

Łódź, 27.02.2023r.

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

**Tytuł: Potencjalne ochronne efekty
substancji indolowych przed oksydacyjnymi
uszkodzeniami lipidów błon komórkowych
wywołanymi przez KIO_3
w gruczole tarczowym – badania *in vitro***

Lek. Paulina Iwan

Uniwersytet Medyczny w Łodzi
Zakład Endokrynologii Onkologicznej

Miejsce pracy: Wojewódzki Zespół Zakładów Opieki Zdrowotnej –
Centrum Leczenia Chorób Płuc i Rehabilitacji, Łódź

Promotor pracy:

Prof. dr hab. n. med. Małgorzata Karbownik-Lewińska

Treść rozprawy:

- 1. Iwan P, Stepniak J, Karbownik-Lewinska M. Melatonin reduces high levels of lipid peroxidation induced by potassium iodate in porcine thyroid. Int J Vitam Nutr Res. 2021 Jun;91(3-4):271-277. doi: 10.1024/0300-9831/a000628. Epub 2019 Dec 17. PMID: 31842692.
IF: 2.560 , punkty ministerialne: 100**
- 2. Iwan P, Stepniak J, Karbownik-Lewinska M. Cumulative Protective Effect of Melatonin and Indole-3-Propionic Acid against KIO₃-Induced Lipid Peroxidation in Porcine Thyroid. Toxics. 2021 Apr 21;9(5):89. doi: 10.3390/toxics9050089. PMID: 33919052; PMCID: PMC8143077.
IF: 4.472, punkty ministerialne: 70**
- 3. Iwan P, Stepniak J, Karbownik-Lewinska M. Pro-Oxidative Effect of KIO₃ and Protective Effect of Melatonin in the Thyroid-Comparison to Other Tissues. Life (Basel). 2021 Jun 21;11(6):592. doi: 10.3390/life11060592. Erratum in: Life (Basel). 2022 Jul 07;12(7): PMID: 34205777; PMCID: PMC8234753.
IF: 3.253, punkty ministerialne: 70**

Sumaryczny IF: 10.285

Suma punktów ministerialnych: 240

STRESZCZENIE

Wstęp

Reaktywne formy tlenu (RFT) i wolne rodniki uczestniczą w wielu procesach metabolicznych. W warunkach fizjologicznych utrzymuje się równowaga pomiędzy wytwarzaniem a neutralizowaniem RFT. Jednakże zaburzenie tej równowagi może powodować niepożądane dla organizmu skutki.

Gruczoł tarczowy jest narządem, w którym procesy oksydacyjne odgrywają ważną rolę i są niezbędne m.in. do syntezy hormonów tarczycy. Z tego względu gruczoł tarczowy charakteryzuje się stałym wysokim poziomem stresu oksydacyjnego, który może być dodatkowo zwiększany w odpowiedzi na różne egzo- i endogenne substancje (prooksydanty) i przyczyniać się wówczas do różnych stanów chorobowych, na przykład raka tarczycy.

Jod jest pierwiastkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Jego kluczową rolę jest udział w syntezie hormonów tarczycy. Oszacowano fizjologiczne stężenie jodu w gruczole tarczowym, które w warunkach odpowiedniej podaży wynosi ok. 9 mM. Niedobór jodu może powodować poważne skutki zdrowotne, m.in. powstanie wola lub niedoczynność tarczycy, a jeśli jest stwierdzany u ciężarnych – także zaburzenia rozwoju płodu. Dlatego tak ważna jest odpowiednia suplementacja jodu, która zapewnia odpowiednią syntezę hormonów tarczycy, zmniejsza częstość występowania wola i zmienia dystrybucję poszczególnych postaci raka tarczycy z obniżeniem odsetka postaci o gorszym rokowaniu.

Jodowanie soli kuchennej jest w wielu krajach najpopularniejszą metodą profilaktyki niedoboru jodu. Światowe programy suplementacji jodu polegają na dodawaniu do soli kuchennej jodku potasu (KI) albo jodanu potasu (KIO_3). Związki te charakteryzują się różnymi właściwościami oksydacyjnymi – KI jest mniej reaktywny, podczas gdy KIO_3 wykazuje silniejsze właściwości prooksydacyjne. Mimo to KIO_3 uzyskał status „GRAS” (*generally recognized as safe* – generalnie uznany za bezpieczny), nadawany przez FDA (*Food and Drug Administration*). Jednakże w pewnych eksperymentalnych warunkach *in vitro* KIO_3 wykazywał zdolność do oksydacyjnych uszkodzeń makrocząsteczek biologicznych.

