

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
"IULIU HAȚIEGANU" CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE MEDICINĂ

# **IMPLICAȚIILE STRESULUI OXIDATIV ÎN HIPO-ȘI HIPERTIROIDISM**

-Rezumatul tezei de doctorat-

Conducător științific,  
Prof.Dr.Ileana Duncea

Doctorand,  
Mirela Sanda Petrulea

CLUJ-NAPOCA  
2013

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	15
<b>STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Stresul oxidativ și speciile reactive ale oxigenului</b>	19
1.1. Stres oxidativ. Definiție	19
1.2. Speciile reactive ale oxigenului	19
1.2.1. Definiția speciilor reactive ale oxigenului	19
1.2.2. Clasificarea speciilor reactive ale oxigenului	20
1.2.3. Efectele speciilor reactive ale oxigenului	23
asupra organismului	
<b>2. Sistemele antioxidante</b>	26
2.1. Sisteme antioxidante enzimatic	28
2.2. Sisteme antioxidante neenzimatic	31
<b>3. Hipertiroidismul</b>	33
3.1. Etiologie	33
3.2. Boala Basedow-Graves	35
3.2.1. Tablou clinic	35
3.2.2. Explorări de laborator	37
3.2.3. Tratament	37
<b>4. Hipotiroidismul</b>	38
4.1. Definiție	38
4.2. Etiologie	38
4.3. Tablou clinic	40
4.4. Explorări paraclinice	40
4.5. Tratament	41
<b>5. Implicațiile stresului oxidativ în hipo-și hipertiroidism</b>	42
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteza de lucru. Obiective</b>	47
<b>2. Metodologie generală</b>	49
2.1. Animale utilizate	49
2.2. Metode utilizate	50
2.3. Analiza statistică	53
2.4. Aprobarea etică	54
<b>3. Studiul 1</b>	55
<b>Balanța oxidanți-antioxidanți în hipertiroidismul experimental</b>	
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru. Obiective	56
3.3. Material și metodă	57

3.4. Rezultate	58
3.5. Discuții	60
3.6. Concluzii	64
<b>4. Studiul 2</b>	
<b>Efectul administrării de vitamina E asupra stresului oxidativ indus de administrarea Tiroxinei</b>	65
4.1. Introducere	65
4.2. Ipoteza de lucru.Obiective	65
4.3. Material și metodă	66
4.4. Rezultate	67
4.5. Discuții	71
4.6. Concluzii	72
<b>5. Studiul 3</b>	
<b>Balanța oxidanți-antioxidanți în hipotiroidismul experimental: efectul administrării de vitamina E</b>	73
5.1. Introducere	73
5.2. Ipoteza de lucru.Obiective	74
5.3. Material și metodă	74
5.4. Rezultate	75
5.5. Discuții	77
5.6. Concluzii	80
<b>6. Studiul 4</b>	
<b>Statusul oxidant-antioxidant în boala Basedow-Graves</b>	81
6.1. Introducere	81
6.2. Ipoteza de lucru.Obiective	82
6.3. Material și metodă	82
6.4. Rezultate	84
6.5. Discuții	88
6.6. Concluzii	90
<b>7. Studiul 5</b>	
<b>Efectul administrării de vitamina E asupra stresului oxidativ în boala Basedow-Graves</b>	91
7.1. Introducere	91
7.2. Ipoteza de lucru.Obiective	92
7.3. Material și metodă	92
7.4. Rezultate	94
7.5. Discuții	97
7.6. Concluzii	99
<b>8. Studiul 6</b>	
<b>Statusul oxidant-antioxidant la pacienți cu hipotiroidism autoimun</b>	101

8.1. Introducere	101
8.2. Ipoteza de lucru.Obiective	102
8.3. Material și metodă	102
8.4. Rezultate	104
8.5. Discuții	109
8.6. Concluzii	112
<b>9. Concluzii generale</b>	113
<b>10.Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei</b>	114
<b>REFERINȚE</b>	115

**Cuvinte cheie:** stres oxidativ, specii reactive ale oxigenului, hipertiroidism, hipotiroidism, vitamina E

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Tot mai multe studii de specialitate subliniază ca hipertiroidismul este asociat cu o producție crescută de specii reactive ale oxigenului în timp ce hipotiroidismul este asociat cu diminuarea producției de radicali liberi ai oxigenului. Recent, unele studii au arătat o creștere a stresului oxidativ în hipotiroidism. Efectele hipo- și hipertiroidismului asupra capacității de apărare antioxidantă au fost mult studiate dar rezultatele sunt mai curând contradictorii.

Scopul cercetării de față a fost de a demonstra implicarea stresului oxidativ în hipo-și hipertiroidism și nuanțarea terapiei adresată acestor afecțiuni prin asocierea unei terapii antioxidante.

### Studiul experimental

Studiul experimental are ca scop cercetarea implicațiilor stresului oxidativ în hipo- și hipertiroidism , având următoarele obiective:

1. Realizarea unui model experimental de hipertiroidism pe care să se poată studia modificările balanței oxidanți-antioxidanți.
2. Studiul efectului administrării de vitamina E asupra parametrilor stresului oxidativ și ai apărării antioxidante în hipertiroidismul experimental.
3. Realizarea unui model experimental de hipotiroidism pe care să se poată studia modificările balanței oxidanți-antioxidanți.
4. Studiul efectului administrării de vitamina E asupra stresului oxidativ din ser, tiroidă și ficat în hipotiroidismul experimental.

