## Introducere

Osteoporoza / osteomalacia este principala boală metabolică osoasă cronică, numită „epidemie silențioasă”, care se caracterizează prin rezistență osoasă redusă, secundară masei osoase scăzute și calității compromise a osului, care crește semnificativ riscul de fracturi patologice. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) a declarat osteoporoza ca fiind a treia problemă de sănătate publică, după bolile cardiovasculare și cancer [1]. Laptele și produsele lactate, datorită conținutului ridicat de calciu și contribuției lui la creșterea și mineralizarea scheletului la copii, constituie principala sursă în alimentație. Însă, situația se complică în cazul persoanelor intolerante la lactoză.

Gena *LCT* este exprimată fiziologic în intestinul sugarilor datorită consumului de lactoză prin alimentare. După înțârcare, *LCT* devine silențioasă; din punct de vedere fiziologic, expresia ei nu e necesară la vârsta adultă [2, 3]. Persistența lactazică era absentă la om în perioada neolitică (acum 20.000 de ani) [4]. Cu toate acestea, odată cu apariția agriculturii și modului de viață pastoral, respectiv – odată cu perenizarea consumului de produse lactate, început în epoca de bronz, s-a produs, treptat, selecția pozitivă a variantelor rare de ADN, legate de persistența lactazică pe parcursul maturității persoanei [5]. La populația

genetic variații asociate cu hipolactasia ([-13 910 bp] of the lactase gene, *LCT*) could influence the consumption of milk and, in turn, bone mineralization.

**Material and methods.** A cohort of 297 young adolescents and children (34 girls and 37 boys from Chisinau, 97 girls and 129 boys from Orhei) was studied. DNA was extracted from blood and analyzed for polymorphisms in the lactase (*LCT*), *klotho* (a transmembrane protein associated with  $\beta$ -glucuronidase) and *VDR* genes. Vitamin D<sub>3</sub> (25-OH D<sub>3</sub>) was assayed from serum. Statistical analysis:  $\chi^2$ , Mann-Whitney U test and variation analysis (ANOVA).

**Results.** The genetic polymorphism (especially type CC of the lactase gene), which underlies at the base of lactose intolerance in children and teenagers from the Republic of Moldova is similar to the polymorphism attested in France. There is a strong interrelation between phenotype, calcium intake and the level of vitamin D<sub>3</sub> in the blood, factors that determine the symptoms and consequences of lactose intolerance.

**Conclusions.** (1) In children, flatulence, vomits and episodes of diarrhea after milk consumption are the most frequent symptoms that could suggest lactose intolerance. (2) The frequency of unique nucleotides polymorphism, associated with lactase gene, *klotho* gene and *VDR* gene is similar for children and teenagers both in the Republic of Moldova and France. (3) Lactase-nonpersistent phenotype, with the background of insufficient intake of calcium (especially with milk and dairy products), mainly depends on vitamin D for maintaining physiological levels of calcium in the blood.

**Key words:** dairy products, calcium, lactase gene polymorphism, *LCT* gene, *klotho* gene polymorphism, vitamin D, lactase insufficiency.

## Introduction

Osteoporosis / osteomalacia is the main chronic metabolic bone disease, called “silent epidemic” and characterized by low bone strength, caused by a decreased bone mass and compromised bone quality, which increases the risk of pathological bone fracture. The World Health Organization (WHO) declared osteoporosis the third public health problem after cardiovascular diseases and cancer [1]. In general, it is accepted that milk and dairy products, due to high calcium content and contribution to skeletal growth and mineralization in children, constitute the main source of calcium in the diet. The situation gets complicated when subjects are lactose intolerant.

The *LCT* gene is physiologically expressed in the gut of infants due to lactose consumption through feeding. After weaning, *LCT* becomes silent, its expression not being physiologically necessary at adult age [2, 3]. The lactase persistence was absent in Human in the Neolithic period some 20,000 years ago [4]. However, with the appearance of farming and a pastoralist way of life, along with consumption of dairy products, positive selection of rare DNA variants linked to lactase persistence through adulthood has been rising during the Bronze Age [5]. In European population, *lactase persistence* is now the most prevalent phenotype. The lactase persistent phenotype

europenă, persistența lactazică este, în prezent, fenotipul cel mai răspândit. Fenotipul *lactaz-persistent* se caracterizează printr-o expresie puternică de mRNA de *LCT*, o activitate crescută a lactazei și o abilitate sporită de a digera lactoza. Pe de altă parte, fenotipul *lactaz-nonpersistent*, implică o expresie redusă de mRNA și o activitate scăzută a lactazei [6].

În prezent, la populațiile europene, sunt descrise două polimorfisme unice de nucleotide (l. engl. *single nucleotide polymorphism*, SNP) în gena *LCT*. Aceste polimorfisme au fost asociate cu expresia genei *LCT*: *C-13910* (C fiind situat la [-13910] baze în amonte de gena *LCT*) și *G-22018* (G fiind situat la poziția [-22018] baze în amonte de gena *LCT*), și care sunt legate de fenotipul *lactaz-nonpersistent* la maturitate; în schimb, SNP-urile *T-13910* și *A-22018* sunt legate de persistența lactazică [3, 7]. Studiile au arătat că gena lactazică are o expresie mai mare, atunci când *T-13910* și *A-22018* sunt prezente, și o expresie mai mică, atunci când prezente sunt *C-13910* și *G-22018*. Variantele din [-13910] au fost asociate cu persistența (T/T și C/T) sau cu absența (C/C) activității lactazice, evaluate prin testul TTLE (testul cu etanol de toleranță la lactoză) [8]. Această asociere a fost confirmată la câțiva pacienți cu vârsta peste 20 de ani, prin măsurarea activității dizaharidazei (lactază / invertază) în biopsatele jejunale. Asocierile persistenței lactazice în [-13910] (T/T și C/T) și [-22018] (A/A și A/G) a genei de lactază, face parte, în principal, din haplotipul observat la majoritatea populației europene [9, 10], deși este destul de variabilă de la nord la sud (întâlnită la 90% din populația britanică și la doar 18% – la populația toscană).

