

Prof. dr hab. n. med. Jan Komorowski
ul. Junacka 14
92-109 Łódź

Ocena rozprawy na stopień doktora nauk medycznych

lek. med. Pauliny Iwan

pt.: „Potencjalne ochronne efekty substancji indolowych przed oksydacyjnymi uszkodzeniami lipidów błon komórkowych wywołanymi przez KIO_3 w gruczole tarczowym - badania *in vitro*”

Reaktywne formy tlenu (RFT) odgrywają kluczową rolę w podstawowych procesach biologicznych zachodzących w organizmie ludzkim zarówno w stanie zdrowia, jak i choroby. W sytuacji określonej mianem „stresu oksydacyjnego” dochodzi do zaburzenia równowagi pomiędzy tempem powstawania RFT a wydolnością układu antyoksydacyjnego. Reaktywne formy tlenu powodują utlenienie tłuszczów, białek, DNA, a co za tym idzie, mogą przyczynić się do uszkodzenia tkanek. Toksyczne produkty reakcji utleniania wywierają działanie cytostatyczne na komórkę, doprowadzają do uszkodzenia błon komórkowych i aktywują mechanizmy apoptozy. Stan równowagi komórek jest utrzymywany przez enzymy oraz takie substancje, jak glutation, witaminy E, C i A czy tioredoksyna. Związki te umożliwiają usuwanie nadmiaru RFT z komórki. Działania zmierzające do zmniejszenia stresu oksydacyjnego w komórkach organizmu mogą skutkować poprawą kliniczną chorych, natomiast nadmierna produkcja wolnych rodników jest pierwotną przyczyną lub wtórnym powikłaniem choroby.

Do chorób, w których stres oksydacyjny odgrywa kluczową rolę, zalicza się między innymi choroby układu krążenia, neurodegeneracyjne, choroby zapalne czy nowotworowe.

Procesy oksydacyjne odgrywają istotną rolę w powstawaniu hormonów tarczycy, a zewnątrzpochodne i wewnątrzpochodne czynniki (peroksydanty) działające na gruczoł tarczowy mogą wywoływać różne jego stany chorobowe, w tym raka tarczycy.

Jod jest niezbędnym czynnikiem w syntezie hormonów tarczycy. Fizjologiczne stężenie jodu w gruczole tarczowym, przy odpowiedniej jego podaży, wynosi ok. 9 mM. Niedobór tego czynnika może powodować niekorzystne skutki zdrowotne, szczególnie u kobiet w ciąży. Regularnie stosowana suplementacja jodu umożliwia właściwe wytwarzanie hormonów tarczycy, wywiera działanie antywolotwórcze oraz zmniejsza występowanie bardziej agresywnych postaci raka tarczycy.

Dodawanie do soli kuchennej jodku potasu (KI) lub jodanu potasu (KIO_3) stanowi najczęstszą metodę profilaktyki niedoboru jodu. Oba wymienione związki, choć uznane za bezpieczne, cechują się różnymi właściwościami prooksydacyjnymi.

Melatonina (5-metoksy-N-acetyltryptamina) oraz strukturalnie do niego podobny kwas indolo-3-propionowy (IPA) uznawane są za bezpieczne w stosowaniu u ludzi, należą do tych związków indolowych, które wykazują silne działanie antyoksydacyjne i są zmiataczami wolnych rodników. Melatonina jest uznanym czynnikiem ochronnym przed różnymi chorobami tarczycy, także jako czynnik ant-nowotworowy gruczołu tarczowego.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska lekarza Pauliny Iwan składa się z wykazu publikacji składającą się na rozprawę doktorską, streszczenia w j. polskim i angielskim, odbitek trzech prac stanowiących cykl publikacji, komentarza do tych prac w języku polskim i angielskim oraz oświadczenia współautorów o ich indywidualnym wkładzie w powstaniu publikacji.

Założenia i wyniki przeprowadzonych badań przez doktorantkę są zawarte w 3 publikacjach składających się na rozprawę doktorską. W/w prace zostały wydrukowane w wysoko rankingowanych, międzynarodowych czasopismach naukowych w 2021 r: [1] **Int J Vitam Nutr Res** (IF: 2,560, punkty ministerialne: 100), [2] **Toxics** (IF: 4,472, punkty ministerialne: 70) oraz [3] **Life** (Basel) (+ Erratum w 2022 r), (IF: 3,253; punkty ministerialne: 70). Sumaryczny IF: 10,285. Suma punktów ministerialnych: 240. We wszystkich zespołowych publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem, a jej udział w realizacji tych prac jest szacowany na 60%.

Celem pierwszej pracy była ocena potencjonalnego działania ochronnego melatoniny przed oksydacyjnymi uszkodzeniami lipidów błon komórkowych (peroksydacją lipidów) indukowanymi przez KI oraz KIO₃ w homogenatach tarczycy wieprzowej.

Celem drugiej pracy było zbadanie ochronnego wpływu kwasu indolo-3-propionowego (IPA) oraz efektów łącznego zastosowania melatoniny i IPA (w najwyższych możliwych stężeniach *in vitro*) przed peroksydacją lipidów wyindukowaną przez KIO₃ w homogenatach tarczycy wieprzowej.

Celem trzeciej pracy było porównanie ochronnego działania melatoniny przed wyindukowanymi przez KIO₃ oksydacyjnymi uszkodzeniami lipidów błon komórkowych w tkance tarczycy i w innych tkankach zwierzęcych (jajnik, śledziona, wątroba, mózg, jelito cienkie i nerka).

Wszystkie eksperymenty badawcze zostały przeprowadzone w warunkach *in vitro*, z użyciem homogenatów tkanek wieprzowych tarczycy (prace oryginalne: 1, 2, 3) oraz dodatkowo: jajnik, śledziona, wątroba, mózg, jelito cienkie i nerka (praca oryginalna 3).