## **Metodologie generală**

Studiul experimental s-a efectuat în Centrul de Cercetare al Catedrei de Fiziologie a Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu", în anul 2008. În acest studiu s-au utilizat șobolani albi, de sex masculin, rasa Wistar cu greutatea medie de 220-240 gr. Animalele au provenit de la Biobaza Universității de Medicină și Farmacie "Iuliu Hațieganu" din Cluj-Napoca. După ce au fost transferate în biobaza Catedrei de Fiziologie au fost menținute la temperatura camerei de 23-24<sup>0</sup>C, cu un ciclu lumină-întuneric de 12 ore (folosind lumină albă artificială 200 lux). Au beneficiat de dietă normocalorică, standardizată și apă ad libitum.

Studiul experimental s-a desfășurat pe 50 de animale, împărțite în 5 loturi egale, timp de 30 de zile.

1. Lotul I- martor
2. Lotul II - animale tratate cu L-Thyroxină 10 μg/animal/zi
3. Lotul III -animale tratate cu L-Thyroxină și cu vitamina E
4. Lotul IV- animale tratate cu Propiltiouracil 5 mg/100 gr.g./zi
5. Lotul V - animale tratate cu Propiltiouracil și cu vitamina E

În ziua 30, după sedare și inhalare de alcool etilic, s-a recoltat sânge din sinusul retroorbital pentru determinarea parametrilor de stres oxidativ. Ulterior animalele au fost sacrificate prin dislocare cervicală. În vederea efectuării analizelor biochimice, s-au prelevat următoarele organe: glanda tiroidă și ficat.

### *Determinarea parametrilor de stres oxidativ*

Din ser s-au determinat : malondialdehida totală (nmol/ml) și proteinele carbonilate (nmol/mg proteină) ca și indicatori ai stresului oxidativ ; grupările sulfhidril (μmol/ml), glutationul redus (nmol/ml) și superoxid-dismutaza(U/g proteină) ca și indicatori ai apărării antioxidante.

Din omogenatul tiroidian și hepatic s-au determinat : malondialdehida totală, proteinele carbonilate , grupările sulfhidril și glutationul redus.

Parametrii stresului oxidativ și ai apărării antioxidante au fost dozați la Laboratorul de Explorare al Stresului Oxidativ al Catedrei de Fiziologie.

## **Analiza statistică**

Rezultatele obținute în urma studiului au fost organizate într-o bază de date și prelucrate statistic, folosindu-se testele ANOVA, testul nonparametric Mann-Whitney/Wilcoxon , Kruskal-Wallis, coeficientul de corelație Spearman. Prezentarea datelor a fost realizată sub forma tabelelor și graficelor cu ajutorul programului Excel.

## **Studiul 1. Balanța oxidanți-antioxidanți în hipertiroidismul experimental**

### **Rezultate:**

În urma analizei statistice comparative efectuate pe baza rezultatelor obținute din ser, s-au observat valori semnificativ crescute ( $p < 0.001$ ) ale tiroxinei libere ( $FT_4$ ) la lotul cu hipertiroidism față de lotul martor. La animalele tratate cu L-Tiroxină, MDA nu a înregistrat modificări semnificative față de lotul martor. În schimb, concentrația proteinelor carbonilate a crescut semnificativ ( $p = 0.0001$ ) față de lotul martor. Parametrii apărării antioxidante (grupările SH, SOD și GSH redus) au scăzut semnificativ în plasma animalelor cu hipertiroidism în comparație cu lotul martor. În omogenatele tiroidiene ale animalelor tratate cu Tiroxină, valorile MDA au fost semnificativ scăzute iar valorile proteinelor carbonilate nu au înregistrat modificări semnificative în comparație cu cele din lotul martor. S-a observat o creștere semnificativă ( $p < 0.001$ ) a grupărilor sulfhidril și o scădere semnificativă a GSH. Administrarea L-Tiroxinei a determinat scăderea semnificativă ( $p < 0.001$ ) a malondilaldehidei și a GSH ( $p < 0.001$ ) în țesutul hepatic al șobolanilor cu hipertiroidism. Proteinele carbonilate și grupările SH, în schimb nu s-au modificat.

## **Studiul 2. Efectul administrării de vitamina E asupra stresului oxidativ indus de administrarea Tiroxinei**

### **Rezultate:**

În urma analizei statistice comparative efectuate pe baza rezultatelor obținute din ser, s-a observat scăderea valorilor  $FT_4$ , la lotul cu hipertiroidism protejat cu vitamina E față de lotul cu hipertiroidism indus. La animalele cu hipertiroidism suplimentate cu vitamina E, MDA și PC au crescut semnificativ ( $p < 0.05$ ) față de lotul cu hipertiroidism. Administrarea vitaminei E a determinat scăderea semnificativă ( $p < 0.001$ ) a parametrilor apărării antioxidante la nivel seric. Administrarea vitaminei E a determinat creșterea semnificativă a peroxizilor lipidici în omogenatul hepatic al șobolanilor cu hipertiroidism. PC nu au înregistrat modificări semnificative. Grupările SH au crescut semnificativ la nivelul țesutului hepatic al animalelor protejate cu vitamina E.

## **Studiul 3. Balanța oxidanți-antioxidanți în hipotiroidismul experimental: efectul suplimentării cu vitamina E**

### **Rezultate:**

La șobolanii cu hipotiroidism indus prin administrare de Propiltiouracil, valorile MDA nu au înregistrat modificări semnificative față de lotul martor, în plasmă, țesutul tiroidian și hepatic.

