

Związek polimorfizmu genu cytochromu P-450 1A1 (CYP1A1) z trądzikiem pospolitym – wyniki wstępne

Polymorphism in cytochrome P-450 (CYP1A1) in *acne vulgaris* – preliminary study

Michał Sobjanek¹, Monika Zabłotna¹, Małgorzata Sokołowska-Wojdyło¹, Adam Włodarkiewicz¹, Piotr Szlązak², Bogusław Nedoszytko¹

¹ Katedra i Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej w Gdańsku, kierownik Katedry i Kliniki: prof. dr hab. Jadwiga Roszkiewicz

² Ambulatorium z Izłą Chorych Komendy Portu Wojennego w Gdyni

Post Dermatol Alergol 2007; XXIV, 2: 69–72

Streszczenie

Wstęp: Cytochrom P450 jest rodziną enzymów katalizujących metabolizm endogennych i egzogennych substratów, m.in. kwasów tłuszczowych, steroli, steroidów płciowych, glikokortykosteroidów, witaminy D, leukotrienów, prostaglandyn oraz metabolitów witaminy A. W obrębie genu cytochromu P-450 1A1 opisano występowanie dwóch mutacji punktowych wzmacniających jego aktywność enzymatyczną: m1 (substytucja T→C w pozycji 6235) oraz m2 (substytucja A→G w pozycji 4889). Warunkuje to osłabienie biologicznego działania naturalnych retinoidów poprzez ich szybki metabolizm do nieaktywnych związków, wpływając tym samym na jeden z kluczowych elementów w patogenezie trądziku pospolitego.

Cel pracy: Celem pracy jest określenie związku występowania mutacji m1 i m2 genu cytochromu P-450 1A1 z występowaniem trądziku pospolitego i ciężkością przebiegu dermatozy.

Materiał i metody: Przebadano 80 osób po 20. roku życia – 40 chorych z objawami lub wywiadem w kierunku trądziku pospolitego oraz 40 osób bez objawów i z negatywnym wywiadem w kierunku dermatozy, stanowiących grupę kontrolną. U każdego chorego określono nasilenie zmian trądzikowych, stosując skalę zaproponowaną przez Cunliffe'a i Burke'a. Do oznaczenia polimorfizmu m1 wykorzystano reakcję cyklicznej polimerazy połączoną z analizą polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP-PCR). W celu oznaczenia polimorfizmu m2 postużono się metodą allelospecyficjnej reakcji cyklicznej polimerazy (ARMS-PCR).

Wyniki: Mutację m1 wykazano u 8 (20%), natomiast m2 u 6 (15%) badanych. Obie mutacje jednocześnie zaobserwowano u 6 chorych, co stanowiło 75% wszystkich chorych z mutacjami. W grupie kontrolnej mutację m1 stwierdzono u 4 (10%), natomiast m2 u 3 osób (7,5%). Tylko jedna osoba z grupy kontrolnej (2,5%) była nosicielem obu mutacji. Pozytywnej korelacji między występowaniem mutacji a nasileniem zmian trądzikowych nie wykazano.

Wnioski: Dwukrotnie częstsze występowanie mutacji m1 i m2 genu CYP1A1 u osób z trądzikiem pospolitym oraz znamienne częstsze współwystępowanie obu mutacji może świadczyć o znaczeniu polimorfizmu genu CYP1A1 w etiopatogenezie trądziku pospolitego. Konieczne jest natomiast kontynuowanie badań na większej liczbie osób.

Słowa kluczowe: trądzik pospolity, retinoidy, cytochrom P-450, polimorfizm.

Abstract

Introduction: Cytochrome P-450 (CYP1A1) belongs to the superfamily of catabolic enzymes metabolizing endo- and exogenous substrates such as: lipid acids, sterols, sexual steroids, glucocorticosteroids, vitamin D, leukotriens and metabolites of vitamin A. There are two known mutations described in CYP1A1 intensifying its activity: m1 – thymine to cytosine transition (T→C) at position 6235, and m2 – adenine to guanine transition (A→G) at position 4889. M1 and m2 mutation lead to rising CYP1A1 activity. This mutation leads to diminution of biological action of natural retinoids by their fast conversion to inactive metabolites. The retinoid deficiency disturbs sebaceous gland activity, which plays one of the most important roles in aetiopathogenesis of acne.

