

Streszczenie pracy doktorskiej mgr Katarzyny Magierowskiej pt.: „*Gastroprotective activity of carbon monoxide in experimental models of gastric mucosa injury*”

Streszczenie

Badania ostatnich lat dowodzą, że tlenek węgla (CO) to endogenny gazowy mediator o wielokierunkowej aktywności biologicznej, biorący udział w transmisji nerwowej oraz rozszerzający łożysko naczyń. Gaz ten uczestniczy również w modulacji procesów zapalnych oraz w mechanizmie hamowania agregacji płytek krwi. Wykazano, że CO, obok biliwerdyny i jonów Fe²⁺, powstaje w wyniku oksydacyjnej degradacji hemu w reakcji katalizowanej przez enzym oksygnazę hemową (HO). Enzym ten występuje w trzech izoformach HO-1, HO-2 oraz HO-3, przy czym ta ostatnia izoforma odznacza się znikomą aktywnością enzymatyczną. HO-1 jest enzymem indukowalnym, a ekspresja tego enzymu wzrasta pod wpływem promieniowania UV, stresu oksydacyjnego, metali ciężkich i hipoksji, natomiast ekspresja konstytutywnej izoformy HO-2 utrzymuje się w tkankach na względnie stałym poziomie, najwyższym w mózgu i jądrach.

Chemicznie, CO to bezbarwny gaz bez zapachu, którego ogólnoustrojowe działanie toksyczne manifestuje się ograniczeniem ilości tlenu dostarczanego tkankom. Jest to wynikiem bezpośredniego łączenia CO z hemoglobina z utworzeniem karboksyhemoglobiny (COHb), jak również zwiększenia stabilności połączenia hemoglobiny z tlenem, co w rezultacie uniemożliwia efektywną wymianę gazową w tkankach. Ponadto CO, łącząc się z enzymami łańcucha oddechowego, zaburza proces oddychania komórkowego potęgując tym samym niedotlenienie tkanek. Poszukiwania wyjaśnienia, zarówno fizjologicznej jak i patofizjologicznej roli CO w ludzkim ustroju, datuje się od roku 1950, kiedy to Torgny Sjöstrand udowodnił istnienie tej gazowej molekuly w organizmie człowieka.

Z ostatnich danych w piśmiennictwie wynika, że CO pełni istotną rolę w fizjologii przewodu pokarmowego. Udowodniono, że CO reguluje jelitową sekrecję jonów wodorowęglanowych (HCO₃⁻), a także działa ochronnie w zwierzęcym modelu gastroparezy, ostrym zapaleniu wątroby oraz trzustki. Odkrycie i zsyntetyzowanie przez grupę naukowców, pracujących pod kierunkiem Roberto Motterliniego, donorów uwalniających CO (z j. ang. Carbon monoxide Releasing Molecule, CORM), np. dimeru trikarbonylodichlororuten (II) [Ru(CO)₃Cl₂]₂, CORM-2, ukazało nowe perspektywy badań podstawowych, zmierzających do udowodnienia mechanizmu działania CO i ewentualnego wykorzystania tych wyników w klinice. Wiadomo obecnie, że donory CO wykazują działanie protekcyjne w obrębie błony śluzowej żołądka względem uszkodzeń indukowanych alendronianem oraz etanolem jednak, to unikalne działanie tych związków, jak również mechanizm działania ochronnego CO w żołądku, nie został wyjaśniony. Wciąż brakuje badań doświadczalnych nad rolą tego gazowego mediatora w przewodzie pokarmowym, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmu gastroprotektynowego działania CO w górnym odcinku przewodu pokarmowego.

Dlatego celem mojej rozprawy doktorskiej było określenie mechanizmów działania CO oraz udowodnienie roli jaką pełni indukowalny enzym HO-1, biorący udział w powstawaniu tej gazowej molekuly, w gastroprotekcji szczurzej błony śluzowej żołądka względem eksperymentalnych uszkodzeń indukowanych dożołądkową aplikacją 75% etanolu lub tych, które pojawiają się u tych zwierząt w wyniku ich ekspozycji na stres.

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar o wadze 250-300 g. Zwierzęta zostały przypisane zasadniczo do dwóch grup badawczych, w których wywołano eksperymentalnie uszkodzenia błony śluzowej żołądka poprzez 1) dożołądkową aplikację 75% etanolu w objętości 1 ml, lub 2) narażenie zwierząt na 3,5 godzinny stres wynikający z ich oziębienia i zanurzenia w wodzie (z j. ang. water immersion and restraint stress, WRS).

