

Malwina Soltysiak

**Ocena cytoprotekcyjnego działania β -escyny przed szkodliwym wpływem
dymu tytoniowego na drogi oddechowe.**

**Evaluation of the cytoprotective impact of β -escin against the harmful
effect of tobacco smoke on the respiratory tract.**

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

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

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2025 r.

Magdalena Paplińska-Goryca

Słowa kluczowe: β -escyna, aronia, dehydrogenaza aldehydowa, ALDH, palenie tytoniu, efekt antyoksydacyjny, nabłonek jamy nosa, stres oksydacyjny, zapalenie

Key words: β -escin, chokeberry, aldehyde dehydrogenase, ALDH, smoking, antioxidant effect, nasal cavity epithelium, oxidative stress, inflammation

Podziękowania

Pragnę wyrazić moją głęboką wdzięczność wszystkim, którzy przyczynili się do powstania tej pracy.

*Przede wszystkim dziękuję mojej Promotor,
Pani dr hab .n. med. Magdalenie Paplińskiej- Goryca, za nieocenione wsparcie merytoryczne, zrozumienie i cierpliwość oraz wsparcie w chwilach zwątpienia.*

Szczególne podziękowanie składam Pani Profesor Katarzynie Koziak i jej Zespołowi za możliwość wzięcia udziału w projekcie i pomoc w jego realizacji.

Wreszcie, z całego serca pragnę podziękować całemu Zespołowi Ośrodka Diagnostyki Laboratoryjnej WUM, bez którego finalizacji pracy nie byłaby możliwa.

Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

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
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115924>.
Praca oryginalna, punktacja MEiN: 100; Impact Factor: 6,9; kwartył: Q1
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>.
Praca oryginalna, punktacja MEiN:70; Impact Factor: 1,7; kwartył: Q3

Łączny IF cyklu publikacji: 7,7

Łączna punktacja MEiN: 170

Spis treści:

1. Wykaz stosowanych skrótów	1
2. Streszczenie w j. polskim	3
3. Streszczenie w j. angielskim	5
4. Wstęp	7
4.1 Problem uzależnienia od tytoniu na świecie.	7
4.2 Aldehydy - kluczowe toksyny dymu tytoniowego	7
4.3 Przewlekłe zapalenie w drogach oddechowych	7
4.4 Wpływ aldehydów z dymu tytoniowego na zapalenie w drogach oddechowych oraz ich rola w patogenezie chorób odtytoniowych.	8
4.5 Rola dehydrogenaza aldehydowa (ALDH) w redukcji toksyczności dymu tytoniowego.	9
4.6 Escyna, stary lek w nowej odsłonie.	10
4.7 Możliwy wpływ escyny na dehydrogenazę aldehydową.	11
4.8 Escyna, właściwości i dotychczasowe zastosowanie.	12
4.9 Ochronny wpływ escyny na układ oddechowy.	12
4.10 Zastosowanie escyny w leczeniu ostrych stanów uszkodzenia płuc.	12
4.11 Potencjalne przeciwnowotworowe właściwości escyny.	13
5. Założenia i cele pracy	15
6. Kopie opublikowanych prac	16
6.1 Publikacja nr 1	17
6.2 Publikacja nr 2	27
7. Podsumowanie	33
8. Wnioski	38
9. Opinia komisji bioetycznej	39
10. Oświadczenia współautorów publikacji	42
11. Piśmiennictwo do rozdziałów w języku polskim	54

1. Wykaz stosowanych skrótów

Skrót	<i>pełna nazwa w języku angielskim</i> <i>pełna nazwa w języku polskim</i>
ALDH	<i>aldehyde dehydrogenase</i> dehydrogenaza aldehydowa
ALI	<i>acute lung injury</i> ostre uszkodzenie płuc
ARDS	<i>acute respiratory distress syndrome</i> ostra niewydolność oddechowa
3BP1	<i>p-53 binding protein</i> białko wiążące p53
CSE	<i>cigarette smoke extract</i> ekstrakt dymu tytoniowego
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> kwas deoksyrybonukleinowy
EGF	<i>epithelial growth factor</i> naskórkowy (nabłonkowy) czynnik wzrostu
EGFR	<i>epithelial growth factor receptor</i> receptor dla naskórkowego (nabłonkowego) czynnika wzrostu
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i> czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów i makrofagów
HMGB1	<i>high mobility group protein 1</i> białko grupy wysokiej mobilności-1
HSV	<i>herpes simplex virus</i> wirus opryszczki pospolitej
IL-1β	<i>interleukin 1beta</i> interleukina 1beta
IL-6	<i>interleukin 6</i> interleukina 6
IL-8	<i>interleukin 8</i> interleukina 8
INF-γ	<i>interferon gamma</i> interferon gamma
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i> lipopolisacharyd
MIP-1β	<i>macrophage inflammatory protein 1 beta</i> białko zapalne makrofagów 1 beta
MMP	<i>matrix metalloproteinase</i> metaloproteinaza
NADPH	<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> dinukleotyd nikotynamidowo-adeninowy
NF-κB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i> jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B
NNK	<i>nicotine-derived nitrosamine ketone</i> keton nitrozoaminowy pochodzący z nikotyny
NO_x	<i>nitrogen oxides mixture</i> mieszanina tlenków azotu
PD-L	<i>programmed cell death ligand</i> ligand programowanej śmierci komórki
PM	<i>particulate matter</i> pył zawieszony
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cell</i> komórki jednojądrzaste krwi obwodowej

POChP	przewlekła obturacyjna choroba płuc
qPCR	<i>quantitative polymerase chain reaction</i> ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy
RNA	<i>ribonucleic acid</i> kwas rybonukleinowy
ROS	<i>reactive oxygen species</i> reaktywne formy tlenu
RSV	<i>respiratory syncytial virus</i> syncytialny wirus nabłonka oddechowego
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego
TGF-β	<i>transforming growth factor beta</i> transformujący czynnik wzrostu beta
TNF-α	<i>tumor necrosis factor alpha</i> czynnik martwicy nowotworów alfa
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i> wirus pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej

2. Streszczenie w języku polskim

Palenie tytoniu jest jednym z największych zagrożeń dla zdrowia publicznego na całym świecie. Dym papierosowy zawiera ponad 7000 związków chemicznych, w tym aldehydy. Są to związki toksyczne, znacząco przyczyniające się do rozwoju chorób odtytoniowych.

β -escyna jest mieszaniną triterpenoidowych saponin ekstrahowanych z nasion kasztanowca zwyczajnego (*Aesculus hippocastanum*. L.). Jej zastosowanie w codziennej praktyce klinicznej obejmuje wskazania wenotoniczne i wenoprotekcyjne, w których wykorzystywane są właściwości przeciwobrzękowe, przeciwzapalne i przeciwutleniające tej substancji. Zastosowanie zaawansowanych technik badawczych doprowadziło w ostatnich latach do lepszego zrozumienia molekularnych mechanizmów działania β -escyny i odkrycia nowych, potencjalnych wskazań dla tego leku. Wykazano między innymi, że β -escyna jest silnym aktywatorem dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) – grupy enzymów katalizujących utlenianie aldehydów do nietoksycznych kwasów karboksylowych. β -escyna może być zatem potencjalnie wykorzystana do ograniczenia negatywnych czynników zdrowotnych związanych z ekspozycją na działanie aldehydów podczas palenia tytoniu.

Celem badania cyklu publikacji składającym się na niniejszą rozprawę doktorską była ocena *in vitro* oraz *in vivo* wpływu β -escyny na procesy biologiczne zachodzące w drogach oddechowych ekspozowanych na działanie dymu papierosowego.

W badaniu *in vitro* wykorzystano komórki nabłonka błony śluzowej nosa pobrane od niepalących, zdrowych osób. 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. W badaniu zaobserwowano zmniejszony poziom IL-6 i IL-8 w płwocinie indukowanej palaczy w 7 dobie suplementacji preparatem β -escyny, jednak zmiany te nie osiągnęły istotności statystycznej. 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 antyoksydacyjnej.

Przedstawione wyniki sugerują protekcyjną rolę β -escyny w redukcji cytotoksyczności i uszkodzeń DNA wywołanych przez dym papierosowy w komórkach nabłonka dróg oddechowych. Potencjalne zastosowanie β -escyny w ochronie dróg oddechowych przed działaniem innych czynników cytotoksycznych wymaga dalszych badań na większej grupie ochotników.

3. Streszczenie w j. angielskim

Smoking is one of the biggest threats to public health worldwide. Cigarette smoke contains more than 7,000 chemicals, including aldehydes, considered priority toxicants. A growing body of evidence supports the thesis of aldehydes as agents in the development of tobacco-related diseases.

β -escin (a mixture of triterpenoid saponins extracted from *Aesculus hippocastanum*. L.) is well known for its endothelial protection. In daily clinical practice, the main use of escin comes down to venotonic and venoprotective indications, where its anti-edema, anti-inflammatory and antioxidant properties are exploited. To date, literature data present the multidirectional effects of escin, confirming its safety profile, cytoprotective and therapeutic effects. However, recent advances in understanding its molecular mechanisms of action provide justification for new applications of β -escin. β -escin is a potent activator of aldehyde dehydrogenase (ALDH), an enzyme that catalyzes the oxidation of aldehydes to non-toxic carboxylic acids. β -escin may have potential applications in reducing negative health effects associated with smoking. The aim of this study was to evaluate *in vitro* and *in vivo* the effects of β -escin on biological processes in airways exposed to cigarette smoke.

The experimental study utilized nasal epithelial cells from non-smoking, healthy subjects, which were treated with β -escin (1 μ M) and CSE (5%) and then cell viability, ALDH activity and mRNA expression for ALDH isoforms were determined after 6 and 24 hours. 24-hour stimulation with β -escin increased the viability of nasal epithelial cells induced by CSE toxicity. Cell cultures exposed to CSE in the presence of escin showed a significant reduction in DNA damage. Both β -escin and CSE stimulated *ALDH3A1* expression (after 6 hours) and ALDH activity (after 24 hours), but the stimulatory effect was much stronger with simultaneous stimulation with β -escin and CSE. The presented results indicate a specific biphasic increase in mRNA expression of ALDH isoenzymes induced by CSE and β -escin. Both β -escin and tobacco smoke extract stimulated ALDH enzymatic activity, but the observed effect was much stronger when cells were simultaneously treated with CSE and β -escin. A similar phenomenon was found for mRNA expression for ALDH isoforms: simultaneous exposure of cells to β -escin and CSE led to the strongest increase in *ALDH1A1* and *ALDH3A1* expression after 6 hours, and after 24 hours for *ALDH1A3*, *ALDH3A2*, *ALDH3B1* and *ALDH18A1*. In addition, β -escin prevented CSE-induced inhibition of ALDH2 expression 24 hours after stimulation.

Application of β -escin solution in combination with chokeberry fruit extract for 7 days had an effect on the number of neutrophils in smokers' induced sputum. Smokers' sputum on day 0 contained a significantly higher number of neutrophils and fewer macrophages (%) compared to non-smokers. On day 7, the number of neutrophils in the smokers' sputum was significantly lower ($p=0.03$), reaching a level comparable to the control group. The applied treatment contributed to a reduction in IL-6 and IL-8 activity, but these changes did not reach statistical significance. The results of the pilot study suggest that low doses of β -escin combined with chokeberry fruit extract may exert a beneficial effect on tobacco smokers by significantly reducing neutrophil accumulation in the airways. A possible underlying mechanism may be due to the increased ALDH activity demonstrated in PBMCs both *in vitro* and *in vivo*, and the increase in antioxidant capacity found in both induced sputum and saliva.

We have shown, for the first time, that β -escin is an effective agent for supporting airway epithelial cells against cytotoxicity and DNA damage caused by cigarette smoke. It increases the antioxidant potential in airways exposed to a toxic agent such as cigarette smoke. The potential use of β -escin in protecting the respiratory tract from other cytotoxic agents such as air pollutants requires further study.

4. Wstęp

4.1. Problem uzależnienia od tytoniu na świecie.

Pomimo powszechnie znanego ryzyka związanego z paleniem papierosów, epidemia palenia tytoniu jest jednym z największych światowych wyzwań dla zdrowia publicznego i jedną z najczęstszych przyczyn przedwczesnych zgonów na świecie (1). Według szacunków Global Burden of Diseases (GBD), co roku ponad 8 mln ludzi na świecie umiera z powodu chorób odtytoniowych. W Polsce są one najczęstszą przyczyną zgonów u mężczyzn i drugą co do częstości przyczyną zgonów u kobiet. Do codziennego palenia tytoniu w 2022 r. przyznało się aż 28,8% dorosłych Polaków (2). Wysokie wskaźniki zachorowalności i umieralności związane z ekspozycją na dym tytoniowy wynikają z cytotoksycznego, mutagennego, genotoksycznego i rakotwórczego działania produktów spalania (3).

4.2 Aldehydy - kluczowe toksyny dymu tytoniowego.

Spośród ponad 7000 substancji obecnych w dymie papierosowym, Grupa Badawcza Światowej Organizacji Zdrowia ds. Regulacji Produktów Tytoniowych (WHO TobReg) wskazała 38 najważniejszych toksyn, z których sześć to lotne aldehydy (1). Z badań wynika, że ze względu na ich rozpowszechnienie i toksyczność, akroleina, formaldehyd, propionaldehyd, krotonaldehyd i butyraldehyd a w szczególności aldehyd octowy, są dla człowieka wyjątkowo szkodliwe (4,5).

4.3 Przewlekłe zapalenie w drogach oddechowych.

Nabłonek oddechowy jest pierwszym miejscem kontaktu dróg oddechowych z toksynami obecnymi w powietrzu, a jego rola polega na ochronie przed przedostaniem się ich do organizmu. Komórki nabłonka odgrywają kluczową rolę w inicjowaniu reakcji zapalnej w drogach oddechowych w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne. Napływające komórki zapalne, w tym makrofagi, limfocyty i granulocyty, produkują cytokiny prozapalne, czynniki wzrostu, enzymy proteolityczne, tym samym przyczyniając się do progresji uszkodzenia tkanki. Dla przykładu, proces zapalny w najlepiej poznanym fenotypie przewlekłej obturacyjnej choroby płuc (POChP) charakteryzuje się napływem do dróg oddechowych limfocytów T, głównie CD8+, makrofagów i neutrofilów. Do najbardziej charakterystycznych dla POChP cytokin zapalnych zaliczane są IL-8, która działa chemotaktycznie na neutrofile i makrofagi

oraz IL-1 β , IL-6 i TNF- α (czynniki martwicy nowotworów alfa, *tumor necrosis factor alpha*,) promujące i podtrzymujące stan zapalny. Za proces migracji neutrofilów do dróg oddechowych w głównej mierze odpowiadają IL-8, IL-1 β , TNF- α i leukotrien B4 (6,7).

Nieinwazyjnym badaniem, za pomocą którego można określić typ zapalenia dróg oddechowych, jest ocena składu komórkowego płwociny indukowanej. Mimo pewnych ograniczeń, takich jak czasochłonność, konieczność spełnienia określonych wymagań aparaturowych i lokalowych oraz potrzeba przeszkolonego personelu, metoda ta pozostaje badaniem referencyjnym.

4.4 Wpływ aldehydów z dymu tytoniowego na zapalenie w drogach oddechowych oraz rola tych związków w patogenezie chorób odtytoniowych.

Długotrwała ekspozycja na dym papierosowy prowadzi do licznych zmian patologicznych w drogach oddechowych. Składniki dymu negatywnie wpływają na komórki dróg oddechowych, zaburzając ich funkcję i prowadząc do trwałych zmian strukturalnych w układzie oddechowym (4). Uszkodzony nabłonek charakteryzuje się zmniejszoną liczbą rzęsek i ich osłabioną ruchliwością, co w połączeniu z nadprodukcją śluzu powoduje nieskuteczne usuwanie zalegającej wydzieliny z dróg oddechowych. Czynniki te, w połączeniu ze stresem oksydacyjnym, przewlekłym stanem zapalnym oraz zwiększoną rekrutacją makrofagów i neutrofilów do dróg oddechowych, są głównymi czynnikami przyczyniającymi się, między innymi do rozwoju chorób obturacyjnych, a w szczególności POChP (8,9).

Stres oksydacyjny związany z paleniem tytoniu jest jednym z najlepiej poznanych mechanizmów prowadzących do patologii struktur komórkowych i tkanek i jest powiązany z wieloma chorobami odtytoniowymi. Mechanizm stresu oksydacyjnego obejmuje akumulację w różnych przedziałach komórkowych reaktywnych form tlenu (ROS) które, jeśli nie zostaną zneutralizowane, mogą uszkadzać DNA, lipidy i białka (9).

Molekularne mechanizmy prozapalnego działania aldehydów obejmują m.in. nadmierną produkcję ROS. Przewlekła akumulacja ROS prowadzi do peroksydacji lipidów, a w efekcie również do produkcji toksycznych aldehydów, m. in. krotonowego, akroleiny, 4-hydroksynonenalu - 4HNE, aldehydu malonowego (MDA), które tworzą mutagenne i rakotwórcze addukty z makrocząsteczkami, w tym z np. białkami, DNA i

RNA, co prowadzi do zaburzeń funkcji komórkowych i nasilenia rekrutacji komórek zapalnych (10,11).

Wyniki licznych badań wskazują na aldehydy jako kluczowe czynniki w rozwoju chorób związanych z paleniem tytoniu, takich jak POChP (12), zaburzeń metabolizmu glukozy, cukrzycy typu 2 (13), dysfunkcji śródbłónka, prowadzących do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych czy nowotworowych (4,14). Co istotne, według danych literaturowych, aldehyd octowy nasila uzależniające działanie nikotyny (15–17).

4.5 Rola dehydrogenazy aldehydowej (ALDH) w redukcji toksyczności dymu tytoniowego.

Obniżenie zawartości aldehydów w dymie papierosowym stanowi część polityki regulacyjnej mającej na celu zmniejszenie narażenia palaczy na czynniki toksyczne. Jednocześnie rozważane jest również podejście farmakologiczne, którego celem jest zmniejszenie toksyczności aldehydów poprzez wykorzystanie substancji neutralizujących lub zwiększenie aktywności enzymów degradujących aldehydy (11). Skuteczność tych rozwiązań w redukcji toksyczności dymu papierosowego została udowodniona w badaniach przedklinicznych. Wykazano na przykład, że wiążący się z aldehydami i blokujący ich reaktywność eksperymentalny lek ADX-102 (reproxalap) chronił komórki nabłonka dróg oddechowych przed uszkodzeniami wywołanymi działaniem ekstraktu z dymu papierosowego (*cigarette smoke extract*, CSE) (18).