Nivelele proteinelor carbonilate au crescut semnificativ ( $p < 0.05$ ) în plasma și țesutul tiroidian al animalelor cu hipotiroidism.

Suplimentarea cu vitamina E a crescut semnificativ proteinele carbonilate (PC) în serul animalelor cu hipotiroidism și a crescut MDA în țesutul hepatic.

Parametrii apărării antioxidante (grupările tiol, GSH, SOD) în serul animalelor cu hipotiroidism nu au diferit semnificativ față de lotul martor.

S-a constatat că animalele din lotul cu hipotiroidism au prezentat o creștere semnificativă a grupărilor tiol și o scădere semnificativă a glutatationului redus în omogenatul tiroidian. În țesutul hepatic GSH a scăzut semnificativ.

Administrarea de vitamina E a determinat scăderea semnificativă a valorilor parametrilor statusului antioxidant (SH, SOD, GSH) în plasmă. Grupările tiol au scăzut semnificativ în țesutul tiroidian al animalelor protejate cu vitamina E și au crescut în țesutul hepatic.

**Studiul clinic** are ca scop cercetarea implicațiilor stresului oxidativ în etiopatogenia hipertiroidismului și a hipotiroidismului, având următoarele obiective:

1. Studiarea balanței oxidanți-antioxidanți la pacienți cu Boala Basedow-Graves.
2. Studiul efectului terapiei cu antitiroidiene de sinteză asupra dinamicii parametrilor de SO la pacienți cu boala Basedow.
3. Studiul efectului suplimentării cu un preparat antioxidant la tratamentul bolii Basedow-Graves, asupra markerilor de stres oxidativ și a valorilor hormonilor tiroidieni.
4. Studiarea statusului oxidant-antioxidant la pacienți cu hipotiroidism autoimun.

#### **Studiul 4. Statusul oxidant/antioxidant în Boala Basedow-Graves**

##### **Material și metodă:**

Studiul s-a desfășurat în perioada 2008-2012 în Clinica Endocrinologie, Cluj-Napoca pe un număr de 30 de pacienți recent diagnosticați și netratați cu boala Basedow-Graves. Diagnosticul a fost stabilit pe criterii clinice, biochimice și pe baza explorărilor funcționale (ecografie tiroidiană, scintigrafie tiroidiană).

Pacienții au fost evaluați atât la momentul diagnosticului, cât și la 6 săptămâni după tratament.

Grupul de control a fost format din 12 pacienți cu profil hormonal tiroidian normal, fără alte afecțiuni asociate.

Terapia cu antitiroidiene de sinteză- s-a efectuat cu Thyrozol cu doze progresiv descrescătoare; Terapia cu betablocante- s-a efectuat cu Metoprolol în doză de  $2 \times 50$  mg/zi, timp de 6 săptămâni.

*Din ser* s-au dozat: (1) parametrii stresului oxidativ : malondialdehida totală (nmol/ml) și proteinele carbonilate (nmol/mg proteine);(2) parametrii apărării antioxidante : glutatationul redus (nmol/ml) ; profilul hormonal tiroidian (TSH, FT<sub>4</sub>)

## **Rezultate:**

Valorile MDA , markerul peroxidării lipidice la pacienții cu boala Basedow la debut, au fost semnificativ crescute în comparație cu cele ale subiecților sănătoși ( $p < 0.0001$ ). După administrarea de ATS, MDA a crescut ne semnificativ față de lotul cu pacienți fără tratament ( $p = 0.07$ ).

PC au crescut ne semnificativ la pacienții netratați cu boala Basedow ( $p = 0.36$ ) și de asemenea au crescut dar fără semnificație statistică după administrarea de ATS ( $p = 0.38$ ).

Glutacionul redus (GSH) a prezentat o creștere semnificativă la pacienții cu boala Basedow, față de grupul de control ( $p < 0.001$ ). La pacienții care au urmat tratament cu ATS și betablocante, valorile GSH au crescut semnificativ.

Pacienții tratați cu Thyrozol comparați cu pacienții din lotul martor încă au prezentat valori semnificativ crescute ale  $FT_4$  ( $p < 0.001$ ), valori scăzute ale TSH-ului ( $p < 0.001$ ) și valori semnificativ crescute ale parametrilor studiați (MDA ;  $p < 0.0001$  PC, GSH ;  $p < 0.001$ ).

## **Studiul 5. Efectul administrării de vitamina E asupra stresului oxidativ în Boala Basedow-Graves**

Boala Basedow-Graves este o afecțiune autoimună și cea mai frecventă cauză de hipertiroidism. Concentrațiile crescute de hormoni tiroidieni modifică metabolismul oxidativ celular, determinând formarea de specii reactive ale oxigenului. Suplimentarea cu antioxidanți poate reduce stresul oxidativ în hipertiroidism și a fost demonstrat că crește rata de obținere a stării de eutiroidie atunci când se administrează concomitent cu ATS în boala Graves nou diagnosticată.

### **Material și metodă:**

Studiul s-a desfășurat în perioada 2009-2012 în Clinica Endocrinologie, Cluj-Napoca pe un număr de 43 de pacienți recent diagnosticați și netratați cu boala Basedow-Graves. S-au constituit trei loturi: un lot martor format din 12 femei cu profil hormonal tiroidian normal fără alte afecțiuni asociate, un lot format din 23 de pacienți cu boala Basedow, nou-diagnosticați care au primit tratament cu ATS timp de 6 săptămâni și un lot format din 20 de pacienți cu boala Basedow, nou-diagnosticați care au primit tratament cu ATS + vitamina E.