Związki indolowe, z ich głównym reprezentantem melatoniną (5-metoksy-N-acetyltryptaminą), są efektywnymi antyoksydantami i zmiataczami wolnych rodników. Kwas indolo-3-propionowy (IPA) jest substancją indolową, podobną do melatoniny pod względem

struktury chemicznej i właściwości biochemicznych. Oba te związki są uznawane za bezpieczne i nie wykazują istotnych działań ubocznych.

W licznych badaniach udowodniono, że melatonina wykazuje działanie ochronne wobec eksperymentalnie wyindukowanych oksydacyjnych uszkodzeń lipidów błon komórkowych w różnych tkankach, ze szczególnym uwzględnieniem gruczołu tarczowego. Melatonina wpływa również hamująco na wzrost i czynność tarczycy. Z tego powodu może być uznawana jako potencjalny czynnik ochronny przed różnymi chorobami tarczycy, włącznie z nowotworami tego gruczołu.

Cel pracy

Pierwszym celem pracy była ocena potencjalnego działania ochronnego melatoniny przed oksydacyjnymi uszkodzeniami lipidów błon komórkowych (czyli peroksydacją lipidów – LPO) indukowanymi przez KI oraz KIO₃ w homogenatach tarczycy wieprzowej (praca oryginalna 1: Iwan P, Stepniak J, Karbownik-Lewinska M. Melatonin reduces high levels of lipid peroxidation induced by potassium iodate in porcine thyroid. Int J Vitam Nutr Res. 2021;91:271-277).

Następnym celem pracy było zbadanie ochronnego efektu kwasu indolo-3-propionowego (IPA) oraz efektów łącznego zastosowania melatoniny i IPA (w najwyższych, możliwych do uzyskania w warunkach *in vitro*, stężeniach, wynikających z ich ograniczonej rozpuszczalności) przed peroksydacją lipidów wyindukowaną przez KIO₃ w homogenatach tarczycy wieprzowej (praca oryginalna 2: Iwan P, Stepniak J, Karbownik-Lewinska M. Cumulative Protective Effect of Melatonin and Indole-3-Propionic Acid against KIO₃-Induced Lipid Peroxidation in Porcine Thyroid. Toxics. 2021;9:89).

W ostatniej części pracy porównywano ochronne działanie melatoniny przed wyindukowanymi przez KIO₃ oksydacyjnymi uszkodzeniami lipidów błon komórkowych w tkance tarczycy i w innych tkankach zwierzęcych (tj. jajnik, śledziona, wątroba, mózg, jelito cienkie i nerka) (praca oryginalna 3: Iwan P, Stepniak J, Karbownik-Lewinska M. Pro-Oxidative Effect of KIO₃ and Protective Effect of Melatonin in the Thyroid-Comparison to Other Tissues. Life (Basel). 2021;11:592. Erratum in: Life (Basel). 2022 Jul 07;12(7)).

Materiały i metody

Badania zostały przeprowadzone w warunkach *in vitro*, z użyciem homogenatów tkanek wieprzowych (tarczyca (we wszystkich pracach oryginalnych: 1, 2, 3) oraz dodatkowo: jajnik, śledziona, wątroba, mózg, jelito cienkie i nerka (praca oryginalna 3)).

Użyte stężenia KI (500; 250; 100; 50 mM), KIO₃ (200; 100; 50; 25; 20; 18.75; 17.5; 16.25; 15; 13.75; 12.5; 11.25; 10; 8.75; 7.5; 5.0; 2.5; 1.25 mM), melatoniny (5.0; 2.5; 1.25; 1.0; 0.625 mM), 17β-estradolu (1.0 mM) oraz IPA (10; 7.5; 5.0; 2.5; 1.25; 0.625 mM) zostały wybrane na podstawie wyników wcześniej opublikowanych badań naszego zakładu (Karbownik et al., J Cell Biochem 2003, 90, 806–811; Karbownik et al., J Cell Biochem 2005, 95, 131–138; Milczarek et al., Thyroid Res 2013, 6, 10; Karbownik-Lewinska et al., Eur J Nutr 2015, 54, 319–323; Stepniak et al., Syst Biol Reprod Med 2016, 62, 17–21).

Stężenie dialdehydu malonowego+4-hydroksyalkenali (MDA+4-HDA), jako wskaźnika peroksydacji lipidów, zmierzono spektrofotometrycznie z użyciem *ALDetect Lipid Peroxidation Assay Kit*.

