

Recenzja rozprawy na stopień naukowy doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne lek. **Malwiny Sołtysiak** pt. **„Ocena cytoprotekcyjnego działania β -escyny przed szkodliwym wpływem dymu tytoniowego na drogi oddechowe”**.

Palenie tytoniu jest jednym z największych zagrożeń dla zdrowia publicznego na całym świecie, bowiem z powodu chorób odtytoniowych (nowotworów, chorób obturacyjnych) umiera rocznie ponad 8 mln ludzi. W Polsce nadal pali papierosy ok. 30 % dorosłych Polaków. W dymie papierosowym stwierdzono obecność ok. 7000 toksycznych związków chemicznych w tym 38 najważniejszych toksyn z których sześć to wyjątkowo szkodliwe lotne aldehydy (akroleina, formaldehyd, propionaldehyd, krotonaldehyd, butyraldehyd oraz aldehyd octowy). Długotrwała ekspozycja na dym papierosowy prowadzi do zaburzenia zarówno funkcji jak i struktury komórek dróg oddechowych. W komórkach nabłonka migawkowego dochodzi do zmniejszenia liczby rzęsek oraz osłabienia ich ruchliwości co w połączeniu z nadprodukcją śluzu, prowadzi do nadmiernego gromadzenia wydzieliny z dróg oddechowych. Dodatkowo generowany stres oksydacyjny, przewlekły stan zapalny oraz zwiększona rekrutacja makrofagów i neutrofilów do dróg oddechowych prowadzi do rozwoju POChP. Stres oksydacyjny i m.in. akumulacja reaktywnych form tlenu (ROS) które, jeśli nie zostaną zneutralizowane, uszkadzają DNA i białka komórek oraz wywołują peroksydację lipidów. W efekcie powstają toksyczne aldehydy: krotonowy, malonowy (MDA) akroleina, 4-hydroksynonenal - 4HNE, które tworzą mutagenne i rakotwórcze addukty z makrocząsteczkami, w tym z DNA i RNA komórek, co skutkuje zaburzeniem funkcji ich, kancerogenezą i nasileniem stanu zapalnego.

Dlatego też, zaprzestanie palenia jest najważniejszym działaniem w prewencji chorób odtytoniowych. Niemniej ważne wydaje się znalezienie substancji zmniejszających toksyczność dymu tytoniowego. I tak wśród poszukiwanych związków na uwagę zasługuje m.in. escyna. Escyna jest mieszaniną około 80 triterpenoidowych saponin czyli acylowanych glikozydów triterpenowych ekstrahowanych z nasion kasztanowca zwyczajnego (*Aesculus hippocastanum*), które zawierają od 3 do 10% escyny. W budowie saponin cechą charakterystyczną jest łańcuch trisacharydowy przy węglu C-3 triterpenu, składający się z kwasu glukuronowego oraz glukozy, galaktozy lub ksylozy. Głównym składnikiem escyny jest β -escyna, czyli protoescygenina estryfikowana kwasem angelikowym przy węglu C-21 oraz kwasem octowym przy węglu C-22. Wykazano, że β -escyna hamuje aktywność NF- κ B (głównego regulatora szlaku zapalnego), a ponadto osłabia reakcję komórek na bodziec zapalny, zmniejsza liczbę komórek odpornościowych rekrutowanych do miejsca zapalenia oraz redukuje wydzielanie MMP9. β -Escyna jest także silnym aktywatorem dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) – grupy 19 enzymów katalizujących utlenianie aldehydów do nietoksycznych kwasów karboksylowych. Dotychczas w badaniach *in vitro*, z użyciem ludzkich

komórek nabłonka oskrzelowego wykazano, że zwiększona ekspresja ALDH3A1 zmniejsza cytotoksyczność wywołaną przez CSE (cigarette smoke extract-ekstrakt dymu tytoniowego). Zatem β -escyna potencjalnie mogła by być wykorzystana do ograniczenia negatywnych czynników zdrowotnych związanych z ekspozycją na działanie aldehydów powstających podczas palenia tytoniu. Dotychczasowe zastosowania medyczne β -escyny w codziennej praktyce klinicznej obejmuje wskazania wenotoniczne i wenoprotekcyjne. Zatem wykorzystywane są właściwości przeciw-obrzękowe, przeciwzapalne i przeciwutleniające β -escyny w łagodzeniu obrzęków i bólu kończyn dolnych w przebiegu przewlekłej niewydolności żylnej, następnie w zmniejszeniu obrzęku i stanu zapalnego guzków krwawniczych, czy w zmniejszeniu obrzęku po urazach lub operacjach. Badano także beta-escynę pod kątem leczenia wspomagającego nowotworów m.in. raka tarczycy.

