

## Streszczenie pracy doktorskiej mgr Dominika Bakalarza

**Promotor: dr hab. Marcin Magierowski**

**Promotor pomocniczy: dr Edyta Korbut**

**Temat pracy doktorskiej: „*Molecular mechanisms of novel carbon monoxide and hydrogen sulfide donors activity enhancing physiological gastric mucosal integrity against acute drug-induced gastrotoxicity*”**

**(„*Molekularne mechanizmy działania nowych donorów tlenu węgla i siarkowodoru wzmacniające fizjologiczną integralność błony śluzowej żołądka w redukcji ostrej gastrotoksyczności polekowej*”) – cykl publikacji**

W świetle dotychczas przeprowadzonych badań naukowych udowodniono, że tlenek węgla (CO) oraz siarkowodor (H<sub>2</sub>S) jako gazowe mediatory, produkowane i uwalniane endogennie w tkankach organizmu, posiadają wielokierunkową aktywność biologiczną i uczestniczą w wielu procesach fizjologicznych i patologicznych. Dlatego też, rola tych molekuł w organizmie jest równie ważna jak ich bliźniaczego mediatora – tlenku azotu (NO). Wykazano, że CO i H<sub>2</sub>S mogą działać ochronnie w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego, modulując odpowiedź zapalną oraz szereg funkcji na poziomie molekularnym i czynnościowym. Szlaki enzymatyczne zaangażowane w endogenną biosyntezę tych gazowych mediatorów są istotnymi składowymi fizjologicznej bariery ochronnej błony śluzowej przewodu pokarmowego warunkującymi utrzymanie jej integralności podczas ekspozycji na ostry stres, ischemię z reperfuzją, bądź też dożołądkową (i.g.) aplikację czynników chemicznych, takich jak etanol i leki. Należy zaznaczyć, że korzystna bioaktywność CO i H<sub>2</sub>S nie jest ograniczona wyłącznie do przewodu pokarmowego, gdyż obserwuje się ją również w układzie krążenia, gdzie molekuly te działają m.in. naczyniorozszerzająco oraz hamują agregację płytek krwi i adherencję leukocytów do śródbłonna, a także w układzie nerwowym, gdzie działają neuromodulująco, antyoksydacyjne i cytoprotekcyjnie.

Biosynteza CO w organizmie odbywa się w wyniku oksydatywnej degradacji hemu, katalizowanej przez oksygenazy hemowe (HMOX), głównie izoformę indukowaną stanem zapalnym HMOX-1 oraz konstytutywną HMOX-2. CO jest jednym z produktów rozpadu hemu, obok biliwerdyny i jonów Fe<sup>2+</sup>. Natomiast H<sub>2</sub>S powstaje głównie w wyniku metabolizmu L-cysteiny, przy udziale dwóch enzymów,  $\gamma$ -liazy cystationinowej (CTH) oraz  $\beta$ -syntazy cystationinowej (CBS), dla których kofaktorem jest fosforan-5-pirydoksalu (witamina B6). H<sub>2</sub>S powstaje dodatkowo z 3-merkaptopirogronianu, wskutek aktywności enzymatycznej siarkotransferazy 3-merkaptopirogronianu (MPST). H<sub>2</sub>S może być generowany również na drodze przemian metabolicznych egzogennych związków, np. polisiiarczków zawartych w czosnku i dostarczanych wraz z pożywieniem, bądź z siarczanów przy udziale bakterii jelitowych w okrężnicy. Biorąc pod uwagę istotność działania tych molekuł w fizjologii

i patofizjologii, w ciągu ostatnich lat zidentyfikowano lub opracowano szereg donorów farmakologicznych, które uwalniają CO lub H<sub>2</sub>S.

