

POLIMORFISMUL A38G AL GENEI  
CC16 LA COPIII CU ASTM BRONȘIC DIN  
REPUBLICA MOLDOVA

**Olga CÂRSTEA,**  
IMSP Institutul de Cercetări Științifice în Domeniul  
Ocrotirii Sănătății Mamei și Copilului

### Summary

#### **The CC16 A38G polymorphism in children with asthma in Moldova**

*Author presents the results of a research aimed to investigate the genetic mechanisms underlying the development and evolution of asthma in children in Moldova. This approach clearly has the potential to elucidate the diseases mechanisms. There had been investigated one of the asthma candidate genes (CC16 gene) thought to be responsible for the secretion of the protein product of Clara cells (Clara cell secretory gene), taking into account the expression of its anti-inflammatory function and genetic location.*

*The study shows a high frequency of the CC16 A38G polymorphism genotypes in the general population including functionally compromised alleles, and in patient group was determined the association of these genotypes with more complex and severe forms of asthma. This study makes an important contribution to current knowledge about the mechanisms of asthma and atopy.*

*The gene studied was selected because of its important role in regulating inflammatory processes, but there it is necessary to conduct further studies of extended range of genes related to asthma and to examine both individual genetic polymorphisms and inherited haplotype patterns.*

**Key words:** asthma, child, CC16 gene, polymorphism, phenotype

### Резюме

#### **Полиморфизм A38G гена CC16 у детей с астмой в Молдове**

*В статье представлены результаты первого исследования проведенного в Молдове, направленного на изучение молекулярно-генетических механизмов развития и течения астмы у детей. Такого рода исследования имеют высокий потенциал выяснения механизмов, лежащих в основе этого заболевания. В данной работе был исследован полиморфизм одного из генов-кандидатов бронхиальной астмы (ген CC16), считающегося ответственным за синтез белкового продукта секреторных клеток Клара, принимая во внимание его выраженные противовоспалительные функции и генетическую локализацию.*

*Результаты исследования указывают на высокую частоту функционально «неблагоприятных» генотипов полиморфизма CC16 A38G среди населения в целом, а в группе пациентов была определена ассоциация этих генотипов с более сложными и тяжелыми формами бронхиальной астмы. Таким образом, это исследование вносит важный вклад в современные познания механизмов астмы и аллергии.*

*Изученный ген был выбран из-за его важной роли в регулировании воспалительных процессов, но подчеркивается необходимость проведения исследования расширенного диапазона генов, для изучения как отдельных генетических полиморфизмов, так и моделей унаследованных гаплотипов.*

**Ключевые слова:** бронхиальная астма, дети, ген CC16, полиморфизм, фенотип

### Introducere

Astmul bronșic este definit ca o dezordine inflamatorie cronică a căilor aeriene superioare, la care participă o varietate de celule, cele mai importante fiind mastocitele, eosinofilele și limfocitele. Din punct de vedere clinic, funcția respiratorie este afectată de obstrucția fluxului de aer, de hiperreactivitatea bronșică crescută și incapacitatea bronhiilor de a răspunde adecvat unor stimuli specifici sau nespecifici, care includ factorii infecțioși, alergenii sau iritanții din mediu, în funcție de nivelul inflamației și de lipsa de control al acesteia. Rezultatele cercetărilor noastre de ultimă oră au constatat că 1/3 din copii prezintă maladii alergice manifestate prin dereglarea funcției diferitelor organe și sisteme, circa 2/3 din acestea fiind de natură atopică [9]. În regiunile ecologic nefavorabile ponderea maladiilor alergice ajunge la nivelul de 300,0-350,0‰. Incidența în continuă creștere, formele clinice particulare dintre cele mai severe, morbiditatea și mortalitatea în creștere fac ca astmul bronșic să fie una dintre marile provocări cu care se confruntă medicina contemporană.

Participarea factorilor genetici în patogeneza astmului bronșic este demonstrată de caracterul familial frecvent al bolii (prezența manifestărilor alergice, a astmului sau a nivelului majorat de IgE la membrii familiei), riscul crescut de boală la rudele pacientului (de 2-5 ori mai mare decât în populația generală) și incidența mai mare la gemenii monoziгоți, comparativ cu gemenii dizigoți (heritabilitatea bolii a fost estimată, în diferite populații, că se situează între 30% și 70%) [3]. Numărul exact al genelor implicate în producerea bolii nu este cunoscut, însă se consideră că factorii genetici determină o predispoziție genetică, care va duce la dezvoltarea maladiei numai dacă asupra individului vulnerabil acționează anumiți factori no-

civi din mediu [3]. În acest grup de gene candidate pentru atopie se regăsește și gena responsabilă de secreția produsului proteic al celulelor Clara – CC16 (*Clara cell secretory gene*), ea având un rol important prin expresia sa, prin funcția antiinflamatoare și localizarea genetică.

