



Ocena rozprawy doktorskiej na stopień doktora nauk medycznych mgr Dominika Bakalarza pt.

„Molekularne mechanizmy działania nowych donorów tlenku węgla i siarkowodoru wzmacniające fizjologiczną integralność błony śluzowej żołądka w redukcji ostrej gastrotoksyczności polekowej”

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska na stopień doktora nauk medycznych Pana **mgr Dominika Bakalarza** pt.: *„Molekularne mechanizmy działania nowych donorów tlenku węgla i siarkowodoru wzmacniające fizjologiczną integralność błony śluzowej żołądka w redukcji ostrej gastrotoksyczności polekowej”* wykonana pod kierunkiem promotora Pana dr hab. n.med. Marcina Magierowskiego w Pracowni Inżynierii Komórkowej i Diagnostyki Izotopowej Katedry Fizjologii *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa Doktorska powstała w oparciu o cykl dwóch oryginalnych publikacji powiązanych ze sobą tematycznie o łącznym współczynniku oddziaływania $IF = 11,65$ (wg. Thomson Reuters Journal Citation Reports) oraz punkty MNiSW: 280;

Publikacja nr 1 pt.: *„Organic carbon monoxide prodrug, BW-CO-111, in protection against chemically-induced gastric mucosal damage”* Dominik Bakalarz, Marcin Surmiak, Xiaoxiao Yang, Dagmara Wójcik, Edyta Korbut, Zbigniew Śliwowski, Grzegorz Ginter, Grzegorz Buszewicz, Tomasz Brzozowski, Jakub Cieszkowski, Urszula Głowacka, Katarzyna Magierowska, Zhixiang Pan, Binghe Wang, Marcin Magierowski. *Acta Pharm Sin B* 2021; 11(2): 456-475.doi: 10.1016/j.apsb.2020.08.005. Epub 2020 Aug 24.

Publikacja nr 2 pt.: *„Novel Hydrogen Sulfide (H_2S)-Releasing BW-HS-101 and Its Non- H_2S Releasing Derivative in Modulation of Microscopic and Molecular Parameters of Gastric Mucosal Barrier”* Dominik Bakalarz, Edyta Korbut, Zhengnan Yuan, Bingchen Yu, Dagmara Wójcik, Aleksandra Danielak, Katarzyna Magierowska, Sławomir Kwiecień, Tomasz Brzozowski, Monika Marcinkowska, Binghe Wang, Marcin Magierowski.

Czasopisma, w których Doktorant opublikował wyniki prac doświadczalnych są wysoko pozycjonowane w obrębie farmakologii eksperymentalnej i badań molekularnych i cechują się wysokimi współczynnikami oddziaływania; *Acta Pharmaceutica Sinica B* (IF 5-letni: 7,865), *International Journal Molecular Science* (IF 5-letni: 4.653). W każdej z wymienionych prac, Doktorant jest pierwszym autorem, co podkreśla wiodącą rolę Doktoranta w przebiegu planowania i realizacji badań, których wyniki badań zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Wymienione publikacje naukowe zostały zrecenzowane zgodnie z wymogami obu redakcji czasopism. W opinii recenzenta, same wyniki badań eksperymentalnych na grupie nowych potencjalnych leków na modelu zwierzęcym oraz wysoka ranga czasopism, w których wyniki te zostały opublikowane świadczą o dużej wartości



merytorycznej, dokonanych obserwacji oraz uzasadniają konieczność podejmowania badań w tym zakresie. Dwie prace doświadczalne były efektem współpracy naukowej Doktoranta z Prof. Binghe Wang'a z George State University w Atlancie (USA), który jest twórcą nowych proleków uwalniających CO i H₂S. Efektem wymiernym współpracy Doktoranta z Prof. Wangiem z USA w ramach stażu naukowego są wyniki badań prezentowane przez Doktoranta w dwóch wieloautorskich publikacjach naukowych. Współpraca naukowa Doktoranta zaowocowała bardzo rzetelną i wielowątkową analizą wpływu nowych proleków uwalniających CO lub H₂S na błonę śluzową żołądka zwierząt doświadczalnych *in vivo* uszkodzoną za pomocą EtOH i/lub ASA. Warto podkreślić, że część pracy dotyczącej molekularnego mechanizmu działania tlenku węgla jest tematycznie powiązana i była częściowo wynikiem realizacji przez Doktoranta grantu badawczego finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (nr UMO-2019/33/B/NZ4/00616).