Droga podania środka farmakologicznego jest istotnym czynnikiem mającym wpływ na aktywność biologiczną oraz dalszą biodystrybucję w organizmie. Wcześniejsze prace koncentrowały się na aplikacji CO drogą inhalacyjną. W późniejszych badaniach zauważono, że CO ma wysokie powinowactwo do szeregu metali przejściowych, tworząc z nimi związki kompleksowe – karbonylki, które przyciągnęły wiele uwagi badaczy jako potencjalne donory CO. Jednym z pierwszych takich związków był tetrakarbonyłek niklu (Ni(CO)<sub>4</sub>), nad którym już w 1891 r. McKendrick i Snodgrass prowadzili badania, jednak związek ten okazał się być wysoce toksyczny. Kolejny przełom nastąpił, gdy grupa naukowców pod kierownictwem Motterliniego opracowała alternatywne donory CO (z j.ang. *Carbon Monoxide Releasing Molecules*, CORM), zawierające w swojej strukturze takie metale jak ruten, mangan, molibden i żelazo. Substancje te okazały się na tyle mało toksyczne, że znalazły zastosowanie w badaniach na poziomie komórkowym *in vitro* oraz na modelach zwierzęcych *in vivo*. Jednym z takich związków jest dimer trikarbonylodichlororutenu (CORM-2), którego chroniczna aplikacja m.in. przyspieszała gojenie się przewlekłych wrzodów błony śluzowej żołądka. Jednakże, CORM-2 posiada w swojej strukturze potencjalnie cytotoksyczny ruten, który jak pokazały ostatnie badania wykazuje tendencję do wiązania się z grupami sulfhydrylowymi w białkach. Dlatego też, kliniczne zastosowanie tej substancji w przyszłości wydaje się ograniczone, pomimo wykazanego w warunkach laboratoryjnych potencjału prewencyjnego oraz terapeutycznego względem uszkodzeń błony śluzowej przewodu pokarmowego oraz zmian patologicznych obejmujących inne układy organizmu.

W warunkach eksperymentalnych, na przełomie lat stosowano różne donory H<sub>2</sub>S, w tym np. wodorosiarczek sodu (NaHS). Ta nieorganiczna sól, w badaniach na zwierzętach zapobiegała gastrotoksyczności indukowanej przez niesteroidowe leki przeciwzapalne (NLPZ) oraz zwiększała sekrecję jonów wodorowęglanowych (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) w dwunastnicy, co przyczyniało się do zachowania integralności błony śluzowej przewodu pokarmowego. Innym prostym związkiem uwalniającym H<sub>2</sub>S pochodzenia naturalnego jest zawarty w czosnku disiarczek diallilu (DADS). Wykazano, że DADS może m.in. hamować proliferację ludzkich komórek raka jelita grubego z linii HT29. W celu weryfikacji efektu biologicznego H<sub>2</sub>S, stosowano również prekursor biosyntezy tej molekuly, L-cysteinę oraz odczynnik Lawessona. Wśród wielu doniesień, zaobserwowano, że dożołądkowa aplikacja tych substancji, m.in. przyspieszyła gojenie przewlekłych wrzodów żołądka.

Na poziomie czynnościowym wykazano, że CO i H<sub>2</sub>S uwalniane z odpowiednich donorów wpływają na regulację mikrokrazenia żołądka, motoryki przewodu pokarmowego

oraz wydzielania żołądkowego i jelitowego. Natomiast molekularny mechanizm działania tych molekuł w obrębie błony śluzowej żołądka wynikał z modulacji szlaków komórkowych regulowanych m.in. przez czynniki jądrowe NRF-2, NF-κB czy indukowany hipoksją czynnik HIF-1α.

W świetle uzyskanych wyników badań, przeciwzapalne i przeciwoksydacyjne działanie H<sub>2</sub>S oraz CO jest zależne od stężenia i dynamiki uwalniania tych molekuł w tkance. Ze względu na obecność potencjalnie szkodliwych metali (np. rutenu w strukturze CORM-2), czy też szybki wyrzut H<sub>2</sub>S w przypadku NaHS, powyżej wymienione związki nie dawały realnych szans na implementację tego typu rozwiązań w warunkach klinicznych oraz dalszy rozwój stopnia zaawansowania badań podstawowych w dziedzinie nauk medycznych. Dlatego też, z biegiem lat opracowywano i syntetyzowano kolejne donory H<sub>2</sub>S oraz CO, o różnych strukturach i właściwościach chemicznych. Szczególnie istotne było uzyskanie kontrolowanego i powolnego uwalniania H<sub>2</sub>S lub CO. Jednym z pierwszych takich donorów H<sub>2</sub>S był związek GYY4137, którego uprzednia aplikacja m.in. zmniejszała uszkodzenia błony śluzowej żołądka wywołane ischemią z reperfuzją w modelu eksperymentalnym. Innym syntetycznym donorem H<sub>2</sub>S jest związek AP-39, który cechuje się zdolnością uwalniania H<sub>2</sub>S wewnątrz mitochondrium. Donor ten wykazuje m.in. działanie kardioprotekcyjne w warunkach laboratoryjnych. Niewątpliwie kamieniem milowym w badaniach nad donorami H<sub>2</sub>S było zsyntetyzowanie pochodnych NLPZ, posiadających w swej strukturze komponentę uwalniającą H<sub>2</sub>S, takich jak diklofenak i kwas acetylosalicylowy (ASA) sprzężone z desmetyloanetolotritonem (odpowiednio, ATB-337 i ACS14) lub naproksen sprzężony z 4-hydroksytiobenzamidem (ATB-346). ATB-346 w badaniach przedklinicznych cechował się znacząco zredukowaną gastrotoksycznością będącą głównym efektem ubocznym farmakoterapii NLPZ i obiecująco przechodzi II fazę badań klinicznych. Z tego względu, udoskonalanie i wdrażanie nowych bezpiecznych proleków uwalniających CO i H<sub>2</sub>S w celu uzyskania efektu ochronnego i terapeutycznego jest szczególnie istotne dla dalszego rozwoju nauk medycznych, w tym szczególnie fizjologii i farmakologii przewodu pokarmowego na poziomie poznawczym i translacyjnym.