Adres do korespondencji: lek. med. Michał Sobjanek, Klinika Dermatologii, Wenerologii i Alergologii Akademii Medycznej w Gdańsku, ul. Dębinki 7, 80-952 Gdańsk, e-mail: sobjanek@wp.pl

Aim: To determine the connection between m1 and m2 CYP1A1 gene mutations and the occurrence and severity of *acne vulgaris*.

Material and methods: Forty (40) patients with *acne vulgaris* symptoms or anamnesis and 40 healthy volunteers without acne in anamnesis (older than 20 years old in both groups) were clinically evaluated according to Cunliffe and Burke's scale. CYP1A1 polymorphism was analyzed by polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) in case of m1 mutation and allele-specific PCR in case of m2 mutation.

Results: The T to C transition (m1) was observed in 20% of patients (8/40), the A to G transition (m2) in 15% of patients (6/40). Both mutations were detected in 6 patients (75%) of patients with any mutation. There was no positive correlation between incidence of mutation and severity of acne. The m1 mutation was detected in 10% of healthy volunteers (4/40), m2 – in 7.5% (3/40). Only one person carries both mutations.

Conclusions: Two times higher incidence of CYP1A1 m1 and m2 mutations and frequently higher coexistence of both mutations in the group of patients with acne seems to indicate significant role of CYP1A1 polymorphism in aetiopathogenesis of that skin disorder. Further investigations are required to yield more information on this field.

Key words: *acne vulgaris*, retinoids, CYP, polymorphism.

Wstęp

Trądzik pospolity (*acne vulgaris*) to jedna z najczęstszych chorób skóry. Etiopatogeneza tej dermatozy jest złożona, wieloczynnikowa i nie w pełni poznana. Kluczową rolę przypisuje się zaburzeniom hormonalnym powodującym przerost gruczołów łojowych, nieprawidłowemu rogowaceniu mieszkowemu oraz obecności *Propionibacterium acnes* [1]. Udział czynników genetycznych w rozwoju tej choroby postulowany jest od dawna, co poparte zostało badaniami genealogicznymi oraz badaniami bliźniąt [2–5]. Nadal jednak bardzo niewiele wiadomo o genach zaangażowanych w rozwój trądziku pospolitego. W literaturze światowej istnieją pojedyncze doniesienia wskazujące na korelację choroby z kilkoma *loci* genowymi [6].

Cytochrom P-450 (CYP) jest rodziną enzymów mających aktywność monooksygenazy. Katalizują one metabolizm substratów endogennych i egzogennych, m.in. kwasów tłuszczowych, glikokortykosteroidów, steroli, steroidów płciowych, leukotrienów, prostaglandyn, witaminy D oraz witaminy A (retinolu) i jej pochodnych. Enzymy te odgrywają również kluczową rolę w metabolizmie ksenobiotyków zarówno w wątrobie, jak i skórze. CYP zlokalizowany w retikulum endoplazmatycznym komórek niemal wszystkich tkanek największą aktywność wykazuje w wątrobie i rdzeniu nadnerczy. CYP1A1 jest jednym z najbardziej konserwatywnych filogenetycznie enzymów CYP, a także jednym z nielicznych enzymów cytochromu, których aktywność wykazano w keratynocytach [7].

Dotychczas zidentyfikowano kilkadziesiąt genów cytochromu P-450. U człowieka gen cytochromu P-450 1A1 (CYP1A1) zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 15 (15q22-q24) i tworzy go 7 egzonów oraz 6 intronów; rejon ten składa się z 5810 par zasad (p.z.) [8]. Polimorfizm genu cytochromu P-450 1A1 u pacjentów z trądzikiem jest niezwykle interesujący z uwagi na kluczowy udział CYP1A1 w metabolizmie retinoidów, które zaangażowane są w regulację funkcjonowania gruczołów łojowych. Kwas retinowy poprzez wiązanie się z receptorami

