

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Magierowskiej pt. „Gastroprotective activity of carbon monoxide in experimental models of gastric mucosa injury”.

Wykonana zgodnie z pismem Prof. Janusza Marcinkiewicza Prodziekana Wydziału Lekarskiego COLL. MED. Uniwersytetu Jagiellońskiego z dnia 24 lutego 2017 r

Rozprawę doktorską stanowią 3 publikacje :

1. Magierowska K, Magierowski M, Hubalewska- Mazgaj M, Adamski J, Surmiak M, Sliwowski Z, Kwiecień S, Brzozowski T.: Carbon monoxide (CO) released from Tricarbonyldichlororuthenium (II) Dimer(CORM-2) in gastroprotection against experimental ethanol-induced Gastric damage. PLoS One. 2015, 10(10):e0140493. Impact factor za 2015 r=3.057
2. Magierowska K, Magierowski M, Adamski J, Surmiak M, Mazur-Biały AI, Pajdo R, Sliwowski Z, Kwiecień S, Brzozowski T. The protective role of Carbon monoxide (CO) produced by heme oxygenases and derived from the CO-releasing molecule CORM -2 in the pathogenesis of stress induced gastric lesions. Evidence for non-involvement of nitric oxide (NO) . Int. J Mol Sci. 2016, 17(4):442. Impact factor za 2015 r=3.257
3. Kwiecień S, Magierowska K, Magierowski M, Surmiak M, Hubalewska- Mazgaj M, Pajdo R, Surmiak M, Sliwowski Z, Chmura A, Wójcik W, Brzozowski T: Carbon monoxide affects antioxidative mechanisms in protection against stress induced gastric lesions. J Physiol. Pharmacol. 2016; 67(5):717-729. Impact factor za 2015 r=2.804

Badania ostatnich lat dowodzą ,że tlenek węgla (CO) to endogenny gazowy mediator o wielokierunkowej aktywności biologicznej, biorący udział w transmisji nerwowej oraz rozszerzający łożysko naczyniowe.

Gaz uczestniczy 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 oksygenazę hemową (HO). 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, 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 niedotlenienie tkanek.

Z ostatnich danych w piśmiennictwie wynika, że CO pełni istotną rolę w fizjologii przewodu pokarmowego. Udowodniono, że CO reguluje jelitową sekrecję jonów wodorowęglanowych, a także działa ochronnie w zwierzęcym modelu gastroparezy, ostrym zapaleniu wątroby i 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, 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 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 gastroprotekcijnego działania CO w górnym odcinku przewodu pokarmowego.

Celem niniejszej 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.

Temat pracy doktorskiej został trafnie dobrany i stanowi kontynuację zainteresowań naukowych promotora tej pracy dr hab. Sławomira Kwietnia, którego osiągnięcia w tej dziedzinie badań naukowych są powszechnie znane cytowane w publikacjach Krajowych i Zagranicznych.

Badania przeprowadzono na szczurach rasy Wistar o wadze 250-300 g, Zwierzęta podzielono na dwie grupy badawcze, u 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(WRS). Przed wywołaniem ostrych uszkodzeń błony śluzowej żołądka zwierzętom podano drogą dożołądkową:1.sól fizjologiczną lub rozcieńczony dimetylosulfotlenek; 2. donor CO tj CORM-2; 3.chlorek rutenu,RuCl₃ ;4.heminę; 5.protoporfirynę cynkową, W celu zbadania mechanizmu działania CO uwalnianego z donoru CORM-2 w gastroprotekcji użyto dodatkowych grup badawczych podając zwierzętom w obydwu zastosowanych modelach uszkodzeń: NG-nitro-Larginine ,L-NNA, inhibitor konstytutywnej syntazy NO (cNOS);Selektywny inhibitor rozpuszczalnej cykazy guanylowej; Indometacynę; selektywny inhibitor cyclooksygenaz (COX);Celekoksyb.

Podział na grupy badawcze i schemat doświadczenia jest w prawidłowy i odpowiada postawionemu celowi pracy. Zastosowane metody badawcze są na bardzo wysokim poziomie.

Z przedstawionych wyników pracy doktorskiej wynika, że CORM-2 dawkozależnie hamował rozwój uszkodzeń błony śluzowej żołądka indukowanych aplikacją 75% etanolu lub ekspozycją na WRS, czemu towarzyszył statystycznie znamienny wzrost żołądkowego przepływu krwi (GBF).

To zaobserwowane ochronne działanie CORM-2 jest powiązane z zastosowaną dawką tego związku, gdyż CORM-2 podany w większej dawce spotęgował rozwój uszkodzeń błony śluzowej żołądka indukowanych etanolem co było dokładnie przedstawione w publikacji nr 1.

W tej publikacji udowodniono , że indometacyna, S.C.-560, celekoksyb, L-NNA oraz ODQ znamiennie redukowały protekcyjne działanie CORM-2 w błonie śluzowej żołądka poddanej uszkodzeniom etanolowym, czemu towarzyszył spadek przepływu żołądkowego (GBF).