Dlatego też, celem niniejszej pracy było określenie molekularnego mechanizmu działania nowej grupy proleków uwalniających CO lub H<sub>2</sub>S w utrzymaniu fizjologicznej integralności błony śluzowej żołądka warunkującej redukcję gastrotoksyczności indukowanej aplikacją ASA jako leku z grupy NLPZ lub porównawczo nekrotyzującego czynnika chemicznego, jakim jest etanol. Badania przeprowadzono w ramach współpracy z Prof. Binghe Wang'iem z Georgia State University w Atlancie (USA), który opracował nową klasę związków uwalniających gazowe mediatory, w tym donor CO o akronimie BW-CO-111 oraz donor H<sub>2</sub>S o akronimie

BW-HS-101. BW-CO-111 nie posiada w swojej strukturze metalu i charakteryzuje się samoistnym wyrzutem CO w roztworze wodnym, z czasem półtrwania wynoszącym około 12 min., natomiast BW-HS-101 cechuje się uwalnianiem H<sub>2</sub>S indukowanym enzymatycznie pod wpływem esteraz, z czasem półtrwania wynoszącym około 13 min.

Materiał biologiczny do analizy mikroskopowej oraz do badań biochemicznych i molekularnych pozyskano w ramach eksperymentów *in vivo*, które przeprowadzono na szczurach rasy Wistar. Zwierzętom zaaplikowano drogą dożołądkową (i.g.):

- i) rozcieńczony dimetylosulfotlenek (DMSO) z wodą (w stosunku 1:9) jako placebo,
- ii) BW-CO-111 (0.02-5 mg/kg),
- iii) BW-CP-111 (0.1 mg/kg) jako kontrola strukturalna dla BW-CO-111, która nie uwalnia CO,
- iv) BW-HS-101 (0.5-50 µmol/kg),
- v) BW-iHS-101 (50 µmol/kg) jako kontrola strukturalna dla BW-HS-101, która nie uwalnia H<sub>2</sub>S,
- vi) nieaktywny metabolit BW-HS-101/BW-iHS-101, określony roboczo jako lakton (50 µmol/kg).

Analizę mikroskopową, biochemiczną i molekularną przeprowadzono również w grupach, które były traktowane donorem H<sub>2</sub>S w kombinacji z inhibitorem syntazy NO (NOS), NG-nitro-L-argininą (L-NNA, 20 mg/kg dootrzewnowo (i.p.)), oraz inhibitorem HMOX, protoporfiryną cynkową IX (ZnPP, 10 mg/kg i.p.) w celu oceny interakcji BW-HS-101 ze szlakiem biosyntezy endogennego NO oraz CO.

Po podaniu ww. związków, zwierzęta otrzymały standardowo ASA (125 mg/kg i.g.) lub 75% etanol (i.g.) w celu wywołania modelowych uszkodzeń błony śluzowej żołądka. Następnie, po wprowadzeniu zwierząt w stan znieczulenia ogólnego dokonano pomiaru poziomu żołądkowego przepływu krwi (z j. ang. *gastric blood flow*, GBF) z użyciem przepływomierza laserowego, pobrano krew (surowica) z żyły próżnej dolnej. Po wypreparowaniu żołądka i ocenie makroskopowej powierzchni modelowych uszkodzeń pobrano bioptaty do badań histopatologicznych oraz do dalszych analiz biochemicznych i molekularnych.

Odpowiednio utrwalone i wybarwione preparaty błony śluzowej żołądka poddano ocenie mikroskopowej z zastosowaniem odpowiedniej skali stopnia uszkodzeń modelowych.