jądrowymi RAR i RXR wpływa na transkrypcję DNA sebcytów, hamując ich proliferację, a wewnątrzkomórkowo zmniejszając produkcję lipidów poprzez inhibicję enzymów lipooksygenazy, prowadząc tym samym do obniżenia produkcji łoju [1]. Rola CYP1A1 w metabolizmie retinoidów polega na katalizacji reakcji hydroksylacji kwasu transretinowego, naturalnego aktywnego metabolitu retinolu, do nieczynnego kwasu 4-hydroksyretinowego, kwasu 4-oksoretinowego i innych polarnych związków [9]. Naturalne pochodne izoenzymu są morfogenetyczne dla gruczołów łojowych [7]. Li i wsp. wykazali, że ekspresja CYP1A1 znamienne spada w przypadku aplikacji retinoidów na skórę [10]. Dotychczas opisano kilka mutacji genu CYP1A1. Najczęściej badanymi są – m1 (polegająca na substytucji T→C w pozycji 6235 w miejscu sąsiadującym z egzonem 7 genu CYP1A1) oraz m2 (polegająca na substytucji A→G w egzonie 7 w pozycji 4889 genu CYP1A1).

Cel pracy

Celem pracy było określenie związku występowania mutacji m1 i m2 genu cytochromu P-450 1A1 z występowaniem trądziku pospolitego oraz ciężkością przebiegu dermatozy.

Materiał i metody

Badaniem objęto 80 osób po 20. roku życia – 40 chorych z objawami lub wywiadem w kierunku trądziku pospolitego oraz 40 osób bez objawów i z negatywnym wywiadem w kierunku dermatozy, stanowiących grupę kontrolną. U każdego chorego określono nasilenie zmian trądzikowych, stosując 6-stopniową ilościowo-jakościową skalę zaproponowaną przez Burke'a i Cunliffe'a [11] (tab. 1).

Od każdej badanej osoby pobierano 5 ml krwi obwodowej, z której przy użyciu zestawu Blood Mini firmy A&A Biotechnology izolowano genomowy DNA.

Do oznaczenia polimorfizmu m1 wykorzystano reakcję cyklicznej polimerazy połączoną z analizą polimorfi-

zmu długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP-PCR) w warunkach opisanych przez Paraskevaidisa i wsp. [12]. Mutacja m1 prowadzi do powstania sekwencji nukleotydowej rozpoznawanej przez enzym restrykcyjny Msp I. W przypadku substytucji T→C w pozycji 6235 uzyskiwano produkty trawienia o długości 206 i 129 par zasad, natomiast w przypadku braku mutacji – produkt o długości 335 par zasad (ryc. 1).

W celu oznaczenia polimorfizmu m2 posłużono się metodą allelospecyficjnej reakcji cyklicznej polimerazy (ARMS-PCR) (ryc. 2.) [12].

Wyniki poddane zostały analizie statystycznej z zastosowaniem testu χ^2 .

Wyniki

Mutację m1 w grupie osób chorych wykazano u 8 (20%), natomiast m2 u 6 (15%) badanych. Obie mutacje jednocześnie zaobserwowano u 6 chorych, co stanowiło 75% wszystkich chorych z mutacjami. W grupie kontrolnej mutację m1 stwierdzono u 4 (10%), natomiast m2 u 3 osób (7,5%). Tylko jedna osoba z grupy kontrolnej (2,5%) była nosicielem obu mutacji (tab. 2.). Korelacji między występowaniem mutacji a nasileniem zmian trądzikowych nie wykazano.

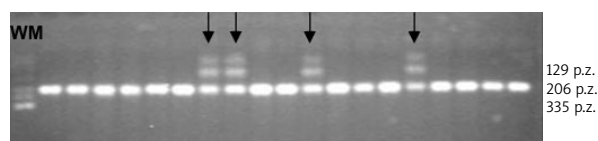
Dyskusja

Wpływ czynników genetycznych na występowanie i przebieg trądziku pospolitego sugerowany jest od dawna. Goulden i wsp. wykazali, że 50% pacjentów z trądzikiem wieku dorosłego (*postadolescent acne*) ma w rodzinie co najmniej jednego krewnego I stopnia z objawami choroby [2]. Późniejsze badania, obejmujące 204 osoby z trądzikiem, 144 osoby zdrowe oraz ich krewnych I stopnia (odpowiednio 1203 i 856 osób), potwierdziły dziedziczny charakter dermatozy. Trądzik występował 4 razy częściej u krewnych osób chorych niż u krewnych osób zdrowych [3]. Obserwacje kliniczne wykazują, że dziedziczna jest szczególnie skłonność do cięższych postaci trądziku [6].