Z uznaniem i dużym zainteresowaniem przyjąłem zatem do recenzji rozprawę doktorską lekarz Malwiny Sołtysiak, której celem zasadniczym była ocena *in vitro* oraz *in vivo* wpływu β -escyny na procesy biologiczne zachodzące w drogach oddechowych ekspozowanych na działanie dymu papierosowego. Podkreślić należy aktualność problematyki i duże znaczenie rozprawy tak teoretyczne jak i kliniczne.

Na rozprawę składają się dwie oryginalne prace opublikowane w języku angielskim w periodykach z Listy Filadelfijskiej, w których to doniesieniach lek. Malwina Sołtysiak jest pierwszym autorem:

1. Malwina Sołtysiak, Magdalena Paplińska-Goryca, Paulina Misiukiewicz-Stępień, Paulina Wójtowicz, Małgorzata Dutkiewicz, Oliwia Zegrocka-Stendel, Maria Sikorska, Dorota Dymkowska, Laura Turos-Korgul, Rafał Krenke, Katarzyna Koziak. **β -Escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death.** Biomedicine & Pharmacotherapy, 2024, Volume 170, 115924, ISSN 0753-3322, PMID: 38016364

2. Malwina Sołtysiak, Katarzyna Koziak, Małgorzata Dutkiewicz, Oliwia Zegrocka-Stendel, Paulina Misiukiewicz-Stępień, Rafał Krenke, and Magdalena Paplińska-Goryca. **β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study.** Journal of Medicinal Food, 2024, PMID: 39230432 <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115924>.

Łączna wartość IF za te publikacje wynosi 7,7 pnkt., a wartość MEiN =170 pnkt.

Indywidualny wkład pracy doktorantki w powstawanie tych oryginalnych doniesień współautorzy zgodnie ocenili na odpowiednio: 35% i 55%.

Zasadniczy cel rozprawy został osiągnięty poprzez realizację celów szczegółowych tj.:

1. ocenę wpływu β -escyny na żywotność komórek nabłonka błony śluzowej nosa oraz uszkodzenia DNA komórek ekspozowanych na CSE (cigarette smoke extract-ekstrakt dymu tytoniowego)

2. analizę wpływu β -escyny na aktywność ALDH oraz ekspresję mRNA izoform ALDH w komórkach nabłonka błony śluzowej nosa stymulowanych CSE.
3. ocenę działania β -escyny na aktywność ALDH w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (PBMC) zdrowych niepalących osób w warunkach in vitro oraz in vivo.
4. zbadanie wpływu tygodniowej suplementacji preparatem zawierającym β -escynę i ekstrakt z owoców aronii na procesy zapalne oraz stres oksydacyjny w drogach oddechowych palaczy tytoniu.

Pierwsza publikacja to praca eksperymentalna z wykorzystaniem komórek nabłonka nosa izolowanych z wymazów szczoteczkowych od osób zdrowych niepalących (n=15). Komórki zostały poddane działaniu β -escyny (1 μ M) i/lub CSE (5%). Żywotność komórek, aktywność ALDH oraz uszkodzenia DNA w komórkach oceniano po 24 godzinach, zaś ekspresję mRNA dla 7 isoform ALDH (ALDH1A1, ALDH1A3, ALDH2, ALDH3A1, ALDH3A2, ALDH3B1 oraz ALDH18A1) badano po 1, 3, 6 i 24 godzinach. W przeprowadzonych doświadczeniach oceniono wpływ 5% ekstraktu dymu tytoniowego (cigarette smoke extract, CSE) na komórki poddane działaniu β -escyny (1 μ M). Wykazano, że w obecności β -escyny zmniejszała się cytotoksyczność dymu tytoniowego. W hodowlach komórkowych narażonych na działanie CSE w obecności escyny wykazano istotną redukcję liczby uszkodzeń DNA. Zarówno β -escyna, jak i ekstrakt dymu tytoniowego stymulowały aktywność enzymatyczną ALDH, ale obserwowany efekt był znacznie silniejszy w przypadku równoczesnego traktowania komórek CSE oraz β -escyną. Podobne zjawisko stwierdzono dla ekspresji mRNA dla izoform ALDH: jednoczesna ekspozycja komórek na β -escynę i CSE prowadziła po 6 godzinach do najsilniejszego wzrostu ekspresji ALDH1A1 i ALDH3A1, a po 24 godzinach dla ALDH1A3, ALDH3A2, ALDH3B1 i ALDH18A1. Ponadto, β -escyna zapobiegała hamowaniu ekspresji ALDH2 indukowanej przez CSE w 24 godzinie po inkubacji.

