

PRZEMYSŁAW NIEWIŃSKI¹, ROBERT WOJCIECHOWSKI², KRYSZYNA ORZECZOWSKA-JUZWENKO¹,
MAREK ŚLIWIŃSKI², MAGDALENA HURKACZ¹, KRYSZYNA GŁOWACKA¹

Genotyp oksydacji CYP2D6 jako czynnik ryzyka w etiologii wola guzkowego

CYP2D6 Oxidation Genotype as a Risk Factor in Development of Nodular Thyroid Goiters

¹ Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej AM we Wrocławiu

² Katedra i Klinika Anestezjologii i Intensywnej Terapii AM we Wrocławiu

Streszczenie

Wprowadzenie. Występowanie chorób tarczycy zależy od interakcji między czynnikami uwarunkowanymi genetycznie i obciążeniem środowiskowym. Czynniki pokarmowe (wolotwórcze), w tym alkohol i palenie papierosów, są uważane za główne, obok niedoboru jodu, czynniki wywołujące choroby tarczycy. Utlanie jest jedną z głównych przemian metabolicznych wielu substancji, zarówno egzogennych, jak i endogennych, w tym także kluczowych substancji zawartych w pożywieniu i dymie tytoniowym. Za procesy utleniania jest odpowiedzialny w głównej mierze cytochrom P-450. Aktywność kilku odmian – izozymów cytochromu P-450, zwłaszcza CYP2D6 (P-450 II D6), jest uwarunkowana genetycznie i charakteryzuje się osobniczą zmiennością.

Cel pracy. Celem pracy była ocena znaczenia genotypu CYP2D6 w etiologii wybranych chorób tarczycy, takich jak wole guzkowe obojętne i wole guzkowe toksyczne.

Materiał i metody. Genotyp oksydacji oznaczono u 380 osób, w tym u 80 osób z wolem guzkowym: u 60 chorych z wolem guzkowym obojętnym i u 20 chorych z wolem guzkowym toksycznym (chorobą Plummera). Grupę kontrolną stanowiło 300 zdrowych ochotników. Polimorfizm genu CYP2D6 badano z użyciem reakcji łańcuchowej polimerazy i cięcia enzymami restrykcyjnymi (PCR/RFLP).

Wyniki. Badania wykazały istnienie statystycznie istotnej przewagi ekstensywnych metabolizerów w grupie osób z wolem guzkowym obojętnym i obu grupach chorych na choroby tarczycy łącznie w porównaniu do grupy zdrowych ochotników. Względne ryzyko zachorowania na choroby tarczycy jest 1,81 raza większe ($p < 0,05$), w tym na wole guzkowe obojętne jest ponad 1,88 ($p < 0,05$), a na wole guzkowe toksyczne 1,60 raza większe ($p > 0,05$; ns) dla osób o ekstensywnym genotypie CYP2D6 niż dla osób o pośrednim i słabym genotypie CYP2D6.

Wniosek. Ekstensywny genotyp utleniania może być jednym z istotnych czynników pozwalających przewidzieć zwiększone ryzyko wystąpienia chorób tarczycy, takich jak wole guzkowe (Adv Clin Exp Med 2004, 13, 4, 601–605).

Słowa kluczowe: CYP2D6, wole guzkowe obojętne, wole guzkowe.

Abstract

Background. The occurrence of thyroid diseases is determined by interplay between genetic and environmental factors such as goitrogens. Goitrogens, e.g. alcohol and tobacco smoking are, beside iodine deficiency, main causes of development of thyroid diseases. Oxidation is the one of the main processes in the metabolism of numerous exo- and endogenous chemicals, involving key substances from food and tobacco smoke. Enzymes belonging to the cytochrome P450 family, especially genetically polymorphic CYP2D6, play an important role in xenobiotics metabolism.

Objectives. The aim of presented study was to evaluate the relationship between genetically determined polymorphic metabolism of CYP2D6 and susceptibility to thyroid diseases such as toxic and non-toxic nodular thyroid goiters.

Material and Methods. Study completed 380 persons, 80 patients with nodular thyroid goiters, 60 with neutral (non-toxic) nodular thyroid goiters, 20 with toxic nodular thyroid goiters (Plummer disease) and 300 healthy volunteers as a control group. The CYP2D6 genotype was analyzed by polymerase chain reaction amplification and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) techniques.

Results. The study revealed a statistically significant predominance of extensive metabolizers among all patients with thyroid diseases and among patients with neutral nodular thyroid goiters in comparison to healthy volunteers.