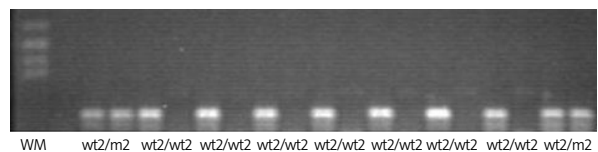
Udział CYP w metabolizmie kancerogenów, takich jak policykliczne aromatyczne węglowodory i związki nitrowe oraz arylaminy, jest powodem poszukiwania związku polimorfizmu genu CYP1A1 z nowotworami. Asocjacje taką wykazano w przypadku raka płuc, przetyku, okrężnicy oraz gruczołu krokowego [13–15]. Publikacje dotyczące polimorfizmu genów CYP w chorobach skóry są nieliczne. W literaturze światowej dostępna jest jedynie jedna pozycja z 1998 r., poświęcona polimorfizmowi genu CYP1A1 w trądziku pospolitym [12]. Paraskevaidis i wsp. [12] badali częstość występowania mutacji m1 i m2 w populacji chorych na trądzik. Przeanalizowali 96 chorych i 408 osób stanowiących grupę kontrolną. Wykazali statystycznie częstsze występowanie mutacji m1 w grupie chorych (8,33% w grupie chorych, 6,99% w grupie kontrolnej). W przypadku mutacji m2

Tabela 1. Sześciostopniowa ilościowo-jakościowa skala oceny stanu klinicznego pacjentów z trądzikiem zaproponowana przez Burke'a i Cunliffe'a [11]

Stopień	Obraz kliniczny
I	zaskórniki, do 30 grudek na jednej stronie ocenianej okolicy
II	zaskórniki, grudki, do 3 cyst na jednej stronie ocenianej okolicy
III	zaskórniki, grudki, od 3 do 10 cyst na jednej stronie ocenianej okolicy
IV	<i>acne phlegmonosa</i> i <i>acne conglobata</i>
V	<i>acne phlegmonosa</i> i <i>acne conglobata</i> z cechami rozpadu
VI	trądzik z objawami ogólnymi



Ryc. 1. Analiza polimorfizmu długości fragmentów restrykcyjnych po trawieniu enzymem Msp I; WM – wzorzec masowy, ↓ – heterozygoty wt1/m1, na pozostałych ścieżkach – homozygoty wt1/wt1 (brak mutacji)



Ryc. 2. Elektroforeza agarozowa produktów ARMS-PCR dla substytucji A→G w pozycji 4889 genu CYP1A1; WM – wzorzec masowy, wt2/wt2 – homozygoty niezmutowane, wt2/m2 – heterozygoty

Tabela 2. Częstość występowania poszczególnych genotypów CYP1A1 w badanych grupach (wt1, wt2 – ang. *wild type*, typ dziki, niezmutowany; m1, m2 – mutacja 1, mutacja 2)

	wt1/wt1	wt1/m1	wt2/wt2	wt2/m2
chorzy z trądzikiem	32 (80%)	8 (20%)	34 (85%)	6 (15%)
grupa kontrolna	36 (90%)	4 (10%)	37 (92,5%)	3 (7,5%)

związku takiego nie stwierdzono (3,13% w grupie chorych; 3,06% w grupie kontrolnej). W opracowanym przez autorów niniejszej pracy materiale mutację m1 wykazano u 20% chorych, a m2 u 15%, 2-krotnie częściej niż w grupie kontrolnej (odpowiednio 10 i 7,5%). Statystycznie istotną różnicę stwierdzono w przypadku częstości występowania obu mutacji jednocześnie (15% w grupie chorych; 2,5%

w grupie kontrolnej). Przedstawione przez autorów wstępne wyniki badań sugerują związek polimorfizmu genu CYP1A1 z występowaniem trądziku pospolitego.