Przed wywołaniem wspomnianych ostrych uszkodzeń błony śluzowej żołądka, zwierzętom obu grup podano drogą dożołądkową (i.g.): 1) sól fizjologiczną lub rozcieńczony dimetylosulfotlenek (jako placebo), 2) donor CO, CORM-2 (0.1-100 mg/kg) lub 3) chlorek rutenu, RuCl₃ (1 mg/kg i.g.), związek, który nie uwalnia CO, podawany jako kontrola negatywna dla CORM-2, 4) heminę (1-10 mg/kg i.g.),

związek będący induktorem HO-1, lub 5) protoporfirynę cynkową, ZnPP (10 mg/kg drogą dootrzewnową (i.p.)), związek hamujący aktywność HO-1.

W celu zbadania mechanizmu działania CO uwalnianego z donoru CORM-2 w gastroprotekcji i jego potencjalnej interakcji z innymi ważnymi czynnikami i mediatorami, jak m.in. tlenek azotu (NO) czy prostaglandyny (PG), użyto dodatkowych grup badawczych, podając zwierzętom w obydwu zastosowanych modelach uszkodzeń: A) NG-nitro-L-argininę, L-NNA, (20 mg/kg i.p.), inhibitor konstytutywnej syntazy NO (cNOS), B) 1H-[1,2,4]okszadiazolo[4,3-a]chinoksalin-1-on, (ODQ, 10 mg/kg i.p.), selektywny inhibitor rozpuszczalnej cykazy guanylowej (z j.ang. soluble guanylate cyclase, sGC), C) indometacynę (5 mg/kg i.p.), nieselektywny inhibitor cyklooksyzgenaz (COX), D) SC-560 (5 mg/kg i.g.), selektywny inhibitor COX-1, lub E) celekoksylb (10 mg/kg i.g.), selektywny inhibitor COX-2. Związki te podawano osobno lub w kombinacji z CORM-2 na 30 min przed aplikacją etanolu lub narażeniem tych zwierząt na stres.

Ponieważ kapsaicyno-wrażliwe zakończenia trzewnych nerwów czuciowych uwalniających neuropetydy naczyniorozszerzające takie jak peptyd pochodny genu kalcytoniny (CGRP), odgrywają kluczową rolę w mechanizmie gastroprotekcji, postanowiłam zbadać, czy ten mechanizm jest zaangażowany w efekt ochronny obserwowany po podawaniu związku CORM-2 uwalniającego CO. W tym celu w osobnych grupach badawczych zwierzętom podano w przez trzy kolejne dni w podskórnej iniekcji kapsaicynę, w całkowitej dawce 125 mg/kg. Jak wykazały wcześniejsze badania w Katedrze Fizjologii, kapsaicyna w zastosowanej dawce prowadzi do unieczynnienia (tzw. chemicznej denerwacji) naczyniorozszerzających aferentnych włókien czuciowych uwalniających CGRP. Po dwóch tygodniach od podania kapsaicyny, zwierzętom w poszczególnych grupach badawczych podano sól fizjologiczną, CORM-2 (1 mg/kg i.g.) lub CGRP (10 µg/kg i.p.) oddzielnie lub w kombinacji z CORM-2. W odstępie półgodzinnym od aplikacji powyższych substancji zwierzęta poddano ekspozycji na 3,5-godzinny WRS.

Po upływie 1 godziny od podania etanolu lub w odstępie 3,5 godziny od momentu narażenia zwierząt na WRS, zwierzęta w poszczególnych grupach badawczych, wprowadzano w stan znieczulenia ogólnego za pomocą narkozy izofluranowej w celu dokonania pomiaru żołądkowego przepływu krwi (z j. ang. gastric blood flow, GBF), przy użyciu metody klirensu wodorowego. Następnie, każdorazowo wycinano żołądek i po jego rozcięciu wzdłuż dużej krzywizny, dokonano makroskopowej oceny liczby i powierzchni uszkodzeń błony śluzowej przy pomocy metody planimetrycznej. W pobranej błonie śluzowej żołądka oznaczono: 1) poziom zredukowanego glutationu (GSH), malonyldialdehydu (MDA) i 4-hydroksynonenalu (4-HNE) oraz aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) - metodą spektrofotometryczną, 2) poziom endogennego CO - metodą chromatografii gazowej, 3) poziom NO - mierzony bezpośrednio przy użyciu selektywnej mikroelektrody, 4) ekspresję mRNA dla HO-1, HO-2, HIF-1α, COX-1, COX-2, iNOS, TNF-α, IL-4, IL-1β, SOD-2 oraz peroksydazy glutationu (GPx)-1 metodą real-time PCR oraz 5) ekspresję na poziomie białka dla HO-1, HO-2 oraz czynnika jądrowego Nrf-2 metodą Western Blot. Ponadto, w pobranej krwi pełnej oznaczono poziom COHb metodą chromatografii gazowej, a w pobranych skrawkach błony śluzowej żołądka utrwalonych i barwionych hematoksyliną i eozyną, dokonano histologicznej oceny morfologicznej oceny stanu tej błony oraz głębokości uszkodzeń.