### Material și metode

În Republica Moldova, cohorta de studiu (297 de copii și adolescenți) a fost recrutată din septembrie 2005 până în august 2007 în cadrul Spitalul Clinic Municipal de Copii nr. 1, or. Chișinău (71 de copii și adolescenți, dintre care 34 de fete și 37 de băieți) și Școala-internat din Orhei (226 de copii și adolescenți, dintre care 97 de fete și 129 de băieți). Vârsta copiilor incluși în studiu a fost cuprinsă între 2,5 și 15 ani.

Pentru a le studia frecvența simptomelor clinice ale intoleranței la lactoză, pentru copiii și adolescenții implicați în studiu în Chișinău și Orhei, a fost elaborat un chestionar special de evaluare a patru simptome (dureri abdominale / crampe, vomă, flatulență, episoade de diaree); de asemenea, le-a fost colectată anamneza personală și familială.

Cercetările genetice și cele referitoare la creșterea și mineralizarea osoasă, au fost efectuate la 248 de copii (proveniți din cohorta inițială, de 297 de persoane) și adolescenți din Republica Moldova, și la 128 de adolescenți francezi, care au fost supravegheați timp de 4 ani. La aceștia, a fost efectuată analiza polimorfismului nucleotid unic (SNP) în genele, care codifică hidrolaza lactază-florizină (*LCT*, rs4988235 -13910C → T), gena *klotho* (KL, rs648202 A749A) și receptorul vitaminei D (VDR, rs4516035 - 1012A → G), folosind tehnica de genotipare rapidă și sondele fluorescente duale (*Tib Molbiol*, Berlin, Germania), după amplificarea clasică a reacției de polimerizare în lanț (PCR), utilizând analizorul *Light Cycler LC 480* (Roche Diagnostics, Franța).

Statutul 25-OH D<sub>3</sub> a fost determinat, utilizând trusa Ni-

has a high mRNA expression of *LCT*, an increased activity of lactase and an enhanced ability to digest lactose. On the other hand, the *lactase non-persistent* phenotype involves a reduced mRNA expression and a low activity of lactase [6].

In the *LCT* gene, two *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in strong linkage disequilibrium are the most described in European populations so far, and have been associated with *LCT* expression. *C-13910* (C located at [-13910] upstream of the *LCT* gene) and *G-22018* (G at position [-22018]) are connected to the *non-persistence* of the lactase expression phenotype at adulthood, while *T-13910* and *A-22018* are related to lactase persistence [3, 7]. Studies have shown that the lactase gene has a higher expression when *T-13910* and *A-22018* are present and a lower expression when *C-13910* and *G-22018* are present. Variants at [-13910] were associated with a persistence (T/T and C/T) or absence (C/C) of the lactase activity evaluated by the TTLE test (lactose tolerance test with ethanol) [8]. This association was confirmed in several patients older than 20 years by measuring the disaccharidase activity (lactase / invertase) in jejunal biopsates. The association of a lactase persistence in [-13910] (T/T and C/T), and [-22018] (A/A and A/G) of the lactase gene are part, mainly, of the haplotype observed in the majority of the European population [9, 10] although it is quite variable from north to south and vary between 90% in British and 18% in Toscan population.

### Material and methods

The cohort was recruited from September 2005 to August 2007 within the Public Medical-Sanitary Institution, Municipal Clinical Children Hospital no. 1, Chisinau (71 children and adolescents: 34 girls and 37 boys) and the Boarding School in Orhei (226 children and adolescents: 97 girls and 129 boys), aged between 2.5 and 15 years.

To assess the situation in both institutions, it was developed a special questionnaire, which included four main symptoms (abdominal pain / cramps, vomit, flatulence, diarrhea episodes). Personal and family history was also taken.

Genetic studies and studies referring to bone growth and bone mineralization were made in 248 children (from the initial cohort of 297 children) and teenagers from the Republic of Moldova and 128 children from France, that were supervised for 4 years. Single nucleotide polymorphism (SNP) analysis in genes coding lactase-phlorizine hydrolase (*LCT*, rs4988235 -13910C→T), *klotho* gene (KL, rs648202 A749A) and Vitamin D receptor gene (VDR, rs4516035 - 1012A→G) were conducted using the rapid genotyping technique using dual fluorescent probes (*Tib Molbiol*, Berlin, Germany) after classical Polymerase chain reaction (PCR) amplification using *Light Cycler LC 480* (Roche Diagnostics, France).

The 25-OH D<sub>3</sub> status was determined using the Nicols kit. The quality of 25-OH D<sub>3</sub> analysis was constantly guaranteed by the committee of Vitamin D external quality assessment (DEQAS).

cols. Calitatea analizei 25-OH D<sub>3</sub> a fost garantată de către Comitetul Extern de Evaluare a Calității vitaminei D (DEQAS).