W publikacji nr 2 Doktorantka zaobserwowała ,że aplikacja CORM-2 spowodowała statystycznie znamienny spadek ekspresji mRNA dla czynników prozapalnych COX2 i czynnika HIF-1 a, oraz dodatkowo wzmacnia ekspresję dla HO-1, podwyższonych w grupie kontrolnej traktowanej placebo w warunkach ekspozycji na WRS.

Zmianom obserwowanym pod wpływem dożołądkowej aplikacji CORM-2 przed ekspozycją na stres towarzyszył spadek ekspresji mRNA dla iNOS z jednoczesnym obniżeniem ilości NO w śluzowce 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.

W publikacji nr 3 Doktorantka przedstawiła dowody na to, że obserwacje makroskopowe potwierdzono badaniem histopatologicznym, gdyż w grupach zwierząt bez jak i 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+4HNE, 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 endogennie podawany CGRP, zarówno na poziomie makroskopowym jak i biochemicznym.

Z przeprowadzonych badań wynika, 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 gastroprotektoryjne w zastosowanych doświadczalnych modelach uszkodzeń błony śluzowej żołądka.

Doktorantka udowodniła, 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 łóżyska naczyniowego skutkujące wzrostem GBF pod wpływem CO, jest również częściowo mediowane poprzez NO.

Jednak w modelu stresowym, obserwowana gastroprotekcja pod wpływem CO jak również wzrost GBF zależny od CO 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.

Redukcja hipoksji obserwowana jako spadek ekspresji czynnika HIF-1a, hamowanie procesu peroksydacji lipidów w żołądku narażonym na stres oraz regulacja odpowiedzi zapalnej poprzez zmniejszenie ekspresji IL-1b w etanolowym modelu uszkodzeń sugerują przeciwzapalne oraz przeciwoksydacyjne działanie CO w obrębie górnego odcinka przewodu pokarmowego.

Zwiększona biodostępność CO zapobiega procesowi peroksydacji lipidów, a także zmniejsza stan zapalny i wywiera działanie antyoksydacyjne w błonie śluzowej żołądka poddanej ekspozycji na czynniki uszkadzające.

Reasumując przedstawiona mnie do recenzji rozprawa doktorska pt. **„Gastroprotective activity of carbon monoxide in experimental models of gastric mucosa injury ”** w pełni odpowiada wymogom stawianym rozprawom na stopień naukowy doktora.

Badania eksperymentalne zostały bardzo dobrze zaplanowane i zrealizowane przy zastosowaniu najbardziej nowoczesnych metod badawczych i olbrzymim nakładem pracy. Pracę doktorską stanowią 3 publikacje ,które zostały opublikowane w czasopismach o wysokim **IF tj łącznie 9.118** co niewątpliwie świadczy o wysokim poziomie merytorycznym rozprawy doktorskiej i zastosowanych nowoczesnych metodach badawczych oraz aktualności problemu badawczego.

Wielokrotnie czytając recenzowaną rozprawę doktorską mgr Katarzyny Magierowskiej nie znalazłem żadnych uwag krytycznych. Wynika to faktu ,że 3 prace już opublikowano w czasopismach o wysokim IF i były już one poddawane ocenie recenzentom.

Jest to praca samodzielna a dotychczasowy dorobek naukowy autorki rozprawy doktorskiej mgr Katarzyny Magierowskiej jest znany o dużym czynniku wpływu (IF). Mgr Katarzyna Magierowska jest częścią znanego Zespołu **Uznanej i Cenionej Krakowskiej Szkoły Fizjologii** kierowanej przez Prof. S.J. Konturka a obecnie kontynuowane przez Prof. Tomasza Brzozowskiego

Badania wykonane przez mgr K. Magierowską wnoszą do nauki oryginalny wkład. **Recenzowana rozprawa doktorska wypełnia lukę w badaniach nad wpływem tlenu węgla w eksperymentalnych modelkach uszkodzeń błony śluzowej żołądka a zatem stanowi znaczny wkład w rozwój gastroenterologii doświadczalnej a jej implikacje kliniczne będą miały istotny wpływ na rozwój współczesnej gastroenterologii klinicznej.**

Dlatego jednoznacznie stwierdzam, że oceniana rozprawa w pełni odpowiada wymogom stawianym na stopień doktora, zatem oceniam ją bardzo wysoko a ze względu wysokie walory naukowe i na jej ważny wkład do medycyny praktycznej

zwracam się do Pana Dziekana i Wysokiej Rady Wydziału Lekarskiego UJ CM z wnioskiem o jej wyróżnienie.

W związku z powyższym przedkładam wniosek Wysokiej Radzie Wydziału Lekarskiego UJ CM o dopuszczenie mgr Katarzyny Magierowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr. hab. n med. Krzysztof Celiński

2766198 Prof. dr hab. n. med. KRZYSZTOF CELIŃSKI
specjalista chorób wewnętrznych
GASTROENTEROLOG
20-815 Lublin, ul. Solarza 16
tel. kom. 601-35-11-79