*Din ser s-au dozat:* (1) parametrii stresului oxidativ : malondialdehida totală (nmol/ml) și proteinele carbonilate (nmol/mg proteine); (2) parametrii apărării antioxidante : glutacionul redus (nmol/ml) ; profilul hormonal tiroidian (TSH,  $FT_4$ ).

### **Rezultate:**

Pe baza rezultatelor obținute se poate concluziona că pacienții care au primit vitamina E, au prezentat o scădere semnificativă diferită a valorilor  $FT_4$  și o creștere diferită a activității

TSH în ser, deci au ajuns la starea de eutiroidism mai rapid comparați cu pacienții care au efectuat tratament doar cu ATS. Diferența semnificativă statistic între loturile de pacienți cu boala Basedow tratați cu ATS și cu vitamina E și loturile de pacienți care au efectuat tratament doar cu ATS, privind scăderea concentrației tiroxinei libere( $FT_4$ ) indică efectul favorabil al terapiei suplimentare cu vitamina E.

Valorile MDA serice la pacienții care au urmat tratament cu ATS, betablocante și vitamina E, au scăzut semnificativ( $p=0.03$ ) față de valorile MDA de la pacienții care au efectuat doar tratamentul de bază (ATS și betablocante). În schimb PC au scăzut dar fără semnificație statistică ( $p=0.80$ ). Glutitionul seric (GSH) a scăzut semnificativ la pacienții tratați și cu vitamina E față de pacienții tratați doar cu ATS ( $p<0.01$ ).

## **Studiul 6. Statusul oxidant-antioxidant la pacienți cu hipotiroidism autoimun.**

### **Material și metodă:**

Studiul s-a desfășurat în perioada 2010-2012 în Clinica Endocrinologie, Cluj-Napoca pe un număr de 20 de pacienți recent diagnosticați și netratați cu hipotiroidism primar de cauză autoimună (Tiroidită Hashimoto). Diagnosticul s-a bazat pe prezența de valori crescute ale TSH asociate cu valori scăzute ale  $FT_4$  și valori crescute ale anticorpilor anti-tiroidperoxidază (Ac anti TPO). Pacienții au fost împărțiți în două loturi: un lot martor constituit din 12 femei cu profil hormonal tiroidian normal fără alte afecțiuni asociate și un lot format din 20 de pacienți cu hipotiroidism autoimun, nou-diagnosticați.

*Din ser s-au dozat:* (1) parametrii stresului oxidativ : malondialdehida totală (nmol/ml) și proteinele carbonilate (nmol/mg proteine);(2) parametrii apărării antioxidante :glutitionul redus (nmol/ml) ; profilul hormonal tiroidian (TSH,  $FT_4$ ),și Ac anti TPO.

### **Rezultate:**

Titrul crescut al Ac anti-TPO a confirmat diagnosticul de tiroidită autoimună cronică, iar profilul hormonal tiroidian (TSH crescut,  $FT_4$  scăzut) hipotiroidismul asociat. Valorile MDA și PC au crescut semnificativ la pacienții cu hipotiroidism autoimun, la debut în comparație cu cele ale subiecților eutiroidieni. Rezultatele cercetării noastre au decelat o creștere semnificativă a glutitionului redus seric ( $p<0.001$ ), a colesterolului total seric ( $p<0.0001$ ) și o tendință de creștere a trigliceridelor serice, nesemnificativă statistic ( $p=0.06$ ) la pacientele cu tiroidită Hashimoto cu hipotiroidism, față de subiecții sănătoși.

## Concluzii generale

1.Administrarea de Tiroxină produce o peroxidare puternică a proteinelor și a lipidelor în ser. În omogenatul tiroidian și hepatic, valorile MDA au fost semnificativ scăzute, sugerând reducerea stresului oxidativ.

2.Parametrii apărării antioxidante (grupările SH, GSH, SOD) înregistrează o scădere semnificativă în plasma animalelor cu hipertiroidism indus iar grupările SH scad semnificativ în țesutul tiroidian și rămân nemodificate în țesutul hepatic. Glutacionul redus prezintă o scădere semnificativă în țesutul tiroidian și hepatic al șobolanilor cu hipertiroidism experimental.

3.Administrarea de vitamina E animalelor cu hipertiroidism experimental a determinat scăderea semnificativă a valorilor FT<sub>4</sub> paralel cu stimularea activității grupărilor SH la nivel tiroidian, însă a condus la scăderea celorlalți antioxidanți la nivel seric(SH,GSH,SOD) și hepatic (SH).

4.Administrarea de Propiltiouracil a determinat creșterea proteinelor carbonilate în plasma și țesutul tiroidian al animalelor cu hipotiroidism experimental.

5.Administrarea de vitamina E a determinat scăderea semnificativă a valorilor parametrilor statusului antioxidant (SH, SOD, GSH) în plasma și omogenatul tiroidian (SH) al șobolanilor cu hipotiroidism.

6.Creșterea semnificativă a MDA , markerul peroxidării lipidice, tendința de creștere a PC și creșterea semnificativă a GSH confirmă prezența stresului oxidativ la pacienții cu hipertiroidism datorat bolii Basedow-Graves.

7.Tratamentul cu Thyrozol de scurtă durată, nu influențează semnificativ parametrii sistemului oxidant/antioxidant la pacienții cu boala Basedow .

