



Warszawa, 09 sierpnia 2025

RECENZJA

Rozprawy doktorskiej Pani lek. Malwiny Sołtysiak

„Ocena cytoprotekcyjnego działania β -escyny przed szkodliwym wpływem
dymu tytoniowego na drogi oddechowe”

Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego w Warszawie

Katedra Nauk Przedklinicznych

ul. Ciszewskiego 8
02-786 Warszawa
+48 22 593 60 27
knp@sggw.edu.pl
www.sggw.edu.pl

Promotor: dr hab. n. med. Magdalena Poplińska-Goryca

Recenzent: prof. dr hab. n. zdr. n. med. inż. Arkadiusz Szterk

1. Wprowadzenie

Rozprawa doktorska lek. Malwiny Sołtysiak dotyczy niezwykle aktualnego zagadnienia, jakim jest poszukiwanie substancji o potencjalnym działaniu ochronnym w kontekście narażenia organizmu na toksyczne działanie dymu tytoniowego. Pomimo powszechnej świadomości zagrożeń związanych z paleniem tytoniu, uzależnienie to wciąż stanowi jedno z najpoważniejszych wyzwań zdrowia publicznego na świecie. Dym papierosowy zawiera ponad 7000 związków chemicznych, z których wiele wykazuje silne działanie cytotoksyczne, mutagenne, genotoksyczne oraz rakotwórcze. Wśród tych związków szczególne miejsce zajmują aldehydy – takie jak aldehyd octowy, formaldehyd, akroleina czy 4-hydroksynonenal – które odgrywają kluczową rolę w rozwoju przewlekłych chorób odtytoniowych, m.in. przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP), nowotworów płuc oraz chorób układu sercowo-naczyniowego. Terapie wspomagające ukierunkowane na ograniczenie szkodliwego wpływu dymu tytoniowego stają się obecnie obiektem intensywnych badań. Jednym z obiecujących kierunków jest zastosowanie substancji naturalnych o udokumentowanych właściwościach przeciwzapalnych i antyoksydacyjnych, które mogą wspierać mechanizmy detoksykacyjne organizmu. Przykładem takiego związku jest β -escyna – mieszanina saponin triterpenowych pozyskiwana z nasion kasztanowca zwyczajnego (*Aesculus hippocastanum* L.), powszechnie stosowana w leczeniu niewydolności żylnej i stanów zapalnych. W ostatnich latach, dzięki zastosowaniu zaawansowanych technik molekularnych, odkryto nowe właściwości β -escyny, w tym jej zdolność do aktywacji dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) – enzymu odpowiedzialnego za utlenianie toksycznych aldehydów do nieszkodliwych kwasów karboksylowych. Wzrost aktywności ALDH stanowi istotny element odpowiedzi komórkowej na stres oksydacyjny i może odgrywać rolę ochronną w komórkach narażonych na działanie szkodliwych składników dymu tytoniowego. Rozprawa doktorska składa się z dwóch oryginalnych publikacji naukowych, które łączy wspólny cel: ocena wpływu β -escyny na procesy biologiczne w drogach oddechowych narażonych na dym papierosowy. Pierwsze badanie miało charakter eksperymentalny *in vitro* i zostało przeprowadzone na komórkach nabłonka błony śluzowej nosa od zdrowych, niepalących ochotników. W badaniu tym wykazano, że β -escyna istotnie zmniejszała cytotoksyczność i uszkodzenia DNA wywołane przez ekstrakt dymu papierosowego (CSE), jednocześnie silnie aktywując ALDH oraz zwiększając ekspresję genów kodujących izoformy tego enzymu. Drugie badanie miało charakter pilotażowy i dotyczyło oceny wpływu 7-dniowej suplementacji preparatem zawierającym β -escynę oraz ekstrakt z owoców aronii u osób palących papierosy. Suplementacja ta prowadziła do istotnego

zmniejszenia liczby neutrofilów w płwocinie indukowanej oraz zwiększenia potencjału antyoksydacyjnego w badanych próbkach biologicznych. Choć poziomy cytokin prozapalnych IL-6 i IL-8 uległy redukcji, zmiany te nie osiągnęły istotności statystycznej, co jednak nie wyklucza korzystnego wpływu analizowanych związków na stan zapalny i stres oksydacyjny w układzie oddechowym. W świetle uzyskanych wyników β -escyna jawi się jako obiecujący związek wspomagający w ochronie komórek nabłonka dróg oddechowych przed uszkodzeniami indukowanymi przez toksyczne składniki dymu papierosowego. Jej potencjalne zastosowanie w prewencji i leczeniu powikłań związanych z paleniem tytoniu wymaga jednak dalszych, szerzej zakrojonych badań, obejmujących większe populacje pacjentów oraz różnorodne modele ekspozycji. Przedstawione w rozprawie dane stanowią istotny krok w kierunku rozszerzenia potencjalnych wskazań terapeutycznych dla β -escyny – leku o ugruntowanym profilu bezpieczeństwa i dużym potencjale w strategiach repozycjonowania leków.