Wyniki poddano analizie statystycznej, używając metody jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), a następnie testu Neuman-Keulsa, lub używając t-testu dla dwóch prób niezależnych. Istotność statystyczną określano na poziomie $p < 0.05$. Wyniki przedstawiono jako średnie \pm SE.

Wyniki

Praca oryginalna 1

Jodek potasu (KI), we wszystkich użytych stężeniach (tj. 500; 250; 100; 50 mM) i w stopniu zależnym od stężenia, spowodował wzrost poziomu peroksydacji lipidów. Także jodan potasu (KIO₃) podwyższył poziom peroksydacji lipidów we wszystkich zastosowanych stężeniach (tj. 200; 100; 50; 25; 10; 5.0; 2.5 mM), przy czym najsilniejszy efekt uszkodzający zaobserwowano przy stężeniach 10 mM i 25 mM. Po inkubacji homogenatów tarczycy z KIO₃ lub KI łącznie z melatoniną (5.0 mM), istotne obniżenie poziomu peroksydacji lipidów było zauważalne jedynie w przypadku KIO₃ użytego w stężeniu 10 mM.

Ponieważ w powyższym modelu nie odnotowano ochronnego działania melatoniny przed peroksydacją lipidów wyindukowaną przez KI, w kolejnych etapach doświadczenia wykorzystywano jedynie KIO₃.

W dalszej części doświadczenia zastosowano dodatkowe stężenia KIO₃ (tj. 20; 15; 7.5; 1.25 mM) aby wyjaśnić niespodziewane wyniki uzyskane w pierwszym etapie badania. Po użyciu dodatkowych stężeń KIO₃, najsilniejszy efekt uszkodzający lipidy błon komórkowych obserwowano przy stężeniach KIO₃ zbliżonych do 15 mM, z najwyższym poziomem LPO potwierdzonym dla stężeń 15 mM i 20 mM.

Melatonina, w stopniu zależnym od stężenia, zredukowała wyindukowaną przez KIO₃ peroksydację lipidów, ale tylko wówczas, gdy ten prooksydant był zastosowany w stężeniach

10 mM (melatonina użyta w stężeniach: 5.0 mM i 2.5 mM działała ochronnie) i 7.5 mM (melatonina użyta w stężeniach: 5.0; 2.5; 1.25 i 1.0 mM działała ochronnie). Należy podkreślić, że powyższe stężenia KIO_3 (tj. 10 mM i 7.5 mM) odpowiadają fizjologicznemu stężeniu jodu w tarczycy (wyliczonemu na ok. 9 mM).

Inkubacja homogenatów tarczycy wieprzowej jedynie z melatoniną zastosowaną w stężeniach 5.0; 2.5; 1.25; 1.0; 0.625 mM nie zmieniła podstawowej peroksydacji lipidów.

W dalszej części badania zdecydowaliśmy się porównać efekt ochronny melatoniny z potencjalnym działaniem ochronnym innej znanej substancji antyoksydacyjnej – 17β -estradiolu. 17β -estradiol, użyty w stężeniu 1.0 mM będącym najwyższym stężeniem możliwym do uzyskania w warunkach *in vitro*, nie wykazywał korzystnych efektów wobec indukowanej przez KIO_3 peroksydacji lipidów, podczas gdy melatonina, zastosowana w tym samym stężeniu (tj. 1.0 mM), istotnie obniżyła poziom peroksydacji lipidów wyindukowanej przez KIO_3 (7.5 mM).

Praca oryginalna 2

W Eksperymentcie I, IPA (10 mM) i melatonina (5.0 mM) użyte osobno, obniżyły poziom peroksydacji lipidów wyindukowanej przez KIO_3 w stężeniach 10 mM, 7.5 mM i 5.0 mM. Jednakże w Eksperymentcie II, po zastosowaniu dodatkowych stężeń KIO_3 wykazano, że IPA wywołuje efekt ochronny przy wyższych stężeniach jodanu potasu (16.25 mM) w porównaniu z efektem ochronnym melatoniny (istotne obniżenie LPO przy stężeniu KIO_3 15 mM).

Dodatkowo, efekt ochronny wywołany przez IPA był silniejszy w porównaniu z działaniem wywołanym przez melatoninę przy stężeniach KIO_3 13.75 mM i niższych.