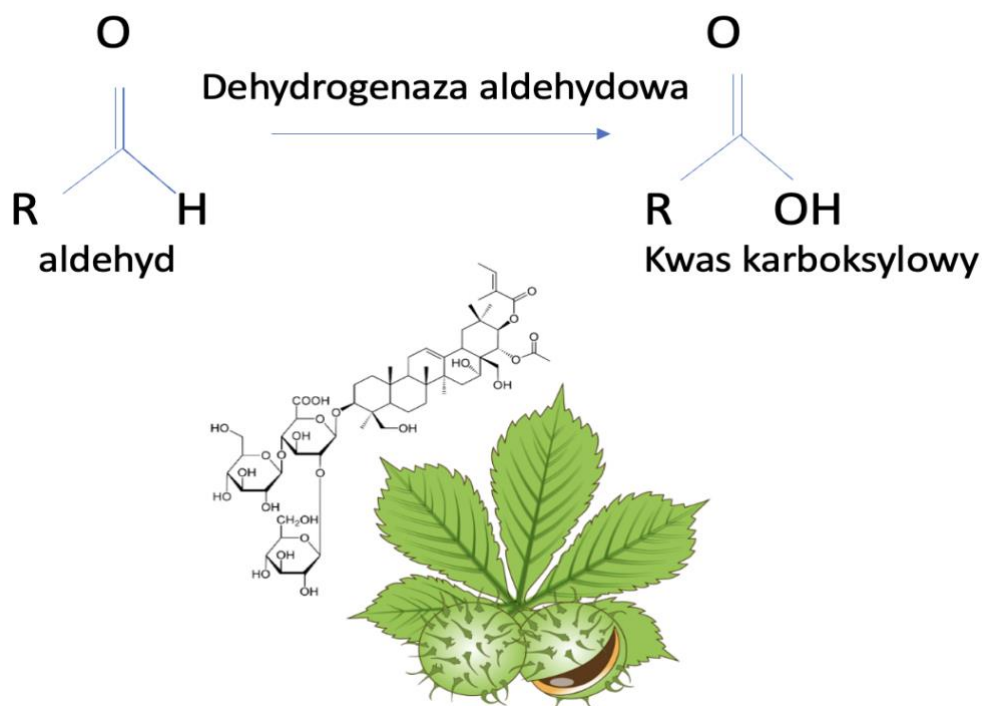
ALDH (EC 1.2.1.3) to super rodzina 19 enzymów, które katalizują oksydację aldehydów do kwasów karboksylowych (19). Jak pokazano *in vitro* w doświadczeniach z użyciem ludzkich komórek nabłonka oskrzelowego, zwiększona ekspresja *ALDH3A1* zmniejszała cytotoksyczność wywołaną przez CSE (20). Z kolei zastosowanie Alda-1, drobnocząsteczkowego aktywatora ALDH2 chroniło myszy przed uszkodzeniem płuc wywołanym akroleiną (21). Wzmocniona aktywność ALDH jest ważnym elementem odpowiedzi komórkowej chroniącej przed uszkodzeniami kwasów nukleinowych oraz białek przez aldehydy.

Cytotoksyczność wywołana przez dym papierosowy jest w dużej mierze związana ze stresem oksydacyjnym. W tym kontekście izoenzymy ALDH odgrywają ważną rolę nie tylko w usuwaniu aldehydów, ale także w funkcjach antyoksydacyjnych niezwiązanych z metabolizmem tych związków. Aktywność ALDH zwiększa wydajność neutralizacji ROS oraz stymuluje produkcję NADPH, który jest niezbędny do regeneracji zredukowanego glutationu – kluczowego antyoksydantu komórkowego.

ROS oraz produkty peroksydacji lipidów, takie jak powstający po ekspozycji na dym papierosowy 4-HNE (4-hidroksynonenal), mogą hamować ALDH, co potęguje stres oksydacyjny i uszkodzenia komórkowe (22).

4.6. Escyna, stary lek w nowej odsłonie.

Nasiona kasztanowca zwyczajnego (*Aesculus hippocastanum* L.) zawierają od 3 do 10% escyny, która jest mieszaniną około 80 związków należących do grupy saponin, czyli acylowanych glikozydów triterpenowych. 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. Część cukrowa w cząsteczce β -escyny składa się z kwasu glukuronowego oraz dwóch cząsteczek glukozy i jest połączona wiązaniem glikozydowym z węglem C-3 pochodnej triterpenu. Wyróżnia się trzy główne składniki escyny: krypto-, α - oraz β -escyna. Mieszanina krypto- i β -escyny to α -escyna (23,24).



Rycina 1 Schemat działania ochronnego ekstraktu z nasion kasztanowca w ograniczaniu szkodliwości tytoniu.

4.7 Escyna, właściwości i dotychczasowe zastosowanie.

Obecnie jedynym zarejestrowanym wskazaniem do stosowania escyny jest przewlekła niewydolność żylna. We wskazaniach wenotonicznych i wenoprotekcyjnych, wykorzystywane są właściwości przeciwobrzękowe, przeciwzapalne i przeciwutleniające tego preparatu (20,26–28).

Przeciwzapalne i przeciwobrzękowe mechanizmy działania escyny są wielokierunkowe (27). Zmniejsza adhezję i agregację neutrofilów do śródbłónka naczyniowego, w konsekwencji redukując produkcję anionu nadtlenkowego i leukotrienu B₄ przez te komórki (29). Wyniki badań *in vitro* wykazały, że escyna zmniejsza przepuszczalność śródbłónka poprzez hamowanie aktywności hialuronidazy o 93%.

Escyna obniża liczbę napływających komórek zapalnych rekrutowanych do miejsca zapalenia, ekspresję TNF- α , IL-1 β i IL-6 (30), metaloproteinazy macierzy-9 (*matrix metalloproteinase 9*, MMP9) oraz poziom NOx (31). Badania z zastosowaniem modelu szczurzego wykazały, że β -escyna chroni regenerujące się mięśnie przed atrofią poprzez zwiększenie liczby włókien mięśniowych, zmniejszenie stanu zapalnego i hamowanie postępu włóknienia (3).

Wyniki innego badania sugerują, że naczyniowy mechanizm przeciwzapalny β -escyny obejmuje zaburzenia homeostazy cholesterolu prowadzące do zaburzenia organizacji cytoszkieletu, a następnie zmniejszonej aktywacji NF κ B i obniżonej regulacji białek efektorowych indukowanych przez TNF- α (3).

Doniesiono również, że działa synergistycznie z glikokortykosteroidami (GC) wzmacniając ich działanie przeciwzapalne (32), przyczyniając się tym samym do redukcji dawki i zmniejszenia działań niepożądanych steroidów (33). Inne badanie potwierdziło jej działanie przeciwzapalne w porównaniu z ibuprofenem i deksametazonem w modelu synowocytów w chorobie zwyrodnieniowej stawów (34). Budowa chemiczna β -escyny, jej pierścieniowy układ szkieletu triterpenowego jest bardzo podobny do glikokortykoidu - kortyzolu, endogennego liganda dla receptor glikokortykoidowy (GR), oba te związki należą do tetracyklicznych triterpenoidów. Dlatego uważa się, że opisywany efekty przeciwzapalny escyny może wynikać z jej wpływu na GR, gdyż jest ona jego częściowym agonistą (13).

4.8 Wpływ escyny na aktywność dehydrogenazy aldehydowej.

Dzięki zastosowaniu zaawansowanych technik badawczych możliwe było odkrycie nieznanych wcześniej właściwości escyny (25). Wyniki opublikowanych kilka lat temu badań ujawniły, że β -escyna jest silnym aktywatorem ALDH, który odgrywa kluczową rolę w szlakach biotransformacji substancji toksycznych, prowadząc m.in. do detoksykacji aldehydów powstających w wyniku stresu oksydacyjnego (3).

4.9 Ochronny wpływ escyny na układ oddechowy.

W leczeniu uzależnienia od tytoniu oprócz interwencji farmakologicznych i behawioralnych, rozważa się przyjmowanie funkcjonalnych produktów spożywczych w celu kompleksowego wsparcia reakcji antyoksydacyjnych u palaczy (20,35).

Wspomagające zastosowanie suplementacji escyną może być ukierunkowane na powyższy cel, poprzez neutralizację stresu oksydacyjnego i stanu zapalnego w drogach oddechowych.

Wśród eksperymentalnych metod zmniejszania stanu zapalnego wywołanego przez palenie papierosów, szczególnie obiecujące są metody mające na celu obniżenie poziomu aldehydów w drogach oddechowych, poprzez zwiększenie ich rozkładu np. poprzez stymulację aktywności ALDH, rodziny kluczowych enzymów przekształcających aldehydy w inne metabolity.

4.10 Zastosowanie escyny w leczeniu ostrych stanów uszkodzenia płuc.

Wpływ escyny na układ oddechowy jest ściśle związany z jej bezpośrednim wpływem na śródbłonek, zwłaszcza w stanach ostrych takich jak zapalenie płuc czy wstrząs septyczny. Ostre uszkodzenie płuc (*acute lung injury*, ALI), ostra niewydolność oddechowa (*acute respiratory distress syndrome*, ARDS) to ciężkie stany charakteryzujące się ostrą odpowiedzią zapalną, która prowadzi do uszkodzenia komórek śródbłonka naczyń włosowatych płuc i komórek nabłonka pęcherzyków płucnych. Dochodzi wówczas do rozpadu glikokaliksu śródbłonka, który odgrywa kluczową rolę w utrzymaniu przeznaczyniowej wymiany wody i substancji rozpuszczalnych (36,37). Wykazano, że β -escyna może mieć potencjalne zastosowanie we wspomaganiu leczenia ostrych stanów poprzez wpływ na cytoszkielet aktynowy, zwiększenie zawartości podokaliksiny regulującej integralność naczyń.

W badaniu na myszach, w którym uszkodzenie płuc wywołano lipopolisacharydem (*lipopolysaccharide*, LPS), wstępne leczenie escyną wykazało korzystny efekt: zmniejszyło śmiertelność, złagodziło uszkodzenia płuc oraz obniżyło poziom mediatorów zapalnych (TNF- α , IL-1 β i NO). Terapia ta poprawiała endogenną zdolność antyoksydacyjną, redukując aktywność dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy glutationowej (GPx) i mieloperoksydazy (MPO), a także zwiększając poziom glutationu (GSH) i dialdehydu malonowego (MDA). Dodatkowo obserwowano wzrost ekspresji GR w płucach (38). Potencjalny mechanizm działania escyny w hamowaniu przepuszczalności śródbłonna indukowanego silnym zapaleniem związanym z ekspresją białka grupy wysokiej mobilności-1 (*high mobility group protein-1*, HMGB1), np. po uszkadzającym działaniu LPS, polega na hamowaniu ekspresji akwaporyny.

Ponadto, wyniki badań z użyciem modeli zwierzęcych wykazały jej działanie przeciwwirusowe i przeciwbakteryjne przeciw patogenom m.in. takim jak: RSV, SARS-CoV-2, wirus Denga, HSV-1, VSV czy pneumokoki (39,40). Dla przykładu, w mysim modelu pneumokokowego zapalenia płuc, 4-dniowe podawanie escyny istotnie zmniejszyło nasilenie zapalenia płuc, co sugeruje jej potencjalne zastosowanie w leczeniu wspomagającym (41,42). Nie znalazło to jednak odzwierciedlenia w żadnych późniejszych globalnych zaleceniach dotyczących leczenia chorych zakażonych SARS-CoV-2 czy innymi patogenami.

4.11. Potencjalne przeciwnowotworowe właściwości escyny.

Zainteresowanie badaczy β -escyną skupia się również na jej potencjalnym działaniu przeciwnowotworowym obejmującym indukcję apoptozy, hamowanie proliferacji komórek nowotworowych (43,44), a także jej właściwości antyoksydacyjne opierające się na aktywacji ALDH.

Komórki nowotworowe charakteryzują się zaburzonym stanem redoks, gdzie nadmierna produkcja reaktywnych form tlenu (*reactive oxygen species*, ROS) prowadzi do oksydacji wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, co skutkuje kumulacją aldehydów. W tym kontekście zwiększenie ekspresji *ALDH1A1* może wspomagać neutralizację ROS (45,46). Wykazano, że *ALDH1A1* może promować inicjację i progresję nowotworu a także korelować z zaawansowaniem raka płuca i stopniem jego złośliwości (46).

Eksperymentalne wyniki sugerują, że β -escyna może mieć potencjalne zastosowanie w chemoprewencji raka płuca. W modelu mysim, w którym użyto kancerogenu z dymu papierosowego 4-(metylo-nitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanonu (NNK), β -escyna wpływała na regulację ekspresji ALDH1A1 i p-Akt oraz indukowała ekspresję p21, co skutkowało zahamowaniem wzrostu komórek raka (47).

W badaniach z użyciem modelu mysiego wykazano, że wprowadzenie β -escyny do diety hamowało proliferację gruczolakoraka oraz opóźniało progresję gruczolaka do gruczolakoraka (48).

Choć dane literaturowe sugerują plejotropowe właściwości escyny, a w niniejszym wstępie wymieniono zaledwie część z nich, to wciąż brakuje badań klinicznych, które potwierdzałyby jej skuteczność i uzasadnienia zastosowania w terapii poza wskazaniami zarejestrowanym dla tego leku. Wiele opublikowanych badań nie dostarcza jednoznacznych dowodów na zasadność stosowania escyny w praktyce klinicznej poza jej aktualnym, zarejestrowanym wskazaniem. Z drugiej jednak strony, jest to preparat o potwierdzonym profilu bezpieczeństwa i nowe dane wspierają konieczność prowadzenia dalszych badań zmierzających do rozszerzenia jego zastosowania w innych niż dotychczas wskazaniach. Repozycjonowanie, czyli wprowadzanie na rynek dobrze znanych i dokładnie przebadanych substancji w nowych wskazaniach, stanowi popularną strategią stosowaną w przemyśle farmaceutycznym (49, 50).

W opisanych poniżej badaniach podjęłam próbę oceny działania β -escyny jako czynnika ochronnego przeciwdziałającego negatywnemu wpływowi dymu tytoniowego na układ oddechowy.

5. Założenia i cele pracy

Palenie tytoniu jest niezwykle istotnym problemem zdrowia publicznego na świecie. Wysokie wskaźniki zachorowalności i umieralności związane z narażeniem na dym tytoniowy wynikają z cytotoksycznego, mutagennego, i rakotwórczego działania składników dymu papierosowego. Dym papierosowy zawiera ponad 7000 składników, spośród których jednymi z najbardziej toksycznych są m. in. aldehyd octowy i inne aldehydy. β -escyna charakteryzuje się właściwościami przeciwozbrękowymi, przeciwzapalnymi i przeciwutleniającymi. Wyniki badań ujawniły, że β -escyna jest również silnym aktywatorem dehydrogenazy aldehydowej – kluczowego enzymu szlaków biotransformacji substancji toksycznych, prowadzącego m.in. do detoksyfikacji toksycznych aldehydów powstających w wyniku stresu oksydacyjnego i zawartych w dymie papierosowym. Wobec dostępnych danych literaturowych sformułowałam hipotezę badawczą, która zakłada, że β -escyna może działać przeciwzapalnie, antyoksydacyjnie i cytoprotekcyjnie w dogach oddechowych narażonych na działanie dymu papierosowego.

Badania stanowiące moją rozprawę doktorską dotyczą oceny *in vitro* oraz *in vivo* działania β -escyny na układ oddechowy po działaniu dymu papierosowego. W pracy eksperymentalnej wykorzystano pierwotne komórki nabłonka błony śluzowej nosa jako często stosowany model zastępczy dla komórek nabłonka oskrzelowego. W badaniu tym oceniano wpływ β -escyny na żywotność, uszkodzenia DNA, ekspresję izoform ALDH oraz aktywność enzymatyczną ALDH w komórkach stymulowanych CSE. Natomiast w drugiej pracy z cyklu stanowiącego niniejszą rozprawę doktorską, oceniano potencjał antyoksydacyjny oraz procesy zapalne w materiałach z dróg oddechowych osób palących przyjmujących preparat β -escyny przez tydzień.

Sformułowano następujący cel główny i cele szczegółowe badań składających się na niniejszą rozprawę doktorską:

Cel główny:

1. Ocena *in vitro* oraz *in vivo* wpływu β -escyny na procesy biologiczne zachodzące w drogach oddechowych ekspozycjach na działanie dymu papierosowego.

Cele szczegółowe:

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

6. Kopie opublikowanych prac

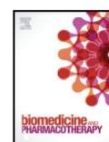
6.1 Publikacja nr 1

β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death.

Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322

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

Praca oryginalna (4,26–28).



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

Malwina Soltysiak^{a,1}, Magdalena Paplińska-Goryca^{a,1}, Paulina Misiukiewicz-Stępień^a,
Paulina Wójtowicz^a, Małgorzata Dutkiewicz^b, Oliwia Zegrocka-Stendel^b, Maria Sikorska^b,
Dorota Dymkowska^c, Laura Turos-Korgul^d, Rafał Krenke^a, Katarzyna Koziak^{b,*,2}

^a Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland

^b Department of Biochemistry and Nutrition, Centre for Preclinical Research and Technology, Medical University of Warsaw, Banacha 1b, 02-097 Warsaw, Poland

^c Laboratory of Cellular Metabolism, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Science, Pasteura 3, 02-093 Warsaw, Poland

^d Laboratory of Cytometry, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Science, Pasteura 3, 02-093 Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Key words:

β -escin
Tobacco
Cigarette smoke extract
ALDH
Epithelium

ABSTRACT

Background: The tobacco use is one of the biggest public health threats worldwide. Cigarette smoke contains over 7000 chemicals among other aldehydes, regarded as priority toxicants. β -escin (a mixture of triterpenoid saponins extracted from the *Aesculus hippocastanum* L.) is a potent activator of aldehyde dehydrogenase (ALDH) – an enzyme catalyzing oxidation of aldehydes to non-toxic carboxylic acids.

Purpose: The aim of this study was to evaluate the effect of β -escin on ALDH activity, ALDH isoforms mRNA expression and cytotoxicity in nasal epithelial cells exposed to cigarette smoke extract (CSE).