8.Asocierea unui preparat antioxidant ( vitamina E ) la terapia clasică (ATS+betablocante) a pacienților cu boala Basedow determină scăderea semnificativă a concentrației serice de tiroxină liberă și a indicatorilor prooxidanți (MDA).

9.Rezultatele acestui studiu indică în mod clar faptul că suplimentarea de antioxidanți în tratamentul bolii Basedow-Graves este justificată și reprezintă o abordare terapeutică inovatoare, ca un tratament combinat cu antitiroidiene de sinteză.

10.Am demonstrat prezența stresului oxidativ la pacienții cu tiroidită Hashimoto cu hipotiroidism, prin creșterea semnificativă atât a MDA cât și a PC . La acești pacienți glutacionul redus seric a crescut semnificativ .

11.Am arătat că valorile crescute ale colesterolului total seric se asociază cu amplificarea stresului oxidativ.

## **Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei**

S-a realizat un model experimental de hipertiroidism, prin administrare de Tiroxină, paralel cu un model experimental de hipotiroidism, prin administrare de Propiltiouracil. Aceste modele au permis studierea parametrilor stresului oxidativ precum și efectele administrării unui antioxidant liposolubil în ser și omogenate de organ (glanda tiroidă și ficat).

Implicarea stresului oxidativ în hipertiroidismul datorat bolii Basedow-Graves este cunoscută de mai multi ani în literatura de specialitate. Studiul nostru a demonstrat că administrarea unui antitiroidian de sinteză (Thyrozol) pe o perioadă scurtă de timp nu influențează semnificativ parametrii sistemului oxidant/antioxidant, dar asocierea vitaminei E, terapiei cu ATS și betablocante a determinat scăderea semnificativă a peroxidării lipidice și a tiroxinei libere(FT<sub>4</sub>).

Rezultatele studiului nostru confirmă utilitatea suplimentării de antioxidanți la tratamentul bolii Basedow întrucât s-au evidențiat efecte pozitive asupra dinamicii parametrilor stresului oxidativ și a nivelului seric al FT<sub>4</sub>.

Studiul clinic a decelat că la pacienții cu hipotiroidism de cauză autoimună creșterea semnificativă a colesterolului seric se asociază cu accentuarea statusului oxidativ, evidențiat prin creșterea semnificativă a peroxidării lipidice și proteice.

Considerăm ca o contribuție inovativă a tezei punerea în evidență a efectului favorabil al administrării de antioxidanți la pacienții cu hipertiroidism asupra unor parametrii prooxidanți dar și asupra dinamicii nivelului seric al FT<sub>4</sub>.

"IULIU HAȚIEGANU" UNIVERSITY OF MEDICINE  
AND PHARMACY CLUJ-NAPOCA  
FACULTY OF MEDICINE

# **IMPLICATIONS OF OXIDATIVE STRESS IN HYPO- AND HYPERTHYROIDISM**

-Abstract of the doctoral thesis-

Scientific coordinator,  
Prof. Dr. Ileana Duncea

PhD student,  
Mirela Sanda Petrulea

CLUJ-NAPOCA

## CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>CURRENT STAGE OF KNOWLEDGE</b>	
<b>1. Oxidative stress and reactive oxygen species</b>	19
1.1. Oxidative stress. Definition	19
1.2. Reactive oxygen species	19
1.2.1. Definition of reactive oxygen species	19
1.2.2. Classification of reactive oxygen species	20
1.2.3. Effects of reactive oxygen species	23
<b>2. Sistemele antioxidante</b>	26
2.1. Enzymatic antioxidant systems	28
2.2. Nonenzymatic antioxidant systems	31
<b>3. Hyperthyroidism</b>	33
3.1. Etiology	33
3.2. Basedow-Graves Disease	35
3.2.1. Clinical picture	35
3.2.2. Laboratory explorations	37
3.2.3. Treatment	37
<b>4. Hypothyroidism</b>	38
4.1. Definition	38
4.2. Etiology	38
4.3. Clinical picture	40
4.4. Paraclinical explorations	40
4.5. Treatment	41
<b>5. Oxidative stress implications in hypo- and hyperthyroidism</b>	42
<b>PERSONAL CONTRIBUTION</b>	
<b>1. Working hypothesis. Objectives</b>	47
<b>2. General methodology</b>	49
2.1. Animals	49
2.2. Methods	50
2.3. Statistical analysis	53
2.4. Ethics approval	54
<b>3. Study 1</b>	
<b>Oxidants-antioxidants balance in experimental hyperthyroidism</b>	55
3.1. Introduction	55
3.2. Working hypothesis. Objectives	56
3.3. Material and method	57
3.4. Results	58

3.5. Discussion	60
3.6. Conclusions	64
<b>4. Study 2</b>	
<b>Effect of vitamin E supplementation on oxidative stress induced by Thyroxin administration</b>	65
4.1. Introduction	65
4.2. Working hypothesis. Objectives	65
4.3. Material and method	66
4.4. Results	67
4.5. Discussion	71
4.6. Conclusions	72
<b>5. Study 3</b>	
<b>Oxidants-antioxidants balance in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation</b>	73
5.1. Introduction	73
5.2. Working hypothesis. Objectives	74
5.3. Material and method	74
5.4. Results	75
5.5. Discussion	77
5.6. Conclusions	80
<b>6. Study 4</b>	
<b>Oxidant-antioxidant status in Basedow-Graves disease</b>	81
6.1. Introduction	81
6.2. Working hypothesis. Objectives	82
6.3. Material and method	82
6.4. Results	84
6.5. Discussion	88
6.6. Conclusions	90
<b>7. Study 5</b>	
<b>Effect of vitamin E supplementation on oxidative stress in Basedow-Graves disease</b>	91
7.1. Introduction	91
7.2. Working hypothesis. Objectives	92
7.3. Material and method	92
7.4. Results	94
7.5. Discussion	97
7.6. Conclusions	99
<b>8. Study 6</b>	
<b>Oxidant-antioxidant status in patients with autoimmune hypothyroidism</b>	101
8.1. Introduction	101