### Analiza statistică

Diferența prevalenței dintre grupuri a fost testată, folosind testul  $\chi^2$ . Pentru a estima prevalența nivelurilor ridicate sau scăzute de calciu seric, a fost luat, drept referință, intervalul centilelor 10-90 (respectiv, 1,8 mmol/L și 2,66 mmol/L) ale valorilor normale. Diferențele statistice au fost testate, folosind testul neparametric Mann-Whitney U și analiza de variație (ANOVA). Calculele au fost efectuate cu ajutorul softului *Statview 5.0*.

### Rezultate

S-a constatat că cele mai frecvente simptome de intoleranță la lactoză au fost înregistrate la copiii și adolescenții din Școala-internat din Orhei, și anume: episoadele de diaree au fost semnificativ mai frecvente la subiecții din Orhei (21,7%) decât la cei din Chișinău (4,2%), inclusiv, 2-3 episoade diareice pe an la 8,0% dintre elevii din Orhei și de doar 1,4% – la cei din Chișinău. S-a constatat, de asemenea, că voma, care era asociată în mod direct cu consumul de lapte integral de vacă la copiii din Școala-internat din Orhei, s-a înregistrat în 4,9% din cazuri, vs. 1,4% – la cei din Chișinău.

Flatulența, fiind cel mai frecvent simptom la copii, a fost înregistrată în 40,8% la cei din Chișinău și la 53,5% – la cei din Orhei (la copii de vârstă școlară din Orhei – în 34,1% din cazuri). O asociere directă dintre consumul de lapte și flatulența a putut fi demonstrată în 29,6% din cazuri (eșantionul din Chișinău). Flatulența, apărută după consumul de produse lactate (altele decât laptele), a fost practic similară la copiii din Chișinău și Orhei: 11,3% și, respectiv, 9,7%.

În colaborare cu echipa de cercetători francezi, au fost efectuate investigații genetice, care au vizat studiarea frecvenței polimorfismului genei *LCT* și a densității minerale osoase respective; rezultatele obținute sunt prezentate în Tabelul 1.

**Tabelul 1**

Creșterea și mineralizarea osoasă în funcție de polimorfismul genetic și aportul de calciu la adolescenții francezi

Varianta genotipului	C/C	C/T	T/T
Frecvența în populația testată, n (%)	34 (27%)	55 (43%)	39 (30%)
Vârsta, ani	14,7±3,3	14,1±2,9	14,0±2,4
Aportul mediu de calciu <sup>†</sup> , mg/zi	866±230	867±196	876±281
DMO <sup>††</sup> lombară, g/cm <sup>2</sup>	0,902±0,182	0,883±0,179	0,873±0,182
DMO <sup>†</sup> lombară, scorul Z	0,049±1,087	+0,035±1,100	-0,228±1,069
Talia, SDS <sup>#</sup>	0,470±1,048	0,642±1,058	0,708±1,129

Notă: Analiză SNP-urilor a fost efectuată la nivelul [-13910] a genei *LCT*; C/C, C/T și T/T sunt o variație de bază de ADN la nivelul [-13910] a genei de lactază; \* – densitatea minerală osoasă; # – scorul devierii standard. Aportul mediu de calciu pe zi a fost estimat în baza datelor, acumulate timp de 4 ani de monitorizare; † – datele sunt prezentate drept medie și deviere standard.

Rezultatele comparative, care reflectă frecvența polimorfismului genei *LCT*, a genei *klotho* și a receptorului pentru vi-

### Statistical analysis

The prevalence between groups was compared using the  $\chi^2$  test. In order to estimate the prevalence of high or low serum calcium levels, a scale of 10 and 90 percentile (1.8 mmol/L and 2.66 mmol/L) was used. The differences between the cohorts included in the study were verified using the non-parametric Mann-Whitney U test and the analysis of variance (ANOVA) with *5.0 Statview* program.

### Results

It was established that the most frequent symptoms of lactose intolerance were found in children and teenagers from boarding school from Orhei; diarrhea episodes were more frequent in children from Orhei (21.7%) compared to children from Chisinau (4.2%), including 2-3 episodes of diarrhea per year found in 8% of children from Orhei and only 1.4% – in children from Chisinau. It was also observed that vomiting was directly associated with the consumption of whole cow milk and it was seen in 4.9% of children from Orhei vs. 1.4% – in children from Chisinau.

Flatulency, being the most frequent symptom in children, was found in 40.8% of children from Chisinau and 53.5% if children from Orhei (in children of school age – in 34.1% of cases). A direct association between milk consumption and flatulence could be demonstrated in 29.6% of cases (group from Chisinau). Flatulence that appeared after consumption of products other than milk was similar in Chisinau and Orhei: 11.3% and 9.7% respectively.

Collaborating with the team of French scientists, we performed genetic investigations aimed at studying the frequency of the *LCT* genetic polymorphisms, and the according bone mineral density. The obtained results are presented in Table 1.