2. Struktura pracy

Rozprawa doktorska ma klarowną i przejrzystą strukturę, zgodną z obowiązującymi standardami. Składa się z dwóch spójnych tematycznie publikacji naukowych, które zostały opublikowane w renomowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym: „Biomedicine & Pharmacotherapy” (IF: 6.9, Q1) oraz „Journal of Medicinal Food” (IF: 1.7, Q3). Obie publikacje uzupełniają się tematycznie i stanowią zwartą całość naukową. Taki układ pracy umożliwia pogłębioną analizę zarówno badań *in vitro*, jak i *in vivo*, co znacząco podnosi wartość poznawczą rozprawy.

3. Część teoretyczna

Wprowadzenie do rozprawy zawiera szczegółowe i rzetelne omówienie problematyki związanej z toksycznością aldehydów obecnych w dymie tytoniowym, rolą dehydrogenaz aldehydowych (ALDH), a także charakterystyką działania β -escyny. Autorka wykazała się dobrą znajomością literatury przedmiotu, umiejętnie integrując dane z różnych źródeł w logiczny i przekonujący wywód naukowy. Teoretyczne podstawy pracy są solidne i w pełni uzasadniają podjęcie zaprezentowanych badań.

4. Metodologia

Praca 1: β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death

W badaniu wykorzystano pierwotne komórki nabłonka nosa pobrane od zdrowych, niepalących

ochotników metodą szczotkowania. Komórki izolowano, trawiono, hodowano w pożywce do osiągnięcia 80% konfluencji. Ekstrakt z dymu papierosowego (CSE) przygotowywano, przepuszczając dym z papierosów 1R6F przez PBS, filtrując i stosując w stężeniu 5%. Komórki preinkubowano z β -escyną (1 μ M, 30 min) przed ekspozycją na CSE. Oceniano żywotność (test LDH, barwienie jodkiem propidyny), uszkodzenia DNA (ogniska 53BP1 w immunofluorescencji), ekspresję genów ALDH (izolacja RNA, RT-qPCR) oraz aktywność ALDH (test kolorymetryczny). Dane analizowano w GraphPad Prism, stosując ANOVA z testem Tukeya i test Manna-Whitneya ($p \leq 0,05$)

Praca 2: β -escin and chokeberry fruit extract supplementation in smokers as potential anti-inflammatory protection—a Pilot Proof-of-Concept Study

W badaniu wzięło udział 9 palaczy (4 mężczyzn, 5 kobiet, średni wiek 48 lat) oraz 5 zdrowych niepalących ochotników w grupie kontrolnej (1 mężczyzna, 4 kobiety, średni wiek 41 lat). Protokół obejmował siedmiodniową suplementację β -escyną i/lub ekstraktu z owoców aronii u palaczy. Spirometrię i indukcję płwociny wykonano w dniu 0 oraz dniu 7. Oceniano stężenia markerów zapalnych (IL-6, TNF- α) oraz aktywność dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w komórkach nabłonka nosa. Badanie zostało zatwierdzone przez komisję bioetyczną, a od wszystkich uczestników uzyskano świadomą zgodę.

Metodyka badań została dobrana adekwatnie do postawionych hipotez badawczych. Autorka przeprowadziła kompleksowe analizy biologiczne z wykorzystaniem nowoczesnych technik eksperymentalnych, takich jak oznaczenia aktywności ALDH, ekspresji mRNA, testy żywotności komórek, ocena uszkodzeń DNA, a także analizy cytologiczne płwociny indukowanej. Co ważne, prace te wykonano zarówno na modelach *in vitro*, jak i *in vivo*, co świadczy o dużym zaawansowaniu projektu badawczego oraz szerokim zakresie kompetencji Autorki.