W pobranych próbkach błony śluzowej żołądka oznaczono:

- 1) ekspresję mRNA dla HMOX-1, HMOX-2, cyklooksygenazy (COX)-1 oraz COX-2, indukowalnej NOS (iNOS), aneksyny-A1 (ANXA1), transformującego czynnika wzrostu (TGF)-β1, receptora dla TGF-β (TGFBR)1, TGFBR2, TGFBR3, interleukiny (IL)-1β,

supresora sygnalizacji cytokin 3 (SOCS3), receptora dla IL-1 (IL1-R)1, IL1-R2, receptora dla czynnika martwicy nowotworów (TNF-R)2 oraz podjednostki A kompleksu dehydrogenazy bursztynianowej i  $\beta$ -aktyny (ACTB) jako genów referencyjnych metodą *real-time* PCR,

2) ekspresję na poziomie białka dla HMOX-1, HMOX-2, COX-1, COX-2 oraz czynnika jądrowego NRF-2, a także ACTB i dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) jako białek referencyjnych metodą Western Blot,

3) stężenia odpowiednich biomarkerów pro- i przeciwzapalnych, takich jak IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , nabłonkowy czynnik wzrostu (EGF), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów (GM-CSF), czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF) techniką multipleksowania z użyciem platformy Luminex,

4) poziom 8-hydroksydeoksyguanozyny (8-OHdG) oraz poziom prostaglandyny (PG)E<sub>2</sub> metodą immunoenzymatyczną (ELISA),

5) poziom endogennego CO - metodą chromatografii gazowej z metanizerem i detektorem płomieniowo-jonizacyjnym (GC-O/FID).

Ponadto, w surowicy oznaczono stężenia tych biomarkerów pro- i przeciwzapalnych na poziomie systemowym, takich jak IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$ , GM-CSF, VEGF techniką multipleksowania z odczytem fluorescencji.

Dokonano także pomiaru uwalniania CO ze związku BW-CO-111 *in vitro* w obecności soku żołądkowego metodą GC-O/FID oraz przeprowadzono konwersję chemiczną związku BW-HS-101/BW-iHS-101 celem uzyskania metabolitu tych związków jakim jest lakton do dalszej implementacji w modelach eksperymentalnych.

Zaobserwowano, że nowe donory CO i H<sub>2</sub>S, tj. odpowiednio BW-CO-111 oraz BW-HS-101 zależnie od dawki hamowały rozwój uszkodzeń błony śluzowej żołądka indukowanych aplikacją ASA lub 75% etanolu, czemu towarzyszył statystycznie znamieny wzrost GBF. Dawki 0.1 mg/kg dla BW-CO-111 oraz 50  $\mu$ mol/kg dla BW-HS-101 redukowały poziom uszkodzeń na poziomie mikro i makroskopowym o co najmniej 50%, dlatego też zostały wybrane do dalszych analiz. BW-CP-111 oraz lakton nie wykazały działania gastroprotekcynowego oraz nie wpływały na analizowane szlaki molekularne. Co ciekawe, w pierwotnym założeniu nieaktywny analog BW-iHS-101, również wykazywał na poziomie mikroskopowym działanie ochronne, podobnie jak BW-HS-101, co może mieć związek ze zbliżoną strukturą chemiczną tych substancji. Jednak mechanizm molekularny działania BW-iHS-101 oraz BW-HS-101 był odmienny.

Aplikacja BW-CO-111 (0.1 mg/kg) zwiększyła biodostępność CO w błonie śluzowej żołądka. Gastroprotekcji BW-CO-111, względem wybranych uszkodzeń modelowych, towarzyszyło utrzymanie indukowanego aplikacją ASA wzrostu ekspresji mRNA

dla HMOX-1 z jednoczesnym spadkiem ekspresji dla prozapalnych iNOS oraz COX-2 w błonie śluzowej żołądka oraz utrzymanie wzrostu poziomu białka dla TGF- $\beta$  na poziomie systemowym. Wysokie dawki ASA obniżały ekspresję mRNA dla przeciwzapalnej ANXA1 czego nie zaobserwowano po aplikacji BW-CO-111. Ponadto, BW-CO-111, obniżył również stężenia jedenastu biomarkerów zapalnych w surowicy (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  i GM-CSF) w modelu etanolem. Ochronnemu działaniu BW-CO-111 względem uszkodzeń indukowanych 75% etanolem towarzyszył wzrost stężenia gastroprotekcynnej PGE<sub>2</sub> w błonie śluzowej żołądka.