Methods: Nasal epithelial cells from healthy non-smokers were treated with β -escin (1 μ M) and exposed to 5% CSE. After 6- or 24-hours of stimulation cell viability, DNA damage, ALDH activity and mRNA expression of ALDH isoforms were examined.

Results: 24 h β -escin stimulation reversed CSE induced cytotoxicity and DNA damage. Cells cultured with β -escin or exposed to CSE responded with strong increase in ALDH activity. This effect was more pronounced in cultures treated with combination of β -escin and CSE. The strongest stimulatory effect on ALDH isoform mRNA expression was observed in cells cultured simultaneously with β -escin and CSE: at 6 h for ALDH1A1 and ALDH3A1, and at 24 h for ALDH1A3, ALDH3A2, ALDH3B1, and ALDH18A1. Combined β -escin and CSE treatment prevented the CSE-induced inhibition of ALDH2 expression at 24 h.

Conclusions: β -escin is an effective ALDH stimulatory and cytoprotective agent and might be useful in the prevention or supportive treatment of tobacco smoke-related diseases.

1. Introduction

Cigarette smoking remains one of the leading causes of premature death worldwide [6]. The high morbidity and mortality rates associated with tobacco smoke exposure are due to cytotoxic, mutagenic, genotoxic and carcinogenic effects of cigarette smoke constituents and combustion products. The contributions of individual components to smoke-induced deleterious health effects has been a subject of extensive studies which led to identification and potency ranking of major cigarette smoke

toxicants [30,41]. Among the more than 7000 chemicals found in cigarette smoke, World Health Organization Study Group on Tobacco Product Regulation (WHO TobReg) identified 38 molecules regarded as priority toxicants, of which six are volatile aldehydes [39]. An estimation of exposure to aldehydes from cigarette smoke and risk assessment studies show that due to their pervasiveness and toxicity, acrolein, acetaldehyde, formaldehyde, propionaldehyde, crotonaldehyde, and butyraldehyde have particularly detrimental effects on human health [30,39,41]. Accumulating evidence supports the notion of aldehydes as

Abbreviations: AHR, aryl hydrocarbon receptor; ALDH, aldehyde-metabolizing enzymes aldehyde dehydrogenase; CSE, cigarette smoke extract; Fancd2, Fanconi anemia complementation group D2; LDH, lactate dehydrogenase; qPCR, quantitative PCR; ROS, reactive oxygen species; SEM, standard error of mean; WHO TobReg, World Health Organization Study Group on Tobacco Product Regulation; 4-HNE, 4-hydroxy-2-nonenal.

* Corresponding author.

E-mail address: katarzyna.kozia@wum.edu.pl (K. Koziak).

¹ These authors contributed equally to this work.

² +48 22 116 61 28

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2023.115924>

Received 7 August 2023; Received in revised form 16 November 2023; Accepted 20 November 2023

Available online 28 November 2023

0753-3322/© 2023 The Authors. Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

causative factor in the development of smoke-related diseases including chronic obstructive pulmonary disease [51] nicotine addiction [2,15,50], chronic liver disease [33], aberrations in glucose metabolism, type-2 diabetes and insulin resistance [14], infertility and adverse pregnancy outcomes [1] and endothelial dysfunction leading to the development of cardiovascular disease [30]. As predominant tobacco smoke carcinogens, aldehydes are able to induce carcinogenesis in various organs [53]. Molecular mechanisms of aldehyde toxicity indicate that by forming adducts with macromolecules (e.g., proteins, DNA, and RNA) these substances cause inactivation and disruption of cellular functions [27].

While mandatory lowering aldehyde levels in cigarette smoke is a part of regulatory policy for reducing exposure of smokers to toxicants, pharmacological approaches mitigating their health impact are also considered. Therapeutic strategies to alleviate aldehyde toxicity have generally focused on reducing their load with scavengers and on enhancing their metabolism by increasing activity of enzymes converting aldehydes to other metabolites [13]. The efficacy of these approaches in reducing cigarette smoke toxicity has been demonstrated in preclinical studies. For example, recently published data showed decreased cigarette smoke extract (CSE)-mediated airway epithelial cell injury after treatment with an aldehyde trapping drug ADX-102 (also known as Reproxalap) [37]. Among aldehyde-metabolizing enzymes aldehyde dehydrogenase (ALDH) seem the most promising for further research. ALDH (EC 1.2.1.3) is a superfamily of 19 enzymes that catalyze oxidation of aldehydes to carboxylic acids [20]. As shown *in vitro* in immortalized primary human bronchial epithelial cells, overexpression of *ALDH3A1* attenuated CSE-induced cytotoxicity [22]. In mice, acrolein-induced lung injury could be prevented and rescued by Alda-1, a small-molecule activator of ALDH2 [29]. These results substantiate further investigation of other compounds preventing aldehyde accumulation and protecting against aldehyde-related injury, which may occur after smoke inhalation.

A recent study revealed that β -escin, a mixture of triterpenoid saponins extracted from the seed of horse chestnut tree (*Aesculus hippocastanum* L.), is a strong activator of ALDH activity [48]. The current use of the drug is restricted mainly to venotonic and venoprotective indications, but recent advances in the understanding of molecular mechanisms of β -escin action provide rationale for its novel uses beyond the current vascular indications [12]. In the present study we used primary human nasal epithelial cells as a well described surrogate model for bronchial epithelial cells [34] to examine the effect of β -escin on cell viability as well as on ALDH activity and ALDH isoforms mRNA expression in cells exposed to CSE.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

For cell cultures we used: Airway Epithelial Cell Growth Medium (PromoCell, cat. no. C-21060), antibiotics/antimycotic (Streptomycin, Amphotericin B, Penicillin, Thermo Fisher, cat. no. 15240062), Accutase (BD Biosciences, cat. no. 561527). For cell stimulation we used: 1R6F with filter (Kentucky Tobacco Research and Development Center at the University of Kentucky), β -escin (amorphous β -escin, CAS No: 6805-41-0, Nobilis Ent). The cytotoxicity was measured by Cytotox96 assay (Promega, cat. no. G1780). For mRNA isolation, reverse transcription and PCR we used: Tri reagent (Sigma Aldrich, cat. no. T9424), reagents purchased from Thermo Fisher Scientific: cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (cat. no. 4374967), TaqMan Gene expression master mix (cat. no. 4369016), primers and TaqMan probes (cat. no. AM16708). ALDH activity was evaluated using Aldehyde Dehydrogenase Activity Colorimetric Assay Kit (Sigma Aldrich, cat. no. MAK082).

For DNA damage staining we used anti-53BP1 polyclonal antibody (Novus, cat. No. NB100-304), and the anti-rabbit Alexa 488 secondary

Table 1

The cohorts' characteristics.

Age (years)	33.5 $\pm$ 8.4
Race	Caucasian
Gender (Male/Female)	(6/9)
BMI (kg/m ²)	21.8 $\pm$ 2.3
FEV ₁ (% predicted)	104.7 $\pm$ 9.2
FEV ₁ /VC (%)	96.8 $\pm$ 12

antibody (Invitrogen, cat. No. A-11008), normal goat serum (Abcam, cat. no. ab7481) DAPI, Vectashield Mounting Medium for Fluorescence with DAPI (Vector Laboratories, Inc.).

2.2. Nasal epithelial cell isolation and culture

Epithelial cells were obtained by nasal brushing (Cytobrush Plus GT, CooperSurgical) from healthy, non-smoking subjects (*n* = 15) with a negative history of chronic lung diseases, an absence of the respiratory symptoms, normal spirometry confirmed during clinical examination, and no respiratory tract infection within three months prior to the cell collection. The study protocol was approved by the Ethical Committee of the Medical University of Warsaw (KB/91/2019) and all subjects provided informed consent. The characteristics of study participants is presented in Table 1. The cells were detached from the brush by gentle agitation, centrifuged (300 g, 10 min, RT) and treated with Accutase for 10 min in 37 °C. The cell pellet was resuspended in a final total volume of 5 ml of Airway Epithelial Cell Growth M growth medium containing antibiotics/antimycotic (streptomycin, amphotericin B, penicillin,) and seeded onto sterile plastic T25 bottles for 24 h at 37 °C. The non-adherent cells were removed, and the cell medium changed. The adhered cells were cultured until 80% confluency. Cells were treated with β -escin 30 min prior to CSE exposure.

3. Data are presented as mean $\pm$ SD

3.1. Cigarette smoke extract preparation

100% CSE was generated as previously described [47]. Briefly, smoke of research cigarettes 1R6F with filter was bubbled through 10 ml of PBS in a closed environment with tension $\sim$ 74 KPa for approximately 4.5 min. The obtained CSE, considered as 100%, was sterilized filtered through a 0.2 μ m filter (TPP) and used immediately at final concentration of 5%. Concentrations higher than 5% CSE caused high cytotoxicity in our cell model (data not shown), which remains in agreement with previously published results [9,56].

3.2. Cell viability assays

To evaluate viability of nasal epithelial cells treated with different concentrations of β -escin and CSE lactate dehydrogenase (LDH) release was measured with Cytotox96 assay. Complementary automated cell method with propidium iodide dye was used to validate the LDH release (Luna, Logos Biosystems).

3.3. DNA damage assessment

The DNA double strand breaks (DSB) were visualized by immunocytochemical detection of 53BP1 foci under a fluorescence microscope as previously described [3]. For the assessment of anti-53BP1 antibody fluorescence signal intensity, histograms of green color channel were created and evaluated with Affinity Photo v. 1.10 software.

3.4. mRNA isolation, reverse transcription and quantitative PCR analysis

Total RNA was isolated from the cells using Tri reagent. The

Table 2
Assay ID of primers and TaqMan probes used in real-time qPCR.

Gene Symbol	Assay ID
ALDH1A1	Hs00946916_m1
ALDH1A3	Hs00167476_m1
ALDH2	Hs01007998_m1
ALDH3A1	Hs00964880_m1
ALDH3A2	Hs01116403_m1
ALDH3B1	Hs00997594_m1
ALDH18A1	Hs00161078_m1
IL-1 β	Hs01555410_m1
IL-6	Hs00174131_m1
IL-8	Hs00174103_m1
18 s rRNA	Hs99999901_s1

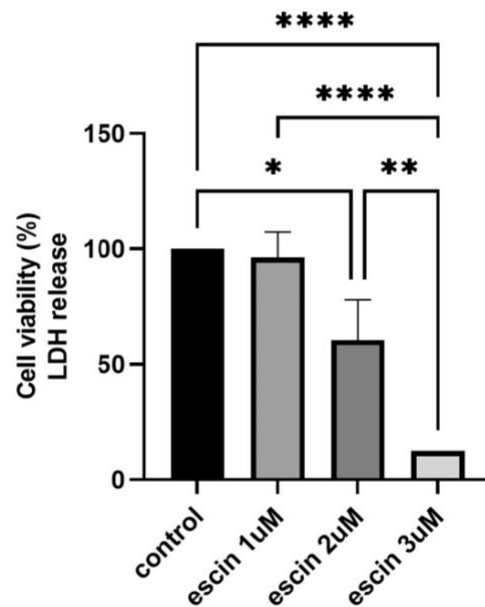


Fig. 1. Cell viability of primary human nasal epithelial cells exposed to different concentrations of β -escin. The results are presented as mean $\pm$ SEM (n = 10). Data were compared using ordinary one-way ANOVA followed by the Tukey's multiple comparisons test with a single pooled variance; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

concentration and purity of isolated RNA was assessed by DU650 spectrophotometer (Beckman Coulter). cDNA synthesis was carried out with 1 μ g of total RNA using cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor.

cDNA amplification was performed in ABI-Prism 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems). For quantitative PCR (qPCR) reaction 0.7 μ l of cDNA was amplified in 14 μ l PCR volume, containing a TaqMan master mix with 150 nM of specific primers and 100 nM of probe. By real-time qPCR the expression of seven ALDH isoforms, i.e., *ALDH1A1*, *ALDH1A3*, *ALDH2*, *ALDH3A1*, *ALDH3A2*, *ALDH3B1* and *ALDH18A1*, was quantified. *18 s rRNA* served as a reference gene for mRNA expression normalization. Assay ID of primers and TaqMan probes used for real-time qPCR are shown in Table 2. Relative

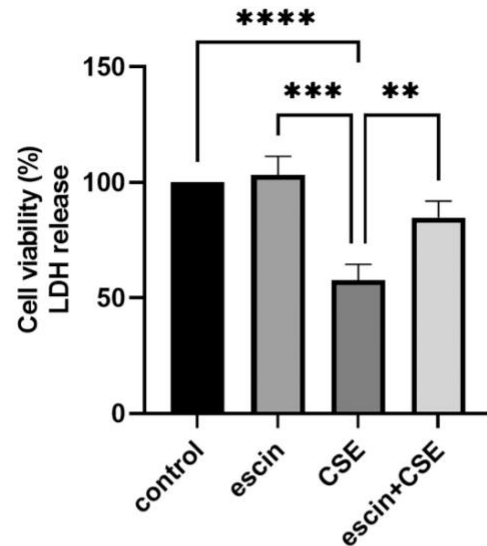


Fig. 2. Cell viability of primary human nasal epithelial cells exposed to β -escin and CSE for 24 h. The results are presented as mean $\pm$ SEM (n = 9–15). Data were analysed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey's multiple comparisons test with a single pooled variance. Abbreviations: control, untreated cells; escin, cells treated with 1 μ M β -escin; CSE, cells exposed to 5% CSE; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

quantification values were calculated by the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (7500 Software, Thermo Fisher Scientific).

3.5. ALDH activity

ALDH activity was determined using the Activity Colorimetric Assay Kit according to manufacturer's instructions in lysates prepared from cells grown to 100% confluency on 6-well plate.

3.6. Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (version 9.3.1). The ordinary one-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparisons test were used for analysing the differences between groups. The Mann-Whitney test was applied for pairwise comparisons. Results are presented as mean and standard error of mean (SEM). Differences were considered statistically significant at $p \leq 0.05$. The following determinations were used: * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

4. Results

4.1. β -escin attenuates CSE-induced cytotoxicity and DNA lesions of nasal epithelial cells

β -escin concentration used in the study was selected based on the results of cell viability assay showing that for primary human nasal epithelial cells 1 μ M is the highest non-toxic dose of the drug (Fig. 1).

The effect of β -escin on CSE-induced cytotoxicity in primary human nasal epithelial cells is depicted in Fig. 2. The significant reduction in cell viability observed after 24 h exposure to 5% CSE led to could be

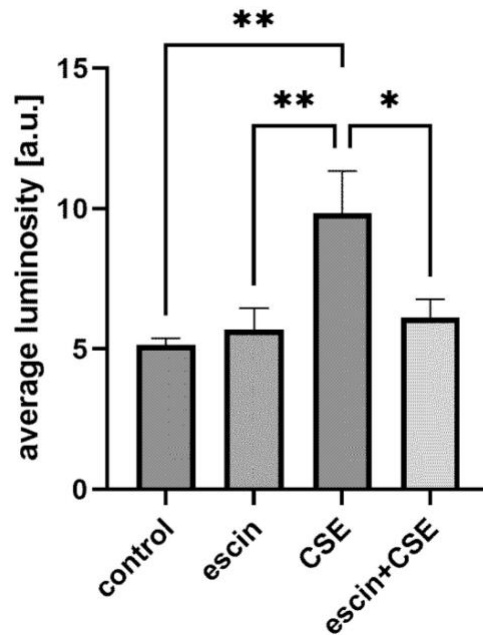


Fig. 3. DNA damage in nasal epithelial cells. Data are shown as mean $\pm$ SEM. Abbreviations: control, untreated cells; escin, cells treated with 1 μ M β -escin; CSE, cells exposed to 5% CSE; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

almost completely reversed with 1 μ M β -escin. Complementary cell-counting experiment confirmed these findings (data not shown). The cytotoxicity results remain in good agreement with DNA damage response, as evidenced by the recruitment of 53BP1, which is a DNA double-strand breaks - responsive protein (Fig. 3). While in CSE-treated cells accumulation of 53BP1 is evident, it is not observed in cells exposed to CSE after pre-treatment with β -escin.

4.2. ALDH activity and ALDH isoforms mRNA expression

Primary human nasal epithelial cells cultured with β -escin (1 μ M) or exposed to CSE (5%) responded with strong increase in ALDH activity. A time-course analysis revealed that for both treatments the maximum change was observed at 24 h and the rise in the enzyme activity was similar (Fig. 4A and B). A significantly more pronounced response was evoked with combination β -escin and CSE (Fig. 4C). qPCR analysis of mRNA expression in nasal epithelial cells revealed a strong stimulatory effect of β -escin on *ALDH1A1*, *ALDH1A3*, *ALDH2*, *ALDH3A1*, *ALDH3A2*, *ALDH3B1* and *ALDH18A1* expression (Fig. 5A). Among the evaluated isoenzymes the earliest statistically significant increase in mRNA level was observed at 3 h for *ALDH1A3* and *ALDH3A2*. A later response, at 6 h, was revealed for the remaining genes. At 24 h mRNA levels were still rising only for *ALDH1A3* and *ALDH2*; for the rest of the isoenzymes mRNA expression did not differ statistically from mRNA expression in unstimulated cells.

Strongly up-regulated expression of all the evaluated ALDH isoforms was also detected in cells exposed to CSE, albeit with different kinetics and to much higher levels (Fig. 5B). The earliest, statistically significant response was detected already at 1 h for *ALDH1A1*, *ALDH2* and *ALDH3A2*; for *ALDH3A1* and *ALDH18A1* the increase in mRNA levels at 1 h did not reach statistical significance. At 24 h mRNA levels were decreasing for most of the analyzed isoenzymes with the exception of *ALDH1A3* and *ALDH3A1* which we identified as late responders. Of note, for *ALDH1A1* and *ALDH2*, their mRNA levels were significantly lower at 24 h as compared to time mRNA expression in control cells.