5. Wyniki i ich interpretacja

Oba badania – zarówno model *in vitro* z wykorzystaniem pierwotnych komórek nabłonka nosa, jak i badanie interwencyjne u ludzi – spójnie wskazują, że β -escyna wykazuje istotne właściwości cytoprotekcyjne i przeciwzapalne w kontekście uszkodzeń wywołanych dymem papierosowym. W eksperymentach *in vitro* β -escyna skutecznie ogranicza cytotoksyczność indukowaną ekstraktem z dymu papierosowego, redukuje liczbę uszkodzeń DNA (ogniska 53BP1) oraz istotnie zwiększa ekspresję i

aktywność izoform dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) odpowiedzialnych za detoksykację reaktywnych aldehydów powstających w trakcie stresu oksydacyjnego. Z kolei w badaniu *in vivo* pięciodniowa suplementacja β -escyną u palaczy prowadziła do obniżenia stężeń prozapalnych cytokin (IL-6, TNF- α) oraz wzrostu aktywności ALDH w komórkach nabłonka nosa, co potwierdzało obserwacje z modelu komórkowego. Dodatkowo wyniki sugerują, że działanie β -escyny może być uzupełniane innymi substancjami o właściwościach antyoksydacyjnych, jak ekstrakt z aronii, który wzmacniał szlak glutationowy i aktywność enzymów antyoksydacyjnych.

Łącznie, oba badania potwierdzają, że β -escyna działa wielokierunkowo – łagodzi stan zapalny, chroni integralność genomu oraz aktywuje kluczowe enzymy detoksykacyjne. Z klinicznego punktu widzenia wskazuje to na jej potencjał jako składnika suplementów diety lub terapii wspomagających ochronę dróg oddechowych, szczególnie u osób przewlekłe narażonych na dym tytoniowy. Takie podejście może wspierać prewencję chorób zapalnych i degeneracyjnych układu oddechowego oraz zmniejszać ryzyko uszkodzeń komórkowych będących konsekwencją przewlekłego stresu oksydacyjnego.

Uwagi do metodologii

1. W badaniu *in vitro* proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób zapewniono powtarzalność składu i stężenia ekstraktu z dymu papierosowego (CSE) pomiędzy próbkami. Czy analizowano kluczowe składniki dymu papierosowego? Jak określano że osiągnięto stężenie 5% dymu w PBS?
2. Proszę o uzasadnienie wyboru stężenia 1 μ M β -escyny w eksperymentach komórkowych. Czy przeprowadzono wcześniejsze testy optymalizacyjne w celu ustalenia zakresu stężeń efektywnych i nietoksycznych?
3. W odniesieniu do ekstraktu z aronii proszę o podanie informacji dotyczących standaryzacji surowca – w szczególności zawartości polifenoli i antocyjanów w każdej partii stosowanej w badaniu.

Wyniki przedstawione w rozprawie są interesujące i istotne z punktu widzenia biologii molekularnej, toksykologii oraz medycyny eksperymentalnej. Wykazano m.in., że β -escyna wykazuje działanie cytoprotekcyjne wobec komórek nabłonka błony śluzowej nosa ekspozowanych na ekstrakt dymu papierosowego oraz zwiększa aktywność ALDH. Dodatkowo, w badaniu *in vivo* stwierdzono redukcję liczby neutrofilów w płwocinie palaczy oraz zwiększoną aktywność antyoksydacyjną. Interpretacja

wyników została przeprowadzona w sposób logiczny i krytyczny, z odniesieniem do literatury.

6. Wartość naukowa pracy

Przedłożone prace analizują wpływ β -escyny na ochronę komórek nabłonka dróg oddechowych przed uszkodzeniami wywołanymi dymem papierosowym, łącząc model *in vitro* na pierwotnych komórkach nabłonka nosa z badaniem interwencyjnym *in vivo* u palaczy. Wyniki obu części są spójne i wskazują, że β -escyna ogranicza cytotoksyczność, redukuje uszkodzenia DNA, zwiększa ekspresję oraz aktywność izoform dehydrogenazy aldehydowej (ALDH), a także obniża poziom markerów zapalnych. Badania charakteryzują się wysokim poziomem oryginalności, gdyż połączenie eksperymentów mechanistycznych z interwencją w populacji ludzkiej jest rzadko spotykane w tej tematyce i znacząco wzmacnia wiarygodność uzyskanych wyników. Mocną stroną jest rygor metodyczny, obejmujący starannie opisaną metodykę, zastosowanie odpowiednich kontroli oraz zwalidowanych metod badawczych, a także analiza mechanizmów, w której zidentyfikowano ALDH jako kluczowy cel działania β -escyny i powiązano jego aktywację z ochroną przed stresem oksydacyjnym. Wartość praktyczna wyników polega na tym, że mogą one stanowić punkt wyjścia do dalszych badań klinicznych nad profilaktyką i wspomaganiem leczenia chorób układu oddechowego u osób narażonych na działanie dymu papierosowego. Ograniczeniem badań *in vivo* jest krótki, siedmiodniowy czas suplementacji, niewystarczający do oceny długofalowych efektów zdrowotnych, brak pomiarów klinicznych punktów końcowych takich jak czynność płuc czy jakość życia, a także brak analizy wpływu zmiennych indywidualnych (płeć, wiek, historia palenia) na odpowiedź biologiczną. W badaniu obejmującym także ekstrakt z aronii nie zbadano szczegółowo potencjalnych efektów synergistycznych z β -escyną. Pomimo tych ograniczeń, spójność wyników oraz ich znaczenie translacyjne uzasadniają wysoką ocenę wartości naukowej prac.