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska posiada układ zgodny z obowiązującymi dla prac doktorskich. Praca zawiera wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską wraz ze streszczeniem w języku polskim i angielskim, dwie opublikowane prace naukowe oraz oświadczenia współautorów.

Temat rozprawy doktorskiej dotyczy jednego z bardzo aktualnych zagadnień związanych z alternatywnymi próbami leczenia ostrego polekowego uszkodzeniu błony śluzowej żołądka, za pomocą zupełnie nowej generacji proleków uwalniających CO lub H₂S. Tematykę tę postrzegam jako oryginalną, uzasadniającą próbę podjęcia badań przedklinicznych z użyciem modelu małych zwierząt laboratoryjnych *in vivo*.

Stany zapalne błony śluzowej żołądka indukowane nekrotycznym działaniem etanolu lub stosowaniem NLPZ stanowią istotny problem kliniczny. Inhibitory pompy protonowej (PPI) są powszechnie stosowanymi lekami, które ograniczają uszkodzenia błony śluzowej żołądka spowodowane przez czynniki gastrotoksyczne. Przewlekłe użycie PPI może doprowadzić do skutków ubocznych w tym: achlorydii mogącej indukować nadmierny rozrost bakterii w przewodzie pokarmowym lub stanowić czynnik ryzyka rozwoju raka żołądka. Istnieje ciągła konieczność poszukiwania nowych leków, które wykazują działanie cytoprotekcyjne względem komórek błony śluzowej żołądka. Istnieją fizjologiczne mechanizmy m.in.: endogenne układy syntetyzujące gazowe molekuly: tlenek węgla (CO) oraz siarkowodór (H₂S), które wykazują działanie cytoprotekcyjne nie tylko w obrębie komórek błony śluzowej żołądka. Wykazano, że CO oraz H₂S wykazują działanie ochronne w obrębie błony śluzowej przewodu pokarmowego ograniczając uszkodzenia komórek błony śluzowej przewodu pokarmowego przed czynnikami toksycznymi. Molekuly te działają także naczynio-rozszerzająco, hamują agregację trombocytów i adhezję leukocytów do śródbłonka, w układzie nerwowym odpowiedzialne są za działanie neuromodulujące, cytoprotekcyjne



i antyoksydacyjne. Biosynteza CO odbywa się w organizmie w wyniku oksydatywnej degradacji hemu, katalizowanej przez oksygenazy hemowe (HMOX). HMOX-1 jest izoformą indukowaną stanem zapalnym, HMOX-2 jest izoformą enzymu, którego gen transkrybowany jest konstytutywnie. Endogeny CO jest więc produktem rozpadu hemu, obok biliwerdyny i Fe^{3+} . H_2S powstaje głównie wskutek metabolizmu aminokwasu L-cysteiny z udziałem liazy cystationowej (CTH) oraz β -syntazy cystationowej (CBS). H_2S może powstawać także wskutek metabolizmu dostarczonych w diecie polisaccharków, bądź powstawać może z siarczanów przy udziale bakterii jelitowych bytujących w okrężnicy.

Doktorant w sposób jasny i jednoznaczny formułuje główny cel pracy jako określenie molekularnego mechanizmu działania nowych proleków uwalniających CO (BW-CO-111) i H_2S (BW-HS-101) w utrzymaniu fizjologicznej integralności błony śluzowej żołądka warunkującej redukcję gastrotoksyczności indukowanej aplikacją aspiryny lub etanolu w wysokim stężeniu.