Significantly stronger stimulatory effect on ALDH isoforms mRNA expression was observed in cells cultured simultaneously with β -escin and CSE: at 6 h for *ALDH1A1* and *ALDH3A1*, and at 24 h for *ALDH1A3*,

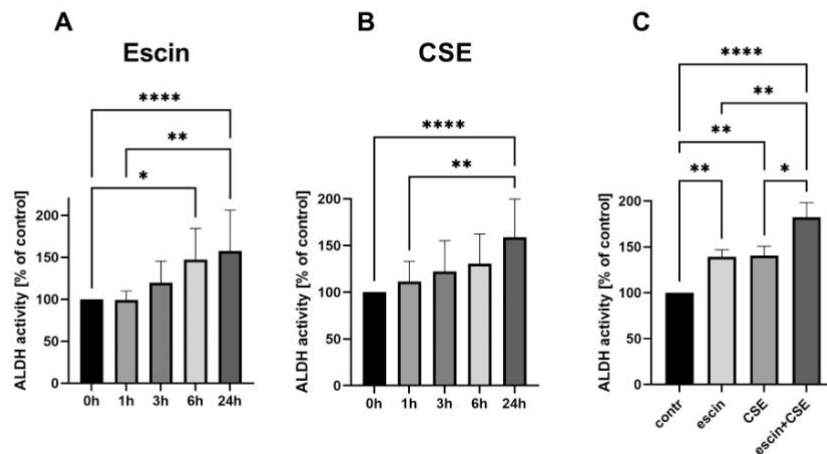


Fig. 4. ALDH activity in primary human nasal epithelial cells. Time-course activation of ALDH activity following exposition to β -escin ($n = 7$) (A), CSE ($n = 7$) (B), and 24 h combined β -escin and CSE treatment ($n = 15$) (C). Abbreviations: control, untreated cells; escin, cells treated with 1 μ M β -escin; CSE, cells exposed to 5% CSE; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

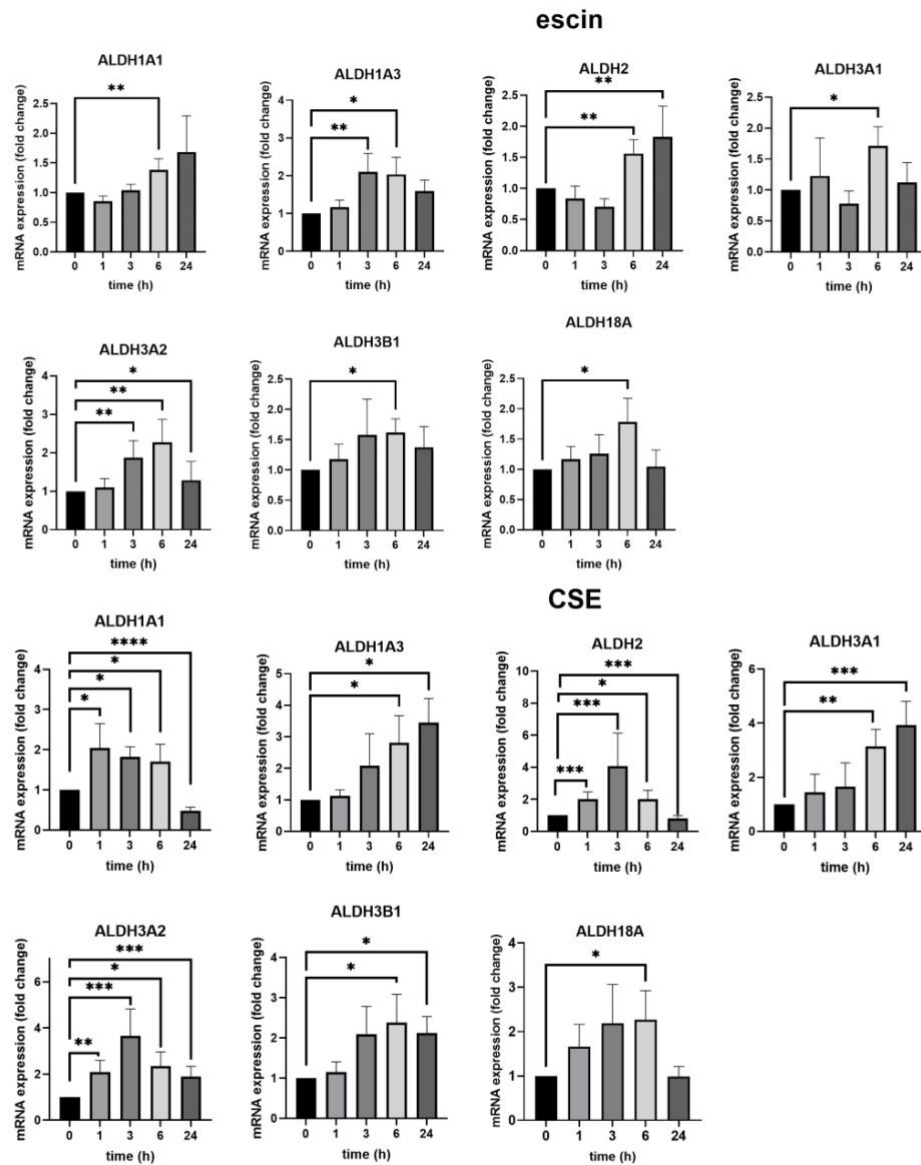


Fig. 5. ALDH isoforms mRNA levels in primary human nasal epithelial cells treated with β -escin (A) and exposed to CSE for 0, 1, 3, 6 or 24 h (B). Abbreviations: escin, cells treated with 1 μ M β -escin; CSE, cells exposed to 5% CSE; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

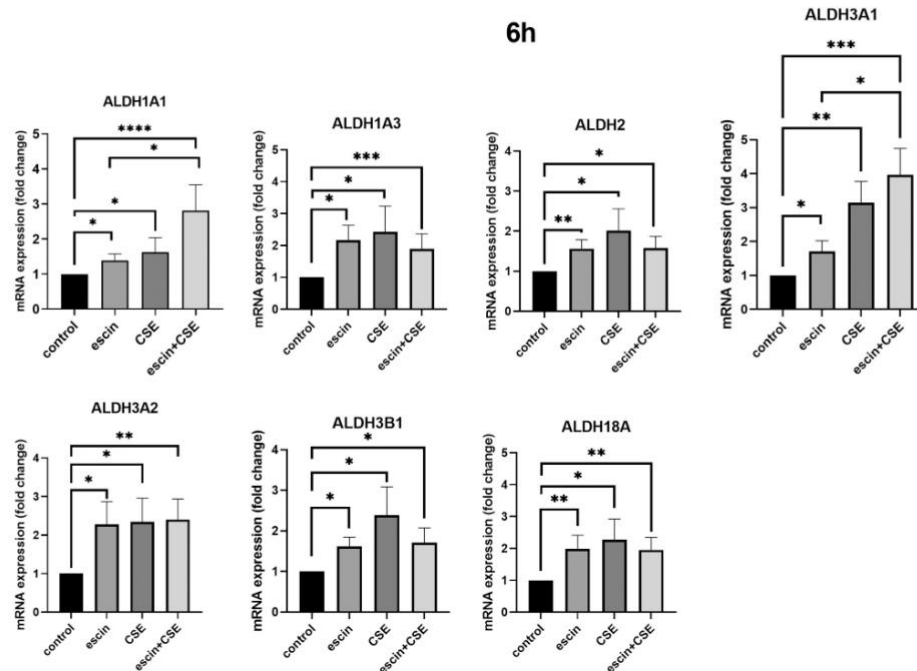


Fig. 6. ALDH isoforms mRNA levels in primary human nasal epithelial cells treated with combination of β -escin and CSE at 6 h (A) and 24 h (B). Abbreviations: control, untreated cells; escin, cells treated with 1 μ M β -escin; CSE, cells exposed to 5% CSE; * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$; *** $p \leq 0.001$.

ALDH3A2, ALDH3B1, and ALDH18A1 (Fig. 6). In addition, combined β -escin and CSE treatment prevented the CSE-induced inhibition of ALDH2 expression at 24 h. This phenomenon could be noticed also for ALDH1A1 but the effect was not statistically significant.

5. Discussion

Despite a nearly universally known health risks due to tobacco smoke exposure, smoking continues to significantly contribute to a global rate of morbidity and mortality. While efforts to expedite the demise of cigarette smoking intensify, investigated are also pharmacological methods to reduce smoke toxicity that may warrant improving public health. In this study we have demonstrated for the first time that β -escin is an efficient drug rescuing human airway epithelial cells from CSE-induced cytotoxicity and DNA lesions. The proposed mechanism underlying the beneficial efficacy of β -escin, shown here in vitro, could involve an increase in ALDH activity and up-regulation of mRNA expression of ALDH isoenzymes. We still need to investigate whether the mechanism of β -escin protective action is directly associated with ALDH and its increased activity, and/or increased protein expression. In addition, β -escin prevents CSE-dependent inhibition of ALDH2 expression. Importantly, the observed β -escin-evoked increase in ALDH activity and mRNA expression was significantly more prominent in cells exposed to CSE as compared to untreated control. This suggests that the drug may be particularly useful in preventing and protecting against aldehyde-related injury, which may occur after smoke inhalation although in vivo validation studies are needed to fully support β -escin-

repurposing.

CSE-evoked increase in ALDH activity and ALDH isoenzyme expression at gene and protein level in airway epithelial cells has been reported previously [17,21,22]. Although important for understanding the endogenous protective mechanisms of respiratory epithelium, this phenomenon has not been fully defined yet. The results of our study reveal a particular, two-wave pattern of CSE-induced expression of ALDH isoforms. The first wave occurring within 1–3 h after CSE exposure involves ALDH1A1, ALDH2 and ALDH3A2, whereas in the second wave observed after 6–24 h upregulated are ALDH1A3, ALDH3A1, ALDH3B1 and ALDH18A1. Among the fastest responding isoforms, ALDH1A1 and ALDH2 are reported to be susceptible to acrolein, 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) and malondialdehyde which are aldehydes generated as by-products of lipid peroxidation but are also abundantly present in cigarette smoke [55]. By showing CSE inhibitory effect on ALDH1A1 and ALDH2 at mRNA level after 24 h of stimulation we demonstrate that the mechanism of the aforementioned susceptibility of these two isoenzymes to cigarette smoke aldehydes involves transcriptional regulation. The effect of β -escin on ALDH activity has been recently described [48], but there is still no data on the drug-evoked changes in ALDH isoforms expression. Similarly, to CSE, in β -escin-treated cells we observed a two-wave pattern of ALDH isoforms expression, but the array of fast- and late- responding genes differed significantly. In the early, β -escin-evoked response we identified ALDH1A3, ALDH3A1, ALDH3A2 and ALDH3B1, then followed the second wave with ALDH1A1, ALDH2 and ALDH18A1. Of note, β -escin-dependent rise in ALDH isoforms mRNA level was less pronounced as

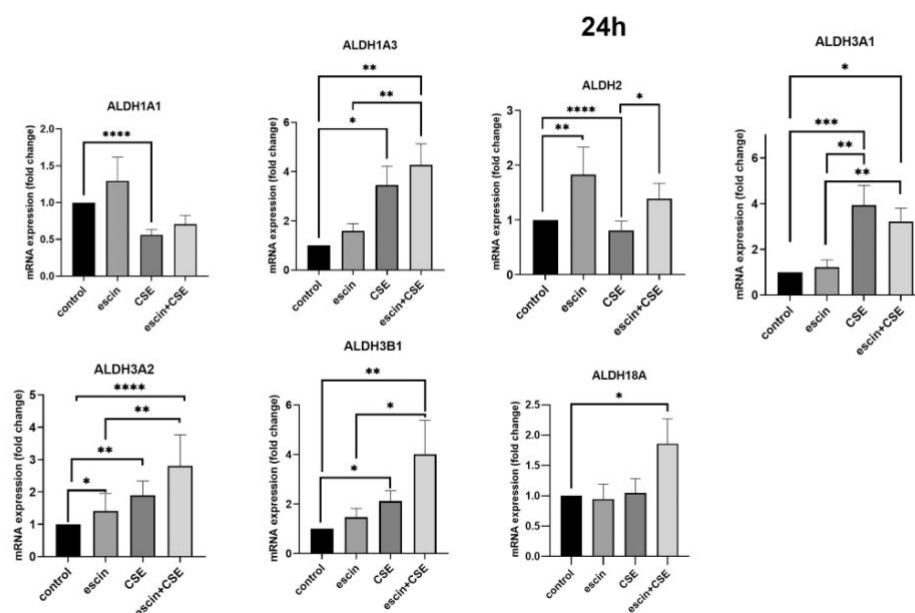


Fig. 6. (continued).

compared to CSE. Although ALDH isoforms were differentially expressed in CSE and β -escin treated cells, they produced indistinguishable time-course changes in the enzyme activity. However, in cells simultaneously exposed to both stimuli we revealed an unexpected, cumulative rise in ALDH activity. The rate of ALDH produced in cells is regulated at transcriptional and post-transcriptional levels [42]. At the moment we may speculate that each isoform of ALDH undergoes unique quantitative adaptations to exposure to CSE constituents as ALDH family members display different substrate specificity [23]. So far it was demonstrated that CSE induces ALDH3A1 via aryl hydrocarbon receptor (AHR) [22]. ALDH increase in response to β -escin might be linked to disturbed cholesterol homeostasis in cells exposed to the drug [12]. As shown previously, the concentration of intracellular cholesterol in tumors was positively related with ALDH activity [43].

Our findings showing strong stimulatory effect of β -escin on ALDH expression and activity in human nasal epithelial cells exposed to CSE provide biochemical rationale for potential use of the drug in reducing the aldehyde-mediated toxicity related to cigarette smoking. CSE-induced cytotoxicity in primary human nasal epithelial cells in a dose- and time dependent manner is well-documented [9,19]. The prolonged cigarette smoke exposure leads to numerous changes in the airways [4]. The inhaled smoke constituents negatively affect airway cells and impair epithelial function resulting i.a. in epithelial barrier dysfunction and structural changes in the respiratory tract [18,35]. Destruction of the epithelial barrier exposes subepithelial layers not only to toxic smoke components but also to inhaled pathogens and hazardous environmental agents. The lesioned epithelium is characterized by a decreased number of cilia with reduced beating frequency, which, combined with the overproduction of mucus, causes ineffective removal of residual secretions from the airways. These factors combined with oxidative stress, chronic inflammation, increased macrophage, and neutrophil airway recruitment are the most important agents contributing among others to

the development of COPD. Data presented in our study are the first demonstration of β -escin-dependent protection of airway epithelial cells from CSE-induced cytotoxicity and DNA lesions. DNA damage, including double-strand DNA breaks, is recognized as an initiating event in cigarette smoke induced diseases [16]. DNA double-strand breaks represent a serious threat to genomic integrity and they can lead to cell death or oncogenic transformation [28]. In the present study we showed that exposure to CSE led to the accumulation of p53BP1, a DNA double-strand breaks response protein and this could be prevented with β -escin treatment. We suggest that the observed cytoprotective effect could be related to ALDH upregulation. Well established molecular cytotoxic mechanisms of aldehydes include adduct formation which can impair the functions of enzymes, DNA, structural proteins, and other macromolecules, thereby leading to the inhibition of cellular processes and subsequent cytotoxicity [27]. As shown previously in immortalized human bronchial epithelial cells overexpressing ALDH3A1, a rise in ALDH activity was sufficient to reduce DNA damage and upregulate protein involved in DNA repair - Fancd2 [25]. CSE-triggered cytotoxicity is mediated also through oxidative stress. As demonstrated in bronchial epithelial cells, their exposure to CSE induced expression of endogenous endoplasmic reticulum stress markers and activated apoptosis [49]. These processes were reactive oxygen species (ROS)- and particularly superoxide anion-dependent and could be prevented with antioxidants. CSE is a rich source of ROS, but they may also be generated in cells in response to aldehydes exposure [36]. ROS mediated oxidation of proteins and lipids triggers generation of endogenous aldehydes including 4-HNE which, as mentioned before, can inhibit the enzymatic activity of ALDH1A1 and ALDH2 and oxidative stress and cellular damage amplifies. It is worth recalling that besides protecting cells from cytotoxic aldehydes, ALDH isoforms play also other important roles in cellular processes, including non-catalytic antioxidant functions through ROS scavenging and

NADPH production for regeneration of reduced glutathione as shown for ALDH1A1 and ALDH3A1 [52]. ALDH1A1 is an important regulator of retinol metabolism catalyzing conversion of retinaldehyde to retinoic acid. Similarly to ALDH2, it is susceptible to inhibition by acrolein, an aldehyde toxicant found in cigarette smoke [11] which might at least partially explain aberrations in retinoic acid signaling after smoke exposure [31]. Preferred aldehyde substrate for ALDH2 is acetaldehyde, but it also oxidizes lipid peroxidation -derived aldehydes, similarly to ALDH3B1. Fatty aldehydes are substrates for ALDH3A2 and glutamic γ -semialdehyde for ALDH18A1 (reviewed in [32]).

The results of this and a few other studies support the strategy of using ALDH agonists to reduce tissue damage caused by aldehydes. The research behind the discovery of ALDH activators has been primarily driven by the well-established links between inborn deficiency in ALDH activity and diseases such as Sjogren-Larsson syndrome (mutations in the ALDH3A2 gene) [44], paranoid schizophrenia (ALDH3B1) [54], hyperprolinemia (ALDH4A1), cataract (ALDH1A1, ALDH3A1), pyridoxine-dependent epilepsy (ALDH7A1) [10], alcohol sensitivity (ALDH2) [8], cutis laxa (ALDH18A1) [26] and cancer [38,40]. To date, only few selective ALDH activators have been reported, of which the most studied is Alda-1 for ALDH2, Alda-89 and Alda-341 for ALDH3A1, onepazole for ALDH1A1 and tamoxifen for ALDH1A1 [5,45,46]. Some reports can be found on botanical compounds augmenting ALDH activity [21,24]. However, none of these compounds have been yet approved for clinical use as ALDH activators.

Further investigation is needed to better understand the pathways leading to differential, treatment-dependent expression of ALDH isoforms in β -escin and/or CSE exposed cells. No matter how challenging, providing an insight into currently known, functionally defined 1350 common genetic variants for all 19 members of the ALDH gene family would contribute to the understanding of aldehyde toxicity and aldehyde metabolism in humans [7]. It should be remembered that genetic variations are highly ethnicity-associated, and each genetic variant can exhibit a large range of variation in frequency and prevalence, depending on the geographical location.

6. Conclusion

In conclusion, the presented results implicate a possible use of β -escin as a potent ALDH stimulator in the prevention or supportive treatment of tobacco smoke-related diseases. Given the documented role of insufficient ALDH activity in numerous diseases, the conclusion of this study may be of broader relevance. Long clinical use of β -escin and its high safety profile makes the drug a valuable repositioning candidate.