8.2. Working hypothesis. Objectives	102
8.3. Material and method	102
8.4. Results	104
8.5. Discussion	109
8.6. Conclusions	112
<b>9. General conclusions</b>	113
<b>10.Originality and innovative contributions of the thesis</b>	114
<b>REFERENCES</b>	115

**Key words:** oxidative stress, reactive oxygen species, hyperthyroidism, hypothyroidism, vitamin E

## **PERSONAL CONTRIBUTION**

More and more speciality studies suggest that hyperthyroidism is associated with increase in reactive oxygen species production , while hypothyroidism is associated with a decrease in oxygen free radical production. Recent studies have shown increased oxidative stress in hypothyroidism. Effects of hypo-and hyperthyroidism on antioxidant defense capacity have been much studied, but results are rather contradictory.

The aim of the present research was to demonstrate the involvement of oxidative stress in hypo-and hyperthyroidism and to refine the therapy intended for these disorders by associating an antioxidant treatment.

### **Experimental study**

The experimental study aims to research oxidative stress implications in hypo-and hyperthyroidism, with the following objectives:

1. To make an experimental model of hyperthyroidism, which allows to study the oxidants-antioxidants balance.
2. To study the effect of vitamin E on oxidative stress and antioxidant defense parameters in experimental hyperthyroidism.
3. To make an experimental model of hypothyroidism, which allows to study the oxidants-antioxidants balance.
4. To study the effect of vitamin E on oxidative stress from serum, thyroid and liver in experimental hyperthyroidism.

### **General methodology**

The experimental study was conducted in the research center of the Department of Physiology, University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu" in 2008. In this study we

used white, male, Wistar rats weighing between 220-240 gr. The animals came from Biobaza University of Medicine and Pharmacy "Iuliu Hațieganu", Cluj-Napoca and kept at a room temperature of 23-24°C, light-dark cycle of 12 hours (using artificial white light 200 lux) in the biobaza of the Department of Physiology. The animals received normocaloric diet, standardized and water ad libitum.

The experimental study was conducted on 50 animals divided into five equal groups for 30 days:

1. Group 1-controls
2. Group 2-animals treated with L-Thyroxine 10µg/animal/day
3. Group 3-animals treated with L-Thyroxine and vitamin E
4. Group 4-animals treated with Propylthiouracil 5mg/100g animal /day
5. Group 5-animals treated with Propylthiouracil and vitamin E

After 30 days, blood was collected from the retroorbital sinus and the rats were sacrificed by cervical dislocation following ether anaesthesia. The thyroids and livers were immediately dissected out and used for analytical procedures.

#### *Measurement of oxidative stress parameters*

The following serum parameters were measured: total malondialdehyde and carbonyl proteins as indicators of oxidative stress; sulhydryl groups, reduced glutathione and superoxid dismutase as indicators of antioxidant defense.

From thyroid and hepatic homogenate were dosed: total malondialdehyde, carbonyl proteins, sulhydryl groups and reduced glutathione.

The oxidative stress and antioxidant defense parameters were dosed at the Laboratory for the Exploration of the oxidative stress, Department of Physiology.

### **Statistical analysis**

The results of the study were organized into a database and processed statistically using ANOVA test, nonparametric Kruskal-Wallis test, Mann-Whitney/Wilcoxon, Spearman correlation coefficient. Presentation of data was performed as tables, graphs and charts using Excel.

## **Study 1. The oxidant/antioxidant balance in experimental hyperthyroidism**

### **Results:**

Following the comparative statistical analysis performed based on the results obtained in the serum, significantly increased free thyroxine values ( $p < 0.001$ ) were found in the group with hyperthyroidism compared to the control group. In animals treated with L-thyroxine, there were no significant changes in MDA compared to the control group. In contrast, the concentration of protein carbonyls significantly increased ( $p = 0.0001$ ) compared to the control group. Antioxidant defense parameters, SH groups, SOD and reduced GSH, significantly decreased in the plasma of animals with hyperthyroidism compared to the control group. In the thyroid homogenates of

animals treated with thyroxine, MDA values were significantly lower and protein carbonyl values were not significantly changed compared to the control group. A significant increase in sulfhydryl groups ( $p < 0.001$ ) and a significant decrease in GSH were seen. The administration of L-thyroxine induced a significant decrease in malondialdehyde ( $p < 0.001$ ) and GSH ( $p < 0.001$ ) in the liver tissue of rats with hyperthyroidism. Protein carbonyls and SH groups were unchanged.

## **Study 2. Effect of vitamin E administration on oxidative stress induced by thyroxine administration**

### **Results:**

Following the comparative statistical analysis performed based on the results obtained in the serum, a decrease in FT<sub>4</sub> values was found in the group with hyperthyroidism protected with vitamin E compared to the group with induced hyperthyroidism. In animals with hyperthyroidism supplemented with vitamin E, MDA and PC significantly increased ( $p < 0.05$ ) compared to the group with hyperthyroidism. Vitamin E administration determined a significant decrease ( $p < 0.001$ ) of antioxidant defense parameters in the serum. Vitamin E administration determined a significant increase in lipid peroxides in the liver homogenate of rats with hyperthyroidism. There were no significant changes in PC. SH groups significantly increased in the liver tissue of rats protected with vitamin E.