**Table 1**

Bone growth and mineralization according to the genetic polymorphism and calcium intake in teenagers from France

Genotype variant	C/C	C/T	T/T
Frequency in tested population, n (%)	34 (27%)	55 (43%)	39 (30%)
Age, years	14.7±3.3	14.1±2.9	14.0±2.4
Mean calcium intake <sup>†</sup> , mg/day	866±230	867±196	876±281
BMD <sup>††</sup> lumbar, g/cm <sup>2</sup>	0.902±0.182	0.883±0.179	0.873±0.182
BMD <sup>†</sup> lumbar, Z score	0.049±1.087	+0.035±1.100	-0.228±1.069
Height, SDS <sup>#</sup>	0.470±1.048	0.642±1.058	0.708±1.129

Note: SNP analyze was made at [-13910] *LCT* gene level; C/C, C/T and T/T are basic variations of DNA at [-13910] lactase gene level; \* – bone mineral density; # – standard deviation score. Mean calcium intake was calculated based on data collected for 4 years of survey; † – data are presented as mean values and standard deviation.

Comparative results that show the frequency of polymorphism of *LCT* gene, *klotho* gene and vitamin D receptor (*VDR*)



tamina D (*VDR*) la copii din Republica Moldova (or. Chișinău și Orhei) și la cei din Franța, sunt prezentate în Tabelul 2.

**Tabelul 2**

Distribuția polimorfismelor la nivel de promotor al genei lactazei [-13910] *LCT*, *klotho* și *VDR*

	-13910 <i>LCT</i>		<i>klotho</i> A749A			<i>VDRp</i>	
	CC	CT+TT	CC	CT+TT	0 Hap1	1 hap1	2 hap 1
Chișinău	44%	56%	71%	29%	23%	62%	15%
Orhei	26%	74%	72%	28%	35%	44%	21%
Franța	32%	68%	78%	21%	27%	54%	20%

Notă: *klotho* A749A reprezintă polimorfismul ADN (C/C, C/T sau T/T), care crează o schimbare de codon fără vreo schimbare în alanina de aminoacid de codificare. Polimorfismul genei *VDR* este situat pe regiunea de promotor la poziția [-1012].

Reieșind din Tabelul 2, varianta CC a polimorfismului de lactază nu este semnificativ diferit în toate cele 3 cohorte studiate.

O situație similară a fost întâlnită în cazul polimorfismului genelor *klotho* și a receptorului *VDR*. Concentrația serică de 25-OH D<sub>3</sub> a fost similară, indiferent ce genotip poartă persoanele investigate (Tabelul 3).

**Tabelul 3**

Concentrația plasmatică de vitamină D<sub>3</sub> [25 (OH) D<sub>3</sub>] (ng/ml), în funcție de polimorfismul *LCT* [-13910]

Variantele [-13 910] <i>LCT</i> :	Chișinău		Orhei	
	<12 ani	12-16 ani	<12 ani	12-16 ani
CC	13,9±0,9 (n=26)	13,3±0,8 (n=13)	21* (n=1)	16,3±1,1 (n=36)
CT+TT	15,5±0,8 (n=36)	15,7±1,4 (n=16)	18,9±0,6 (n=75)	18,7±1,3 (n=45)

Notă: \*- doar un copil sub 12 ani din Orhei este purtător al genotipului CC al genei lactazei. Datele sunt prezentate drept medie și deviere standard.

Rămâne, însă, neexplicată cauza unei frecvențe atât de reduse a variantei CC a genei [-13 910] *LCT* la copiii sub 12 ani din Orhei (unde a fost identificat un singur CC la 75 de CT+TT).

### Discuții

Polimorfismul genelor *LCT*, *klotho* și *VDR*, identificat în eșantionul de studiu din Republica Moldova (Chișinău și Orhei), are o frecvență similară (fără diferențe statistice semnificative) cu cel din populația franceză. Atunci, când aportul zilnic de calciu este insuficient, mineralizarea osoasă depinde într-o mai mare măsură de nivelul de vitamină D în sânge, dacă polimorfismul genetic al *VDR* este unul lactaz-persistent.

Numeroase studii transversale și intervenționale, efectuate în diverse țări asupra copiilor în vârstă prepubertară, adolescenți și adulți, au demonstrat importanța aportului de calciu în timpul adolescenței, indiferent de regiunea geografică – China, Europa sau America de Nord [11-15].

Malabsorbția de lactoză poate fi asociată cu o mineralizare osoasă insuficientă sau cu un risc crescut de fracturi. Însă, malabsorbția de lactoză nu este asociată cu hipomineraliza-

in children from Republic of Moldova (Chisinau and Orhei cities) and children from France, are presented in Table 2.

**Table 2**

Polymorphism of lactase gene at promoter level [-13910] *LCT*, *klotho* and *VDR*

	-13910 <i>LCT</i>		<i>klotho</i> A749A			<i>VDRp</i>	
	CC	CT+TT	CC	CT+TT	0 Hap1	1 hap1	2 hap 1
Chisinau	44%	56%	71%	29%	23%	62%	15%
Orhei	26%	74%	72%	28%	35%	44%	21%
France	32%	68%	78%	21%	27%	54%	20%

Note: *klotho* A749A represents the DNA polymorphism (C/C, C/T or T/T), which creates a codone change without any change of the alanine codification amino acid. *VDR* gene polymorphism is situated on the promoter region in position [-1012].

Therefore, the Table 2 shows that the CC variant of the lactase polymorphism is not significantly different in all 3 cohorts studied.

The same situation is found in the other polymorphism in *klotho* and *VDR* genes. Serum levels of 25-OH D<sub>3</sub> were similar, regardless of the genotype (Table 3).