CRedit authorship contribution statement

Malwina Soltysiak: Investigation (clinical assessment, RNA and PCR), Data analysis, Writing – original draft. **Magdalena Paplińska-Goryca:** Conceptualization, Data analysis, Project administration, Investigation (cell isolation and culture, CSE preparation), Supervision, Writing – review & editing. **Paulina Misiukiewicz-Stepień:** Investigation (PCR, ALDH activity), Formal analysis. **Paulina Wójtowicz:** Investigation (cell viability), Formal analysis. **Małgorzata Dutkiewicz:** Investigation (ALDH activity), Formal analysis, Writing. **Olivia Zegrocka-Stendel:** Investigation (ALDH activity), Formal analysis, Writing. **Maria Sikorska:** Investigation (DNA damage), Data analysis, Writing, Graphical abstract. **Dorota Dymkowska:** Investigation (DNA damage), Data analysis, Writing. **Laura Turowska-Korgul:** Investigation (DNA damage), Data analysis, Writing. **Rafał Kroenke:** Formal analysis, Funding acquisition, Manuscript critical review. **Katarzyna Koział:** Conceptualization, Project administration, Data analysis, Funding acquisition, Writing – review & editing.

Declaration of Competing Interest

K.K., M.D. and O.Z.-S. are inventors on patents related to β -escin and its derivatives. The other authors declare no competing financial interests.

Acknowledgments

We thank Michał Mierzejewski for help in material collection. Graphical abstract was created with BioRender (BioRender.com). This work was supported by Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy Medical University of Warsaw and Department of Biochemistry and Nutrition, Centre for Preclinical Research and Technology, Medical University of Warsaw (statutory research).

References

- [1] A. Anadón, I. Ares, M.R. Martínez-Larrañaga, M.A. Martínez, Cigarette and E-cigarettes smoking and reproductive and developmental toxicity, in: R.C. Gupta (Ed.), *Reproductive and Developmental Toxicology* (Third Edition), Academic Press, 2022, pp. 395–420, <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99773-0.00021-7>.
- [2] J.D. Belluzzi, R. Wang, F.M. Leslie, Acetaldehyde enhances acquisition of nicotine self-administration in adolescent rats, *Neuropsychopharmacol.* Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol. 30 (2005) 705–712, <https://doi.org/10.1038/gnpp.1300586>.
- [3] A. Bielak-Zmijewska, M. Wnuk, D. Przybylska, W. Grabowska, A. Lewinska, O. Alster, Z. Korwek, A. Cmocho, A. Myszkis, S. Pilula, G. Mosieniak, E. Sikora, A comparison of replicative senescence and doxorubicin-induced premature senescence of vascular smooth muscle cells isolated from human aorta, *Biogerontology* 15 (2014) 47–64, <https://doi.org/10.1007/s10522-013-9477-9>.
- [4] S. Braber, P.A.J. Henricks, F.P. Nijkamp, A.D. Kraneveld, G. Folkerts, Inflammatory changes in the airways of mice caused by cigarette smoke exposure are only partially reversed after smoking cessation, *Respir. Res.* 11 (2010), 99, <https://doi.org/10.1186/1465-9921-11-99>.
- [5] L.F. Calleja, J.A. Belmont-Díaz, O. Medina-Contreras, H. Quezada, B. Yoval-Sánchez, J. Campos-García, J.S. Rodríguez-Zavala, Onepazole as a potent activator of human cytosolic aldehyde dehydrogenase ALDH1A1, *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* 1864 (2020), 129451, <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.129451>.
- [6] CDCTobaccoFree, 2021, Health Effects of Cigarette Smoking [WWW Document]. Cent. Dis. Control Prev. URL https://www.cdc.gov/tobacco/data_statistics/fact_sheets/health_effects/effects_cig_smoking/index.htm (accessed 6.30.22).
- [7] C.-H. Chen, B.R. Kraemer, L. Lee, D. Mochly-Rosen, Annotation of 1350 Common Genetic Variants of the 19 ALDH Multigene Family from Global Human Genome Aggregation Database (gnomAD), *Biomolecules* 11 (2021) 1423, <https://doi.org/10.3390/biom11101423>.
- [8] C.-H. Chen, B.R. Kraemer, D. Mochly-Rosen, ALDH2 variance in disease and populations, *Dis. Model. Mech.* 15 (2022), dnm049601, <https://doi.org/10.1242/dmm.049601>.
- [9] D.M. Comer, J.S. Elborn, M. Ennis, Inflammatory and cytotoxic effects of acrolein, nicotine, acetaldehyde and cigarette smoke extract on human nasal epithelial cells, *BMC Pulm. Med.* 14 (2014), 32, <https://doi.org/10.1186/1471-2466-14-32>.
- [10] C.R. Coughlin, M.A. Swanson, E. Spector, N.J.L. Meeks, K.E. Kronquist, M. Aslamy, M.F. Wempe, C.D.M. van Karnebeek, S.M. Gospe, V.G. Aziz, B.P. Tsai, H. Gao, P. L. Nagy, K. Hyland, S.J.M. van Dooren, G.S. Salomons, J.L.K. Van Hove, The genotypic spectrum of ALDH7A1 mutations resulting in pyridoxine dependent epilepsy: A common epileptic encephalopathy, *J. Inher. Metab. Dis.* 42 (2019) 353–361, <https://doi.org/10.1002/jimd.12045>.
- [11] O.I. Covaci, B. Bucur, G.L. Radu, Acrolein detection based on alcohol dehydrogenase inhibition, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 93 (2013) 325–334, <https://doi.org/10.1080/03067319.2011.581374>.
- [12] D. Domanski, O. Zegrocka-Stendel, A. Perzanowska, M. Dutkiewicz, M. Kowalewska, I. Grabowska, D. Maciejko, A. Fogtman, M. Dadlez, K. Koział, Molecular Mechanism for Cellular Response to β -Escin and Its Therapeutic Implications, *PLoS One* 11 (2016), e0164365, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164365>.
- [13] E.M. Ellis, Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention, *Pharmacol. Ther.* 115 (2007) 13–24, <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.03.015>.
- [14] A.G. Feroe, R. Attanasio, F. Scinicariello, Acrolein metabolites, diabetes and insulin resistance, *Environ. Res.* 148 (2016) 1–6, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.03.015>.
- [15] C.D. Fowler, J.R. Turner, M. Imad Damaj, Molecular mechanisms associated with nicotine pharmacology and dependence, *Handb. Exp. Pharmacol.* 258 (2020) 373–393, https://doi.org/10.1007/164_2019_252.
- [16] S. Gao, H. Lin, W. Yu, F. Zhang, R. Wang, H. Yu, B. Qian, LncRNA LCPAT1 is involved in DNA damage induced by CSE, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 508 (2019) 512–515, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.11.171>.
- [17] A.E. Hegab, V.L. Ha, B. Bisht, D.O. Darmawan, A.T. Ooi, K.X. Zhang, M.K. Paul, Y. S. Kim, J.L. Gilbert, Y.S. Attiga, J.A. Alva-Ornelas, D.W. Nickerson, B.N. Gomperts, Aldehyde dehydrogenase activity enriches for proximal airway basal stem cells and

- promotes their proliferation, *Stem Cells Dev.* 23 (2014) 664–675, <https://doi.org/10.1089/scd.2013.0295>.
- [18] I.H. Heijink, S.M. Brandenburg, D.S. Postma, A.J.M. van Oosterhout, Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell-cell contact recovery, *Eur. Respir. J.* 39 (2012) 419–428, <https://doi.org/10.1183/09031936.00193810>.
 - [19] Y. Hoshino, T. Mio, S. Nagai, H. Miki, I. Ito, T. Izumi, Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 281 (2001) L509–L516, <https://doi.org/10.1152/ajplung.2001.281.2.L509>.
 - [20] B. Jackson, C. Brocker, D.C. Thompson, W. Black, K. Vasilou, D.W. Nebert, V. Vasilou, Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily, *Hum. Genom.* 5 (2011) 283–303, <https://doi.org/10.1186/1479-7364-5-4-283>.
 - [21] A.J. Jang, J.-H. Lee, M. Yotsu-Yamashita, J. Park, S. Kye, R.L. Benza, M. J. Pasineau, Y.-J. Jeon, T. Niyonoya, A Novel Compound, “FA-1” Isolated from *Prunus mume*, Protects Human Bronchial Epithelial Cells and Keratinocytes from Cigarette Smoke Extract-Induced Damage, *Sci. Rep.* 8 (2018), 11504, <https://doi.org/10.1038/s41598-018-29701-2>.
 - [22] J.-H. Jang, S. Bruse, Y. Liu, V. Duffy, C. Zhang, N. Oyama, S. Randell, A. Matsumoto, D.C. Thompson, Y. Lin, V. Vasilou, Y. Tesfagi, T. Niyonoya, Aldehyde dehydrogenase 3A1 protects airway epithelial cells from cigarette smoke-induced DNA damage and cytotoxicity, *Free Radic. Biol. Med.* 68 (2014) 80–86, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.11.028>.
 - [23] V. Koppaka, D.C. Thompson, Y. Chen, M. Ellermann, K.C. Nicolaou, R.O. Juvonen, D. Petersen, R.A. Deitrich, T.D. Hurley, V. Vasilou, Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application, *Pharmacol. Rev.* 64 (2012) 520–539, <https://doi.org/10.1124/pr.111.005538>.
 - [24] S.-K. Ku, J.J. Choung, J.K. Kim, Y.S. Chun, J.-S. Choi, J.W. Kim, Enhancement of Alcohol Metabolism by Ginseng Berry Extract and its Mixed Herbal Beverages: In vitro and in vivo Experiments, *Toxicol. Environ. Health Sci.* 11 (2019) 144–154, <https://doi.org/10.1007/s13530-019-0399-z>.
 - [25] F. Langevin, G.P. Crossan, I.V. Rosado, M.J. Arends, K.J. Patel, Fanc2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice, *Nature* 475 (2011) 53–58, <https://doi.org/10.1038/nature10192>.
 - [26] M. Lefebvre, A.-M. Beaufere, C. Francannet, H. Laurichesse, C. Poe, T. Jouan, B. Troude, P. Dechelette, P. Vabres, M. Briard, A.-L. Mosca-Boidron, Y. Duffourd, L. Faivre, J. Thevenon, C. Thauvin-Robinet, Extending the ALDH18A1 clinical spectrum to severe autosomal recessive fetal cutis laxa with corpus callosum agenesis, *Am. J. Med. Genet. A* 176 (2018) 2509–2512, <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.40515>.
 - [27] R.M. LoPachin, T. Gavin, Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: a chemical perspective, *Chem. Res. Toxicol.* 27 (2014) 1081–1091, <https://doi.org/10.1021/tx5001046>.
 - [28] J. Lou, D.G. Priest, A. Solano, A. Kerjovan, E. Hinde, Spatiotemporal dynamics of 53BP1 dimer recruitment to a DNA double strand break, *Nat. Commun.* 11 (2020), 5776, <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19504-3>.
 - [29] Q. Lu, M. Mundy, E. Chambers, T. Lange, J. Newton, D. Borgas, H. Yao, G. Choudhary, R. Basak, M. Oldham, S. Rounds, Ald-1 Protects Against Acrolein-Induced Acute Lung Injury and Endothelial Barrier Dysfunction, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 57 (2017) 662–673, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2016-0342OC>.
 - [30] J. Lynch, L. Jin, A. Richardson, D.J. Conklin, Tobacco smoke and endothelial dysfunction: role of aldehydes? *Curr. Hypertens. Rep.* 22 (2020), 73, <https://doi.org/10.1007/s11906-020-01085-7>.
 - [31] S.E. Manoli, L.A. Smith, C.A. Vyhliadal, C.H. An, Y. Porrata, W.V. Cardoso, R. M. Baron, K.J. Haley, Maternal smoking and the retinoid pathway in the developing lung, *Respir. Res.* 13 (2012), 42, <https://doi.org/10.1186/1465-9921-13-42>.
 - [32] S.A. Marchitti, C. Brocker, D. Stagos, V. Vasilou, Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily, *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 4 (2008) 697–720, <https://doi.org/10.1517/17425255.4.6.697>.
 - [33] D. Marti-Aguado, A. Clemente-Sanchez, R. Bataller, Cigarette smoking and liver diseases, *J. Hepatol.* 77 (2022) 191–205, <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.01.016>.
 - [34] C.M. McDougall, M.G. Blaylock, J.G. Douglas, R.J. Brooker, P.J. Helms, G. M. Walsh, Nasal epithelial cells as surrogates for bronchial epithelial cells in airway inflammation studies, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 39 (2008) 560–568, <https://doi.org/10.1165/rcmb.2007.0325OC>.
 - [35] A. Michcik, M. Gichorek, A. Daga, P. Chomik, S. Wojcik, A. Zawrocki, A. Wlodarczyk, Tobacco smoking alters the number of oral epithelial cells with apoptotic features, *Folia Histochem. Cytobiol.* 52 (2014) 60–68, <https://doi.org/10.5603/FHC.2014.0007>.
 - [36] P.J. O'Brien, A.G. Siraki, N. Shangari, Aldehyde sources, metabolism, molecular toxicity mechanisms, and possible effects on human health, *Crit. Rev. Toxicol.* 35 (2005) 609–662, <https://doi.org/10.1080/104084005901002183>.
 - [37] C.A. Ochao, C.G. Nissen, D.D. Mosley, C.D. Bauer, D.L. Jordan, K.L. Bailey, T. A. Wyatt, Aldehyde Trapping by ADX-102 Is Protective against Cigarette Smoke and Alcohol Mediated Lung Cell Injury, *Biomolecules* 12 (2022) 393, <https://doi.org/10.3390/biom12030393>.
 - [38] K. Okudela, T. Woo, H. Mitsui, T. Suzuki, M. Tajiri, Y. Sakuma, Y. Miyagi, Y. Tateishi, S. Umeda, M. Masuda, K. Ohashi, Downregulation of ALDH1A1 expression in non-small cell lung carcinomas—its clinicopathologic and biological significance, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 6 (2013) 1–12.
 - [39] E.C. Pack, H.S. Kim, D.Y. Jang, Y.J. Koo, H.H. Yu, S.H. Lee, K.M. Lim, D.W. Choi, Risk assessment of toxicants on WHO TobReg priority list in mainstream cigarette smoke using human-smoked yields of Korean smokers, *Environ. Res.* 169 (2019) 206–219, <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.012>.
 - [40] M. Patel, L. Lu, D.S. Zander, L. Sreerama, D. Coco, J.S. Moreb, ALDH1A1 and ALDH3A1 expression in lung cancers: correlation with histologic type and potential precursors, *Lung Cancer Amst. Neth.* 59 (2008) 340–349, <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2007.08.033>.
 - [41] C.G.M. Pauwels, W.N.M. Klerx, J.L.A. Pennings, A.W. Boots, F.J. van Schooten, A. Opperhuizen, R. Talhout, Cigarette Filter Ventilation and Smoking Protocol Influence Aldehyde Smoke Yields, *Chem. Res. Toxicol.* 31 (2018) 462–471, <https://doi.org/10.1021/acs.chrestox.7b00342>.
 - [42] M. Poturnajova, Z. Kozovska, M. Matuskova, Aldehyde dehydrogenase 1A1 and 1A3 isoforms - mechanism of activation and regulation in cancer, *Cell. Signal.* 87 (2021), 110120, <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110120>.
 - [43] Y. Qin, Y. Hou, S. Liu, P. Zhu, X. Wan, M. Zhao, M. Peng, H. Zeng, Q. Li, T. Jin, X. Cui, M. Liu, A Novel Long Non-Coding RNA lnc030 Maintains Breast Cancer Stem Cell Stemness by Stabilizing SQLE mRNA and Increasing Cholesterol Synthesis, *Adv. Sci. Weinheim. Baden-Wuert. Ger.* 8 (2021), 2002232, <https://doi.org/10.1002/adv.200202232>.
 - [44] W.B. Rizzo, D. S'aulis, E. Dorwart, Z. Bailey, Sjögren-Larsson syndrome: A biochemical rationale for using aldehyde-reactive therapeutic agents, *Mol. Genet. Metab. Rep.* 30 (2022), 100839, <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2021.100839>.
 - [45] J.S. Rodriguez-Zavala, L.F. Calleja, R. Moreno-Sánchez, B. Yoval-Sánchez, Role of Aldehyde Dehydrogenases in Physiopathological Processes, *Chem. Res. Toxicol.* 32 (2019) 405–420, <https://doi.org/10.1021/acs.chrestox.8b00256>.
 - [46] J.P. Salki, H. Cao, L.D. Van Wassenhove, Y. Viswanathan, D. K. Nambiar, A.J. Mattingly, D. Jiang, C.-H. Chen, M.C. Stevens, A.L. Simmone, H. S. Park, R. von Eyben, E.T. Kool, D. Sirjani, S.M. Knox, Q.T. Le, D. Mochly-Rosen, Aldehyde dehydrogenase 3A1 activation prevents radiation-induced xeroderma by protecting salivary stem cells from toxic aldehydes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) 6279–6284, <https://doi.org/10.1073/pnas.1802184115>.
 - [47] A.C. Schamberger, C.A. Stab-Weijnitz, N. Mize-Racek, O. Eickelberg, Cigarette smoke alters primary human bronchial epithelial cell differentiation at the air-liquid interface, *Sci. Rep.* 5 (2015), 8163, <https://doi.org/10.1038/srep08163>.
 - [48] M. Sikorska, M. Dutkiewicz, O. Zegrocka-Stendel, M. Kowalewska, I. Grabowska, K. Kozlak, Beneficial effects of β-escin on muscle regeneration in rat model of skeletal muscle injury, *Phytomed. Int. J. Phytother. Phytopharm.* 93 (2021), 153791, <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153791>.
 - [49] Y. Tagawa, N. Hiramatsu, A. Kasai, K. Hayakawa, M. Okamura, J. Yao, M. Kitamura, Induction of apoptosis by cigarette smoke via ROS-dependent endoplasmic reticulum stress and CCAAT/enhancer-binding protein-homologous protein (CHOP), *Free Radic. Biol. Med.* 45 (2008) 50–59, <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.03.003>.
 - [50] R. Talhout, A. Opperhuizen, J.G.C. van Amsterdam, Role of acetaldehyde in tobacco smoke addiction, *Eur. Neuropharmacol.* 17 (2007) 627–636, <https://doi.org/10.1016/j.europharm.2007.02.013>.
 - [51] M. van der Toorn, D.-J. Slebos, H.G. de Bruin, R. Gras, D. Rezaei, L. Jorge, K. Sandra, A.J.M. van Oosterhout, Critical role of aldehydes in cigarette smoke-induced acute airway inflammation, *Respir. Res.* 14 (2013), 45, <https://doi.org/10.1186/1465-9921-14-45>.
 - [52] V. Vasilou, D.C. Thompson, C. Smith, M. Fujita, Y. Chen, Aldehyde dehydrogenases: from eye crystallins to metabolic disease and cancer stem cells, *Chem. Biol. Interact.* 202 (2013) 2–10, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2012.10.026>.
 - [53] M.-W. Weng, H.-W. Lee, S.-H. Park, Y. Hu, H.-T. Wang, L.-C. Chen, W.N. Rom, W. C. Huang, H. Lepor, X.-R. Wu, C.S. Yang, M.-S. Tang, Aldehydes are the predominant forces inducing DNA damage and inhibiting DNA repair in tobacco smoke carcinogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) E6152–E6161, <https://doi.org/10.1073/pnas.1804869115>.
 - [54] Q. Xu, Y.-B. Jia, B.-Y. Zhang, K. Zou, Y.-B. Tao, Y.-P. Wang, B.-Q. Qiang, G.-Y. Wu, Y. Shen, H.-K. Ji, Y. Huang, X.-Q. Sun, L. Ji, Y.-D. Li, Y.-B. Yuan, L. Shu, X. Yu, Y.-C. Shen, Y.-Q. Yu, G.-Z. Ju, Chinese Schizophrenia Consortium, Association study of an SNP combination pattern in the dopaminergic pathway in paranoid schizophrenia: a novel strategy for complex disorders, *Mol. Psychiatry* 9 (2004) 510–521, <https://doi.org/10.1038/sj.mp.4001472>.
 - [55] B. Yoval-Sánchez, J.S. Rodríguez-Zavala, Differences in susceptibility to inactivation of human aldehyde dehydrogenases by lipid peroxidation byproducts, *Chem. Res. Toxicol.* 25 (2012) 722–729, <https://doi.org/10.1021/tx2005184>.
 - [56] C. Yu, L. Zhang, Methylprednisolone up-regulates annexin A1 (ANXA1) to inhibit the inflammation, apoptosis and oxidative stress of cigarette smoke extract (CSE)-induced bronchial epithelial cells, a chronic obstructive pulmonary disease in vitro model, through the formyl peptide receptor 2 (FPR2) receptors and the adenosine 5'-monophosphate (AMP)-activated protein kinase (AMPK) pathway, *Bioengineered* 13 (2022) 4028–4038, <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2031769>.