CC16 este una dintre proteinele principale secretate de epitelocitele căilor respiratorii, fiind sintetizată în marea majoritate de celulele nonciliate (Clara), localizate în stratul de epiteliu al bronhiolilor pulmonare și care dețin un rol important imunomodulator și antiinflamator în inflamația alergică [1]. Această proteină inhibă chemotaxia neutrofilelor și a monocitelor, controlează proliferarea și migrarea fibroblaștilor [5], inhibă in vitro producerea și activitatea biologică a interferonului  $\gamma$ , având astfel potențial antiinflamator exprimat. Polimorfismul genetic A38G al genei CC16 determină formarea alelelor cu funcționalitate redusă, care pot condiționa susceptibilitatea pentru dezvoltarea astmului bronșic și rămân a fi în continuare subiect al cercetărilor științifice [2, 6, 7, 8]. Studiul nostru a avut ca scop analiza comparativă a răspândirii genotipurilor polimorfismului A38G al genei CC16 la copiii moldoveni cu diferite forme clinice și evolutive de astm, la rudele lor de gradul I și la copiii „condiționat sănătoși”.

### Material și metode

Au fost studiate particularitățile genotipice la 90 de copii cu diferite forme clinice și evolutive de astm bronșic, care au fost spitalizați în secția de alergologie a IMSP ICȘDOSMC în perioada 2009-2010, cu vârsta de la 5 la 17 ani, media fiind egală cu 10,93 ani (DS 3,6). Printre subiecți au prevalat băieții (raportul dintre băieți și fete fiind 1,3:1). Lotul de control a fost selectat în timpul interviuării copiilor din regiunile rurale prin chestionarele standardizate ISAAC (*International Study of Asthma and Allergies in Childhood* [4]), din rândurile celor care au răspuns negativ la toate întrebările referitor la prezența semnelor de atopie și la care examinarea clinică complexă nu a evidențiat simptome ale maladiilor acute și cronice, fiind comparabili după vârstă și sex cu cazurile studiate. Adicional, am inclus în cercetare un grup de 20 de rude ale pacienților cu astm (părinți, frați).

Copiii lotului de bază au fost regrupați în: 29 de copii care manifestau astm bronșic solitar; 22 de copii la care astmul era asociat cu rinită alergică cu/fără conjunctivită alergică și 39 de pacienți la care maladia se asocia cu dermatită atopică cu/fără conjunctivită (triada atopică). Totodată, analiza rezul-

tatelor a fost efectuată și ținând cont de gravitatea manifestării astmului bronșic (33 de copii cu evoluție ușoară a maladiei și 57 cu astm moderat până la sever persistent).

Metodele aplicate în studiu au fost: examenul clinic, investigațiile molecular-genetice ale polimorfismului CC16 A38G prin metoda de polimerizare în lanț (RPL) și metodele instrumentale (spirografia). Prelucrarea statistică a materialului a fost efectuată cu aplicarea setului de programe statistice *Statistica 6.0 (StatSoft®)* și *GraphPad InStat*, versiunea 2.0 pentru Windows. Dependența statistică dintre parametrii calitativi a fost apreciată prin calcularea criteriului Chi pătrat ( $\chi^2$ ) și a ratei de șansă (OR).

### Rezultate și discuții

În populația generală de copii „condiționat sănătoși” și rudele pacienților cu astm care nu prezentau manifestări atopice (n=97), analiza răspândirii genotipurilor polimorfismului CC16 A38G a demonstrat că genotipul homozigot CC16 A/A, cu ambele alele reprezentate de variantele mutaționale, a fost prezent la 12,4% din subiecții studiului, iar cel mai frecvent genotip identificat a fost cel heterozigot CC16 G/A – în 48,5% cazuri (figura 1). Totodată, genotipul homozigot „normal” CC16 G/G s-a regăsit la 1/3 din grupul studiat (39,2%).

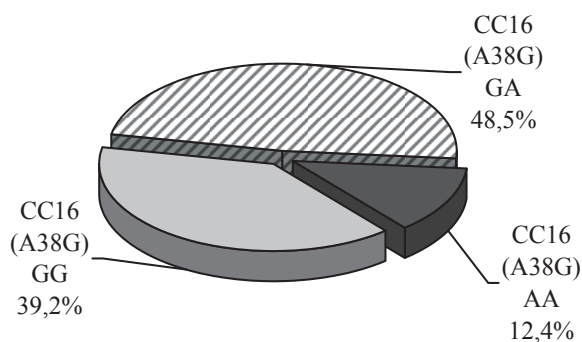


Fig. 1. Repartizarea genotipurilor polimorfismului CC16 A38G în populația generală.

