



**Zakład Patofizjologii**  
**Katedra Nauk Przedklinicznych**  
**UNIwersytet Medyczny w Lublinie**  
ul. Jaczewskiego 8b, 20-090 Lublin  
tel. +48 81 448 65 00

---

prof. dr hab. Jerzy Bętkowski  
Zakład Patofizjologii  
Uniwersytet Medyczny w Lublinie  
ul. Jaczewskiego 8b  
20-090 Lublin  
tel. 81 4486500  
e-mail: jerzy.beltowski@umlub.pl

Lublin, 2.02.2024

Recenzja pracy doktorskiej Pani Urszuli Głowackiej  
pt. „**Nowe aspekty patogenezы uszkodzeń przewodu pokarmowego w oparciu o  
eksperymentalną implementację unikatowych pochodnych niesteroidowych leków  
przeciwzapalnych uwalniających siarkowodór**”

przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Magierowskiego w Pracowni Inżynierii Komórkowej i Diagnostyki Izotopowej w Katedrze Fizjologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie

Celem przedstawionej pracy doktorskiej była ocena wpływu pochodnych niesteroidowych leków przeciwzapalnych (NLPZ) uwalniających siarkowodór (H<sub>2</sub>S) na rozwój uszkodzeń błony śluzowej przewodu pokarmowego. Badania wykonano w Pracowni Inżynierii komórkowej i Diagnostyki Izotopowej w Katedrze Fizjologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Magierowskiego

Pracę doktorską stanowi cykl trzech publikacji, w tym dwóch prac oryginalnych i jednej przeglądowej. Prace oryginalne opublikowano w czasopismach *Antioxidants and Redox Signaling* oraz *Antioxidants* odpowiednio w latach 2022 i 2023. Łączny 5-letni Impact Factor prac oryginalnych wynosi 15,5. Praca przeglądowa została opublikowana w czasopiśmie *Biomolecules* w 2020 roku. Łączny Impact Factor wszystkich trzech publikacji wynosi 21,3, a punktacja Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 420. We wszystkich publikacjach doktorantka jest pierwszym autorem. Wszyscy współautorzy złożyli oświadczenia określające

indywidualny wkład każdego z nich w powstanie publikacji oraz wskazujące, co jest samodzielną i możliwą do wyodrębnienia częścią pracy będącą indywidualnym wkładem Doktorantki. W oświadczeniach współautorów wszystkich 3 publikacji stwierdzono, że udział Doktorantki polegał na zaplanowaniu i wykonaniu części doświadczalnej (ze wskazanie konkretnych oznaczeń), wykonaniu analizy statystycznej i interpretacji wyników badań, przygotowaniu manuskryptu oraz współdziałanie w analizie recenzji manuskryptu, przygotowaniu odpowiedzi na recenzję i przygotowaniu poprawionej wersji pracy. Na podstawie analizy oświadczeń stwierdzam, że przedstawiona praca stanowi samodzielny wkład Doktorantki.

Tematyka rozprawy doktorskiej dotyczy dwóch aktualnych i ważnych zagadnień, tj. znaczenia endogennego siarkowodoru jako cząsteczki sygnałowej oraz niekorzystnego wpływu niesteroidowych leków przeciwzapalnych na błonę śluzową przewodu pokarmowego. W badaniach zastosowano dwie pochodne NLPZ uwalniające  $H_2S$ , ATB-352 (pochodna ketoprofenu) oraz ATB-344 (pochodna indometacyny) opracowane przez prof. Johna Wallace'a z Uniwersytetu w Calgary oraz rozwijane jako kandydaci na leki przez firmę biotechnologiczną Antibe Therapeutics Inc. (Toronto, Kanada).