Gastroprotekcynnemu działaniu BW-HS-101 towarzyszył spadek poziomu stężenia markera oksydacji DNA, 8-OHdG w błonie śluzowej żołądka. Związki BW-HS-101 i BW-iHS-101 nie miały wpływu na wytwarzanie PGE<sub>2</sub> w błonie śluzowej żołądka, ale wykazywały działanie przeciwzapalne na poziomie ogólnoustrojowym obserwowane jako spadek stężenia w surowicy TNF- $\alpha$  i VEGFA. Co istotne, uwalniający H<sub>2</sub>S związek BW-HS-101, ale nie BW-iHS-101 wpływał na wzrost ekspresji mRNA dla przeciwzapalnego SOCS3 i HMOX-1 oraz efektywniej redukował stężenie markerów zapalnych w błonie śluzowej żołądka z gastropatią indukowaną aplikacją ASA. Farmakologiczne zahamowanie aktywności biosyntezy NO przez aplikację L-NNA znacząco obniżało działanie ochronne BW-HS-101, czemu również towarzyszył spadek GBF.

Podsumowując, przeprowadzone badania wykazały, że H<sub>2</sub>S oraz CO uwalniane z nowych donorów, takich jak odpowiednio BW-HS-101 oraz BW-CO-111 po aplikacji dożołądkowej wzmacniają fizjologiczną barierę ochronną błony śluzowej górnego odcinka przewodu pokarmowego. Tym samym, związki te wykazują działanie gastroprotekcynne względem ostrych uszkodzeń błony śluzowej żołądka wynikających z bezpośredniej ekspozycji na czynnik chemiczny jakim jest etanol oraz redukują gastrotoksyczność indukowaną aplikacją ASA jako modelowego leku z grupy NLPZ. Molekularny mechanizm działania gastroprotekcynnego H<sub>2</sub>S uwalnianego z BW-HS-101 jest zależny od biosyntezy endogenego NO oraz modulacji aktywności przeciwzapalnego szlaku SOCS3, przy możliwym udziale ścieżki CO/HMOX-1. Molekularny mechanizm gastroprotekcynnego działania BW-CO-111 może być mediowany przez aktywność szlaku TGF- $\beta$  oraz ANXA1. Ochronne działanie CO uwalnianego z BW-CO-111 na śluzówkę żołądka wynika częściowo z utrzymania poziomu ochronnej PGE<sub>2</sub>. Zarówno BW-HS-101 jak i BW-CO-111 wykazały działanie przeciwzapalne na poziomie systemowym jak i bezpośrednio w obrębie śluzówki żołądka.

**SŁOWA KLUCZOWE:** BW-CO-111, BW-HS-101, gazowe mediatory, gastrotoksyczność polekowa, bariera śluzówkowa żołądka

## **Streszczenie w języku angielskim**

A growing body of scientific evidence showed that carbon monoxide (CO) and hydrogen sulfide (H<sub>2</sub>S) are important gaseous mediators produced and released endogenously in mammalian tissues. Both molecules exert multidirectional biological activity and participate in many physiological and pathological processes. Therefore, these molecules play an important role in the organisms, similarly to the third sibling gaseous mediator, nitric oxide (NO). It has been shown that CO and H<sub>2</sub>S can protect gastrointestinal (GI) mucosa by modulation of inflammatory response and several processes at the molecular and functional levels. The enzymatic pathways involved in the endogenous biosynthesis of these gaseous mediators are key components of the physiological protective barrier of the GI mucosa taking part in the maintenance of its integrity during exposure to acute stress, ischemia/reperfusion or intragastric (i.g.) application of chemical agents such as ethanol and drugs. It should be noted that the beneficial bioactivity of CO and H<sub>2</sub>S is not limited to the GI tract since it was also observed within cardiovascular system, where these molecules exert vasodilatory effect or inhibit the aggregation of platelets and adherence of leukocytes to the endothelium, as well as within central nervous system where they act as neuromodulator, antioxidant and cytoprotective factors.