Relative risk (odds ratio) of development of thyroid diseases was 1.81 times higher ($p < 0.05$), non-toxic nodular thyroid goiters was 1.88 times higher ($p < 0.05$), toxic nodular thyroid goiters 1.60 times higher ($p > 0.05$; NS) for persons with extensive CYP2D6 genotype, in comparison to persons with intermediate and poor genotype.

Conclusions. The results represent some evidence for a possible relationship between extensive CYP2D6 genotype and the higher susceptibility to development of thyroid diseases, such as nodular thyroid goiters (*Adv Clin Exp Med* 2004, 13, 4, 601–605).

Key words: CYP2D6, thyroid goiters, thyroid nodules.

Choroby tarczycy są poważnym problemem w populacji europejskiej, dotyczą bowiem 10% osób dorosłych.

Występowanie chorób tarczycy zależy od interakcji między czynnikami uwarunkowanymi genetycznie i obciążeniem środowiskowym. Czynniki pokarmowe (wolotwórcze), w tym alkohol i palenie papierosów, są uważane za główne, obok niedoboru jodu, czynniki wywołujące choroby tarczycy [1–3].

Utlennianie jest jedną z głównych przemian metabolicznych wielu substancji zarówno egzogennych, jak i endogennych, w tym także kluczowych substancji zawartych w pożywieniu i dymie tytoniowym. Za procesy utleniania jest w głównej mierze odpowiedzialny układ enzymatyczny frakcji mikrosomalnej wątroby, tzw. układ monoooksygenaz (wieloczynnościowa monoooksygenaza, MFO – mixed function oxidase), którego głównym składnikiem jest cytochrom P-450. Poznano kilkanaście odmian – izozymów cytochromu P-450, spośród których aktywność kilku izozymów, zwłaszcza: CYP2D6 (P-450 II D6), CYP2C19 (P-450 II C19) i CYP2C9 (P-450 II C9), jest uwarunkowana genetycznie i charakteryzuje się osobniczą zmiennością [4]. W związku z tym procesy metaboliczne odbywające się z udziałem ww. izoenzymów wykazują polimorfizm w obrębie określonej populacji [5, 6]. Szczególne znaczenie zarówno dla skuteczności, bezpieczeństwa farmakoterapii, jak i dla zrozumienia etiologii wielu jednostek chorobowych, takich jak: choroby nowotworowe, alergiczne, choroba Parkinsona, cukrzyca, czy schizofrenia ma polimorfizm enzymu CYP2D6 [5, 7, 8].

Celem pracy jest ocena znaczenia genotypu CYP2D6 w etiopatogenezie chorób tarczycy, tj. w wolu guzkowym obojętnym i w wolu guzkowym toksycznym (chorobie Plummera).

Zagadnienie genotypu oksydacji w chorobach tarczycy nie było dotąd przedmiotem badań i w światowym piśmiennictwie autorzy nie znaleźli żadnych danych na ten temat.

Material i metody

Genotyp CYP2D6 oznaczono u 380 osób (u 266 kobiet i u 114 mężczyzn) w wieku 17–88 lat.

Badania kliniczne genotypu oksydacji prze-

prowadzono u 80 osób (74 kobiet i 6 mężczyzn) w wieku 18–88 lat (średnio $28,9 \pm 11,1$ lat) z klasycznymi chorobami tarczycy – wolem guzkowym obojętnym i wolem guzkowym toksycznym (chorobą Plummera), hospitalizowanych w Klinice Chirurgii AM we Wrocławiu w celu wykonania zabiegu strumektomii.

Badanych chorych podzielono na dwie grupy. Pierwszą grupę stanowiło 60 chorych z wolem guzkowym obojętnym w wieku 18–62 lat (średnio $31,20 \pm 11,34$ lat). Do drugiej grupy zaliczono 20 chorych z wolem guzkowym toksycznym (chorobą Plummera) w wieku 17–52 lat (średnio $26,47 \pm 8,87$ lat).

Grupę kontrolną stanowili zdrowi ochotnicy. Do grupy tej należało 300 osób (192 kobiety i 108 mężczyzn) w wieku 18–88 lat (średnio $28,9 \pm 11,1$ lat).

Charakterystykę badanych grup przedstawiono w tabeli 1.

Każda badana osoba otrzymała informację o celach i metodzie badań oraz wyraziła zgodę na ich przeprowadzenie. Protokół badań został zaakceptowany przez Terenową Komisję Etyki Badań Naukowych.

Izolowanie genomowego DNA przeprowadzono z leukocytów krwi obwodowej.