W badaniu in vivo oceniano wpływ 7 dniowej suplementacji β -escyną w połączeniu z ekstraktem z owoców aronii na procesy zapalne i oksydacyjne w drogach oddechowych palaczy. Spożywanie produktu zawierającego β -escynę i ekstrakt z owoców aronii istotnie obniżyło liczbę neutrofilów w płwocinie indukowanej palaczy w porównaniu do poziomu neutrofilów bez suplementacji. W 7 dobie suplementacji, liczba neutrofilów w płwocinie palaczy była istotnie niższa (p=0,03), osiągając poziom porównywalny do poziomu w grupie kontrolnej. Zaobserwowano nieistotne statystyczne zmniejszenie zawartości IL-6 i IL-8 w płwocinie indukowanej palaczy w 7 dobie suplementacji preparatem β -escyny. Wyniki przeprowadzonego badania pilotażowego sugerują, że niskie dawki β -escyny w połączeniu z ekstraktem z owoców aronii mogą wywierać korzystne działanie ochronne, poprzez istotne zmniejszenie akumulacji neutrofilów w drogach oddechowych palaczy tytoniu. Możliwy mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska może wynikać z aktywacji ALDH i wzmocnienia komórkowej odpowiedzi antyoksydacyjnej. W przeprowadzonym badaniu β -escyna istotnie podwyższała aktywność ALDH in vitro w komórkach PBMC, natomiast in vivo w materiale

biologicznym pobranym z dróg oddechowych palaczy tytoniu stwierdzono zwiększenie zdolności antyoksydacyjne.

Po podsumowaniu wyników doktorantka wyciąga wnioski odpowiadając szczegółowo na wytyczone cele.

Wniosek zasadniczy: Escyna wywiera działanie cytoprotekcyjne, przeciwzapalne oraz antyoksydacyjne w drogach oddechowych poddanych działaniu dymu tytoniowego.

Wnioski szczegółowe:

1. β -escyna zwiększa żywotność oraz zmniejsza liczbę uszkodzeń DNA w komórkach nabłonka błony śluzowej nosa poddanych działaniu CSE.

2. β -escyna zwiększa aktywność ALDH w komórkach nabłonka nosa. Mechanizm tego zjawiska obejmuje nasilenie ekspresji genów kodujących różne izoformy ALDH. Zaobserwowane zjawisko ma efekt addytywny w środowisku stymulowanym dymem papierosowym.

3. β -escyna jest silnym aktywatorem ALDH w PBMC i zwiększa aktywność ALDH zarówno in vitro jak i in vivo.

4. β -escyna wpływa na stan zapalny przez hamowanie napływu neutrofilów oraz zwiększa potencjał antyoksydacyjny w drogach oddechowych osób palących papierosy. Wpływa na stan zapalny przez hamowanie napływu neutrofilów oraz zwiększa potencjał antyoksydacyjny w drogach oddechowych osób palących papierosy.

Recenzując dysertację lekarz Malwiny Sołtysiak mam ułatwione zadanie bowiem te 2 prace składające się na jej rozprawę zostały ogłoszone drukiem w renomowanych czasopismach. Zostały zatem wszechstronnie zrecenzowane przez co najmniej kilku niezależnych badaczy i redaktorów tych czasopism co wpłynęło na odpowiednie przedstawienie założeń i celów badań, dobór właściwych metod statystycznych jak i czytelną prezentację wyników wraz z interesującą dyskusją i doбором odpowiedniego piśmiennictwa. Prace te, tematycznie i logicznie spójne uważam za interesujące, wartościowe i wnoszące nowe istotne informacje na temat ochronnych właściwości beta-escyny.