CO biosynthesis in mammalian tissues is based on oxidative degradation of heme, catalyzed by heme oxygenases (HMOX), mainly inflammation-sensitive and inducible HMOX-1 as well as constitutive HMOX-2. CO is one of the heme degradation products, next to biliverdin and Fe<sup>2+</sup> ions. Whereas H<sub>2</sub>S is generated endogenously mainly as a result of L-cysteine metabolism by enzymatic activity of cystathionine  $\gamma$ -lyase (CTH) and cystathionine  $\beta$ -synthase (CBS), with pyridoxal-5-phosphate (vitamin B6) as a cofactor. H<sub>2</sub>S is additionally formed from 3-mercaptopyruvate, due to the enzymatic activity of 3-mercaptopyruvate sulfur transferase (MPST) and can also be generated through the metabolism of exogenous compounds e.g., from polysulfides derived from garlic and food or from sulphates by the activity of colonic microbiota. Considering the important contribution of these molecules in physiology and pathophysiology, many CO- or H<sub>2</sub>S-releasing pharmacological donors have been identified or developed in recent years.

The route of administration of a pharmacological agent is an important factor affecting its biological activity and further biodistribution. Previously published data were based on the inhalational CO application. Nevertheless, it was noted that CO has a high affinity to transition metals and ability to form complexes with them, namely carbonyls. These compounds attracted attention as potential CO donors. McKendrick and Snodgrass were focused on the one

of the first compounds from this class - nickel tetracarbonyl ( $\text{Ni}(\text{CO})_4$ ). However, this compound was shown to be highly toxic. Furthermore, Motterlini *et al.* developed alternative group of metal-based CO-releasing compounds (Carbon Monoxide Releasing Molecules, CORM), containing ruthenium (Ru), manganese, molybdenum, and iron in their structure. These CO-donors were shown to have sufficiently low toxicity to be implemented as pharmacological tools in the research area involving *in vitro* cellular and *in vivo* animal models. One of these compounds is tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer (CORM-2) which was reported e.g., to accelerate the healing of chronic gastric ulcers. However, CORM-2 contains in its structure potentially cytotoxic Ru which tends to bind to sulfhydryl groups in proteins. Therefore, despite the preventive and therapeutic potential of CORM-2 demonstrated experimentally within GI mucosa and within other systems, the possible clinical implementation of this compound seems to be limited.

On the other hand, under experimental conditions, various  $\text{H}_2\text{S}$  donors were used over the years, including for example, sodium hydrosulfide (NaHS). This inorganic salt was shown to decrease gastrototoxicity induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), to increase the secretion of bicarbonate ions ( $\text{HCO}_3^-$ ) in the duodenum, and to enhance the maintenance GI mucosal integrity in animal studies. Another simple  $\text{H}_2\text{S}$  liberating compound of natural origin is the diallyl disulfide (DADS) derived from garlic. Among others, DADS was reported to inhibit the proliferation of HT29 human colon cancer cells. Additionally, L-cysteine as the precursor of  $\text{H}_2\text{S}$  biosynthesis and Lawesson's reagent were used to verify the biological effect of this gaseous mediator. Among many reports, it has been observed that intragastric (i.g.) application of these compounds accelerated the healing of chronic gastric ulcers.

At the functional level, it has been shown that CO and  $\text{H}_2\text{S}$  released from chemical donors affect gastric microcirculation, GI motility and secretion. The molecular mechanism of action of these molecules within gastric mucosa involves the modulation of cellular pathways such as nuclear factors NRF-2, NF- $\kappa$ B or the hypoxia-inducible factor (HIF)-1 $\alpha$ .

Based on previously published data, anti-inflammatory and anti-oxidative activity of  $\text{H}_2\text{S}$  and CO depends on the concentration and the release dynamics of these molecules in the tissue. Due to the presence of potentially cytotoxic metals (e.g., Ru in CORM-2 structure), or the rapid release of  $\text{H}_2\text{S}$  from NaHS, the above-mentioned compounds do not seem to be further implemented in clinical pharmacology and to significantly increase the advancement of basic research in the field of medical sciences. Therefore, over the recent years, a variety of  $\text{H}_2\text{S}$  and CO donors with different structures and chemical properties were developed and synthesized. It was particularly important to obtain a pharmacological tool with controlled