**Table 3**

Vitamin D<sub>3</sub> plasma concentration [25 (OH) D<sub>3</sub>] (ng/ml), according to the *LCT* polymorphism [-13910]

Variants of [-13 910] <i>LCT</i> :	Chisinau		Orhei	
	<12 years	12-16 years	<12 years	12-16 years
CC	13.9±0.9 (n=26)	13.3±0.8 (n=13)	21* (n=1)	16.3±1.1 (n=36)
CT+TT	15.5±0.8 (n=36)	15.7±1.4 (n=16)	18.9±0.6 (n=75)	18.7±1.3 (n=45)

Note: \*- only one child under 12 years from Orhei is a carrier of CC genotype of the lactase gene. Data are presented as mean values and standard deviations.

We could not explain the small frequency of the CC variant of the gene [-13910] *LCT* in children under 12 years from Orhei (where only one case of CC to 75 cases of CT+TT was reported).

### Discussion

Polymorphism of *LCT*, *klotho* and *VDR* genes, identified in the study group from the Republic of Moldova (Chisinau and Orhei), has a similar frequency (without significant statistical differences) with the French population. If daily intake of calcium is insufficient, bone mineralization depends of the plasma vitamin D level, and *VDR* polymorphism should be functional.

Numerous cross-sectional and interventional studies to date in prepubertal children, adolescents and adults, have demonstrated the importance of calcium intakes during adolescence different countries, regardless of the geographic region – China, Europe or North America [11-15].

Lactose malabsorption can be associated with insufficient bone mineralization or increased risk of fractures. Nevertheless, malabsorption is not associated with bone hypomi-

rea osoasă decât dacă este manifestată prin simptome clinice foarte severe, care impun evitarea consumului de produse lactate (în consecință, însemnând un aport de calciu <700 mg/zi); există unele suspiecții, că această asociere ar fi în funcție de sexe sau de vârstă.

Asigurarea aportului de calciu (în special, prin lapte) și, respectiv, mineralizarea osoasă, devine dificilă la subiecții care au intoleranță la lactoză. Aceste persoane, după consumul de lapte, prezintă tulburări digestive mai mult sau mai puțin severe: flatulență, dureri abdominale, crampe, vomă și diaree. În consecință, persoanele evită consumul de lapte, iar odată cu el – și aportul de calciu [16]. S-a demonstrat că atât adulții, cât și copiii, care suferă de malabsorbție de lactoză, evită consumul de lapte doar dacă există simptome clinice clare, în special – dureri abdominale și crampe. Activitatea lactazei are o importanță vitală pentru supraviețuirea nou-născuților; apoi, ea scade treptat, până la dispariție completă la mamiferele adulte, inclusiv, la oameni [17]. La adulți, persistența lactazică apare în populațiile europene [18, 19].

Potrivit autorităților din domeniul sănătății, persoanele cu intoleranță la lactoză nu trebuie neapărat să limiteze consumul de produse lactate sau să le excludă în totalitate din regimul alimentar. O simplă limitare a aportului de lactoză ar putea atenua simptomele gastro-intestinale [20-22]. Întreruperea consumului de produse lactate înseamnă lipsirea de surse ușor accesibile de calciu și alte elemente nutritive importante, care, pe termen lung, ar putea avea un impact negativ asupra sănătății. Laptele și produsele lactate au, în general, un impact pozitiv asupra sănătății, cum ar fi: reducerea riscului de hipertensiune arterială, cancer colorectal și diabet. Astfel, un studiu național multiethnic, realizat în SUA, a constatat un procent mult mai mare de hipertensiune arterială și de diabet la persoanele considerate intolerante la lactoză [22].

Copiii și adolescenții, care nu consumă cantitățile recomandate de lapte și produse lactate, nu reușesc să-și satisfacă nevoile lor în calciu, ceea ce îi împiedică să acumuleze masa osoasă necesară. La persoanele vârstnice, consumul unor cantități insuficiente de produse lactate ar putea spori riscul osteoporozei, soldată cu o frecvență sporită de fracturi [20, 21].

Un regim alimentar, care conține cantități insuficiente de vitamina D, crește tensiunea arterială prin activarea sistemului renină-angiotensină-aldosteron, care determină vasoconstricție, retenție de sodiu și de apă în organism [23]. Alte minerale conținute în produsele lactate, cum ar fi magneziul și potasiul, ar putea echilibra tensiunea arterială, dar este dificil de evaluat contribuția lor individuală, deoarece ambele se conțin, de obicei, în alimente bogate în calciu [24].

Mai multe studii au arătat că produsele lactate pot preveni pierderea de masă musculară și forță, care apar odată cu vârsta. Acest fenomen, numit sarcopenie, ar putea fi prevenit prin activitate fizică și o dietă bogată în produse lactate și vitamina D [25]. Recomandările, elaborate de Fundația Internațională de Osteoporoză și Societatea de Sarcopenie și Cașexie [25], se bazează pe faptul consumului regulat al pro-

neralization unless it is associated with very severe clinical symptoms caused by avoiding consumption of dairy products or consumption of small amounts of milk products (less than 700 mg/day of calcium). This association is sometimes linked to sex or age.

Link between calcium / dairy intake and bone mineralization is getting complicated in subjects that are lactose intolerant. Such people exhibit more or less serious digestive disorders after drinking milk: flatulence, abdominal pain / cramps, vomiting and diarrhea. These people are compelled to refuse milk consumption, which in turn decreases calcium intake [16]. It has been clearly demonstrated that both in adults and in children lactose malabsorption is not associated with avoidance of milk consumption, only when there are clear clinical symptoms such as abdominal pain / cramps. The lactase activity has a vital importance for the survival of newborns and then decreases slowly until complete disappearance in adult mammals, including Humans [17]. In adults, lactase persistence occurs in European populations [18, 19].