6.2 Publikacja nr 2

β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study. Journal of Medicinal Food, Short Communication, JMF-2024-0180.R1 09-Aug-2024.

Malwina Sołtysiak, Katarzyna Koziak, Małgorzata Dutkiewicz, Oliwia Zegrocka-Stendel, Paulina Misiukiewicz-Stępień, Rafał Krenke, and Magdalena Paplińska-Goryca.

Praca oryginalna <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115924>.



β-Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study

Malwina Sołtysiak,¹ Katarzyna Koziak,² Małgorzata Dutkiewicz,² Oliwia Zegrocka-Stendel,²
Paulina Misiukiewicz-Stepień,¹ Rafał Krenke,¹ and Magdalena Paplińska-Goryca¹

¹Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland.

²Department of Biochemistry and Nutrition, Centre for Preclinical Research and Technology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland.

ABSTRACT Despite the well-recognized risks associated with cigarette smoking, exposure to tobacco smoke remains one of the most serious public health threats worldwide.

The aim of the study was to evaluate the potential of β-escin combined with chokeberry fruit extract as anti-inflammatory intervention for tobacco smokers. In addition, mechanisms of the observed effects were investigated.

Nine smoking volunteers received 10 mg of water soluble β-escin combined with 5 mg of chokeberry fruit juice concentrate daily for 7 days. The effects of β-escin and chokeberry fruit extract on neutrophil number, IL-6 and IL-8 concentration in induced sputum, antioxidant capacity in induced sputum and saliva as well as on aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in PBMC *in vitro* and *in vivo* were evaluated. Simultaneously, IL-6, IL-8 and neutrophil number in day 0 and 7 was analyzed in sputum from control subject without β-escin and chokeberry fruit extract intervention.

Short, 7-day treatment led to a considerable decrease in neutrophil and increase in macrophage concentration in smokers' sputum as well as significant rise in antioxidant capacity of induced sputum and saliva. The observed reduction in IL-6 and IL-8 concentration did not reach statistical significance. β-escin and chokeberry fruit extract induced a strong upregulation of ALDH activity in PBMC *in vitro* and *in vivo*.

This pilot proof-of-concept study suggests that by increasing ALDH activity and antioxidant capacity, β-escin and chokeberry fruit extract may effectively lower the inflammation associated with tobacco smoking and contribute to toxicity reduction in the airways exposed to cigarette smoke.

KEYWORDS: • ALDH • β-escin • chokeberry fruit extract • inflammation • tobacco

INTRODUCTION

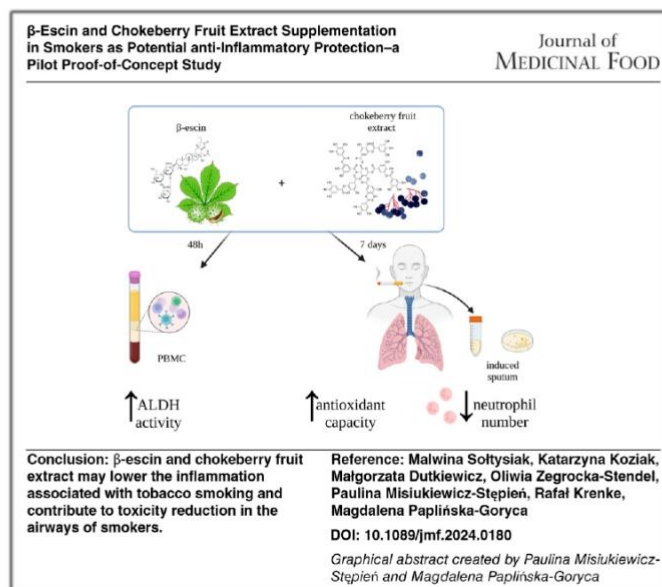
Despite the well-recognized risks associated with cigarette smoking, exposure to tobacco smoke remains one of the most serious public health threats worldwide.¹ Cigarette smoke-induced chronic lung inflammation leads to pathological tissue remodeling underlying chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and other smoking-related chronic inflammatory diseases. Chronic cigarette smoke exposure has been linked to the excessive production of neutrophil extracellular traps, complex extracellular structures composed of chromatin fibers decorated with histones and

granule proteases including neutrophil elastase.² A self-amplifying inflammatory loop established by influx of neutrophils leading to neutrophilic inflammation and compounds that may reduce cigarette smoke-induced airway neutrophilic inflammation have been subjects of intensive research.³

Among experimental methods of reducing cigarette-induced inflammation, particularly promising are the approaches lowering the load of aldehydes contained in smoke, for example by increasing the activity of ALDH, a family of key enzymes converting aldehydes to other metabolites.⁴ Molecular mechanisms of pro-inflammatory effects of aldehydes include excessive production of reactive oxygen species and adducts formation with macromolecules (*e.g.*, proteins, DNA, and RNA), which disturbs cellular functions and drives recruitment of inflammatory cells.⁵

Manuscript received 21 May 2024. Revision accepted 11 August 2024.

Address correspondence to: Magdalena Paplińska-Goryca, PhD, Department of Internal Medicine, Pulmonary Diseases and Allergy, Medical University of Warsaw, Banacha 1a, 02-097 Warsaw, Poland. E-mail: magdalena.paplińska@wum.edu.pl



Recently, β-escin, a natural mixture of triterpenoid saponins extracted from the seeds of *Aesculus hippocastanum* L. has been shown to efficiently rescue human airway epithelial cells from cigarette smoke extract-induced cytotoxicity and DNA lesions.⁶ The proposed mechanism underlying the drug's efficacy in protecting against aldehyde-related injury *in vitro* involves an increase in ALDH activity and up-regulation of mRNA expression of numerous ALDH isoenzymes. Protective effects against cigarette smoke-related alterations, including pulmonary emphysema and lung adenomas, could also be achieved in mice after oral administration of chokeberry (*Aronia melanocarpa*) fruit extract.⁷ Similarly to β-escin, chokeberry has been attributed not only with ALDH-stimulatory but also with potent anti-inflammatory and antioxidant properties that could be of potential relevance for prevention or supportive treatment of tobacco smoke-related.^{8–10}

In the current proof-of-concept pilot study, we have aimed to validate the hypothesis that β-escin combined with chokeberry fruit extract would provide beneficial health effects in smokers.

MATERIAL AND METHODS

Study design

This was a prospective two step pilot proof-of-concept study. We evaluated the effect of 10 mg of water soluble β-escin (pharmaceutical grade herbal preparation, Nobilus Ent, batch nr. 020115) mixed with chokeberry extract (5 g of chokeberry juice concentrate dissolved in 175 mL of water)

(Rauch Polska, batch nr. 1429399) consumed once a day on (1) ALDH activity in PBMC *in vitro* and *in vivo* in healthy non-smokers; and (2) saliva collection and cellular and cytokine concentration in induced sputum of smokers. For *in vitro* ALDH assays we used cells obtained from healthy male donors aged 25–35 years (Warsaw Blood Donation Center), while for *in vivo* tests we collected PBMC from the study participants on day 1 and day 2. The cellular and biochemical analyses in induced sputum collected from the study participants on day 7.

Study group involved 9 smoking volunteers: 4 men, 5 women, age 48 years (35–57 years), 30 pack years (10–38 pack years), FEV₁ 74% (59–81%). Control group included 5 healthy nonsmokers (1 man, 4 women, age 41 years (28–60 years), FEV₁ 95% (91–105%) who did not receive any treatment. The spirometry and sputum induction were performed on day 0 and on day 7. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (KB/91/2019). An informed consent was obtained from all study participants.

Materials and methods

Sputum induction and processing were conducted as previously described.¹¹ ALDH activity was determined using the Activity Colorimetric Assay Kit (Sigma-Aldrich) in cell lysates prepared from 2×10^6 cells. The concentrations of IL-6 and IL-8 in sputum supernatants were measured using ELISA kits (Thermo Fisher). Antioxidant capacity was detected using

Antioxidant Assay Kit (Sigma–Aldrich) with Trolox as an antioxidant standard. All measurements were performed according to the manufacturers' procedures.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed with GraphPad Prism (version 9.3.1). The ordinary one-way ANOVA test followed by Tukey's multiple comparisons test were used for analyzing the differences between groups. The Mann–Whitney test was applied for pairwise comparisons. Results are presented as mean and standard error of mean (SEM).

RESULTS

One week of β-escin combined with chokeberry fruit extract treatment affected the number of sputum neutrophils. Sputum collected from smokers at day 0 contained a significantly higher concentration of neutrophils (total number and %) and lower number of macrophages (%) as compared with non-smokers (Fig. 1). At day 7 the number of neutrophils in smokers' sputum were significantly lower ($P = .03$) reaching a level comparable to healthy controls. Concomitantly, we observed statistically important rise in concentration of macrophages

($P = .02$). The evaluated intervention led to IL-6 and IL-8 reduction; however, the change did not reach statistical significance (Fig. 1). The treatment did not affect FEV₁ (69% [60–76%], $P = 0.32$) nor the number of cigarettes smoked (15.5 cigarettes [10–20 cigarettes], 10.5 cigarettes [4–20 cigarettes], $P = .3$ for day 0 and day 7, respectively). We detected the increased antioxidant capacity in both saliva and sputum after one week of β-escin and chokeberry fruit extract supplementation.

We observed a strong, significant upregulation of ALDH activity in PBMC treated for 24 h and 48 h with β-escin and chokeberry fruit extract. The effect was more pronounced when β-escin and chokeberry fruit extract were used simultaneously. In vivo the upregulation of ALDH activity in PBMC was observed after 48 h of β-escin and chokeberry fruit extract supplementation (Fig. 2).

DISCUSSION

Our proof-of-concept pilot study reveals that low dose β-escin combined with chokeberry fruit extract may exert beneficial effects in cigarette smokers by significant attenuation of airway neutrophil accumulation. The plausible pathway underlying the observed reduction of neutrophil count

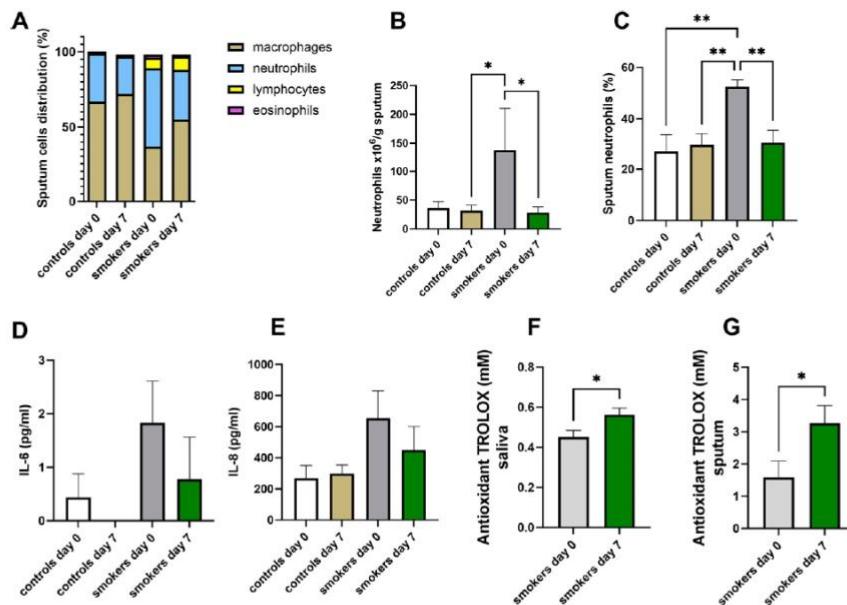


FIG. 1. The effect of β-escin and chokeberry fruit extract supplementation on sputum and saliva parameters in the control group (w/o β-escin and chokeberry fruit extract supplementation) and smokers (one week of β-escin and chokeberry fruit extract supplementation) on day 0 and on day 7. (A) The deposition of cells in induced sputum of study participants. (B) The total number of sputum neutrophils per gram of sputum. (C) The neutrophil percentage (%) in sputum. (D) interleukin 6 (IL-6) concentration in sputum. (E) interleukin-8 (IL-8) concentration in sputum. (F) antioxidant capacity of saliva. (G) antioxidant capacity of sputum.

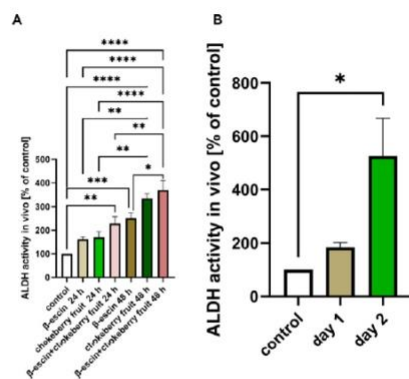


FIG. 2. ALDH activity in (A) PBMC treated *in vitro* for 24 and 48 h with 3 μ M β -escin and 0.5% chokeberry fruit extract ($n = 4$), (B) in PBMC of study participants ($n = 3$) before and after 24 and 48 h of β -escin and chokeberry fruit extract supplementation.

in smokers' sputum could involve increased ALDH activity shown here in PBMC both *in vitro* and *in vivo* and an increase in antioxidant capacity demonstrated in sputum and saliva.

Previous studies demonstrated that aldehydes present in cigarette smoke play a critical role in neutrophilic- but not mononuclear airway inflammation.¹² The critical role of neutrophils in inflammatory response to cigarette smoke exposure has been demonstrated for example in neutrophil depletion experiments.¹³ Aldehydes present in cigarette smoke or generated during lipid peroxidation are able to suppress apoptosis of neutrophils. Our findings showing strong stimulatory effect of β -escin and chokeberry fruit extract on ALDH activity in PBMC obtained from the study volunteers provide biochemical rationale for potential use of this combination in reducing the aldehyde-mediated inflammation related to cigarette smoking. The mechanism of β -escin and chokeberry fruit extract effect revealed in this work could also involve their anti-inflammatory properties. In animal studies β -escin has been shown to inhibit NF- κ B activity, attenuate cell response to inflammatory stimulus, decrease the number of immune cells recruited into the place of inflammation, and reduce secretion of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9).¹⁴ Anti-inflammatory effect of chokeberry fruit has been attributed, among others, to inhibition of IL-8 release.¹⁵ NF- κ B is the master transcriptional regulator of the inflammatory pathway controlling the expression of proinflammatory cytokines and immunoregulatory mediators, including IL-8, which is a neutrophil chemoattractant. Furthermore, β -escin or chokeberry fruit are known for their antioxidant properties.^{8,16} Cigarette smoking induces a significant oxidant effect related to variety of free radical-related diseases often affecting the upper respiratory tract, unless it is effectively compensated by the antioxidant mechanisms.¹⁷ Any of the above mentioned β -escin or

chokeberry fruit-dependent anti-inflammatory pathways could disrupt neutrophil recruitment and chemotaxis.

While investigating the molecular mechanism of the inhibition of neutrophil accumulation in smokers, we confirmed previous findings that β -escin- and chokeberry fruit extract induce ALDH activity, and this effect was more pronounced when β -escin- and chokeberry fruit extract were used simultaneously. It was shown that chokeberry fruit extract protects mice exposed to cigarette smoke e.g., against pulmonary emphysema.⁷ Our observation further suggests that the phenomena observed in this study might be associated with an efficient degradation of tobacco smoke aldehydes. Of note, aldehydes may be also produced in cell-mediated processes, and activated neutrophils can produce aldehydes from almost any amino acid.¹⁸

Finally, the current study verifies the concern related to effective doses of β -escin. As shown here, an amelioration of neutrophil count has been achieved already with 10 mg of β -escin whereas for chronic venous insufficiency, which is the most common use of the drug, the daily dose is typically 100 to 150 mg. Although short, 7-day treatment with β -escin and chokeberry fruit extract has been sufficient to decrease neutrophil count in smokers' sputum, it has not brought significant changes in IL-8 levels. Studies show that biomarkers of inflammation and oxidative stress remain elevated even in subjects who quit smoking, which remains with agreement with our observations.¹⁹

Limitation of the methodology used in our study should also be noticed. Sputum induction is a method for noninvasive measurement of airway inflammation, but it should be kept in mind that material collected in this procedure reflects the inflammatory status in trachea and bronchus and not in small airways. Additionally, the small number of volunteers and short duration of the study may limit our findings.