## **Study 3. The oxidant/antioxidant balance in experimental hypothyroidism: effect of vitamin E supplementation**

### **Results:**

In rats with hypothyroidism induced by propylthiouracil administration, MDA levels in the plasma, thyroid and liver tissue were not significantly changed compared to the control group. Protein carbonyl levels significantly increased ( $p < 0.05$ ) in the plasma and thyroid tissue of animals with hypothyroidism.

Vitamin E supplementation determined a significant increase in protein carbonyls (PC) in the serum of animals with hypothyroidism and an increase in MDA in liver tissue.

Antioxidant defense parameters in the serum of animals with hypothyroidism were not significantly different compared to the control group.

It was found that animals in the group with hypothyroidism had a significant increase in thiol groups and a significant decrease of reduced glutathione in the thyroid homogenate. GSH significantly decreased in liver tissue.

Clinical research study aims to oxidative stress implications in hyperthyroidism and hypothyroidism etiopathogenesis with the following objectives:

1. The study of oxidants-antioxidants balance in Basedow-Graves disease patients.
2. To study the effect of synthesis antithyroid drugs on oxidative stress parameters in Basedow-Graves disease patients.
3. To study the effect of an antioxidant preparation supplementation in the treatment of Basedow-Graves disease on oxidative stress markers and thyroid hormone values.
4. The study of oxidants-antioxidants status in autoimmune hypothyroid patients.

#### **Study 4. Oxidant/antioxidant status in Basedow-Graves disease**

##### **Material and method:**

The study was carried out in the period 2008-2012, at the Clinic of Endocrinology Cluj-Napoca, in a group of 30 recently diagnosed, untreated patients with Basedow-Graves disease. Diagnosis was made based on clinical, biochemical criteria and on functional explorations (thyroid ultrasound, thyroid scintigraphy).

The patients were evaluated at the time of diagnosis and 6 weeks after treatment.

The control group consisted of 12 patients with normal thyroid hormone status, without other associated disorders.

Therapy with synthesis antithyroid drugs (SAT) was administered using Thyrozol in progressively decreasing doses; therapy with beta-blockers used Metoprolol in doses of 2x50 mg/day, for 6 weeks.

The following serum parameters were measured: (1) oxidative stress parameters: total malondialdehyde (nmol/ml) and protein carbonyls (nmol/mg protein); (2) antioxidant defense parameters: reduced glutathione (nmol/ml); thyroid hormonal status (TSH, FT<sub>4</sub>).

##### **Results:**

The values of MDA, the marker of lipid peroxidation, in patients with Basedow disease at onset were significantly increased compared to those of healthy subjects ( $p < 0.0001$ ). After SAT administration, MDA values increased insignificantly compared to the group of untreated patients ( $p = 0.07$ ).

PC levels increased insignificantly in untreated patients with Basedow disease ( $p = 0.36$ ) and they also increased without statistical significance after the administration of SAT ( $p = 0.38$ ).

Reduced glutathione (GSH) significantly increased in patients with Basedow disease compared to the control group ( $p < 0.001$ ). In patients treated with SAT and beta-blockers, GSH values increased significantly.

Patients treated with Thyrozol compared to control patients had significantly increased FT<sub>4</sub> values, decreased TSH values, and significantly increased values of the studied parameters (MDA;  $p < 0.0001$  PC, GSH;  $p < 0.001$ ).

## **Study 5. Effect of vitamin E administration on oxidative stress in Basedow-Graves disease**

Basedow-Graves disease is an autoimmune disorder and the most frequent cause of hyperthyroidism. Increased thyroid hormone concentrations change cellular oxidative metabolism, determining the formation of reactive oxygen species. Antioxidant supplementation can reduce oxidative stress in hyperthyroidism and the rate of euthyroidism obtained when antioxidants are administered concomitantly with SAT in newly diagnosed Graves disease has been demonstrated to increase.

### **Material and method:**

The study was carried out in the period 2009-2012, at the Clinic of Endocrinology Cluj-Napoca, in a group of 43 recently diagnosed, untreated patients with Basedow-Graves disease. Three groups were formed: a control group including 12 women with normal thyroid hormone status without other associated diseases, a group of 23 patients with newly diagnosed Basedow disease who received SAT treatment for 6 weeks, and a group of 20 patients with newly diagnosed Basedow disease who received SAT treatment + vitamin E.

The following serum parameters were measured: (1) oxidative stress parameters: total malondialdehyde (nmol/ml) and protein carbonyls (nmol/mg protein); (2) antioxidant defense parameters: reduced glutathione (nmol/ml); thyroid hormonal status(TSH, FT<sub>4</sub>).

### **Results:**

Based on the results obtained, it can be concluded that patients who were administered vitamin E showed a significant different decrease in FT<sub>4</sub> values and a different increase in serum TSH activity, so they reached euthyroidism more rapidly than patients who were administered only SAT treatment. The statistically significant difference between the groups of patients with Basedow disease treated with SAT and vitamin E and the groups of patients treated with SAT alone, regarding the decrease of free thyroxine (FT<sub>4</sub>) concentration, indicates the favorable effect of vitamin E supplementation.