W eksperymentach badawczych użyto KI, KIO₃, melatoninę, 17β-estradiol oraz IPA w stężeniach wybranych na podstawie wyników wcześniej opublikowanych doświadczeń przez zespół pracowników naukowych Zakładu Endokrynologii Onkologicznej w Łodzi. Stężenie dialdehydu malonowego+4-hydroksyalkenali (MDA+4-HDA) jako wskaźnika peroksydacji lipidów, zmierzono spektrofotometrycznie z użyciem *ALDetect Lipid Peroxydation Assay Kit*. W analizie statystycznej uzyskanych wyników wykorzystano: test jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), test Neuman-Keuls lub t-test dla dwóch prób niezależnych.

Wyniki uzyskane w pracy 1 wykazały, że zarówno jodek potasu (KI) jak i jodan potasu (KIO₃) podwyższyły poziom peroksydacji lipidów. Po inkubacji homogenatów z KIO₃ lub KI łącznie z melatoniną (5,0 mM), obniżenie poziomu peroksydacji lipidów

stwierdzono wyłącznie w przypadku KIO_3 użytego w stężeniu 10 mM. Po zwiększeniu stężeń KIO_3 zbliżonych do 15 mM stwierdzono najsilniejszy efekt uszkodzający lipidy błon komórkowych. Melatonina w stężeniach 5,0 mM i 2,5 mM zredukowała wyindukowaną przez KIO_3 (w stężeniach 10 mM i 7,5 mM co odpowiada fizjologicznemu stężeniu jodu w tarczycy wyliczonemu na ok. 9,0 mM) peroksydację lipidów. Inkubacja homogenatów tarczycy wyłącznie z melatoniną (stężenia od 5,0 do 0,25 mM) nie zmieniała podstawowej peroksydacji lipidów. Zbadano kontrolnie również inny czynnik antyoksydacyjny- 17β -estradiol, który nie wykazywał korzystnych efektów wobec indukowanej przez KIO_3 peroksydacji lipidów.

Wniosek z tych eksperymentów potwierdza przypuszczenie, że w tarczycy melatonina wykazuje antyoksydacyjne działanie w obecności fizjologicznych stężeń jodanu potasu.

Wyniki badań uzyskane w 2 pracy wskazują na to, że kwas indolo-3-propionowy (IPA) i melatonina zastosowane osobno, obniżają poziom peroksydacji lipidów wyindukowany przez KIO_3 w stężeniach 10 mM, 7,5 mM i 5,0 mM. Po zastosowaniu dodatkowo większych stężeń KIO_3 (16,25 mM) wykazano, że IPA wywołuje silniejszy efekt ochronny w porównaniu z efektem ochronnym melatoniny.

W tych badaniach najważniejszą obserwacją było to, że melatonina użyta łącznie z IPA wykazywała silniejsze działanie niż każdy z antyoksydantów oddzielnie. Efekt ten ujawnił się przy stężeniach KIO_3 w szerokim zakresie stężeń od 18,5 mM do 8,75 mM. To zjawisko zaobserwowano 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.

Poziom podstawowej peroksydacji lipidów był niższy w tkance jajnika niż w pozostałych badanych tkankach (tarczycy, śledziony, wątroby i nerki). Natomiast poziom peroksydacji lipidów był wyższy w śledzionie niż w innych tkankach. Inkubacja w obecności melatoniny obniżyła poziom podstawowej peroksydacji lipidów jedynie w tkance jajnika.

W badanych homogenatach tkanek wieprzowych zaobserwowano, że KIO_3 zwiększa poziom peroksydacji lipidów w tarczycy, śledzionie, wątrobie, mózgu, jelicie cienkim i nerce. 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, a w gruczole tarczowym melatonina wykazywała także działanie ochronne przy wyższym stężeniu KIO_3 (15 mM). Ujawniono, że w porównaniu z innymi tkankami, gruczoł tarczowy jest mniej wrażliwy na peroksydacyjne działanie KIO_3 .

W rozprawie doktorskiej przedstawione są trzy wnioski szczegółowe, które właściwie podsumowują wyniki cyklu prac, ale za najważniejszy uważam czwarty wniosek ogólny, który brzmi jak następuje:

„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”.

Za kluczowy rozdział w rozprawie doktorskiej uważam komentarz do cyklu prac, w którym doktorantka rozważa wyniki uzyskanych i opublikowanych badań.

Uwaga techniczna - w języku polskim, w ułamkach dziesiętnych, stosuje się przecinek a nie kropkę tak jak w j. angielskim (tutaj: dla wartości stężeń stosowanych roztworów, IF i tzw. punktów ministerialnych).

W podsumowaniu uważam, że uzyskane przez doktorantkę wyniki są nowatorskie i oryginalne oraz potencjalnie aplikacyjne.

Stwierdzam, że rozprawa doktorska lek. Pauliny Iwan pt.: „**Potencjalne ochronne efekty substancji indolowych przed oksydacyjnymi uszkodzeniami lipidów błon komórkowych wywołanymi przez KIO_3 w gruczole tarczowym-badania *in vitro***” spełnia warunki i wymagania dla prac na stopień doktora nauk medycznych. Stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wykazuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydatki oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. W związku z powyższym wnioskuję o dopuszczenie lek. Pauliny Iwan do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na uzyskanie wielu nowatorskich wyników oraz przyszłe możliwości aplikacyjne wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Lódź, dnia 29 kwietnia 2023 roku



Prof. dr hab. n. med. Jan Komorowski

Prof. dr hab. med.
Jan Komorowski
lek. spec. chorób wewnętrznych
endokrynolog
6068197