Badanie alleli genu CYP2D6 (CYP2D6*1, CYP2D6*3 i CYP2D6*4) dokonano metodą Smitha et al. [9]. Mutacja w allelu CYP2D6*3 jest spowodowana delecją 1 pary zasad w eksonie 5, a w allelu CYP2D6*4 mutacja jest wywołana zamianą guaniny na adeninę w miejscu zetknięcia się intronu 3 i eksonu 4 (mutacja G1934 do A). Allele niewykazujące powyższych mutacji (wild type – wt) były klasyfikowane jako CYP2D6*1. Aby wykryć występowanie zmutowanych alleli, zastosowano metody PCR (Polymerase Chain Reaction Amplification) i RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism).

Genomowy DNA wyizolowany z krwi obwodowej poddano reakcji amplifikacji metodą PCR z parą syntetycznych oligonukleotydów, oddzielnie dla mutacji CYP2D6*3 (primery E – GATGAGCTGCTAACTGAGCCC, F – CCGAGAGCATACTCGGGAC) oraz dla mutacji CYP2D6*4 (primery C – GCCTTCGCCAACCCTCCG, D – AAATCCTGCTCTCCGAGGC).

Tabela 1. Charakterystyka pacjentów z chorobami tarczycy i osób zdrowych (grupy kontrolnej)**Table 1.** Characteristic of patients with thyroid diseases and healthy persons as a control group

Grupa (Group)	Wiek – lata (Age – years)		Płeć (Gender)	
	\bar{x}	\pm SD	Kobiety (Females)	Mężczyźni (Males)
Wole guzkowe obojętne (Non-toxic nodular thyroid goiters) n = 60	31,20	11,34	57	3
Wole guzkowe toksyczne (Toxic nodular thyroid goiters) n = 20	26,47	8,87	17	3
Choroby tarczycy ogółem (Thyroid diseases) n = 80	28,70	10,38	74	6
Osoby zdrowe (Healthy persons) n = 300	28,86	11,01	192	108

Tabela 2. Ekstensywny (EM-wt/wt), pośredni (IM-wt/mut) i słaby (PM-mut/mut) genotyp CYP2D6 u pacjentów z chorobami tarczycy i u osób zdrowych**Table 2.** Extensive (EM-wt/wt), intermediate (IM-wt/mut) and poor (PM-mut/mut) CYP2D6 genotype among patients with thyroid diseases and healthy persons

Grupa (Group)	EM wt/wt		IM wt/mut		PM mut/mut	
	n	%	n	%	n	%
Wole guzkowe obojętne (Non-toxic nodular thyroid goiters) n = 60	44	73,34**	14	23,33	2	3,33
Wole guzkowe toksyczne (Toxic nodular thyroid goiters)	14	70,00	5	25,00	1	5,00
Choroby tarczycy ogółem (Thyroid diseases)	58	72,50**	19	23,75	3	3,75*
Osoby zdrowe (Healthy persons) n = 300	178	59,33	98	32,67	24	8,00

Statystyczna istotność różnic w porównaniu z grupą osób zdrowych: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$.

Statistic significance of difference in comparison with healthy persons: * $p < 0,1$, ** $p < 0,05$.

Otrzymany produkt amplifikacji PCR po sprawdzeniu w 2% żelu agarozowym poddano reakcji trawienia przez enzymy restrykcyjne BstNI (mutacja CYP2D6*4) i HpaII (mutacja CYP2D6*3). Separacja uzyskanych produktów trawienia została przeprowadzona elektroforetycznie w 3% żelu agarozowym. Otrzymane prążki odpowiadające poszczególnym fragmentom DNA po wybarwieniu żelu agarozowego bromkiem etydyny obserwowano w świetle UV i rejestrowano w formie graficznej.

Homozygoty dominujące (wt/wt-CYP2D6*1/CYP2D6*1), czyli osoby, które od obojga rodziców otrzymały DNA bez mutacji, są uznawane za osoby o ekstensywnym genotypie CYP2D6. Heterozygoty z 1 allelem typu wild type (wt-CYP2D6*1) i 1 zmutowanym (CYP2D6*3 lub CYP2D6*4) są uznawane za osoby o pośrednim genotypie CYP2D6. Homozygoty recesywne (nosiciele 2 zmutowanych alleli) są uznawane za osoby o słabym genotypie CYP2D6.