Według Petersena i wsp. oraz Kawajiri i wsp. [16, 17] mutacje m1 i m2 mogą prowadzić do zwiększonej aktywności enzymatycznej CYP1A1. Mutacja m1 jest najprawdopodobniej markerem zmian w miejscu regulatorowym genu, zwiększając jego ekspresję, natomiast m2 warunkuje wzrost aktywności enzymu. Wzrost aktywności CYP1A1 może osłabiać biologiczne działanie naturalnych retinoidów poprzez ich szybki metabolizm do nieaktywnych związków, co indukuje nieprawidłowe różnicowanie sebocytów i hiperkeratynizację kanałów wyprowadzających gruczołów łojowych. Procesy te wiążą się ściśle z patogenezą trądziku. Obecność mutacji może mieć także wpływ na odpowiedź pacjentów z trądzikiem na leczenie retinoidami. Być może mutacje przyczyniają się do swoistej oporności na leczenie doustną izotretinoiną, obserwowaną w niektórych przypadkach, oraz do różnej odpowiedzi na miejscowo stosowane retinoidy. Problem ten wymaga dalszych badań uwzględniających pacjentów z postaciami trądziku niepoddającego się wspomnianemu leczeniu.

Piśmiennictwo

1. Sobjanek M, Sokołowska-Wojdyło M, Barańska-Rybak W i wsp. Rola czynników hormonalnych w etiopatogenezie i terapii trądziku pospolitego. *Post Dermatol Alergol* 2006; 6: 266-72.
2. Goulden V, Clark SM, Cunliffe WJ. Post-adolescent acne: a review of clinical features. *Br J Dermatol* 1997; 136: 66-70.
3. Goulden V, McGeown CH, Cunliffe WJ. The familial risk of adult acne: a comparison between first-degree relatives of affected and unaffected individuals. *Br J Dermatol* 1999; 141: 297-300.
4. Ballanger F, Baudry P, N'Guyen JM, et al. Heredity: a prognostic factor for acne. *Dermatology* 2006; 212: 145-9.
5. Friedman GD. Twin studies of disease heritability based on medical records: application to acne vulgaris. *Acta Genet Med Gemellol (Roma)* 1984; 33: 487-95.
6. Herane MI, Ando I. Acne in infancy and acne genetics. *Dermatology* 2003; 206: 24-8.
7. Zouboulis CC, Korge B, Akamatsu H, et al. Effects of 13-cis-retinoic acid, all-trans-retinoic acid, and acitretin on the proliferation, lipid synthesis and keratin expression of cultured human sebocytes in vitro. *J Invest Dermatol* 1991; 96: 792-7.
8. Kawajiri K, Watanabe J, Gotoh O, et al. Structure and drug inducibility of the human cytochrome P-450c gene. *Eur J Biochem* 1986; 159: 219-25.
9. Robersts AB, Lamb LC, Sporn MB. Metabolism of all-trans-retinoic acid in hamster liver microsomes: oxidation of 4-hydroxy- to 4-keto-retinoic acid. *Arch Biochem Biophys* 1980; 199: 374-83.
10. Li XY, Astrom A, Duell EA, et al. Retinoic acid antagonizes basal as well as coal tar and glucocorticoid-induced cytochrome P4501A1 expression in human skin. *Carcinogenesis* 1995; 16: 519-24.
11. Burke BM, Cunliffe WJ. The assessment of acne vulgaris the Leeds technique. *Br J Dermatol* 1984; 111: 83-92.
12. Paraskevaidis A, Drakoulis N, Roots I, et al. Polymorphisms in the human cytochrome P-450 1A1 gene (CYP1A1) as a factor for developing acne. *Dermatology* 1998; 196: 171-5.
13. Wenzlaff AS, Cote ML, Bock CH, et al. CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers: a population-based study. *Carcinogenesis* 2005; 26: 2207-12.
14. Yang CX, Matsuo K, Wang ZM, Tajima K. Phase I/II enzyme gene polymorphisms and esophageal cancer risk: a meta-analysis of the literature. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 2531-38.
15. Vijayalakshmi K, Vettriselvi V, Krishnan M, et al. Cytochrome P-4501A1 gene variants as susceptibility marker for prostate cancer. *Cancer Biomark* 2005; 1: 251-8.
16. Petersen DD, McKinney CE, Ikeya K, et al. Human CYP1A1 gene: cosegregation of the enzyme inducibility phenotype and an RFLP. *Am J Hum Genet* 1991; 48: 720-5.
17. Kawajiri K, Nakachi K, Imai K, et al. The CYP 1A1 gene and cancer susceptibility. *Crit Rev Oncol Hematol* 1993; 14: 77-87.