Cigarette smoking is a chronic relapsing disorder and smoking cessation is a challenge. The results of this study strengthen the relevance of β -escin and chokeberry fruit extract use in smokers as potential tobacco harm reduction intervention. Clinical trials including longer treatment periods and larger group sizes are necessary to improve data showing that this approach may contribute to decreasing smoking-related pathologies.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Monika Wróbel for her help in biochemical measurements.

STATEMENT OF ETHICS

All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. The study protocol was approved by the Institutional Review Board (KB/91/2019). An informed consent was obtained from all study participants.

DATA AVAILABILITY

The data underlying this article will be shared on reasonable request to the corresponding author.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

M.S.—methodology, data curation, investigation, writing—original draft; K.K.—conceptualization, project administration, data curation, writing—review and editing; M.D.—methodology, formal analysis; O.Z.S.—methodology, formal analysis, R.K.—formal analysis, funding acquisition, article critical review; P.M.S.—methodology, visualization; M.P.G.—methodology, conceptualization, data curation, data analysis, investigation, supervision, writing—review and editing.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

K.K., M.D. and O.Z.-S. are inventors on patents related to β-escin and its derivatives. The other authors declare no competing financial interests.

FUNDING INFORMATION

This study did not receive any external funding.

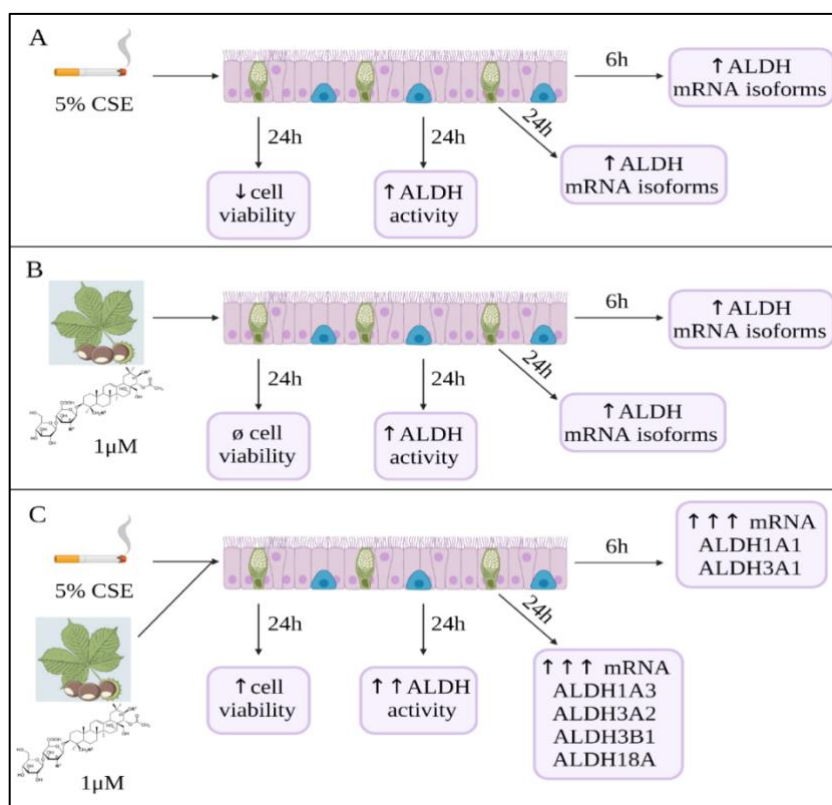
REFERENCES

1. GBD 2019 Cancer Risk Factors Collaborators. The global burden of cancer attributable to risk factors, 2010-19: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet* 2022; 400(10352):563–591; doi: 10.1016/S0140-6736(22)01438-6
2. Wang K, Liao Y, Li X, et al. Inhibition of neutrophil elastase prevents cigarette smoke exposure-induced formation of neutrophil extracellular traps and improves lung function in a mouse model of chronic obstructive pulmonary disease. *Int Immunopharmacol* 2023;114:109537; doi: 10.1016/j.intimp.2022.109537
3. Yu X, Seow HJ, Wang H, et al. Matrine reduces cigarette smoke-induced airway neutrophilic inflammation by enhancing neutrophil apoptosis. *Clin Sci (Lond)* 2019;133(4):551–564; doi: 10.1042/CS20180912
4. Jackson B, Brocker C, Thompson DC, et al. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics* 2011;5(4):283–303; doi: 10.1186/1479-7364-5-4-283
5. LoPachin RM, Gavin T. Molecular mechanisms of aldehyde toxicity: A chemical perspective. *Chem Res Toxicol* 2014; 27(7):1081–1091; doi: 10.1021/tx5001046
6. Soltysiak M, Paplińska-Goryca M, Misiukiewicz-Stepień P, et al. β-escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death. *Biomed Pharmacother* 2024;170:115924; doi: 10.1016/j.biopha.2023.115924
7. Balansky R, Ganchev G, Ilcheva M, et al. Inhibition of lung tumor development by berry extracts in mice exposed to cigarette smoke. *Int J Cancer* 2012;131(9):1991–1997; doi: 10.1002/ijc.27486
8. Dufour C, Villa-Rodriguez JA, Furger C, et al. Cellular antioxidant effect of an aronia extract and its polyphenolic fractions enriched in proanthocyanidins, phenolic acids, and anthocyanins. *Antioxidants (Basel)* 2022;11(8):1561; doi: 10.3390/antiox11081561
9. Idris S, Mishra A, Khushtar M. Phytochemical, ethnomedicinal and pharmacological applications of escin from *Aesculus hippocastanum* L. towards future medicine. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 2020;31(5); doi: 10.1515/jbcpp-2019-0115
10. Pyun C-W, Seo T-S, Kim D-J, et al. Protective effects of *Ligularia fischeri* and *Aronia melanocarpa* extracts on alcoholic liver disease (*In Vitro* and *In Vivo* Study). *Biomed Res Int* 2020;2020:9720387; doi: 10.1155/2020/9720387
11. Weiszhar Z, Horvath I. Induced sputum analysis: Step by step. *Breathe* 2013;9(4):300; doi: 10.1183/20734735.042912
12. van der Toorn M, Slebos D-J, de Bruin HG, et al. Critical role of aldehydes in cigarette smoke-induced acute airway inflammation. *Respir Res* 2013;14(1):45; doi: 10.1186/1465-9921-14-45
13. Nascimento M, Huot-Marchand S, Gombault A, et al. B-Cell activating factor secreted by neutrophils is a critical player in lung inflammation to cigarette smoke exposure. *Front Immunol* 2020;11:1622; doi: 10.3389/fimmu.2020.01622
14. Sikorska M, Dutkiewicz M, Zegrocka-Stendel O, et al. Beneficial effects of β-escin on muscle regeneration in rat model of skeletal muscle injury. *Phytomedicine* 2021;93:153791; doi: 10.1016/j.phymed.2021.153791
15. Martin DA, Taheri R, Brand MH, et al. Anti-inflammatory activity of aronia berry extracts in murine splenocytes. *Journal of Functional Foods* 2014;8:68–75; doi: 10.1016/j.jff.2014.03.004
16. Cengiz M, Kutlu HM, Peker Cengiz B, et al. Escin attenuates oxidative damage, apoptosis and lipid peroxidation in a model of cyclophosphamide-induced liver damage. *Drug Chem Toxicol* 2022;45(3):1180–1187; doi: 10.1080/01480545.2020.1810262
17. Charalabopoulos K, Assimakopoulos D, Karkabounas S, et al. Effects of cigarette smoking on the antioxidant defence in young healthy male volunteers. *Int J Clin Pract* 2005;59(1): 25–30; doi: 10.1111/j.1742-1241.2004.00340.x
18. Shin H-W, Umber BJ, Meinardi S, et al. Gas signatures from cultured neutrophils and peripheral blood mononuclear cells obtained from healthy humans. *J Mol Biomark Diagn* 2011; 02(04); doi: 10.4172/2155-9929.1000112
19. Xie L, Vance T, Kim B, et al. Aronia berry polyphenol consumption reduces plasma total and low-density lipoprotein cholesterol in former smokers without lowering biomarkers of inflammation and oxidative stress: A randomized controlled trial. *Nutr Res* 2017;37:67–77; doi: 10.1016/j.nutres.2016.12.007

7. Podsumowanie

Celem cyklu publikacji składających się na niniejszą rozprawę doktorską jest ocena wpływu β -escyny na szereg procesów biologicznych w komórkach nabłonkowych oraz materiałach z dróg oddechowych poddanych traktowaniu dymu papierosowego.

Praca *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death* jest pracą eksperymentalną z wykorzystaniem komórek nabłonka nosa izolowanych z wymazów szczoteczkowych od osób zdrowych niepalących (n=15), poddanych działaniu β -escyny (1 μ M) i/lub CSE (5%). Żywotność komórek, aktywność ALDH oraz uszkodzenia DNA mierzono w komórkach 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. Stężenie β -escyny wykorzystane w doświadczeniach dobrano po przeprowadzeniu doświadczeń wstępnych. Wykazano, że stężeniem β -escyny, które nie indukuje w komórkach nabłonkowych cytotoksyczności jest 1 μ M; dla 3 μ M β -escyny obserwowano ponad 90% śmiertelność komórek. 24-godzinna ekspozycja komórek na CSE powodowała śmiertelność na poziomie około 60%, natomiast w obecności escyny, efekt ten był znacząco mniejszy. Schematyczna prezentacja wyników z publikacji 1 przedstawiona jest na Rycinie 2.



Rycina 2. Graficzna prezentacja wyników publikacji 1.

Uszkodzenie DNA, w tym pęknięcia podwójnej nici DNA, jest uznawane za patologiczny proces inicjujący choroby wywołanej przez dym papierosowy. Pęknięcia podwójnej nici DNA stanowią poważne zagrożenie dla integralności genomu i mogą prowadzić do śmierci komórki lub ich transformacji (51). Niniejsze badanie wykazało, że ekspozycja na CSE prowadzi do uszkodzeń DNA, czego dowodem jest akumulacja białek p53BP1 (tumor suppressor p53-binding protein 1), gromadzących się w miejscach pęknięcia podwójnej nici DNA. W hodowlach komórkowych narażonych na działanie CSE w obecności escyny wykazano istotną redukcję liczby uszkodzeń DNA, co sugeruje cytoprotekcyjne właściwości β -escyny. Dobrze znane molekularne mechanizmy cytotoksyczne aldehydów obejmują tworzenie adduktów, które mogą upośledzać funkcje enzymów, DNA, białek strukturalnych i innych makrocząsteczek, prowadząc tym samym do zahamowania procesów komórkowych i cytotoksyczności.

Zarówno escyna, jak i CSE w podobnym stopniu nasilały aktywność enzymatyczną ALDH. Aktywacja ALDH przez CSE jest elementem obrony komórkowej przed toksycznym działaniem aldehydów zawartych w dymie papierosowym i była opisywana już wcześniej (20). Należy podkreślić, że aktywność ALDH osiągnęła najwyższe wartości w hodowlach stymulowanych równocześnie escyną oraz CSE, co wskazuje na addytywny efekt aktywacji ALDH w tym układzie doświadczalnym.

Regulacja ekspresji mRNA izoform ALDH przez CSE i escynę była bardziej złożona. CSE zmieniał ekspresję izoform ALDH dwufazowo. Po 1–3 godzinach po ekspozycji na CSE, wzrastała ekspresja mRNA dla *ALDH1A1*, *ALDH2* i *ALDH3A2*, podczas gdy po 6 i 24 godzinach, ekspresja *ALDH1A1* i *ALDH2* była hamowana, a rosła ekspresja mRNA dla *ALDH1A3*, *ALDH3A1*, *ALDH3B1* i *ALDH18A1*. Dane literaturowe podają, że ekspresja *ALDH1A1* i *ALDH2*, czyli izoform ALDH, których ekspresja po ekspozycję na CSE najpierw rosła, a następnie malała, jest regulowana przez akroleinę, 4- HNE i malondialdehyd, które są aldehydami generowanymi jako produkty uboczne peroksydacji lipidów, ale również obecnymi w dużym stężeniu w dymie papierosowym (20,21,52).

Regulacja ekspresji mRNA dla izoform ALDH przez β -escynę była odmienna niż zaobserwowana w przypadku CSE. β -escyna aktywowała najpierw, po 1h i 3h ekspresję *ALDH1A3*, *ALDH3A1*, *ALDH3A2* i *ALDH3B1* a następnie po 24h *ALDH1A1*,

ALDH2 i *ALDH18A1*. Odnotowane zmiany w ekspresji mRNA izoform ALDH indukowane przez β -escynę były mniejsze niż zmiany wywołane przez CSE.

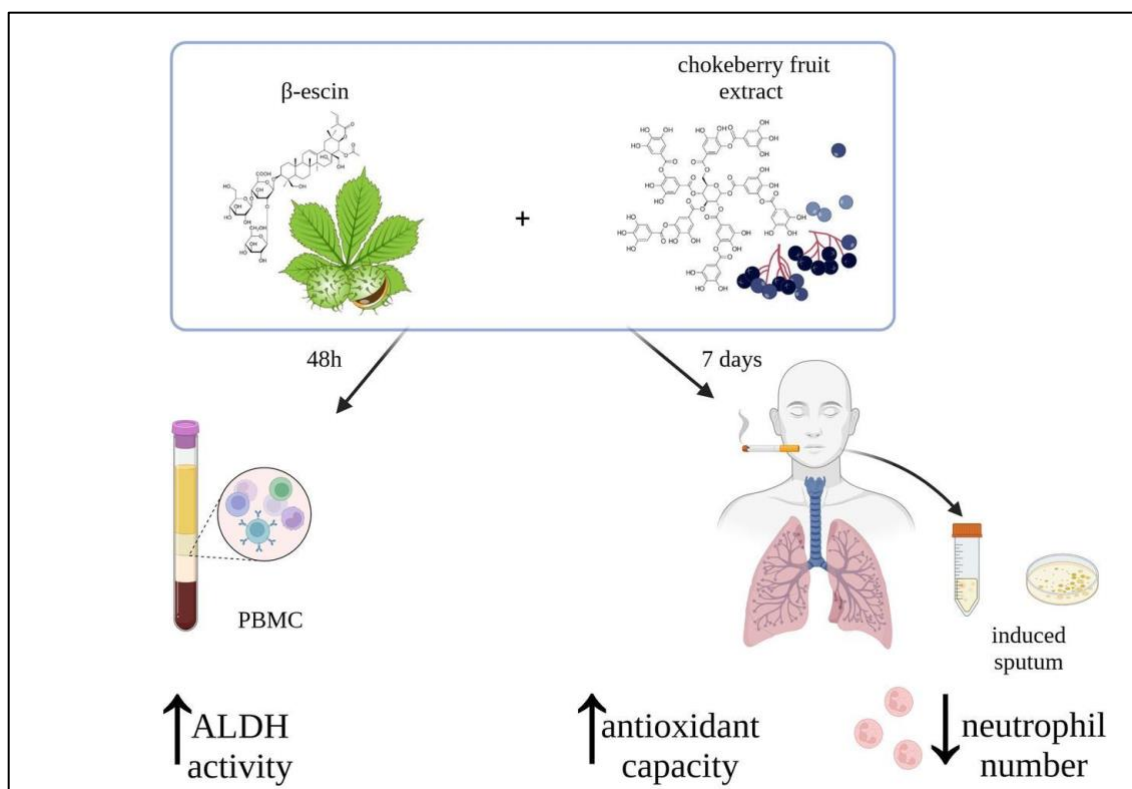
Znacznie silniejszy stymulujący wpływ na ekspresję mRNA izoform ALDH zaobserwowano w komórkach nabłonka nosowego poddanych jednoczesnemu działaniu β -escyny oraz CSE: po 6 godzinach dla *ALDH1A1* i *ALDH3A1* oraz po 24 godzinach dla *ALDH1A3*, *ALDH3A2*, *ALDH3B1* i *ALDH18A1*. Zaobserwowano również, że w komórkach poddanych jednocześnie suplementacji β -escyną i działaniu CSE, escyna zapobiegała inhibicji ekspresji *ALDH2* wywołanej przez CSE po 24 godzinach, prowadząc tym samym do wzrostu aktywności *ALDH2*.

Podsumowując wyniki pracy możemy stwierdzić, że stymulacja β -escyną zmniejszyła cytotoksyczność oraz uszkodzenia DNA indukowane przez CSE w komórkach nabłonka nosa. Zarówno CSE, jak i escyna stymulowały ekspresję izoform ALDH dwufalowo (do 6 godzin i po 24 godzinach), ale efekt stymulujący był znacznie silniejszy w przypadku skojarzonego zastosowania β -escyny i CSE. Escyna zwiększyła aktywność ALDH poprzez regulację ekspresji mRNA izoform tego enzymu, zaś efekt był istotnie wyższy w komórkach poddanych działaniu CSE. Wyniki naszej pracy sugerują, że substancja ta może być przydatna w łagodzeniu i ochronie przed uszkodzeniami wywołanych przez dym papierosowy w drogach oddechowych. Do pełnej weryfikacji zaobserwowanego zjawiska konieczne są badania walidacyjne *in vivo*.

Wyniki zaprezentowane w pracy *β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study*, sugerują, że suplementacja niską dawką β -escyny w połączeniu z ekstraktem z owoców aronii może mieć korzystny efekt zdrowotny u osób narażonych na wdychanie dymu papierosowego. Po pierwsze, w badaniach wstępnych z wykorzystaniem PBMC od osób zdrowych niepalących wykazaliśmy, że β -escyna jest silnym aktywatorem ALDH. Co istotne, efekt ten został potwierdzony dla wyciągu z owoców aronii, który był dodany dla zamaskowania bardzo gorzkiego smaku escyny i który ma udokumentowane działanie antyoksydacyjne. W przypadku jednoczesnego zastosowania β -escyny i wyciągu z owoców aronii zaobserwowaliśmy silny addytywny efekt aktywujący ALDH w PBMC. Efekt ten rósł wraz ze wzrostem czasu ekspozycji na działanie β -escyny i był najwyższy po 48h.