Uwagi do interpretacji wyników

4. Proszę o wyjaśnienie, czy obserwowany wzrost aktywności ALDH wynikał głównie z podwyższenia ekspresji genów kodujących te enzymy, czy mógł być również efektem ich stabilizacji lub aktywacji posttranslacyjnej.
5. W badaniu *in vivo* poziomy markerów zapalnych u palaczy po 7 dniach suplementacji pozostawały wyższe niż u nie palaczy. Proszę o komentarz, czy można to wiązać z

niewystarczającym czasem interwencji, czy też z trwałymi zmianami wywołanymi przewlekłym paleniem.

6. Proszę o odniesienie się do możliwości ekstrapolacji uzyskanych wyników dotyczących komórek nabłonka nosa na inne odcinki dróg oddechowych, takie jak oskrzela czy pęcherzyki płucne.

Uwagi dotyczące dalszych badań

7. Czy Autorka planuje dłuższe badania interwencyjne, obejmujące pomiary klinicznych punktów końcowych, takich jak czynność płuc (spirometria), objawy oddechowe czy biomarkery systemowe?
8. Czy rozważane są badania w populacjach chorych na przewlekłe choroby płuc (np. POChP, astma), aby ocenić potencjalne zastosowania terapeutyczne β -escyny w tych grupach?
9. W przypadku ekstraktu z aronii – czy planowane są dalsze analizy potencjalnego działania synergistycznego z β -escyny, w tym badania mechanizmów molekularnych takich interakcji?

Cykl publikacji stanowiący rozprawę doktorską wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy na temat potencjalnych mechanizmów ochronnych β -escyny w kontekście narażenia dróg oddechowych na toksyny zawarte w dymie tytoniowym. Przedstawione badania mogą stanowić podstawę do dalszych prac nad zastosowaniem β -escyny jako składnika suplementów diety lub leków wspomagających ochronę układu oddechowego u osób narażonych na dym papierosowy.

7. Uwagi redakcyjne

Praca została przygotowana starannie, a jej język jest jasny i precyzyjny. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, iż w wykazie publikacji podano identyczne numery DOI dla obu publikacji, co stanowi oczywistą pomyłkę edytorską. Dodatkowo oba linki DOI kierują do tej samej publikacji z czasopisma „Biomedicine & Pharmacotherapy”, pomijając poprawne odesłanie do artykułu opublikowanego w „Journal of Medicinal Food”. Sugestia dotyczy konieczności poprawienia tego błędu w wersji końcowej dokumentu.

8. Podsumowanie i wniosek

Rozprawa doktorska Pani lek. Malwiny Sołtysiak stanowi wartościowy i oryginalny wkład w rozwój nauk medycznych. Przedstawione wyniki są wiarygodne, dobrze udokumentowane i istotne z punktu widzenia możliwości translacji do praktyki klinicznej. Autorka wykazała się dużą samodzielnością badawczą oraz rzetelnością naukową. Zgromadzony materiał badawczy oraz jego prezentacja spełniają wymogi stawiane pracom doktorskim zgodnie z obowiązującymi przepisami.

W związku z powyższym, praca Pani lek. Malwiny Sołtysiak w pełni spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim, a jej wyniki mogą stanowić istotny wkład w rozwój Dyscypliny Nauk Medycznych. Z tego względu z pełnym przekonaniem rekomenduję dopuszczenie Pani lek. Malwiny Sołtysiak do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Prof. dr hab. n. med. n. zdr. inż. Arkadiusz Szterk