According to health authorities it is not necessary for lactose intolerant people to limit milk products consumption, or to exclude it them from their diet. A simple restriction of lactose intake can alleviate gastrointestinal symptoms [20-22]. Limitation in consumption of dairy products means to be deprived of easily accessible sources of calcium and other important nutrients, with negative impact on health. Among other things, milk and milk products have generally a positive health impact such as reduction of the risk of hypertension, colorectal cancer and diabetes. Thus, a national multiethnic study conducted in the US, established a much higher percentage of hypertension and diabetes in people who were considered lactose intolerant [22].

Studies have shown that children and adolescents who do not consume the recommended quantities of milk and milk products fail to meet their needs in calcium, which also impedes them to reach the peak of required bone mass. Consumption of insufficient amounts of dairy products could increase at the same time the risk of osteoporosis in elderly adults and lead to an increased risk of pathological bone fractures [20, 21].

It was established that a nutritional diet containing insufficient amounts of vitamin D increases blood pressure by activating the renin-angiotensin-aldosterone system, which causes vasoconstriction as well as sodium and water retention in the body [23]. Other minerals contained in dairy products, such as magnesium and potassium, might be able to regulate blood pressure, but their individual contribution is difficult to be assessed since both nutrients are usually in foods rich in calcium [24].

Several studies have shown that dairy products may prevent loss of muscle mass and strength that occurs with age. This phenomenon, called sarcopenia, could be prevented thanks to physical activity and a diet rich in dairy products and vitamin D [25]. The recommendations are made by The International Osteoporosis Foundation and The Society on Sarcopenia and Cachexia [25] and are based on the fact that

duselor lactate. Această obișnuință asigură creșterea masei și forței musculaturii scheletice [26-29, 36], îmbunătățește structura trabeculară, sporește densitatea și masa osoasă totală [25-28].

Strategiile utilizate în cazul intoleranței la lactoză se bazează pe principiul ingerării cantităților mici de lactoză. Cele mai multe studii au arătat că persoanele cu intoleranță la lactoză nu prezintă niciun simptom după consumul unor cantități mici de alimente care conțin lactoză. În general, un aport de până la 12 grame de lactoză într-o singură priză (echivalentul unui pahar de lapte), poate fi tolerată fără apariția de simptome evidente, mai ales în cazul în care alte produse alimentare sunt consumate în același timp [18]. Cei mai mulți oameni intoleranți la lactoză, inclusiv copiii, pot tolera două pahare de lapte pe zi, dacă sunt consumate în cantități mici pe parcursul întregii zile [30].

S-a constatat că laptele și produsele lactate sunt mai bine tolerate, dacă sunt ingerate împreună cu alte alimente. Laptele este mai ușor digerat, dacă este consumat cu alimente care interferează cu eliberarea rapidă a lactozei în intestinul subțire [18]. Ingestia de lapte, împreună cu alte alimente solide, bogate în fibre, încetinește golirea stomacului, oferind mai mult timp lactazei pentru a digera lactoza în intestin [21, 30].

Este recomandat să se opteze pentru produsele lactate fermentate, unde lactobacteriile transformă lactoza în acid lactic. Astfel, iaurtul este, în general, mai bine tolerat și, totodată, conține culturi de bacterii active care favorizează digestia lactozei [18, 30]. Mai mult decât atât, consistența semisolidă a iaurtului încetinește golirea gastrică și tranzitul intestinal, oferind mai mult timp pentru a digera lactoza [18]. Cașcavalurile de consistență tare (Mozzarella, Cheddar, Parmezan, Emmental) și cele vechi conțin mai puțină lactoză [18]. Laptele cu ciocolată pare să fie mai bine tolerat decât laptele natural, neprocesat [18, 19]. În prezent, unii dieteticieni recomandă alegerea produselor lactate fără lactoză sau cu conținut redus de lactoză. Asociația Națională de Medicină din Canada, de exemplu, menționează că produsele lactate fără lactoză sunt substituenți ideali ai produselor lactate obișnuite pentru persoanele cu intoleranță la lactoză [19]. Copiii preferă mai mult laptele de vacă fără lactoză decât băuturile aromatizate din soia; acestea, chiar dacă sunt îmbogățite cu calciu și alte elemente suplimentate, nu pot substitui laptele ca echivalent nutrițional [19].

Administrarea pastilelor de lactază ar putea face parte din strategia de nutriție a acestor persoane [18, 19]. Adaptarea colică este o strategie în care aportul de lactoză este crescut în mod treptat [18]. La unele persoane, expunerea regulată la lactoză crește eficiența bacteriilor colonice de a metaboliza lactoza, crescând, astfel, pragul de toleranță la lactoză [20].

### Concluzii

[1] La copii, flatulența, voma și episoadele de diaree în urma consumului de lapte sunt cele mai frecvente simptome care ar putea reflecta intoleranța la lactoză. Reducerea aportului alimentar de lactoză și nu întreruperea lui totală este suficientă, în majoritatea cazurilor, pentru evitarea disconfortului produs de consumul laptelui și produselor lactate.

regular use of milk products would have a positive impact on muscles, increasing skeletal muscle mass and force [26-29, 36], improving trabecular structure and at the same time increasing bone mineral density and bone mass [25-28].