Z przedstawionych wyników mojej pracy doktorskiej wynika, że CORM-2 dawkozależnie hamował rozwój uszkodzeń błony śluzowej żołądka indukowanych aplikacją 75% etanolu lub ekspozycją na WRS, czemu towarzyszył statystycznie znamienne wzrost GBF. To zaobserwowane ochronne działanie CORM-2 jest powiązane z zastosowaną dawką tego związku, gdyż CORM-2 podany w większej dawce np. 100 mg/kg, spotęgował rozwój uszkodzeń błony śluzowej żołądka indukowanych etanolem [publikacja 1].

CORM-2 w dawce 5 mg/kg i.g., zwiększając poziom endogennego CO w błonie śluzowej żołądka, zredukował powierzchnię uszkodzeń indukowanych 75% etanolem o 50% i tę dawkę CORM-2 wybrałam do dalszych badań w celu wyjaśnienia mechanizmu tej gastroprotekcji. Udowodniono, że indometacyna, SC-560, celekoksylb, L-NNA oraz ODQ znamienne redukowały protekcyjne działanie CORM-2 w błonie śluzowej żołądka poddanej uszkodzeniom etanolowym, czemu towarzyszył spadek GBF. W tym modelu, zastosowanie ZnPP osłabiało ochronne działanie zarówno donora CO, CORM-2, jak i induktora

aktywności HO-1, heminy. Protekcji wynikającej z aplikacji CORM-2 towarzyszył wzrost ekspresji mRNA dla HO-1 z jednoczesnym spadkiem ekspresji dla iNOS, COX-2 oraz IL-1 β . Natomiast, nie zaobserwowałam zmian w poziomie białka, zarówno dla HO-1 oraz czynnika Nrf2, pod wpływem CORM-2, których ekspresja była obniżona w błonie śluzowej narażonej na nekrotyczne działanie 75% etanolu [publikacja 1].

W modelu stresowym, zaobserwowano protekcyjne działanie CORM-2 w dawce 1 mg/kg i.g. jako spadek liczby uszkodzeń z jednoczesnym wzrostem GBF. Efekt ten został zredukowany pod wpływem zastosowanych związków takich jak ZnPP, ODQ, indometacyna, SC-560 oraz celekoksyb, lecz działania tego nie zaobserwowano po podaniu L-NNA. Powyższym zmianom obserwowanym pod wpływem dożołądkowej aplikacji CORM-2 przed ekspozycją zwierząt na stres, towarzyszył spadek ekspresji mRNA dla iNOS z jednoczesnym obniżeniem ilości NO w śluzówce żołądka. Wykazano, że podanie CORM-2 w dawce 1 mg/kg i.g. znacząco zwiększa ilość CO w błonie śluzowej żołądka oraz poziom COHb we krwi pełnej. Zaobserwowałam ponadto, że aplikacja CORM-2 spowodowała statystycznie znamienne spadki ekspresji mRNA dla czynników pozapalnych COX-2 i czynnika HIF-1 α , oraz dodatkowo wzmacnia ekspresję dla HO-1, podwyższonych w grupie kontrolnej traktowanej placebo w warunkach ekspozycji na WRS [publikacja 2]. Obserwacje makroskopowe potwierdzono badaniem histopatologicznym, gdyż w grupach zwierząt bez jak i z wywołaną denerwacją czuciową po aplikacji CORM-2, zaobserwowano redukcję rozległości i głębokości uszkodzeń błony śluzowej żołądka na poziomie mikroskopowym. Dodatkowo w tych grupach zwierząt narażonych na stres powodujący mikrokrwawienia i uszkodzenia żołądkowe, CORM-2 obniżył poziom MDA+4-HNE, zwiększył aktywność antyoksydacyjnego enzymu SOD, poziom GSH, ekspresję mRNA dla SOD-2 i GPx-1 oraz znacząco zmniejszył uszkodzenia struktury błony śluzowej ocenianej histologicznie. To działanie ochronne CORM-2 względem uszkodzeń stresowych u tych zwierząt, zostało spotęgowane w warunkach ich suplementacji przez egzogennie podawany CGRP, zarówno na poziomie makroskopowym jak i biochemicznym [publikacja 3].