Korzystając jednakże z obowiązku jak i przywileju recenzenta chciałbym podkreślić, że o ile pierwszą pracę tj. badania in vitro oceniam bardzo wysoko z uwagi na nakład pracy, nowoczesny warsztat badawczy, wszechstronność i zakres wykonanych oznaczeń w tym żywotności komórek nabłonka jamy nosowej, aktywności ALDH, liczby uszkodzeń DNA to drugą pracę traktuję tylko jako doniesienie wstępne, pilotażowe. W pracy pierwszej zabrakło mi może tylko pewnego porównania wyników z pracami innych autorów m.in. w zakresie warsztatu i metodyki. Druga praca tj. praca kliniczna, w mojej opinii, nie uprawnia do wyciągnięcia tak jednoznacznych wniosków na temat wpływu escyny na stan zapalny przez hamowanie napływu neutrofilów oraz zwiększenie potencjału antyoksydacyjnego w drogach oddechowych osób palących papierosy. Dlaczego tak uważam? Otóż w drugim badaniu zastosowano β -escynę

w bardzo małej dawce tj. tylko 10 mg, ale nie wykonywano badań z zakresu farmakokinetyki – nie oznaczono stężeń β -escyny ani w surowicy krwi, ani w ślinie ani w płwocinie indukowanej. Zatem nie wiadomo, czy osiągnięto takie stężenia β -escyny jakie chociażby stosowano w badaniach in vitro czyli wystarczające np. do skutecznego stymulowania ALDH ???.

W badaniach klinicznych innych autorów stosowane dawki escyny podawanej i.v. wahały się np. od 0,2 mg/kg/dobę do 0,9 mg mg/kg/dobę. Sama doktorantka przyznaje, że rutynowo stosowane dawki β -escyny np. w chorobach żył kończyn są dziesięciokrotnie wyższe, ale poza takim lakonicznym stwierdzeniem nie rozwija dalej dyskusji w tym kierunku. Poza tym w badaniu nr 2 ochotnicy otrzymywali dodatkowo wyciąg z aronii co, w moim przekonaniu, nieco gmatwa sprawę, bo jak rozróżnić dokładnie i pewnie działanie przeciwzapalne od antyutleniającego i jak ocenić ewentualne interakcje pomiędzy β -escyną a wyciągiem z aronii.

Owoce aronii (*Aronia melanocarpa*) należącej do rodziny różowatych (*Rosaceae*) nie zawierają escyny, ale są bogate w antocyjany, flawonoidy, procyjanidyny, witaminę C oraz kwasy fenolowe. Uważa się zatem, że aronia jest cennym źródłem przeciwutleniaczy, wspierających układ sercowo-naczyniowy i odpornościowy. Enigmatyczna jest jednak dawka wyciągu z owoców aronii, która miałyby być skuteczna klinicznie? No i najważniejsza uwaga do tego badania: nie zastosowano placebo i nie zaślepiono badania. Powszechnie wiadomym jest, że w ocenie klinicznej skuteczności substancji badanej wiarygodne są tylko prospektywne, długofalowe wielośrodkowe badania z wykorzystaniem placebo i podwójnie ślepą próbą wraz z doбором odpowiednich tzw. punktów końcowych. Zabrakło mi zatem pewnego krytycznego odniesienia doktorantki do konstrukcji samego badania jak i długości stosowanej interwencji, bo czy 7 dni jest rzeczywiście wystarczającym okresem ? Jakie mogłyby być wyniki po dalszych 7 dniach obserwacji ale z wykorzystaniem placebo?

Poczynione uwagi mogą być zacznem dyskusji w czasie obrony i absolutnie nie umniejszają wartości całej dysertacji, która w mojej opinii spełnia warunki na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne określone w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668). Rozprawa ta porusza niezwykle istotne i aktualne problemy związane z poszukiwaniem substancji wykorzystywanych w zapobieganiu negatywnym skutkom dymu papierosowego. Świadczy o dużej wiedzy, pracowitości, pewnej samodzielności doktorantki i umiejętności wykorzystania nowoczesnego warsztatu badawczego.

Dziękując Radzie Dyscypliny Nauk Medycznych WUM oraz Szanownej Pani Profesor Marcie Strudze - Przewodniczącej Rady za przywilej recenzowania tej dysertacji wnoszę o dopuszczenie lekarz Malwiny Sołtysiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Profesor dr hab.n.med Dariusz Ziora