Istotność statystyczną wyników sprawdzano stosując test χ^2 z poprawką Yatesa (tam, gdzie jej

zastosowanie było konieczne). Względne ryzyko wystąpienia choroby w zależności od przynależności pacjenta do grupy bardziej narażonej na zachorowanie określono poprzez obliczenie tzw. „ilorazu (proporcji) szans” (OR – odds ratio) wraz z odpowiednim przedziałem ufności.

Wyniki

Wyniki badań wykazały istnienie statystycznie istotnej przewagi częstości występowania ekstensywnych metabolizerów (homozygoty dominujące) w grupach osób z chorobami tarczycy w porównaniu do grupy zdrowych ochotników.

Wśród 80 pacjentów z chorobami tarczycy homozygoty dominujące (wt/wt-CYP2D6*1/CYP2D6*1) stanowiły 72,50%, a heterozygoty z 1 allelem typu wild type (wt-CYP2D6*1) i 1 zmutowanym (CYP2D6*3 lub CYP2D6*4) – 23,75%. Trzy osoby, tj. 3,75% były homozygotami recesywnymi (2 zmutowane allele).

Wśród 60 pacjentów z wolem guzkowym obojętnym homozygoty dominujące (wt/wt-CYP2D6*1/CYP2D6*1) stanowiły 73,34%, a heterozygoty z 1 allelem typu wild type (wt-CYP2D6*1) i 1 zmutowanym (CYP2D6*3 lub CYP2D6*4) – 23,33%. Dwie osoby, tj. 3,33%, były homozygotami recesywnymi (2 zmutowane allele).

Wśród 20 pacjentów z wolem guzkowym toksycznym homozygoty dominujące (wt/wt-CYP2D6*1/CYP2D6*1) stanowiły 70%, a heterozygoty z 1 allelem typu wild type (wt-CYP2D6*1) i 1 zmutowanym (CYP2D6*3 lub CYP2D6*4) – 25%. Jedna osoba, tj. 5% była homozygotą recesywną (2 zmutowane allele).

W grupie kontrolnej 300 zdrowych ochotników homozygoty dominujące (wt/wt-CYP2D6*1/CYP2D6*1) stanowiły 59%, a heterozygoty z 1 allelem typu wild type (wt-CYP2D6*1) i 1 zmutowanym (CYP2D6*3 lub CYP2D6*4) – 33 %. Dwaście cztery osoby, tj. 8%, były homozygotami recesywnymi mającymi 2 zmutowane allele (tab. 2).

Względne ryzyko zachorowania na wole guzkowe obojętne, wyrażone za pomocą proporcji szans (OR) jest prawie 2 razy większe (OR = 1,88, przedział ufności CI 1,02–3,49, wynik testu χ^2 $p < 0,05$, istotność statystyczna) dla osób o ekstensywnym genotypie CYP2D6 niż u osób o pośrednim i słabym genotypie CYP2D6.

Względne ryzyko zachorowania na wole guzkowe toksyczne, wyrażone za pomocą proporcji szans (OR) jest ponad 1,5 raza większe (OR = 1,60, przedział ufności CI 0,60–4,28, wynik testu χ^2 $p > 0,05$, brak istotności statystycznej) dla osób o ekstensywnym genotypie CYP2D6 niż u osób o pośrednim i słabym genotypie CYP2D6.

W obu grupach pacjentów z chorobami tarczycy, traktowanych jako całość, ryzyko zachorowania jest prawie 2 razy większe (OR = 1,81 przedział ufności CI 1,05–3,11 wynik testu χ^2 $p < 0,05$, istotność statystyczna) dla osób o ekstensywnym genotypie CYP2D6 w porównaniu do osób o pośrednim i słabym genotypie CYP2D6.

Omówienie

W przedstawionej pracy podjęto próbę wykazania związków między genetycznie uwarunkowaną wydolnością przebiegu procesów metabo-

licznych określonych przez genotyp oksydacji a ryzykiem wystąpienia chorób tarczycy na przykładzie chorych z wolem guzkowym obojętnym i chorych z wolem guzkowym toksycznym (chorobą Plummera).

Obecnie coraz większą wagę przywiązuje się do roli cytochromu P-450 i jego izoenzymów w regulacji i kontroli nie tylko procesów metabolizmu leków, ale również innych funkcji organizmu, m.in. procesów odpowiedzialnych za aktywację substancji toksycznych i alergenów i przemianę prokarcynogenów do karcynogenów. Wynikiem szybszej aktywacji metabolicznej tych substancji u osób będących ekstensywnymi metabolizatorami CYP2D6 jest zwiększenie ryzyka zachorowania m.in. na choroby nowotworowe, alergiczne, neurologiczne, cukrzycę, schizofrenię [7–10].