Przeprowadzone badania dowodzą, że CO, zarówno ten produkowany endogennie w wyniku enzymatycznej aktywności HO-1 jak i uwalniany egzogennie z farmakologicznego donora takiego jak związek CORM-2, wykazuje działanie gastroprotecyjne w zastosowanych doświadczalnych modelach uszkodzeń błony śluzowej żołądka. Do oceny gastroochronnego działania CO wybrałam dwa modele uszkodzeń pojawiających się u zwierząt doświadczalnych zarówno po podawaniu bezpośrednio do żołądka czynnika nekrotycznego jakim jest 75% etanol lub w wyniku ich ekspozycji na stres. Udowodniłam, że podstawowy mechanizm protekcji śluzówki pod wpływem CO jest wynikiem poprawy mikrokrążenia żołądkowego na skutek naczyniorozszerzającego działania tego gazu. Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że mechanizm naczyniorozszerzającego działania CO uwalnianego z CORM-2 polega na uaktywnieniu śródkomórkowego układu przekaźnika zależnego od sGC/cGMP oraz związany jest z produkcją endogennych PG przez aktywność obu cyklooksygenaz, zarówno COX-1 oraz COX-2. W modelu etanolowym, rozszerzenie łożyska naczyniowego skutkujące wzrostem GBF pod wpływem CO, jest również częściowo mediowane poprzez NO. Jednak w modelu stresowym, obserwowana gastroprotekcja pod wpływem CO jak również CO-zależny wzrost GBF zachodzą niezależnie od śluzówkowego poziomu NO, lecz dodatkowo może być wynikiem wzmożonej aktywności aferentnych włókien naczyniorozszerzających uwalniających CGRP pod wpływem tego gazowego mediatora. Na poziomie molekularnym CORM-2 zwiększa ekspresję mRNA dla HO-1, a zwiększając biodostępność CO wykazuje działanie protekcyjne potęgując odpowiedź obronną, przyczyniając się w ten sposób do utrzymania integralności błony śluzowej żołądka mimo jej narażenia na wspomniane czynniki uszkodzające. Co więcej, redukcja hipoksji obserwowana jako spadek ekspresji czynnika HIF-1 α , hamowanie procesu peroksydacji lipidów w żołądku narażonym na stres oraz regulacja odpowiedzi zapalnej poprzez zmniejszenie ekspresji IL-1 β w etanolowym modelu uszkodzeń sugerują przeciwzapalne oraz przeciwoksydacyjne działanie CO w obrębie górnego odcinka przewodu pokarmowego.

Podsumowując, CO produkowany endogennie oraz uwalniany ze związku CORM-2, jest gazomediatorem wykazującym działanie ochronne względem ostrych uszkodzeń pojawiających się w błonie śluzowej żołądka poddanej ekspozycji na stres lub narażonej na uszkodzające działanie 75% etanolu. Mechanizm działań tej molekuly jest związany z jej działaniem naczyniorozszerzającym skutkującym wzrostem przepływu krwi w obrębie mikrokrążenia żołądkowego, aktywnością układu COX/PG produkującego ochronne PG, aktywnością sGC oraz częściowego wpływu na aktywność układu NOS/NO i nerwów czuciowych uwalniających CGRP. Zwiększona biodostępność CO zapobiega procesowi peroksydacji lipidów, a także zmniejsza stan zapalny i wywiera działania antyoksydacyjne w błonie śluzowej żołądka poddanej ekspozycji na czynniki uszkodzające.