W pierwszej z prac oryginalnych opublikowanej w *Antioxidants and Redox Signaling* w 2022 roku porównywano działanie ketoprofenu oraz ATB-352 podawanych dożołądkowo w równoważnych dawkach. Badano również wpływ ATB-352 na działanie kwasu acetylosalicylowego oraz porównywano działanie inhibitora pompy protonowej, omeprazolu, w połączeniu z ketoprofenem lub w połączeniu z ATB-352. Następnie dokonywano oceny makro- i mikroskopowej błony śluzowej żołądka i jelit. W błonie śluzowej oznaczano stężenie prostaglandyny  $E_2$ , 8-hydroksydeoksyguanozyny jako markera oksydacyjnego uszkodzenia DNA, ekspresję cyklooksigenazy 1, miedziowo-cynkowej oraz manganowej dysmutazy ponadtlenkowej (SOD-1 i SOD-2), oksydoreduktazy ksantynowej katalazy, czynnika transkrypcyjnego Nrf2, oksygenazy hemowej typu 1, czynnika indukowanego hipoksją HIF1 $\alpha$ , czynnika transkrypcyjnego NF- $\kappa$ B, aneksyny A1, białka SOCS3, interleukiny 1 $\beta$ . Oznaczano też biodostępność  $H_2S$ , profil mikrobioty jelitowej oraz poziom szeregu białek zidentyfikowanych w poprzednich badaniach jako cele molekularne  $H_2S$  lub biorących udział w ochronie błony śluzowej przed czynnikami szkodliwymi. W wykonanych badaniach wykazano, że ATB-352 w znacznie mniejszym stopniu niż ketoprofen indukuje uszkodzenia błony śluzowej przy czym w podobnym stopniu jak ketoprofen zmniejsza stężenie PGE $_2$ . Sugeruje to, że mniejsze uszkodzenia

błony śluzowej wynikają z uwalniania H<sub>2</sub>S, a nie ze słabszego hamowania COX-1. Potwierdzono to badając stężenie H<sub>2</sub>S, przy czym sam ketoprofen obniżał to stężenie w błonie śluzowej, a ATB-352 zwiększał jego biodostępność. Wykazano, że ATB-352 zwiększał ekspresję indukowalnej oksygenazy hemowej (HO-1) oraz czynnika transkrypcyjnego CREBP. Wykazano również, że o ile omeprazol nasila dysbiozę jelitową wywołaną przez ketoprofen, ATB-352 ma w tym zakresie działanie korzystne, co sugeruje, że stosowanie pochodnych NLPZ uwalniających H<sub>2</sub>S może być cenną klinicznie alternatywą dla łączenia klasycznych NLPZ z inhibitorami pompy protonowej.

W drugiej pracy oryginalnej (*Antioxidants*, 2023) badano wpływ indometacyny i jej pochodnej uwalniającej H<sub>2</sub>S, ATB-344, na rozwój uszkodzenia błony śluzowej wywołanego niedokrwieniem i reperfuzją. W badaniach tych indometacynę lub ATB-344 podawano w jednej z trzech dawek, a po 30 minutach w znieczuleniu ogólnym dokonywano okluzji pnia trzewnego w celu wywołania niedokrwienia trwającego 30 minut, a następnie przywracano przepływ krwi (reperfuzja). Badania histopatologiczne i biochemiczne wykonywano po 3 godzinach reperfuzji. Wykazano, że w przeciwieństwie do indometacyny ATB-344 w najmniejszej stosowanej dawce (7 mg/kg) wykazywał efekt gastroprotekcyny i zwiększał biodostępność H<sub>2</sub>S w błonie śluzowej żołądka, jednocześnie powodując spadek stężenia PGE<sub>2</sub> we krwi. Działanie protekcyjne nie występowało po podaniu większych dawek ATB-344, co wskazuje, że przy większych dawkach NLPZ działanie ochronne H<sub>2</sub>S zanika. Ponadto ATB-344 w przeciwieństwie do indometacyny zwiększał ekspresję SOD-2, a zmniejszał ekspresję enzymów będących potencjalnymi źródłami reaktywnych form tlenu i azotu, oksydoreduktazy ksantynowej i indukowalnej syntazy tlenku azotu. ATB-344 zmniejszał też stopień oksydacyjnego uszkodzenia kwasów nukleinowych.

W pracy przeglądowej opublikowanej w czasopiśmie *Biomolecules* w 2020 roku przedstawiono obszerne informacje na temat znaczenia H<sub>2</sub>S oraz tlenku węgla (CO) w fizjologii i patologii układu pokarmowego oraz potencjalne zastosowanie donorów tych mediatorów w terapii. Obszerne scharakteryzowano podobieństwa i różnice między obydwoimi mediatorami oraz interakcje między nimi na wielu poziomach, w tym wpływ CO na biosyntezę H<sub>2</sub>S oraz wpływ H<sub>2</sub>S na biosyntezę CO. Bardzo cenną częścią pracy jest tabela podsumowująca podobieństwa i różnice w działaniu obu mediatorów w układzie pokarmowym. Praca jest oparta na obszernym i aktualnym piśmiennictwie.