Jednak najważniejszą obserwacją było, że melatonina użyta łącznie z IPA wykazywała silniejsze działanie niż każdy z antyoksydantów zastosowany osobno. Efekt ten był widoczny przy stężeniach KIO_3 15 mM i 10 mM (w Eksperymentcie I), a po użyciu dodatkowych stężeń w Eksperymentcie II w zakresie stężeń od 18.75 mM do 8.75 mM. Ten kumulacyjny efekt ochronny melatoniny+IPA był szczególnie zauważalny przy wyższych stężeniach KIO_3 , tj. przy 18.75 mM i 17.5 mM, przy których ani melatonina, ani IPA użyte osobno nie wykazywały działania protekcyjnego.

Podobnie jak wykazano w pracy oryginalnej 1, także w omawianym badaniu potwierdzono, że melatonina nie zmienia podstawowej peroksydacji lipidów, podczas gdy zarówno IPA, jak i melatonina+IPA obniżyły podstawową peroksydację lipidów.

Praca oryginalna 3

Poziom podstawowej peroksydacji lipidów był niższy w tkance jajnika niż w pozostałych badanych tkankach, co potwierdzono statystycznie w odniesieniu do tkanki tarczycy, śledziony, wątroby i nerki. Z kolei poziom podstawowej peroksydacji lipidów był wyższy w śledzionie niż w innych tkankach (istotność statystyczna w porównaniu z tkanką tarczycy, jajnika i nerki). Inkubacja w obecności melatoniny obniżyła poziom podstawowej peroksydacji lipidów jedynie w tkance jajnika.

Porównując efekt działania KIO_3 na homogenaty tkanek wieprzowych zaobserwowano, że KIO_3 zwiększa poziom peroksydacji lipidów we wszystkich badanych tkankach (tj. tarczycy, jajnika, śledzionie, wątrobie, mózgu, jelicie cienkim, nerce), z najsilniejszym efektem uszkadzającym stwierdzanym przy stężeniach KIO_3 20 mM, 15 mM i 10 mM. Należy jednak podkreślić, że w tkance tarczycy nie stwierdzono efektu uszkadzającego przy najniższym stężeniu KIO_3 – 5.0 mM. Ponadto poziom LPO indukowany przez KIO_3 w stężeniach 10 mM i 7.5 mM był istotnie niższy w tarczycy niż w innych badanych tkankach (wyłączając tkankę nerki).

Melatonina (w stężeniu 5.0 mM) obniżyła indukowaną przez KIO_3 (10 mM, 7.5 mM i 5.0 mM) peroksydację lipidów we wszystkich badanych tkankach. Ważną obserwacją jest to, że w gruczole tarczowym melatonina wykazywała działanie ochronne także przy wyższym stężeniu KIO_3 , tj. 15 mM. Poziom LPO po inkubacji w obecności KIO_3 +melatonina był istotnie niższy w gruczole tarczowym niż w innych badanych tkankach. Dwie ostatnie obserwacje sugerują, że ochronny efekt melatoniny był najsilniejszy w tkance tarczycy.

WNIOSKI

1. Melatonina i kwas indolo-3-propionowy bardzo wyraźnie obniżają poziom oksydacyjnych uszkodzeń lipidów błon komórkowych spowodowanych działaniem jodanu potasu (KIO_3) użytego w stężeniach odpowiadających fizjologicznym stężeniom jodu w tarczycy.
2. Melatonina i kwas indolo-3-propionowy wywierają kumulacyjny efekt ochronny przed oksydacyjnymi uszkodzeniami lipidów błon komórkowych tkanki tarczycy wywołanymi przez KIO_3 użyty w stężeniach odpowiadających fizjologicznym stężeniom jodu w tarczycy; sugeruje to, że te dwie substancje indolowe powinny być stosowane jednocześnie w celu uzyskania lepszego efektu ochronnego przed stresem oksydacyjnym.
3. W porównaniu z innymi tkankami, gruczoł tarczowy jest mniej wrażliwy na prooksydacyjne działanie KIO_3 . Z drugiej strony, najsilniejsze działanie ochronne melatoniny wykazano właśnie w tkance tarczycy, co sugeruje, że gruczoł ten skuteczniej odpowiada na antyoksydacyjne działanie melatoniny.

WNIOSEK OGÓLNY

Melatonina i kwas indolo-3-propionowy, w szczególności przyjmowane jednocześnie, powinny być rozważane w celu zapobiegania możliwym uszkodzeniom oksydacyjnym w gruczole tarczowym (a także w innych tkankach) wywołanym przez związki jodu stosowane w profilaktyce jodowej.