Summary

The most recent studies have documented that carbon monoxide (CO) is a gaseous mediator with pleiotropic biological activity. CO has been considered to possess neuromodulatory, vasodilatory, anti-inflammatory and anti-aggregatory properties. Growing body of evidence points out to the important role of CO as a component of complex mechanism of gastric mucosal defence. CO is produced intracellularly during heme degradation in reaction catalyzed by heme oxygenase (HO). Three mammalian isoforms of HO have been described, but only HO-1 and HO-2 have been shown to be biologically active. HO-1 isoform is induced by wide number of stressful stimuli such as UV radiation, hypoxia, heavy metals and oxidative stress while HO-2 is constitutively expressed in most tissues with the highest level in the brain and testes.

CO is a colorless and odorless gas which toxic action results from its binding to hemoglobin and subsequent formation of carboxyhemoglobin (COHb) followed by tissue oxygen deprivation. Additionally, the interaction of CO with respiratory chain enzymes results in deterioration of cellular respiration leading to intensification of tissue hypoxia. Torgny Sjöstrand discovered CO production in humans thereby providing an evidence for physiological relevance of this gaseous molecule within human body.

There have been numerous reports over the past years on the important role of CO in the gastrointestinal physiology and pathophysiology. CO is involved in prostaglandins (PG)-mediated stimulation of bicarbonate (HCO_3^-) secretion in the duodenum, participates in the process of restoration of delayed gastric emptying in diabetic mice and seems to act as the protective factor against acute hepatitis or pancreatitis.

Class of compounds recently discovered by Roberto Motterlini, and called CO-releasing molecules, in particular CORMs, e.g. tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$, CORM-2, has been widely approved as the pharmacological tool to examine CO mechanism of action and to determine its potential clinical relevance. The pretreatment with CO donors is considered to prevent ethanol- or alendronate-induced gastric lesions. However, the contribution of this gaseous molecule in the mechanism of gastric mucosal defense has not been fully explored.

The major aim of my doctoral dissertation consisting of three papers published in international journals was to determine the role and physiological significance of CO and HO-1 in pathomechanism of acute gastric lesions formation induced by 75% ethanol or water immersion and restraint stress (WRS) using animal models of ethanol-induced gastric lesions and WRS-induced gastric damage in rats.

Male Wistar rats with the weight of 250-300 g were prescribed to experimental groups in which gastric mucosal damage was induced by administration of 75% ethanol or exposure to 3.5 h of WRS. Before gastric damage induction, animals were pretreated intragastrically (i.g.) with 1) saline or dimethyl sulfoxide (DMSO, placebo), 2) CO donor, CORM-2 (0.1-100 mg/kg), 3) RuCl_3 (1mg/kg), a non-CO-releasing negative control, 4) hemin (1-10mg/kg), HO-1 inducer or 5) zinc protoporphyrin, ZnPP (10 mg/kg intraperitoneally (i.p.), HO-1 inhibitor.

In other experimental groups, rats were pretreated with A) NG-nitro-L-arginine, L-NNA (20 mg/kg i.p.), constitutive nitric oxide synthase (cNOS) inhibitor, B) 1H-[1, 2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-on,

ODQ (10 mg/kg i.p.), soluble guanylate cyclase (sGC) inhibitor, C) indomethacin (5 mg/kg i.p.), non-selective cyclooxygenases (COX) inhibitor, D) SC-560 (5 mg/kg i.g.) selective COX-1 inhibitor, E) celecoxib (10 mg/kg i.g.), selective COX-2 inhibitor in combination with or without CORM-2 applied 30 min before exposure to ethanol or WRS.

In separate experimental groups, animals underwent afferent sensory nerves denervation by application of capsaicin (total dose of 125 mg/kg s.c. within 3 consecutive days) two weeks before experiments. Thirty min before exposure to WRS, rats were pretreated i.g. with saline (control), CORM-2 (1 mg/kg) or CGRP (10 µg/kg i.p.) applied alone or administered in combination with CORM-2.

After the end of each experiment, animals were anesthetized with isofluran and gastric blood flow (GBF) was measured by H₂-gas clearance technique. Macroscopic assessment of the area of gastric lesions or the number of gastric lesions was performed by planimetry. Gastric mucosal biopsies were collected to measure: 1) reduced glutathione (GSH), malonyldialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (4-HNE) content and superoxide dismutase (SOD) activity using spectrophotometric assays, 2) CO concentration in gastric mucosa by gas chromatography, 3) NO content by micro-ionic selective electrode, 4) mRNA expression for HO-1, HO-2, HIF-1 α , COX-1, COX-2, iNOS, TNF- α , IL-4, IL-1 β , SOD-2 and glutathione peroxidase (GPx)-1 by *real-time* PCR and 5) protein expression for HO-1, HO-2 and nuclear factor Nrf-2 by Western Blot. In addition, the COHb concentration was measured in whole blood by gas chromatography. The gastric mucosal specimens were excised for histology and the depth of gastric mucosal damage and the degree of gastric mucosal regeneration were assessed microscopically.