Omówienie rozprawy doktorskiej ma układ typowy dla prac doktorskich opartych na cyklu publikacji. Obejmuje spis treści, wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską, informacje na temat finansowania badań, streszczenie w języku polskim i angielskim, opis badań prezentowanych w publikacjach wchodzących w skład rozprawy, podsumowanie, kopie prac opublikowanych oraz oświadczenia współautorów.

We wprowadzeniu przedstawiono podstawowe informacje na temat syntezy i działania  $H_2S$  ze szczególnym uwzględnieniem jego roli w przewodzie pokarmowym, niekorzystne działanie NLPZ na błonę śluzową oraz aktualnie dostępne donory  $H_2S$  stosowane w badaniach naukowych. W dalszej części przedstawiono cele i hipotezy badawcze oraz syntetyczny opis metod i uzyskanych wyników oraz ich krótkie podsumowanie.

Podjęcie przez autorkę badań na ten temat jest w pełni uzasadnione. Niesteroidowe leki przeciwzapalne należą do leków najczęściej stosowanych w medycynie, a ich powszechna dostępność bez recepty powoduje, że często są nadużywane. W związku z tym problem działań niepożądanych tych leków ma coraz większe znaczenie praktyczne, a metody zapobiegania tym działaniom oparte na stosowaniu inhibitorów pompy protonowej mają istotne ograniczenia (te ostatnie leki, również dostępne w mniejszych dawkach bez recepty same w sobie są również często nadużywane przez pacjentów). W badaniach zastosowano adekwatne modele doświadczalne. Zastosowano szeroki wachlarz metod badawczych obejmujący badania makroskopowe, histopatologiczne, ekspresję szeregu enzymów i białek sygnałowych na poziomie mRNA i białka, oznaczanie produktów oksydacyjnego uszkodzenia białek, sekwencjonowanie nowej generacji. Metody badań zostały wyczerpująco opisane w pracach oryginalnych. Doktorantka uzyskała szereg wartościowych wyników poszerzających naszą wiedzę na temat znaczenia  $H_2S$  w patologii przewodu pokarmowego oraz mechanizmów działania zarówno klasycznych NLPZ jak i ich pochodnych uwalniających  $H_2S$ . Wyniki badań mają potencjalne znaczenie praktyczne, ponieważ pochodne NLPZ uwalniające  $H_2S$  mogą stać się alternatywą dla klasycznych leków z tej grupy, o mniejszym ryzyku działań niepożądanych. Z kolei zastosowane w chorobach zapalnych pochodne te mogą być też bardziej skuteczne, ze względu na działanie przeciwzapalne samego  $H_2S$ . Wysoko należy ocenić badania porównawcze stosowania klasycznych NLPZ w połączeniu z omeprazolem i pochodnej NLPZ uwalniającej  $H_2S$ . Szczególnie dużą wartość mają nowatorskie badania składu mikrobioty jelitowej w tym kontekście. Wysoko oceniam też metodę oceny oksydacyjnych uszkodzeń DNA na podstawie

stężenia 8OGdG w przeliczeniu na całkowitą ilość DNA. W większości badań na ten temat stężenie tego związku wyrażane jest w przeliczeniu na masę tkanki lub ilość białka całkowitego, co w tym przypadku nie jest adekwatne. Na uznanie zasługuje fakt, że praca powstała w zespole z wieloletnim doświadczeniem w dziedzinie gastroenterologii doświadczalnej oraz kilkunastoletnim doświadczeniem w zakresie badania roli H<sub>2</sub>S w tym zakresie. Ponadto należy podkreślić, że praca powstała w ramach współpracy międzynarodowej z jednym z wiodących na świecie ośrodków zajmujących się znaczeniem H<sub>2</sub>S w biologii i medycynie. Wysoko oceniam też pracę przeglądową stanowiącą część pracy doktorskiej. W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój badań na temat H<sub>2</sub>S i również pojawia się coraz więcej prac przeglądowych na ten temat, często o niewielkiej wartości, powtarzających wielokrotnie te same informacje i niewiele wnoszących do rozwoju badań. Uwagi te nie dotyczą pracy przeglądowej doktorantki, która porusza oryginalne problemy poznawcze, a zwłaszcza szczegółowe podobieństwa i różnice między działaniem H<sub>2</sub>S i CO w przewodzie pokarmowym oraz interakcje między tymi mediatorami. W ostatnich latach pojawia się coraz więcej prac na temat interakcji między H<sub>2</sub>S i tlenkiem azotu, natomiast znacznie mniej uwagi poświęcono interakcji między H<sub>2</sub>S i tlenkiem węgla. W pracy przeglądowej poruszono też wpływ CO na aktywność β-syntazy cystationiny w szerszym kontekście jego znaczenia dla aktywności szlaków transsulfuracji i remetylacji homocysteiny i jego implikacji dla modyfikacji epigenetycznych (metylacji) histonów i kwasów nukleinowych.