Czytając tekst dwóch publikacji, których głównym autorem jest Doktorant z przyjemnością stwierdzam, że nie mam krytycznych uwag, które mogłyby się nasunąć podczas analizy przedstawionej rozprawy, a drobne uwagi, które nasunęły mi się jako recenzentowi nie wpływają na merytoryczną ocenę przedstawionej pracy doktorskiej.

Z obowiązku recenzenta muszę stwierdzić, że metodologia badań stosowanych przez doktoranta jest złożona, co może tłumaczyć dużą ilość współautorów (15-u w **publikacji nr 1**, 12-u w **publikacji nr 2**). W omawianych pracach naukowych dokonano szeregu złożonych i czasochłonnych analiz biochemicznych, molekularnych (ekspresja na poziomie mRNA oraz białka) oraz badań mikroskopowych wycinków tkankowych, co tłumaczy obecność wielu autorów w publikacjach wchodzących w cykl. Doktorant wskazuje w rozprawie doktorskiej swój procentowy udział w procesie powstawania **publikacji nr 1** i określa go na poziomie 40%, w przypadku **publikacji nr 2** – 50% i wskazuje na swój współudział (w obydwu publikacjach) w: projektowaniu całościowej koncepcji badawczej, przygotowaniu proleków do badań eksperymentalnych, izolacji kwasów nukleinowych, wykonaniu badań molekularnych (w tym: RT-PCR, Western-Blot, ELISA) oraz współudziale w analizie, opracowaniu i interpretacji wyników badań oraz częściowego pisania części wynikowej, dyskusji oraz wniosków, a także w przygotowaniu rycin w obydwu publikacjach.

Eksperymenty *in vivo* przeprowadzono z użyciem szczurów rasy Wistar i prowadzone były w oparciu o zgodę lokalnej komisji etycznej UJ (nr 311/2019 z 17 lipca 2019). Na uwagę zasługuje fakt dobrze przemyślanych i zaplanowanych grup badawczych w eksperymentach doświadczalnych, które prowadził Doktorant; gdyż oprócz grupy kontrolnej, gdzie zwierzętom doświadczalnym (podawany był DMSO z wodą) zamiast leku, stosowano także kontrole pozytywne i negatywne (np. prolek nieuwalniający leku - strukturalnie podobny do funkcjonalnego



proleku lub nieaktywny metabolit (lakton). Co więcej, Doktorant w analizie mikroskopowej, biochemicznej i molekularnej przeprowadził również w grupach, które były traktowane donorem H₂S w kombinacji z inhibitorem syntazy tlenku azotu (NOS) oraz inhibitorem HMOX, w celu oceny interakcji BW-HS-101 ze szlakiem endogennej biosyntezy NO oraz CO. Interesujące wydają się także wyniki przedstawione w **publikacji nr 1**, gdzie Doktorant badał także wpływ testowanych proleków w modelu uszkodzenia błony śluzowej żołądka na ogólnoustrojowe (systemowe) stężenie wybranych cytokin: IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, TNF- α , IFN- γ w surowicy zwierząt doświadczalnych z użyciem platformy luminex (Fig.11). Analiza wpływu omawianego proleku na systemowy stan zapalny indukowany chemicznym uszkodzeniem błon śluzowej żołądka byłaby pewnie jeszcze bardziej widoczna w przypadku badania ekspozycji przewlekłej na ASA lub/i EtOH. Osobiście uważam, za dodatkową zaletę dla czytelnika, że Doktorant umieścił rycinę 12 (Fig 12) w **publikacji nr 1**, która sumaryzuje (jako grafika) możliwe mechanizmy działania gastroprotekcynowego proleku BW-CO-111, co stanowi dodatkową zaletę pracy ułatwiając analizę otrzymanych wyników badań. Z drobnych uwag, rycina 1B (Fig 1B **publikacja nr 1**), przedstawiająca krzywą kalibracyjną do analizy uwalniania CO uważam za zbyteczną, tego typu wyniki badań powinny być raczej dostępne w „*supplementary materials*” a nie głównym tekście pracy.