The pretreatment with CORM-2 dose-dependently decreased mean lesion area or number induced by 75% ethanol or WRS and these effects were accompanied by the increase in GBF. CORM-2 administered in the dose of 100 mg/kg i.g. significantly increased the area of gastric mucosa injury induced by 75% ethanol [publication 1].

The standard dose of CORM-2 inhibiting ethanol lesions by 50% was 5 mg/kg i.g. and this dose has been selected for further determinations. In my study, indomethacin, SC-560, celecoxib, L-NNA and ODQ reduced CORM-2 gastroprotection against ethanol-induced gastric damage and this effect was followed by the decrease in GBF. The pretreatment with ZnPP inhibited CORM-2- and hemin-induced gastroprotection. CORM-2 elevated expression of mucosal HO-1 mRNA and decreased mRNA level for iNOS, COX-2, IL-1 β , with no impact on HO-1 and Nrf-2 protein level [publication 1].

The pretreatment with CORM-2 in the dose of 1 mg/kg i.g. reduced WRS-induced gastric lesions number and this effect was accompanied by the increase in GBF. The pretreatment with ZnPP, ODQ, indomethacin, SC-560 or celecoxib but not L-NNA reversed protective effect of CORM-2. CO donor decreased mucosal NO level and WRS-elevated COX-2, iNOS and HIF-1 α mRNA expression. It has been demonstrated that CORM-2 in the protective dose increased COHb level and CO content in gastric mucosa. Furthermore, CORM-2-induced gastroprotection against WRS damage involves the upregulation of HO-1 over the values obtained in control group [publication 2]. The pretreatment with CORM-2 significantly decreased MDA+4-HNE level, increased SOD activity, GSH level and SOD-2 and GPx-1 mRNA expression and diminished histopathological alterations in gastric mucosa of rats with or without sensory nerves ablation. The concurrent treatment with CORM-2 and exogenous CGRP potentiated these effects of CO donor at the macroscopic and biochemical level [publication 3].

In summary, this study has revealed that CO, produced endogenously *via* HO-1 enzymatic activity or derived from its chemical donor CORM-2, exerts gastroprotection in experimental models of gastric mucosal injury induced by ulcerogenic factors such as stress or ethanol *via* the enhancement of gastric microcirculation induced by CO. The current study demonstrated that CO-dependent vasodilatation involves the sGC/cGMP pathway activity and the activity of endogenous PGs biosynthesis due to the activation of COX-1 and COX-2 enzymatic pathways. CORM-2-mediated protection against ethanol injury could involve endogenous NO activity. In opposite, in gastric mucosa compromised by WRS, the rise in GBF observed upon CO donor administration seems to be NO-independent. Moreover, the CORM-2 protection against WRS-injury may involve the activity of afferent sensory nerves releasing vasodilatory CGRP. The pretreatment with CORM-2 increased mRNA expression for HO-1 and elevated

bioavailability of CO resulting in the gastroprotection. This protective effect of CO which improves the gastric mucosal defense, can contribute to the mechanism of gastric mucosal integrity. Moreover, my findings that the CO-induced reduction of hypoxia documented by the decrease in expression of HIF-1 α , an inhibition of lipid peroxidation in stress-exposed gastric mucosa and the CO-induced attenuation of the inflammatory response by diminishing IL-1 β expression in gastric mucosa compromised by ethanol, can account for the anti-inflammatory and antioxidative actions of CO within upper gastrointestinal tract.

In summary, the present study has demonstrated that CO generated endogenously or that released from its chemical donor, contributes to gastric mucosal protection against local and systemic damage caused by ethanol and stress, respectively. Hypermic effect of CO involves the activation of sGC/cGMP system, biosynthesis of endogenous PGs by COX-1 and COX-2 and, at least to some extent, NOS/NO system and CGRP-releasing afferent sensory nerves activity. The CO-mediated gastroprotection against stress- but not that exhibited by this gaseous molecule against ethanol-induced injury seems to be NO-independent. The enhanced bioavailability of CO prevents lipid peroxidation and limits inflammatory response exerting anti-oxidative activity in gastric mucosa subjected to damaging factors.