Z obowiązku recenzenta wskazuję na pewne niedociągnięcia i ograniczenia przedstawionej do oceny pracy. Najslabszą częścią pracy jest zastosowana kolorymetryczna metoda oznaczania H<sub>2</sub>S, która nawet w wersji zmodyfikowanej zastosowanej przez Autorkę ma istotne ograniczenia i nie jest metoda swoistą. Określanie uzyskanych wyników jako odzwierciedlających biodostępność H<sub>2</sub>S jest nadinterpretacją, ponieważ w metodzie mogą interferować inne reaktywne formy siarki. Ponadto zastosowany w pracy pomiar w obecności cysteiny i fosforanu pirydoksalu bardziej odzwierciedla zdolność tkanek do syntezy H<sub>2</sub>S niż jego biodostępność *in vivo*. W badaniach podawano NLPZ zwierzętom zdrowym, w związku z czym trudno interpretować ich wpływ na stężenie PGE<sub>2</sub>, stężenie cytokin itd. jako działanie przeciwzapalne. Warto byłoby podjąć analogiczne badania w modelu zapalenia, ponieważ NLPZ są głównie stosowane w takich stanach. Ponadto badania wykonano po podaniu jednej dawki

NLPZ, co bardziej odzwierciedla ich ostrą toksyczność niż działania niekorzystne przy podawaniu przewlekłym stanowiące obecnie częsty problem kliniczny.

Ponadto w polskojęzycznym omówieniu pracy znalazły się pewne uproszczenia i nieścisłości.

- 1) Stwierdzenie, że przy większych dawkach NLPZ działanie ochronne H<sub>2</sub>S zanika wynikające według Autorki z badań opisanych w pracy oryginalnej z 2023 roku nie zostało jednoznacznie udowodnione. Zaproponowane wyjaśnienie może być prawdziwe, ale niekorzystne efekty obserwowane po większych dawkach ATB-344 mogą też wynikać z większych dawek samego H<sub>2</sub>S. Niekorzystne działania dużych dawek donorów H<sub>2</sub>S obserwowano w wielu badaniach.
- 2) W rozdziale 4.1 (Wprowadzenie merytoryczne) jest informacja, że cele molekularne i ścieżki sygnałowe endogenego H<sub>2</sub>S obejmują m. in. polisiarczki oraz tiosiarczyny i siarczyny. Jest to nieścisłe – celem molekularnym są białka, zwłaszcza ich grupy tiolowe, natomiast wymienione powyżej związki siarki są metabolitami powstającymi z H<sub>2</sub>S, a niektóre z nich mogą też pełnić rolę mediatorów, nie są jednak jego celami molekularnymi.
- 3) Jakkolwiek określenie „inhibitory pompy protonowej” jest powszechnie stosowane w medycynie klinicznej, nie jest ono w pełni właściwe, ponieważ enzym hamowany przez te leki to H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPaza aktywnie transportująca jony wodorowe (protony) na zewnątrz komórki, a jony potasowe do komórki. Enzym ten powinien być zatem określanym raczej jako pompa protonowo-potasowa, a określenie „pompa protonowa” jest bardziej adekwatne w odniesieniu do lizosomalnej H<sup>+</sup>-ATPazy transportującej wyłącznie protony należącej do grupy ATPaz typu V.
- 4) W omówieniu pracy w rozdziale 4.4 model doświadczalny zastosowany w pracy opublikowanej w *Antioxidants* w 2023 roku jest określany jako oksydacyjne uszkodzenie błony śluzowej żołądka. Jakkolwiek stres oksydacyjny odgrywa istotną rolę w patogenezie skutków niedokrwienia i reperfuzji, nie jest to mechanizm jedyny. Dlatego lepiej wprost odnosić się do uszkodzenia wywołanego niedokrwieniem i reperfuzją niż określać je jako uszkodzenie oksydacyjne.
- 5) W omówieniu pracy kilkakrotnie pojawia się stwierdzenie o antyoksydacyjnym działaniu H<sub>2</sub>S. Jest to uproszczenie, ponieważ jakkolwiek H<sub>2</sub>S ma działanie