and slow release of H<sub>2</sub>S or CO. One of the first H<sub>2</sub>S slow-releasing donors was GYY4137. This compound was reported to reduce ischemia/reperfusion-induced gastric mucosal damage in experimental model. Another synthetic H<sub>2</sub>S donor, AP-39 is capable to target mitochondria. This compound was shown to exert e.g., cardioprotective activity. Importantly, a milestone in the research on the role of H<sub>2</sub>S and its donors in biomedicine was the development of novel derivatives of NSAIDs with an H<sub>2</sub>S-releasing moiety in their structure. This includes e.g., diclofenac and acetylsalicylic acid (ASA) coupled with desmethylanethol trithione (ATB-337 and ACS14, respectively) or naproxen coupled with 4-hydroxytibenamide (ATB-346). In preclinical studies, ATB-346 was shown to have significantly reduced gastrotoxicity being the main adverse effect of NSAIDs pharmacotherapy. Moreover, ATB-346 passed Phase II clinical trials. Thus, the development and implementation of novel, safe CO and H<sub>2</sub>S releasing prodrugs as a protective and therapeutic solutions is important for the further development of medical sciences, including particularly GI physiology and pharmacology at the cognitive and translational level.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the molecular mechanism of action of a novel group of CO- or H<sub>2</sub>S-releasing prodrugs in the maintenance of the physiological gastric mucosal integrity determining the reduction of gastrotoxicity induced by i.g. administration of acetylsalicylic acid (ASA) as a representative NSAID or comparatively, by ethanol as necrotizing chemical agent. This study was performed in collaboration with Prof. Binghe Wang from Georgia State University in Atlanta (USA), who developed a new class of organic gaseous mediators-releasing prodrugs, including CO donor with the acronym BW-CO-111 and H<sub>2</sub>S donor with the acronym BW-HS-101. Importantly, BW-CO-111 does not contain metal in its structure and is characterized by a spontaneous CO release in aqueous solution with a half-life of approximately 12 minutes. BW-HS-101 is characterized by an enzymatically induced H<sub>2</sub>S release by esterase activity, with a half-life of approximately 13 minutes.

Biological samples for microscopic evaluation as well as for biochemical and molecular analysis was collected within *in vivo* experiments on male Wistar rats. The animals were administered i.g. with following chemicals:

- i) dimethyl sulfoxide (DMSO) and water (1:9 ratio) as placebo,
- ii) BW-CO-111 (0.02-5 mg/kg),
- iii) BW-CP-111 (0.1 mg/kg) as a structural control for BW-CO-111 without ability to release CO,
- iv) BW-HS-101 (0.5-50 μmol/kg),

v) BW-iHS-101 (50  $\mu\text{mol/kg}$ ) as a structural control for BW-HS-101 without ability to release  $\text{H}_2\text{S}$ ,

vi) inactive metabolite of BW-HS-101/BW-iHS-101, operatively designated as a lactone (50  $\mu\text{mol/kg}$ ).

Microscopic, biochemical, and molecular analyses were also performed within the groups that were treated with the above-mentioned  $\text{H}_2\text{S}$  donor applied in combination with the NO synthase inhibitor (NOS), NG-nitro-L-arginine (L-NNA, 20 mg/kg intraperitoneally (i.p.)), and the inhibitor of HMOX, zinc Protoporphyrin IX (ZnPP, 10 mg/kg i.p.) to evaluate the interaction of BW-HS-101 with the endogenous NO and CO biosynthesis pathways.

After treatments, animals were administered with ASA (125 mg/kg i.g.) or 75% ethanol (i.g.) to induce experimental model of gastric mucosal damage. Next, under general anaesthesia, the level of gastric blood flow (GBF) was measured using a laser flowmeter, blood (serum) samples were collected from *vena cava*. Stomach was isolated and macroscopic evaluation of gastric mucosal lesions was performed. Gastric tissue samples were collected for histopathological examination and further biochemical and molecular analyses.

Appropriately fixed and stained gastric tissue sections were assessed microscopically based on the scale evaluating the degree of gastric damage.

The following molecular analyses were performed based on gastric mucosal biopsies:

1) mRNA expression for HMOX-1, HMOX-2, cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2, inducible NOS (iNOS), annexin-A1 (ANXA1), transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1, TGF-receptor  $\beta$  (TGFB $\beta$ 1, TGFB $\beta$ 2, TGFB $\beta$ 3), interleukin (IL)-1 $\beta$ , suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3), IL-1 receptor (IL1-R)1, IL1-R2, tumor necrosis factor receptor (TNF-R)2 and the succinate dehydrogenase complex flavoprotein subunit A (SDHA) and  $\beta$ -actin (ACTB) as reference genes by real-time PCR,

2) protein level for HMOX-1, HMOX-2, COX-1, COX-2, and nuclear factor NRF-2, as well as ACTB and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as reference proteins by Western Blot,

3) concentrations of appropriate pro- and anti-inflammatory biomarkers, such as IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, TNF- $\alpha$ , epithelial growth factor (EGF), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF) by Luminex multiplex microbeads fluorescent assay,

4) the level of 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) and the level of prostaglandin (PG) $\text{E}_2$  by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA),

5) endogenous CO level by gas chromatography with methanizer and flame ionization detector (GC-O/FID).