W **publikacji nr 2**, Doktorant badał wpływ proleku uwalniającego H₂S (BW-HS-101) na uszkodzenia błony śluzowej żołądka indukowanej kwasem acetylosalicylowym (ASA) w modelu małych zwierząt laboratoryjnych (szczury szczepu Wistar). Co ciekawe, w pracy tej Doktorant wykazał ochronną aktywność biologiczną analogu BW-iHS-101 na poziomie mikroskopowym, podobnie jak BW-HS-101 co jak wskazuje może być spowodowane podobieństwem struktury chemicznej tych związków (mechanizm oddziaływania tych substancji chemicznych był jednak odmienny). Gastroprotekcynemu działaniu BW-HS-101 towarzyszył spadek stężenia 8-OHdG (marker oksydacji DNA komórek) w błonie śluzowej żołądka oraz obniżenie systemowego stanu zapalnego (*vide*: VEGFA, TNF- α). Uwalniający H₂S związek BW-HS-101 ale nie BW-iHS-101 wpływał na wzrost ekspresji mRNA kodującego białka: SOCS-3, HMOX-1. Za podobną zaletę, szczególnie w kontekście rozprawy doktorskiej, uważam umieszczenie grafiki wskazującej na możliwe mechanizmy działania BW-HS-10 oraz BW-iHS-101 na poziomie komórkowym w obrębie uszkodzonej kwasem acetylosalicylowym błony śluzowej żołądka (Fig. 8, **publikacja nr 2**).

Podsumowując, uważam, że Doktorant w przedstawionej mi do recenzji Dysertacji wykazał się wysoką umiejętnością prowadzenia badań naukowych, właściwym i rozbudowanym doбором metod badawczych, a wyniki uzyskanych obserwacji w modelu leczenia ostrej gastrotoksyczności polekowej za interesujące i warte kontynuowania, szczególnie w kontekście badania skuteczności



leczenia uszkodzeń błony śluzowej żołądka zwierząt doświadczalnych poddanych ekspozycji przewlekłej na etanol lub/i kwas acetylosalicylowy (w różnych stężeniach). Przeprowadzone badania w przekonujący sposób udowadniają na modelu zwierzęcym, że CO oraz H₂S uwalniane z nowych donorów, takich jak odpowiednio BW-CO-111 oraz BW-HS-101 po aplikacji dożołądkowej, wzmacniają fizjologiczną barierę ochronną błony śluzowej górnego odcinka przewodu pokarmowego. Tym samym związki te wykazują w badaniach przedklinicznych z użyciem modelu małych zwierząt laboratoryjnych - aktywność gastroprotekcijną względem ostrych uszkodzeń błony śluzowej żołądka wynikającej z bezpośredniej ekspozycji na etanolu lub/i kwas acetylosalicylowy. Warto podkreślić, że oba związki chemiczne wykazywały miejscowe oraz ogólnoustrojowe działanie przeciwzapalne. Tym bardziej uzasadnione będą próby kontynuowania badań także na innym modelu zwierzęcym (i być może także w modelu ekspozycji przewlekłej na EtOH i/lub ASA i leczenia z użyciem w/w proleków) tak, aby móc w przyszłości podjąć próbę opracowania badania klinicznego I fazy u ludzi po pozytywnych testach, z użyciem dwóch gatunków zwierząt doświadczalnych *in vivo*.

Pracę oceniam wysoce pozytywnie i uważam za odpowiadającą w pełni wymogom stawianym rozprawom doktorskim.

Biorąc powyższe pod uwagę z przyjemnością przedstawiam Wysokiej Radzie *Collegium Medicum* Uniwersytetu Jagiellońskiego **wniosek o dopuszczenie mgr Dominika Bakalarza do dalszych etapów przewodu doktorskiego na stopień doktora nauk medycznych.**