

Recenzja rozprawy doktorskiej lekarz Pauliny Iwan „Potencjalne ochronne efekty substancji indolowych przed oksydacyjnymi uszkodzeniami lipidów błon komórkowych wywołanymi przez KIO₃ w gruczole tarczowym – badania in vitro”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa dotyczy bardzo ważnego zagadnienia naukowego, mającego duży aspekt praktyczny, jakim jest stres oksydacyjny w gruczole tarczowym oraz znaczenie równowagi między wytwarzaniem a neutralizowaniem reaktywnych form tlenu i wolnych rodników. Proces biosyntezy hormonów tarczycy jest wieloetapowy i obejmuje: aktywny transport jodu, utlenianie jodków, organifikację jodu, sprzęganie jodotyrozyn, pinocytozę koloidu do światła tyreocyta, proteolizę koloidu, uwolnienie hormonów tarczycy do krwioobiegu oraz odjodowanie monojodotyrozyny i dijonotyrozyny. Niezbędnym warunkiem do biosyntezy hormonów tarczycy jest obecność prawidłowego stężenia jodu w krwioobiegu, a następnie jego transport do tyreocyta przy udziale symportera sodowo-jodowego oraz działanie enzymów i H₂O₂ w obrębie tyreocyta. Procesy oksydacyjne są niezbędne do syntezy hormonów tarczycy, tak więc w gruczole tarczowym jest wysoki poziom stresu oksydacyjnego, który może być jeszcze zwiększony przez endogenne i egzogenne pro oksydanty. Badania przeprowadzone w Polsce po awarii elektrowni atomowej w Czarnobylu wykazały niedobór jodu w naszym Kraju oraz związane z tym częstsze występowanie wola. Wprowadzono obligatoryjny model jodowania soli kuchennej polegający na dodawaniu do soli kuchennej jodku potasu (KI). W niektórych państwach jodowanie soli kuchennej oparte jest na dodawaniu jodanu potasu (KIO₃), który jest bardziej stabilny, ale wykazuje silniejsze właściwości prooksydacyjne niż KI. Programy profilaktyki jodowej są niezbędne dla prawidłowego funkcjonowania gruczołu tarczowego i

zapobiegania zespołowi zaburzeń z niedoboru jodu, ale niosą ze sobą potencjalne ryzyko nasilenia stresu oksydacyjnego w gruczole tarczowym, ale także w wielu innych narządach. W obniżaniu poziomu stresu oksydacyjnego ważną rolę odgrywają związki indolowe (w tym głównie melatonina, a także kwas indolo-3-propionowy [IPA]), które są istotnymi antyoksydantami i zmiataczami wolnych rodników. Biorąc pod uwagę przedstawione powyżej fakty należy uznać, że temat podjęty przez doktorantkę odnosi się do bardzo istotnych zagadnień tyreologicznych, a szerzej mówiąc endokrynologicznych.

Praca liczy 85 stron, zawiera wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, streszczenie w języku polskim i angielskim, prace tworzące cykl publikacji, komentarz do cyklu prac w języku polskim i angielskim oraz oświadczenia współautorów.

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską:

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 zarówno w języku polskim jak i angielskim napisane jest prawidłowo. Doktorantka streszcza informacje zawarte w jej publikacjach, będące istotą jej badań. Wspomina o znaczeniu stresu oksydacyjnego w gruczole tarczowym, który może prowadzić do szeregu chorób tego gruczołu, w tym raka tarczycy. Podkreśla znaczenie jodu w biosyntezie hormonów tarczycy, wskazuje na następstwa niedoboru tego pierwiastka i korzyści płynące z suplementacji jodu. Wskazuje także, że w programach profilaktyki jodowej wykorzystywany jest zarówno KI jak i KIO₃. Podkreśla, że jodan potasu ma silniejsze właściwości prooksydacyjne. Doktorantka wskazuje, że związki indolowe takie jak melatonina i IPA są efektywnymi antyoksydantami i zmiataczami wolnych rodników.

Cele pracy zostały jasno przedstawione w 3 punktach:

1. 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 levelsof lipid peroxidation induced by potassium iodate in porcine thyroid. Int J Vitam Nutr Res. 2021;91:271-277).

2. 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).

3. Porównanie ochronnego działania 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)).

Materialy 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), 17 β -estradiolu (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.

Ta część pracy została również dobrze napisana.

Wyniki badań przedstawione są w trzech opublikowanych pracach, są dobrze udokumentowane i zilustrowane.

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 uszkadzający 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 KIO₃ (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 autorzy zdecydowali 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 KIO₃ peroksydacji lipidów, podczas gdy melatonina, zastosowana w tym samym stężeniu (tj. 1.0 mM), istotnie obniżyła poziom peroksydacji lipidów wyindukowanej przez KIO₃ (7.5 mM).