antyoksydacyjne, jego stężenie w tkankach jest bardzo małe i prawdopodobnie znaczenie bezpośredniej reakcji z reaktywnymi formami tlenu jest minimalne. Bardziej prawdopodobne, że efekty obserwowane w badaniach Autorki i innych badaczy wynikają z pobudzającego wpływu  $H_2S$  na ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, m. in. za pośrednictwem czynnika Nrf2.

Należy jednak zaznaczyć, że przedstawione uwagi w niczym nie umniejszają wartości pracy i mają charakter uwag redakcyjnych oraz sugestii dalszych badań.

Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki. Analiza treści wstępów i dyskusji prac oryginalnych oraz treści pracy przeglądowej wchodzącej w skład rozprawy wskazuje, że Doktorantka posiada obszerną wiedzę w zakresie zastosowania, mechanizmów działania niesteroidowych leków przeciwzapalnych oraz ich niekorzystnych działań w obrębie przewodu pokarmowego. Pani Urszula Głowacka wykazała się też obszerną wiedzą na temat powstawania i mechanizmów działania  $H_2S$  i tlenku węgla ze szczególnym uwzględnieniem ich roli w przewodzie pokarmowym oraz dokonała szczegółowej analizy porównawczej ich działania oraz wzajemnych interakcji, co jest cenne wobec ciągle pojawiających się nowych informacji w pracach oryginalnych na ten temat.

Rozprawa doktorska wykazuje umiejętność prowadzenia przez Doktorantkę samodzielnej pracy naukowej. Poprawnie sformułowano cele i hipotezy badawcze; praca wpisuje się w tok aktualnych badań na ten temat dostarczając jednocześnie istotnych nowych informacji. Doktorantka odegrała kluczową rolę w realizacji badań zaprezentowanych w dwóch pracach oryginalnych i wykazała się znajomością szerokiego spektrum nowoczesnych metod badawczych o charakterze interdyscyplinarnym. Wykazała się również umiejętnością twórczej interpretacji wyników badań w kontekście stanu wiedzy i wyników prezentowanych przez innych autorów, o czym świadczy obszerna i analityczna dyskusja zawarta w obu pracach oryginalnych.

Rozprawa doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Doktorantka po raz pierwszy dokonała tak wszechstronnej oceny mechanizmów działania dwóch pochodnych NLPZ uwalniających  $H_2S$  w błonie śluzowej przewodu pokarmowego, a wykonane badania

wpisują się w nurt nie tylko badań podstawowych ale również badawczo-rozwojowych w kontekście rozwoju obu kandydatów na leki i ewentualnego ich zastosowania w klinice.

Podsumowując, rozprawa doktorska pani Urszuli Głowackiej pt. „**Nowe aspekty patogenezy uszkodzeń przewodu pokarmowego w oparciu o eksperymentalną implementację unikatowych pochodnych niesteroidowych leków przeciwzapalnych uwalniających siarkowodór**” przygotowanej pod kierunkiem prof. dr hab. Marcina Magierowskiego w Pracowni Inżynierii komórkowej i Diagnostyki Izotopowej w Katedrze Fizjologii Wydziału Lekarskiego Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie spełnia wszystkie kryteria stawiane rozprawom doktorskim. W związku z tym wnoszę do Rady Dyscypliny Nauk Medycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie o dopuszczenie Autorki do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, biorąc pod uwagę nowatorską tematykę pracy, zastosowanie szerokiego zakresu metod badawczych, potencjalnie istotne znaczenie praktyczne uzyskanych wyników oraz fakt, że prace wchodzące w skład rozprawy zostały opublikowane w czasopiśmie o wysokim Impact Factor wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

Lublin, dn. 2 luty 2024