Serum MDA values in patients treated with SAT, beta-blockers and vitamin E significantly decreased( $p=0.03$ ) compared to MDA values in patients treated with SAT alone. In contrast, PC values decreased, but without statistical significance( $p=0.80$ ). Serum glutathione (GSH) significantly decreased in patients supplemented with vitamin E compared to patients treated only with SAT( $p<0.01$ ).

## **Study 6. Oxidant/antioxidant status in patients with autoimmune hypothyroidism**

### **Material and method:**

The study was conducted in the period 2010-2012, at the Clinic of Endocrinology Cluj-Napoca, in a group of 20 recently diagnosed, untreated patients with primary hypothyroidism of autoimmune etiology. Diagnosis was based on the presence of increased TSH values associated with low FT<sub>4</sub> values and increased anti-thyroid peroxidase antibody values. The patients were assigned to two groups: a control group consisting of 12 women with normal thyroid hormone status without other associated disorders, and a group of 20 patients with newly diagnosed autoimmune hypothyroidism.

The following serum parameters were measured: (1) oxidative stress parameters: total malondialdehyde (nmol/ml) and protein carbonyls (nmol/mg protein); (2) antioxidant defense parameters: reduced glutathione (nmol/ml); TSH, FT<sub>4</sub>, Ac anti TPO.

### **Results:**

The high anti-TPO antibody titer confirmed the diagnosis of chronic autoimmune thyroiditis, and the thyroid hormone status (high TSH, low FT<sub>4</sub>) confirmed associated hypothyroidism. MDA and PC values significantly increased in patients with autoimmune hypothyroidism at onset compared to those of euthyroid subjects. The results of our research revealed a significant increase of serum reduced glutathione ( $p < 0.001$ ), and total serum cholesterol ( $p < 0.0001$ ), and an increasing tendency of serum triglycerides, which was statistically insignificant ( $p = 0.06$ ), in patients with Hashimoto thyroiditis and hypothyroidism compared to healthy subjects.

## **General conclusions**

1. Thyroxine administration induces a strong peroxidation of serum proteins and lipids. In thyroid and liver homogenates, MDA values were significantly decreased, suggesting the reduction of oxidative stress.

2. Antioxidant defense parameters (SH groups, GSH, SOD) were significantly decreased in the plasma of animals with induced hyperthyroidism, and SH groups were significantly decreased in thyroid tissue and unchanged in liver tissue. Reduced glutathione was significantly decreased in the thyroid and liver tissue of rats with experimental hyperthyroidism.

3. Vitamin E administration to animals with experimental hyperthyroidism determined a significant decrease in FT<sub>4</sub> values, paralleled by a stimulation of SH activity at thyroid level, but led to a decrease of the other antioxidants in the serum (SH, GSH, SOD) and the liver (SH).

4. Propylthiouracil administration induced an increase in protein carbonyls in the plasma and thyroid tissue of animals with experimental hypothyroidism.

5. Vitamin E administration caused a significant decrease in the values of antioxidant status parameters (SH, SOD, GSH) in the plasma and thyroid homogenate (SH) of rats with hypothyroidism.

6. The significant increase in MDA, the marker of lipid peroxidation, the increasing tendency of PC and the significant increase of GSH confirm the presence of oxidative stress in patients with hyperthyroidism due to Basedow-Graves disease.

7. Short-term thyrozol treatment does not significantly influence the oxidant/antioxidant system parameters in patients with Basedow disease.

8. The association of an antioxidant preparation (vitamin E) to the classic therapy (SAT + beta-blockers) of patients with Basedow disease determines a significant decrease in the serum concentration of free thyroxine and prooxidant indicators (MDA).

9. The results of this study clearly indicate the fact that antioxidant supplementation in the treatment of Basedow-Graves disease is justified and represents an innovative therapeutic approach, as a treatment combined with synthesis antithyroid drugs.

10. We demonstrated the presence of oxidative stress in patients with Hashimoto thyroiditis and hypothyroidism through the significant increase in both MDA and PC. In these patients, serum reduced glutathione was significantly increased.

11. We showed that increased serum total cholesterol values were associated with the amplification of oxidative stress.

### **Originality and innovative contributions of the thesis**

An experimental model of hyperthyroidism through thyroxine administration and an experimental model of hypothyroidism through propylthiouracil administration were carried out. These models allowed to study oxidative stress parameters as well as the effects of the administration of a liposoluble antioxidant in the serum and organ homogenates (thyroid gland and liver).

The implication of oxidative stress in hyperthyroidism due to Basedow-Graves disease has been known in the literature for years. Our study demonstrated that the administration of a synthesis antithyroid drug (Thyrozol) over a short time period did not significantly influence the oxidant/antioxidant system parameters, but the association of vitamin E, SAT and beta-blockers determined a significant decrease of lipid peroxidation and free thyroxine (FT<sub>4</sub>).

The results of our study confirm the utility of antioxidant supplementation in the treatment of Basedow disease, evidencing positive effects on the dynamics of oxidative stress parameters and serum FT<sub>4</sub> levels.

The clinical study showed that in patients with hypothyroidism of autoimmune etiology, the significant increase in serum cholesterol was associated with the amplification of oxidative status, evidenced by the significant increase of lipid and protein peroxidation.

We consider the evidencing of the favorable effect of antioxidant administration in patients with hyperthyroidism on some prooxidant parameters as well as on the dynamics of serum FT<sub>4</sub> levels as an innovative contribution of the thesis.