Istnieje przypuszczenie, że wpływ genetycznie uwarunkowanych, osobniczych odmienności procesów metabolizmu substancji zarówno egzogennych, jak i endogennych, może powodować zwiększone ryzyko zapadalności na choroby tarczycy.

Wyniki badań potwierdzają założenie, że procesy utleniania, być może przez wpływ na przemiany czynników wolotwórczych (goitrogens), takich jak: egzogenne aminy aromatyczne zawarte w dymie tytoniowym lub niezidentyfikowane jeszcze czynniki egzo- i endogenne, mogą odgrywać istotną rolę w rozwoju niektórych chorób tarczycy. Wyniki badań wykazały istnienie statystycznie istotnej przewagi ekstensywnych metabolizatorów w grupie osób z wolem guzkowym obojętnym, w grupie osób z wolem guzkowym toksycznym (chorobą Plummera) i obu grupach chorych na choroby tarczycy łącznie w porównaniu do grupy zdrowych ochotników.

Dokładny mechanizm wpływu procesów utleniania na etiologię chorób tarczycy nie jest jeszcze poznany i wymaga dalszych badań, zarówno *in vitro*, które pomogą poznać naturę tych mechanizmów, jak i *in vivo*, które pozwolą na dokładniejsze poznanie zależności między genotypami a chorobami tarczycy.

Ekstensywny genotyp utleniania może być jednym z istotnych czynników, pozwalających przewidzieć zwiększone ryzyko wystąpienia chorób tarczycy, np. wola guzkowego.

Piśmiennictwo

- [1] Knudsen N, Laurberg P, Perrild H, Bulow I, Ovesen L, Jorgensen T: Risk factors for goiter and thyroid nodules. *Thyroid* 2002, 12 (10), 879–888.
- [2] Vestergaard P, Rejnmark L, Weeke J, Hoeck HC, Nielsen HK, Rungby J, Laurberg P, Mosekilde L: Smoking as a Risk Factor for Graves' Disease, Toxic Nodular Goiter, and Autoimmune Hypothyroidism, *Thyroid* 2002, 12, 1, 69–75.

- [3] **Collins J, Gough S:** Autoimmunity in thyroid disease. *Eur J Nucl Med Mol Imag* 2002, 29, Suppl 2, S417–S424.
- [4] **Nebert DW:** Polymorphisms in drug-metabolizing enzymes: what is their clinical relevance and why do they exist? *Am J Hum Genet* 1997, 60, 265.
- [5] **Cascorbi I:** Pharmacogenetics of cytochrome P4502D6: genetic background and clinical implication. *Eur J Clin Invest* 2003, 33, Suppl 2, 17–22.
- [6] **Meisel Ch, Gerloff T, Kirchheiner J, Mrozkiewicz PM, Niewiński P, Brockmöller J, Roots I:** Implications of pharmacogenetics for individualizing drug treatment and for study design. *J Mol Med* 2003, 81, 154–167.
- [7] **Niewiński P, Orzechowska-Juzwenko K, Patkowski J, Mędrała W, Wolańczyk-Mędrała A, Hurkacz M:** Znaczenie genotypu oksydacji CYP2D6 jako czynnika zwiększającego ryzyko wystąpienia chorób alergicznych. *Pol Arch Med Wew* 2003, 109, 2, 137–142.
- [8] **Niewiński P, Orzechowska-Juzwenko K:** Znaczenie genetycznie uwarunkowanego utleniania leków i ksenobiotyków w patogenezie chorób nowotworowych. *Pol Merk Lek* 1997, 9, 231–235.
- [9] **Smith C, Gough A, Leigh P, Summers B, Harding A:** Debrisoquine hydroxylase gene polymorphism and susceptibility to Parkinson's disease. *Lancet* 1992, 339, 1375–1377.
- [10] **Nebert DW:** Drug-metabolizing enzymes, polymorphisms and interindividual response to environmental toxicants. *Clin Chem Lab Med* 2000, 38, 857–861.

Adres do korespondencji:

Przemysław Niewiński
Katedra i Zakład Farmakologii Klinicznej AM
ul. Bujwida 44
50-345 Wrocław
e-mail: niewinski@farmklin.am.wroc.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 13.01.2004 r.

Po recenzji: 23.02.2004 r.

Zaakceptowano do druku: 23.02.2004 r.

Received: 13.01.2004

Revised: 23.02.2004

Accepted: 23.02.2004