The strategies for intolerance entail the recommendation to ingest small amounts of lactose. Most studies have shown that lactose intolerant people do not show any symptoms after ingesting small amounts of foods containing lactose. In general, a quantity of lactose that reaches up to 12 grams in a single dose (equivalent to a cup of milk) can be tolerated without the occurrence of obvious symptoms, especially if other foods are consumed at the same time [18]. Most lactose intolerant people, including children, can tolerate two cups of milk daily, it being consumed in small quantities over the whole day [30].

It was found that milk and dairy products are better tolerated if ingested along with other foods incorporated into the menu. Milk is more easily digested when consumed with foods interfering with rapid release of lactose in the small intestine, and therefore, the reduction in lactose charge which needs to be digested immediately [18]. The ingestion of milk along with other solid foods, especially foods high in solid fibers slows gastric emptying, giving more time to lactase to digest lactose in the intestine [21, 30].

It is recommended to opt for dairy products such as yogurt, cheese and chocolate milk, since yogurt and cheese are produced due to the process of milk fermentation by lactic bacteria. During the fermentation process, a certain amount of lactose is converted to lactic acid. As a result, yogurt is generally better tolerated and at the same time contains active bacterial cultures that favor the digestion of lactose [18, 30]. Moreover, the semi-solid consistency of the yogurt slows gastric emptying and intestinal transit, providing more time to digest lactose [18]. Most cheese products of hard consistency and old cheeses contain less lactose. Mozzarella, Cheddar, Parmesan, Swedish Cheese Emmental, are just some examples of cheeses that contain less lactose [18]. For uncertain reasons, chocolate milk tends to be better tolerated than natural unprocessed milk [18, 19]. Currently, some dietitians recommend the choice of lactose-free and low lactose dairy products. The National Medical Association of Canada, for instance, mentions that lactose-free dairy products are ideal substituents of ordinary milk products for lactose intolerant people [19]. However, it was found that children prefer more lactose free cow milk than flavored soy drinks [19]. Nevertheless, fortified beverages and other foods supplemented with calcium cannot substitute cow milk as a nutritional equivalent.

Administration of lactase pills could be part of the nutrition strategy of these individuals [18, 19]. Colic adapting is a strategy within which the intake of lactose is gradually increased [18]. In some persons regular exposure to lactose increases the effectiveness of colonic bacteria to metabolize lactose, thus improving the lactose tolerance threshold [20].

### Conclusions

[1] In children, flatulence, vomiting and diarrhea episodes after milk consumption are the most frequent symptoms that could suggest lactose intolerance. Reducing and not complete

[2] Frecvența polimorfismului nucleotidelor unice, asociate cu gena lactazei, gena *klotho* și cea a receptorului pentru vitamina D este similară la copiii și adolescenții din Republica Moldova și cei din Franța.

[3] Fenotipul lactaz-nonpersistent, pe fundalul unui aport insuficient de calciu cu alimentele (în special, lapte și produse lactate), este dependent, în mare măsură, de vitamina D pentru menținerea în limite fiziologice a calcemiei.

### Conflict de interese

Autorii declară lipsa conflictului de interese financiare sau nonfinanciare, referitoare la articolul dat.

### Contribuția autorilor

AV, VT au conceptualizat și au realizat designul studiului; AV și MG au achiziționat datele primare; MG și FJ au realizat secvențierile genetice; AV, MG și FJ au analizat și interpretat datele; AV, FJ și VT au adus o contribuție intelectuală semnificativă la redactarea versiunii finale a manuscrisului.

interrupția de lactoză este suficientă, în majoritatea cazurilor, pentru a reduce disconfortul produs de consumul de lapte și produse lactate.

[2] Frecvența polimorfismului nucleotidelor unice, asociate cu gena lactazei, gena *klotho* și gena *VDR* este similară la copiii și adolescenții din Republica Moldova și Franța.

[3] Fenotipul lactaz-nonpersistent, pe fundalul unui aport insuficient de calciu (especialmente cu lapte și produse lactate), depinde în mare măsură de vitamina D pentru menținerea nivelurilor fiziologice de calciu în sânge.

### Conflict of interests

Authors declare no financial or non-financial conflict of interest regarding this article.

### Authors' contribution

AV, VT developed the concept and the design of the study; AV and MG collected primary data; MG and FJ made the genetic sequences; AV, MG and FJ analyzed and interpreted the data; AV, FJ, VT significantly contributed intellectually in editing of the final version of the manuscript.