In addition, serum concentrations of pro-and anti-inflammatory biomarkers, such as IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$ , interferon (IFN) - $\gamma$ , GM-CSF, VEGF were measured at the systemic level by multiplex microbeads fluorescent assay.

Measurement of CO release from BW-CO-111 *in vitro* in the presence of stimulated gastric fluid was performed by GC-O/FID. Chemical conversion of BW-HS-101/BW-iHS-101 was also performed *in vitro* to obtain a metabolite of these compounds (lactone), for further implementation in experimental models.

Novel CO and H<sub>2</sub>S prodrugs, BW-CO-111 and BW-HS-101, respectively, dose-dependently inhibited the development of gastric mucosal damage induced by the i.g. administration of ASA or 75% ethanol. This effect was accompanied by increased GBF level. The doses of 0.1 mg/kg for BW-CO-111 and 50  $\mu$ mol/kg for BW-HS-101 reduced the level of macro- and/or microscopic gastric damage by at least 50%. Therefore, these doses were selected for further analyses. BW-CP-111 and lactone did not show any gastroprotective effect and did not affect selected molecular pathways. Surprisingly, the chemical analogue without ability to release H<sub>2</sub>S, BW-iHS-101 also showed a protective effect at the microscopic level, in similar extent to BW-HS-101. This effect may be related to the similar chemical structure of these substances. However, the molecular mechanism of action of BW-iHS-101 and BW-HS-101 was different.

Administration of BW-CO-111 (0.1 mg/kg) increased the bioavailability of CO in gastric mucosa. BW-CO-111-mediated gastroprotection against chemically induced lesions was accompanied by the maintenance of ASA-induced increase in gastric mucosal mRNA expression for anti-inflammatory HMOX-1 with a simultaneous decrease in the expression of pro-inflammatory iNOS and COX-2 and maintenance of the increased systemic TGF- $\beta$  protein level. ASA downregulated mRNA expression for the anti-inflammatory ANXA1, which was not observed after pre-treatment with BW-CO-111. Moreover, BW-CO-111 also decreased serum content of eleven inflammatory biomarkers (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and GM-CSF) in samples of rats exposed to ethanol. Preventive effect of BW-CO-111 against the GI damage induced by 75% ethanol was accompanied by an increase in cytoprotective PGE<sub>2</sub> gastric mucosal concentration.

BW-HS-101 gastroprotection was accompanied by a decrease in the gastric mucosal concentration of the DNA oxidation marker, 8-OHdG. Both, BW-HS-101 and BW-iHS-101 had no effect on the gastric mucosal production of PGE<sub>2</sub> but exerted anti-inflammatory effect at the systemic level reflected by decreased TNF- $\alpha$  and VEGFA serum concentrations. Importantly, the H<sub>2</sub>S-releasing BW-HS-101 but not BW-iHS-101, increased the mRNA expression for anti-inflammatory SOCS3 and HMOX-1 and more effectively reduced

the concentration of inflammatory markers within the gastric mucosa with ASA-induced gastropathy. Pharmacological inhibition of NO biosynthesis pathway activity significantly decreased GBF and the protective effect of BW-HS-101.

In conclusion, this study reported that H<sub>2</sub>S and CO released from novel organic prodrugs, such as BW-HS-101 and BW-CO-111, respectively, after i.g. administration enhance the physiological protective mucosal barrier within upper GI tract. Thus, these gaseous mediators-releasing compounds exert gastroprotective effects against acute gastric mucosal damage induced by direct exposure to ethanol as the chemical agent and importantly to reduce gastric toxicity induced by the administration of ASA, as a representative drug from the NSAIDs group. The molecular mechanism of the gastroprotective action of BW-HS-101-derived H<sub>2</sub>S is dependent on the biosynthesis of endogenous NO and the modulation of the activity of the anti-inflammatory SOCS3 signalling, possibly mediated at least in part by the CO/HMOX-1 pathway. The molecular mechanism of BW-CO-111-mediated gastroprotection may involve the co-activity of the TGF- $\beta$  and ANXA1 pathways. The protective effect of BW-CO-111-derived CO on the gastric mucosa in part due to the maintenance of protective PGE<sub>2</sub> level. Both prodrugs, BW-HS-101 and BW-CO-111 showed anti-inflammatory effects at the systemic level and directly within the gastric mucosa.

**KEY-WORDS:** BW-CO-111, BW-HS-101, gaseous mediators, drug-induced gastric toxicity, gastric mucosal barrier