Astfel, se atestă un nivel destul de înalt al genotipurilor cu funcționalitate redusă determinate de polimorfismul genetic, ceea ce poate reprezenta un potențial de formare a susceptibilității către astmul bronșic. Analiza comparativă a răspândirii genotipurilor studiate la copiii cu astm bronșic și în lotul de control a depistat diferențe semnificative ale unor genotipuri, inclusiv în funcție de sexul copiilor (vezi tabelul).

Răspândirea genotipurilor polimorfismului CC16 A38G în funcție de sexul copiilor incluși în studiu

Genotip	Copii cu astm bronșic (n=90)		Lot de control (n=90)	
	Băieți, %	Fete, %	Băieți, %	Fete, %
CC16 A/A	5,9*	28,2*	11,8	11,8
CC16 G/A	49,02	41,03	52,9	35,9
CC16 G/G	45,1	30,8	35,3	48,7

Notă: (\*) – diferență semnificativă,  $0,01 < p < 0,05$ ;

Rezultatele studiului demonstrează că genotipul funcțional incompetent CC16 A/A a fost identificat de 4,8 ori mai frecvent la fetițele cu astm bronșic, comparativ cu băieții bolnavi (28,2% versus 5,9%, respectiv; OR=0,159; 95% IC: 0,041-0,619;  $p < 0,05$ ) și de 2 ori mai frecvent față de fetițele din lotul-martor (28,2% versus 11,8%,  $p > 0,05$ ).

Cercetările au continuat și cu scop de evaluare comparativă a tabloului genotipic la copiii cu diferite forme clinice de astm (astm solitar sau asociat cu alte forme de atopie). Datele obținute demonstrează o repartizare neuniformă a genotipurilor în funcție de manifestările clinico-evolutive ale maladiei (figura 2).

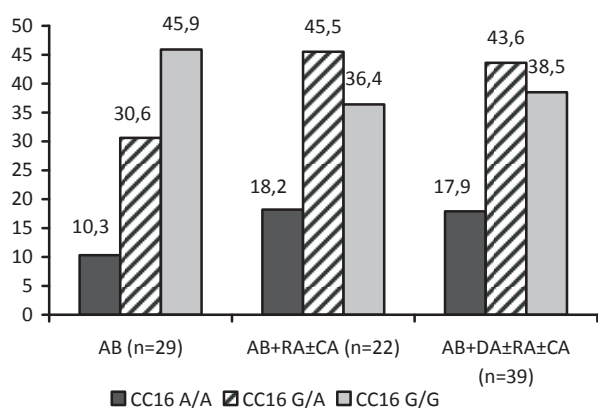


Fig. 2. Răspândirea genotipurilor polimorfismului CC16 A38G la pacienții cu diferite forme clinice de astm bronșic, % (AB – astm bronșic; RA – rinită alergică; CA – conjunctivită alergică; DA – dermatită atopică).

Astfel, deși valorile răspândirii genotipului homozigot funcțional „nefavorabil” CC16 A/A nu au atins diferențe semnificativ veridice, totuși el a fost mai frecvent regăsit la copiii cu astm asociat cu rinită/conjunctivită alergică și cu triadă atopică (astm bronșic, rinita alergică și dermatita atopică), în comparație cu cei cu astm solitar (18,2% și 17,9% față de 10,3%, respectiv;  $p > 0,05$ ). Totodată, au fost observate diferențe de răspândire a genotipurilor polimorfismului CC16 A38G în funcție de severitatea astmului (figura 3).

Rezultatele studiului demonstrează că în formele cu evoluție severă a maladiei de 2 ori mai frecvent a fost depistat genotipul homozigot CC16 A/A, în comparație cu astmul ușor (19,3% versus 9,1%,  $p > 0,05$ ), în timp ce genotipul homozigot „normal” CC16 G/G s-a regăsit mai frecvent la pacienții cu evoluție ușoară a astmului bronșic, comparativ cu cazurile severe (48,5% versus 33,3%,  $p > 0,05$ ).

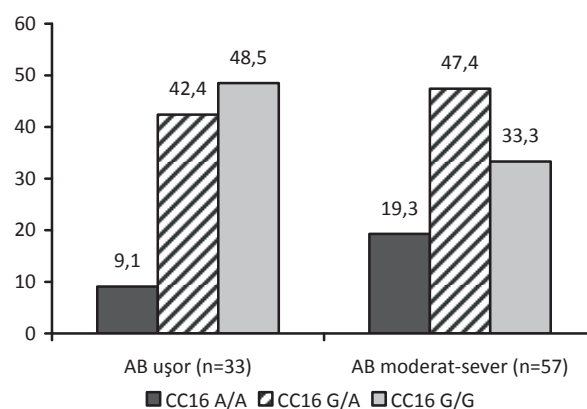


Fig. 3. Răspândirea genotipurilor polimorfismului CC16 A38G la pacienții cu astm bronșic în funcție de severitatea maladiei (%).