### Referințe / references

1. Popa F. Etiopatogenia osteoporozei masculine. *Medic ro. Revista Media SRL*, București, 2006; 23: 36-9.
2. Mathews S., Waud J., Roberts A., Campbell A. Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J*, 2005; 81: 167-73.
3. Stallow L. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annual Rev Genet*, 2003; 37: 197-219.
4. Burger J., Kirchner M., Bramanti B., Haak W., Thomas MG. Absence of the lactase persistence-associated allele in early Neolithic Europeans. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007; 104: 3736-41.
5. Allentoft M., Sikora M., Sjögren K., Rasmussen S., Rasmussen M., Stenderup J. *et al.* Population genomics of Bronze Age Eurasia. *Nature*, 2015; 522: 167-72.
6. Harvey C., Wang Y., Hughes L., Swallow D., Thurrell W., Sams V., Barton R., Lanzon-Miller S., Sarnar M. Studies on the expression of intestinal lactase in different individuals. *Gut*, 1995; 36: 28-33.
7. Kuokkanen M., Enattah N., Oksanen A., Savilahti E., Orpana A., Järvelä I. Transcriptional regulation of the lactase-phlorizin hydrolase gene by polymorphisms associated with adult-type hypolactasia. *Gut*, 2003; 52: 647-52.
8. Jussila J. Diagnosis of lactose malabsorption by the lactose tolerance test with peroral ethanol administration. *Scand J Gastroenterol*, 1969; 4: 361-8.
9. Mulcare C., Weale M., Jones A., Connell B., Zeitlyn D., Tarekegn A., Swallow D., Bradman N., Thomas M. The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (*LCT*) (C-13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *Am J Hum Genet*, 2004; 74: 1102-10.
10. Tishkoff S., Reed F., Ranciaro A., Voight B., Babbitt C., Silverman J. *et al.* Convergent adaptation of human lactase persistence in Africa and Europe. *Nature Genetics*, 2006; 39: 31-40.
11. Bachrach L. Acquisition of optimal bone mass in childhood and adolescence. *Trends Endocrinol Metab*, 2001; 12: 22-8.
12. Novotny R., Boushey C., Bock M., Peck L., Auld G., Bruhn C. *et al.* Calcium intake of Asian, Hispanic and white youth. *J Am Coll Nutr*, 2003; 22: 64-70.
13. Zhu K., Du X., Greenfield H., Zhang Q., Ma G., Hu X., Fraser D. Bone mass in Chinese premenarcheal girls: the roles of body composition, calcium intake and physical activity. *Br J Nutr*, 2004; 92: 985-93.
14. Weinsier R., Krumdieck C. Dairy foods and bone health: examination of the evidence. *Am J Clin Nutr*, 2000; 72: 681-89.
15. Greer F., Krebs N. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Optimizing bone health and calcium intakes of infants, children, and adolescents. *Pediatrics*, 2006; 117 (2): 578-85.
16. Scrimshaw N., Murray E. The acceptability of milk and milk products in populations with a high prevalence of lactose intolerance. *Am J Clin Nutr*, 1988; 48: 1079-159.
17. Sahi T. Hypolactasia and lactase persistence. Historical review and the terminology. *Scand J Gastroenterol Suppl*, 1994; 202: 1-6.
18. Suchy F., Brannon P., Carpenter T., Fernandez J., Gilsanz V., Gould J. *et al.* NIH Consensus Development Conference Statement: lactose intolerance and health. *NIH Consens State Sci Statements*, 2010; 27: 1-27.
19. Bailey R., Fileti C., Keith J., Tropez-Sims S., Price W., Allison-Otley S. Lactose intolerance and health disparities among African Americans and Hispanic Americans: an updated consensus statement. *J Natl Med Assoc*, 2013; 105: 112-27.
20. Zaitlin P., Dwyer J., Gleason G. Mistaken beliefs and the facts about milk and dairy foods. *Nutrition Today*, 2013; 48: 135-43.
21. Heyman M. Lactose intolerance in infants, children and adolescents. *Pediatrics*, 2006; 118: 1279-86.
22. Appel L., Moore T., Obarzanek E., Vollmer W., Svetkey L., Sacks F.



- et al.* (DASH Collaborative Research Group). A clinical trial of the effects of dietary patterns on blood pressure. *N Engl J Med*, 1997; 336: 1117-24.
23. McGrane M., Essery E., Obbagy J., Lyon J., MacNeil P., Spahn J., Van Horn L. Dairy consumption, blood pressure, and risk of hypertension: an evidence-based review of recent literature. *Curr Cardiovasc Risk Rep*, 2011; 5: 287-98.
  24. Krauss R., Eckel R., Howard B., Appel L., Daniels S., Deckelbaum R. *et al.* AHA dietary guidelines, revision 2000: a statement for healthcare professionals from the Nutrition Committee of the American Heart Association. *Circulation*, 2000; 102: 2284-99.
  25. Morley J., Argiles J., Evans W., Bhasin S., Cella D., Deutz N. *et al.* Society for Sarcopenia, Cachexia. Nutritional recommendations for the management of sarcopenia. *J Am Med Dir Assoc*, 2010; 11: 391-6.
  26. Radavelli-Bagatini S., Zhu K., Lewis J., Prince R. Dairy food intake, peripheral bone structure, and muscle mass in elderly ambulatory women. *J Bone Miner Res*, 2014; 29: 1691-1700.
  27. Radavelli-Bagatini S., Zhu K., Lewis J., Dhaliwal S., Prince R. Association of dairy intake with body composition and physical function in older community-dwelling women. *J Acad Nutr Diet*, 2013; 113: 1669-74.
  28. Alemán-Mateo H., Macías L., Esparza-Romero J., Astiazaran-García H., Blancas A. Physiological effects beyond the significant gain in muscle mass in sarcopenic elderly men: evidence from a randomized clinical trial using a protein-rich food. *Clin Interv Aging*, 2012; 7: 225-34.
  29. Birnie K., Ben-Shlomo Y., Gunnell D., Ebrahim S., Gallacher J., Jeff M., Holly P. Childhood milk consumption is associated with better physical performance in old age. *Age Ageing*, 2012; 41: 776-84.
  30. Zaitlin P., Dwyer D., Gary R., Gleason P. Mistaken beliefs and the facts about milk and dairy foods. *Nutr Today*, 2013; 48: 135-43.