Praca oryginalna 2

W eksperymencie I, IPA (10 mM) i melatonina (5.0 mM) użyte osobno, obniżyły poziom peroksydacji lipidów wyindukowanej przez KIO₃ w stężeniach 10 mM, 7.5 mM i 5.0 mM. Jednakże w eksperymencie II, po zastosowaniu

dodatkowych stężeń KIO₃ 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 KIO₃ 15 mM). Dodatkowo, efekt ochronny wywołany przez IPA był silniejszy w porównaniu z działaniem wywołanym przez melatoninę przy stężeniach KIO₃ 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 KIO₃ 15 mM i 10 mM (w eksperymencie I), a po użyciu dodatkowych stężeń w eksperymencie II w zakresie stężeń od 18.75 mM do 8.75 mM. Ten kumulacyjny efekt ochronny melatoniny+IPA był szczególnie zauważalny przy wyższych stężeniach KIO₃, 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 KIO₃ na homogenaty tkanek wieprzowych zaobserwowano, że KIO₃ zwiększa poziom peroksydacji lipidów we wszystkich badanych tkankach (tj. tarczycy, jajnika, śledzionie,

wątrobie, mózgu, jelicie cienkim, nerce), z najsilniejszym efektem uszkadzającym stwierdzanym przy stężeniach KIO₃ 20 mM, 15 mM i 10 mM. Należy jednak podkreślić, że w tkance tarczycy nie stwierdzono efektu uszkadzającego przy najniższym stężeniu KIO₃ – 5.0 mM. Ponadto poziom LPO indukowany przez KIO₃ 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 KIO₃ (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 KIO₃, tj. 15 mM. Poziom LPO po inkubacji w obecności KIO₃+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.

W wyniku przeprowadzonych badań doktorantka wyciągnęła trzy **wnioski szczegółowe i jeden ogólny**, które znajdują uzasadnienie w przeprowadzonych badaniach:

1. Melatonina i kwas indolo-3-propionowy bardzo wyraźnie obniżają poziom oksydacyjnych uszkodzeń lipidów błon komórkowych spowodowanych działaniem jodanu potasu (KIO₃) 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 KIO₃ 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 KIO₃. 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.

Komentarz do cyklu prac w języku polskim i angielskim zawiera wstęp (pokrywający się z przedstawionym wcześniej streszczeniem), cele pracy, materiał i metody, wyniki, dyskusję oraz wnioski. **Dyskusja** jest nowym elementem komentarza, zajmuje 6 stron maszynopisu, jest ciekawa, odnosząca się do istotnych zagadnień niedoboru jodu, metod profilaktyki jodowej i potencjalnych zagrożeń wynikających z suplementacji jodem. Doktorantka sprawnie wykorzystuje dostępne piśmiennictwo do analizowania wyników swoich badań. Uzyskane wyniki potwierdzają hipotezę, że w warunkach fizjologicznych poziom stresu oksydacyjnego w tarczycy jest znacznie wyższy niż w innych tkankach, co wynika faktu, że reakcje oksydacyjne są niezbędne do syntezy hormonów tarczycy. Doktorantka podkreśla, że wywołana przez jodan potasu peroksydacja lipidów w homogenatach tarczycy wieprzowej jest prawdopodobnie efektem bezpośredniego działania oksydacyjnego tego związku na błony komórkowe. Uzyskane wyniki potwierdziły potencjalną toksyczność jodanu dla tarczycy, choć szkodliwość tego związku nie została do tej pory potwierdzona w badaniach u ludzi. Przeprowadzone przez doktorantkę badania

potwierdziły również istotne ochronne działanie melatoniny, która obniża poziom peroksydacji lipidów indukowany przez jodan potasu. Melatonina stymuluje także enzymy antyoksydacyjne, w tym peroksydazę glutationową, reduktazę glutationową, dysmutazę ponadtlenkową i katalazę, pobudza syntezę glutationu oraz współdziała ze zmiataczami wolnych rodników. Autorka jednocześnie podkreśla, że uzyskane wyniki badań *in vitro* dotyczące ochronnego działania samej melatoniny oraz melatoniny stosowanej razem z IPA, nie można bezpośrednio przenosić na badania *in vivo*. Bardzo istotnym wynikiem badań doktorantki jest wykrycie, że efekty prooksydacyjne KIO₃ nie były zmniejszane przez melatoninę lub IPA przy stężeniach jodanu potasu zarówno wyższych jak i niższych od stężeń fizjologicznych jodu w tarczycy.

Piśmiennictwo prawidłowo cytowane w każdej z trzech prac cyklu. Dodatkowo na końcu pracy autorka umieściła 23 pozycje piśmiennictwa dotyczące omawianego zagadnienia.

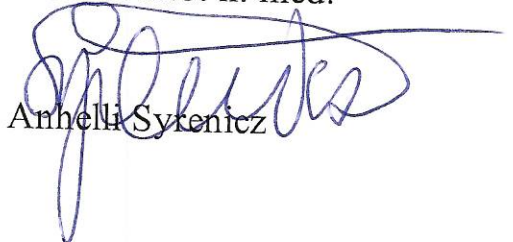
W ostatniej części pracy doktorantka zamieściła **oświadczenie** swojego udziału i innych autorów w przeprowadzonych badaniach, wskazując na 60% udział własny w przeprowadzonych eksperymentach.

Z ogólnych uwag recenzenta, proponowałbym zamieszczenie **podrozdziału skróty** użyte w pracy co może przyczynić się do łatwiejszej analizy prezentowanych badań.

Podsumowanie: przedstawiona mi do recenzji rozprawa spełnia wszelkie wymogi rozprawy na stopień doktora nauk medycznych, przeto wnoszę do Rady Naukowej Instytutu „Centrum Zdrowia Matki Polki” w Łodzi o dopuszczenie lekarz Pauliny Iwan do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Równocześnie wnioskuję o wyróżnienie pracy z uwagi na jej nowatorski charakter w skali krajowej i międzynarodowej. Badania zostały opublikowane w czasopiśmie z IF oraz rzucają nowe światło na problemy wpływu suplementacji jodowej na

procesy stresu oksydacyjnego w gruczole tarczowym i możliwości ich zapobiegania przy zastosowaniu związków indolowych, w tym szczególnie melatoniny.

Prof. dr hab. n. med.


Anieli Syrenicz