Studiul realizat aduce astfel o contribuție semnificativă la cunoștințele actuale despre mecanismele astmului bronșic și al atopiei. Gena cercetată a fost selectată datorită rolului important în reglarea proceselor inflamatorii, însă este necesară efectuarea studiilor pe cohorte similare, cu extinderea spectrului de gene, pentru a examina atât polimorfismele genetice individuale, cât și modelele haplotipului moștenit. Identificarea tendințelor de răspândire prezintă importanță practică în vederea delimitării grupurilor de copii cu risc sporit de evoluție complicată a maladiei și pentru individualizarea managementului profilactic și curativ al pacienților cu astm bronșic.

## Concluzii

1. Studiul a determinat răspândirea genotipurilor polimorfismului CC16 A38G în populația generală și a constatat prezența numărului înalt al genotipurilor funcțional „nefavorabile” – genotipul homozigot CC16 A/A la 12,4% de subiecți ai studiului și genotipul heterozigot CC16 G/A în 48,5% cazuri.

2. Analiza comparativă a tabloului genotipic la copiii cu diferite forme clinico-evolutive de astm bronșic a demonstrat că genotipul homozigot CC16 A/A a fost mai frecvent regăsit la copiii cu astm asociat cu rinită și/sau conjunctivită alergică (18,2%) și cu triadă atopică (17,9%), în comparație cu cei cu astm solitar (10,3%). Totodată, acesta a fost mai frecvent

identificat în funcție de severitatea bolii.

3. În studiul de față a fost examinat doar un singur polimorfism al genei CC16, însă CC16 A38G este considerat cel mai important polimorfism, deoarece este singurul dovedit a avea semnificație funcțională. Studiile de această natură au potențialul de a oferi perspective noi de cunoaștere a mecanismelor de control al evoluției procesului inflamator la nivelul căilor respiratorii și a facilită individualizarea profilaxiei și a tratamentului copiilor cu astm bronșic.

### Bibliografie

1. Broeckaert F., Bernard A., *Clara cell secretory protein (CC16): characteristics and perspectives as lung peripheral biomarker*, in *Clin. Exp. Allergy*, 2000, no. 30, p. 469-475.
2. Candelaria P.V., Backer V., Laing I.A. et al., *Association between asthma-related phenotypes and the CC16 A38G polymorphism in an unselected population of young adult Danes*, in *Immunogenetics*, 2005, no. 57, p. 25-32.
3. Covic M., Stefanescu D., Sandovici I., *Principii de genetică medicală*, Iași, Ed. Polirom, 2004, 200 p.
4. ISAAC Steering Committee. *Worldwide Variation in the Prevalence of Symptoms of Asthma, Allergic Rhinconjunctivitis, and Atopic Eczema: The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC)*, in *Lancet*, 1998, no. 351(9111), p. 1225-1232.
5. Lesur O. et al., *Clara cell protein (CC-16) induces a phospholipase A<sub>2</sub>-mediated inhibition of fibroblast migration in vitro*, in *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 1995, no. 152, p. 290-297.
6. Martin A.C., Laing I.A., Khoo S.K. et al., *Acute asthma in children: relationships among CD14 and CC16 genotypes, plasma levels, and severity*, in *J. Respir. Crit. Care Med.*, 2006, no. 173, p. 617-622.
7. Saadat M., Saadat I., Saboori Z., Emad A., *Combination of CC16, GSTM1, and GSTT1 genetic polymorphisms is associated with asthma*, in *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, no. 113(5), p. 996-998.
8. Sengler C., Heinzmann A., Jerkic S.P., Haider A., Sommerfeld C., Niggemann B., Lau S., Forster J., Schuster A., Kamin W. et al., *Clara cell protein 16 (CC16) gene polymorphism influences the degree of airway responsiveness in asthmatic children*, in *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, no. 111, p. 515-519.
9. Vasilos L., Cojocaru A., Aramă M., Savoschin D., Cîrstea O., *Impactul poluării aerului atmosferic în geneza patologiei alergice respiratorii la copii*, în *Anale științifice ale USMF „N. Testemițanu”*, *Probleme actuale ale sănătății mamei și copilului*, ediția a IX-a, 2008, oct. (5), p. 162-168.

Prezentat la 14.04.2011

### Olga Cârstea,

cercetător științific stagiar,  
Laboratorul Științific de Pediatrie  
al IMSP ICȘDOSMC  
tel: 636130; 069038523  
e-mail: [olga.cirstea@gmail.com](mailto:olga.cirstea@gmail.com)