Po drugie, stosowanie roztworu β -escyny w połączeniu z ekstraktem z owoców aronii przez 7 dni zmniejszyło poziom stanu zapalnego w drogach oddechowych

palaczy. Liczba neutrofilów w płwocinie palaczy w dniu rozpoczęcia była istotnie wyższa w porównaniu do osób niepalących. Po 7 dniach przyjmowania preparatu liczba neutrofilów w płwocinie palaczy była istotnie niższa ($p=0,03$), osiągając poziom porównywalny do grupy kontrolnej. W grupie osób przyjmujących preparat zaobserwowano redukcję poziomu IL-6 i IL-8, jednak zmiany te nie osiągnęły istotności statystycznej. Zastosowanie suplementacji escyną nie miało wpływu na zmianę FEV₁ ($p=0,32$) ani na zmniejszenie liczby wypalanych papierosów u uczestników badania. Schematyczna prezentacja wyników z publikacji 2 przedstawiona jest na Rycinie 3.



Rycina 3. Graficzna prezentacja wyników publikacji 2.

Mechanizm działania β -escyny i ekstraktu z owoców aronii opisany w niniejszej pracy może również obejmować ich właściwości przeciwzapalne. W badaniach z wykorzystaniem modelu zwierzęcego wykazano, że β -escyna hamuje aktywność NF- κ B, osłabia reakcję komórek na bodziec zapalny, zmniejsza liczbę komórek odpornościowych rekrutowanych do miejsca zapalenia oraz redukuje wydzielanie MMP9 (53).

NF- κ B jest głównym regulatorem transkrypcyjnym szlaku zapalnego, kontrolującym ekspresję cytokin prozapalnych oraz mediatorów immunoregulacyjnych, w tym IL-8,

działającej chemotaktycznie na neutrofile. Podczas badania mechanizmu molekularnego inhibicji akumulacji neutrofili u palaczy, potwierdziliśmy wcześniejsze wyniki, że β -escyna i ekstrakt z owoców aronii indukują aktywność ALDH, a efekt ten był bardziej wyrażony podczas jednoczesnego stosowania obu specyfików.

Wyniki przeprowadzonego badania pilotażowego sugerują, że niskie dawki β -escyny w połączeniu z ekstraktem z owoców aronii mogą wywierać korzystne działanie zdrowotne u palaczy tytoniu, poprzez istotne zmniejszenie akumulacji neutrofilów w drogach oddechowych. Możliwy mechanizm leżący u podstaw tego zjawiska może wynikać ze zwiększonej aktywności ALDH, którą wykazano w PBMC zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*, oraz wzrostu zdolności antyoksydacyjnej, stwierdzonej zarówno w płwocinie indukowanej jak i ślinie.

8. Wnioski

Wyniki przeprowadzonych badań będących przedmiotem niniejszej rozprawy doktorskiej pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

Wniosek główny:

1. 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.

9. Opinia komisji bioetycznej



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/...../2019

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
w dniu 13 maja 2019 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

Dr hab. n. med. Katarzyna Górska
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych, Pneumonologii i Alergologii
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt.: „Ocena potencjału antyoksydacyjnego β -escyny u palaczy tytoniu.”

wyraża następującą opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*

Uwagi Komisji – *verte*

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOŚ z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.
Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .
W załączeniu: skład komisji oraz lista obecności

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej


Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz

*niepotrzebne skreślić

Komisja wyraża pozytywną opinię w sprawie przeprowadzenia wnioskowanych badań- na warunkach określonych we wniosku oraz dodatkowo zastrzegając:

1/ obowiązek przedstawienia Komisji:

- wszystkich zmian w protokole mających wpływ na przebieg oraz ocenę badania,
- wszystkich przypadków zdarzeń niepożądanych,
- zawiadomienia o przyczynach przedwczesnego zakończenia badania,
- sprawozdania w toku przeprowadzonych badań-za sześć miesięcy,
- raportu końcowego.

strona podpisowa do uchwały Komisji Bioetycznej przy Warszawskim
Uniwersytecie Medycznym nr KB/.....⁹¹..... z dnia 13 maja 2019r.

1. Prof. dr hab. n.med. Magdalena Kuźma –Kozakiewicz

2. Dr hab. n. med. Tomasz Grzela

3. Dr hab. n. med. Andrea Horvath-Stolarczyk

4. Prof. dr hab. n. med. Paweł Piątkiewicz

5. Dr hab. n. med. Marek Postuła

6. Prof. dr hab. n. med. Marcin Ufnal

7. Dr hab. n. med. Katarzyna Kosińska-Kaczyńska

8. Dr hab. n. farm. Sylwia Flis

9. Dr n. med. Agnieszka Serafin

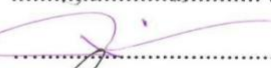
10. Ks. Paweł Śmierzchalski

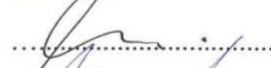
11. Prof. dr hab. Maria Boratyńska

12. Prof. Joanna Domagała-Kulawik

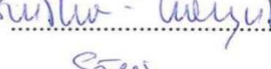


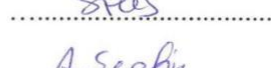


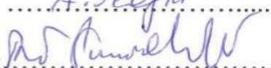




















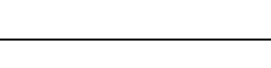


























10. Oświadczenia współautorów publikacji

Warszawa, dnia 18 marca 2025.

Małwina Sołtysiak
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 35%.

Jako współautor pracy pt. *β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study* (Journal of Medicinal Food, Short Communication, JMF-2024-0180.R1 09-Aug-2024), oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 55 %.


(podpis oświadczającego)

Magdalena Paplińska- Goryca
(imię i nazwisko)

Warszawa, 18.03.2024 (miejscowość, data)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował opracowanie koncepcji badania, zarządzanie projektem, oznaczenia laboratoryjne, analizę danych, pozyskiwanie funduszy, pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określiłam jako 35%.

Wkład **Malwiny Soltysiak** w powstawanie publikacji określiłam jako 35 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Soltysiak.

Jako współautor pracy pt.

β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study (Journal of Medicinal Food, Short Communication, JMF-2024-0180.R1 09-Aug-2024), oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował opracowanie koncepcji badania, zarządzanie projektem, oznaczenia laboratoryjne, analizę danych, pozyskiwanie funduszy, pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określiłam jako 15 %. Wkład **Malwiny Soltysiak** w powstawanie publikacji określiłam jako 55 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Soltysiak.

Magdalena Paplińska - Goryca
(podpis oświadczającego)

Warszawa, dnia 18 marca 2025 r.

Prof. dr hab. n. med. Katarzyna Koziak
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował konceptualizację, zarządzanie projektem, analizę danych, pozyskiwanie funduszy, pracę nad tekstem manuskryptu, merytoryczne poprawki i akceptację ostatecznej wersji artykułu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 14%. Wkład **Malwiny Sołtysiak** w powstawanie publikacji określłam jako 35% obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Sołtysiak.

Jako współautor pracy pt.

β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study (Journal of Medicinal Food, Short Communication, JMF-2024-0180.R1 09-Aug-2024), oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował konceptualizację, analizę danych, pozyskiwanie funduszy, pracę nad tekstem manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 16%. Wkład **Malwiny Sołtysiak** w powstawanie publikacji określłam jako 55 % i obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Sołtysiak.



.....
(podpis oświadczającego)

Prof. dr hab. n. med. Rafał Krenke
(imię i nazwisko)

Warszawa, dnia 19.03.2025

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował pozyskiwanie funduszy, pracę nad tekstem manuskryptu oraz merytoryczne poprawki. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Soltysiak** w powstawanie publikacji określam jako 35 % obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Soltysiak.

Jako współautor pracy pt.

β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study (Journal of Medicinal Food, Short Communication, JMF-2024-0180.R1 09-Aug-2024), oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował pozyskiwanie funduszy, pracę nad tekstem manuskryptu oraz merytoryczne poprawki.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Soltysiak** w powstawanie publikacji określam jako 35 % obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Soltysiak.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, dnia 18.03.2025

Dr n. med. i n. o zdr. Maria Sikorska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określiam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Sołtysiak** w powstawanie publikacji określiam jako 35 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Sołtysiak.

.....  **PODPIS ZAUFANY**
MARIA
SIKORSKA
18.03.2025 18:43:58 [GMT+1]
Dokument podpisany elektronicznie
podpisem zaufanym

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 18.02.2025 r. (miejscowość, data)

Dr n.med. Paulina Misiukiewicz- Stępień
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Soltysiak** w powstawanie publikacji określam jako 35 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Soltysiak.

Jako współautor pracy pt.

β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study (Journal of Medicinal Food, Short Communication, JMF-2024-0180.R1 09-Aug-2024), oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Soltysiak** w powstawanie publikacji określam jako 55 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Soltysiak.

Paulina Misiukiewicz- Stępień
(podpis oświadczającego)

Warszawa, dnia 18 03 2025

Dr n.chem. Oliwia Zegrocka-Stendel
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Sołtysiak** w powstawanie publikacji określłam jako 35 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Sołtysiak.

Jako współautor pracy pt.

β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study (Journal of Medicinal Food, Short Communication, JMF-2024-0180.R1 09-Aug-2024), oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 5 %.

Wkład **Malwiny Sołtysiak** w powstawanie publikacji określłam jako 55 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Sołtysiak.

O. Zegrocka-Stendel
(podpis oświadczającego)

Warszawa, dnia 18.03.2025r.

Dr n.med. Małgorzata Dutkiewicz
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Sołtysiak** w powstawanie publikacji określłam jako 35 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Sołtysiak.

Jako współautor pracy pt.

β -Escin and Chokeberry Fruit Extract Supplementation in Smokers as Potential anti-Inflammatory Protection—a Pilot Proof-of-Concept Study (Journal of Medicinal Food, Short Communication, JMF-2024-0180.R1 09-Aug-2024), oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określłam jako 5 %.

Wkład **Malwiny Sołtysiak** w powstawanie publikacji określłam jako 55 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Sołtysiak.

Małgorzata Dutkiewicz
(podpis oświadczającego)

Warszawa, dnia 19.03.2025 r.

Dr hab. Dorota Dymkowska
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH1 and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Soltysiak** w powstawanie publikacji określam jako 35 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Soltysiak.


(podpis oświadczającego)

Warszawa, dnia 18.03.2025

Mgr Laura Turows-Korgul
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Sołtysiak** w powstawanie publikacji określam jako 35 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Sołtysiak.


(podpis oświadczającego)

Warszawa, dnia...18/3/25.....

Mgr Paulina Wójtowicz
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *β -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death (Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 170, 2024, 115924, ISSN 0753-3322)* oświadczam, że mój wkład merytoryczny w powstanie tej pracy obejmował oznaczenia laboratoryjne, pracę nad tekstem manuskryptu oraz akceptacja ostatecznej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 2 %.

Wkład **Malwiny Sołtysiak** w powstawanie publikacji określam jako 35 %, obejmował on rekrutację chorych, wykonanie oznaczeń laboratoryjnych, interpretację wyników badań oraz pracę nad tekstem manuskryptu. Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. Malwiny Sołtysiak.


(podpis oświadczającego)

11. Piśmiennictwo

1. Pack EC, Kim HS, Jang DY, Koo YJ, Yu HH, Lee SH, i in. Risk assessment of toxicants on WHO TobReg priority list in mainstream cigarette smoke using human-smoked yields of Korean smokers. *Environ Res.* luty 2019;169:206–19.
2. Jankowski M, Ostrowska A, Sierpiński R, Skowron A, Sytnik-Czetwertyński J, Giermaziak W, i in. The Prevalence of Tobacco, Heated Tobacco, and E-Cigarette Use in Poland: A 2022 Web-Based Cross-Sectional Survey. *Int J Environ Res Public Health.* 18 kwiecień 2022;19(8):4904.
3. Sikorska M, Dutkiewicz M, Zegrocka – Stendel O, Kowalewska M, Grabowska I, Koziak K. Beneficial effects of β -escin on muscle regeneration in rat model of skeletal muscle injury. *Phytomedicine.* grudzień 2021;93:153791.
4. Lynch J, Jin L, Richardson A, Conklin DJ. Tobacco Smoke and Endothelial Dysfunction: Role of Aldehydes? *Curr Hypertens Rep.* wrzesień 2020;22(9):73.
5. Pauwels CGGM, Klerx WNM, Pennings JLA, Boots AW, Van Schooten FJ, Opperhuizen A, i in. Cigarette Filter Ventilation and Smoking Protocol Influence Aldehyde Smoke Yields. *Chem Res Toxicol.* 18 czerwiec 2018;31(6):462–71.
6. Hoshino Y, Mio T, Nagai S, Miki H, Ito I, Izumi T. Cytotoxic effects of cigarette smoke extract on an alveolar type II cell-derived cell line. *Am J Physiol-Lung Cell Mol Physiol.* 1 sierpień 2001;281(2):L509–16.
7. Heijink IH, Brandenburg SM, Postma DS, van Oosterhout AJM. Cigarette smoke impairs airway epithelial barrier function and cell–cell contact recovery. *Eur Respir J.* 20 lipiec 2011;39(2):419–28.
8. Barnes PJ. Cellular and Molecular Mechanisms of Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Clin Chest Med.* marzec 2014;35(1):71–86.
9. Manoli SE, Smith LA, Vyhlidal CA, An CH, Porrata Y, Cardoso WV, i in. Maternal smoking and the retinoid pathway in the developing lung. *Respir Res.* grudzień 2012;13(1):42.
10. LoPachin RM, Gavin T. Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. *Chem Res Toxicol.* 21 lipiec 2014;27(7):1081–91.
11. Ellis EM. Reactive carbonyls and oxidative stress: Potential for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther.* lipiec 2007;115(1):13–24.
12. Van Der Toorn M, Slebos DJ, De Bruin HG, Gras R, Rezayat D, Jorge L, i in. Critical role of aldehydes in cigarette smoke-induced acute airway inflammation. *Respir Res.* grudzień 2013;14(1):45.
13. Zhao SQ, Xu SQ, Cheng J, Cao XL, Zhang Y, Zhou WP, i in. Anti-inflammatory effect of external use of escin on cutaneous inflammation: possible involvement of glucocorticoids receptor. *Chin J Nat Med.* luty 2018;16(2):105–12.
14. Weng M wen, Lee HW, Park SH, Hu Y, Wang HT, Chen LC, i in. Aldehydes are the predominant forces inducing DNA damage and inhibiting DNA repair in tobacco smoke carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* 3 lipiec 2018 [cytowane 3 marzec 2025];115(27). Dostępne na: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1804869115>
15. Fowler CD, Turner JR, Imad Damaj M. Molecular Mechanisms Associated with Nicotine Pharmacology and Dependence. W: Nader MA, Hurd YL, redaktorzy. *Substance Use Disorders [Internet].* Cham:

- Springer International Publishing; 2019 [cytowane 3 marzec 2025]. s. 373–93. (Handbook of Experimental Pharmacology; t. 258). Dostępne na: http://link.springer.com/10.1007/164_2019_252
16. Belluzzi JD, Wang R, Leslie FM. Acetaldehyde Enhances Acquisition of Nicotine Self-Administration in Adolescent Rats. *Neuropsychopharmacology*. kwiecień 2005;30(4):705–12.
 17. Talhout R, Opperhuizen A, Van Amsterdam JGC. Role of acetaldehyde in tobacco smoke addiction. *Eur Neuropsychopharmacol*. październik 2007;17(10):627–36.
 18. Ochoa CA, Nissen CG, Mosley DD, Bauer CD, Jordan DL, Bailey KL, i in. Aldehyde Trapping by ADX-102 Is Protective against Cigarette Smoke and Alcohol Mediated Lung Cell Injury. *Biomolecules*. 2 marzec 2022;12(3):393.
 19. Jackson B, Bocker C, Thompson DC, Black W, Vasiliou K, Nebert DW, i in. Update on the aldehyde dehydrogenase gene (ALDH) superfamily. *Hum Genomics*. 2011;5(4):283.
 20. Jang JH, Bruse S, Liu Y, Duffy V, Zhang C, Oyamada N, i in. Aldehyde dehydrogenase 3A1 protects airway epithelial cells from cigarette smoke-induced DNA damage and cytotoxicity. *Free Radic Biol Med*. 2014;68:80–6.
 21. Lu Q, Mundy M, Chambers E, Lange T, Newton J, Borgas D, i in. Alda-1 Protects Against Acrolein-Induced Acute Lung Injury and Endothelial Barrier Dysfunction. *Am J Respir Cell Mol Biol*. grudzień 2017;57(6):662–73.
 22. Yoval-Sánchez B, Rodríguez-Zavala JS. Differences in Susceptibility to Inactivation of Human Aldehyde Dehydrogenases by Lipid Peroxidation Byproducts. *Chem Res Toxicol*. 19 marzec 2012;25(3):722–9.
 23. Sirtori CR. Aescin: pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic profile. *Pharmacol Res*. wrzesień 2001;44(3):183–93.
 24. Gruza M, Jateczak K, Zagrodzki B, Łaszcz M, Koziak K, Malińska M, i in. Preparation, Purification and Regioselective Functionalization of Protoescigenin—The Main Aglycone of Escin Complex. *Molecules*. 15 kwiecień 2013;18(4):4389–402.
 25. Domanski D, Zegrocka-Stendel O, Perzanowska A, Dutkiewicz M, Kowalewska M, Grabowska I, i in. Molecular Mechanism for Cellular Response to β -Escin and Its Therapeutic Implications. Kanthou C, redaktor. *PLOS ONE*. 11 październik 2016;11(10):e0164365.
 26. Pittler MH, Ernst E. Horse chestnut seed extract for chronic venous insufficiency. Cochrane Vascular Group, redaktor. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 14 listopad 2012 [cytowane 3 marzec 2025];2012(12). Dostępne na: <http://doi.wiley.com/10.1002/14651858.CD003230.pub4>
 27. Raposo A, Saraiva A, Ramos F, Carrascosa C, Raheem D, Bárbara R, i in. The Role of Food Supplementation in Microcirculation—A Comprehensive Review. *Biology*. 2 lipiec 2021;10(7):616.
 28. Gallelli L. Escin: a review of its anti-edematous, anti-inflammatory, and venotonic properties. *Drug Des Devel Ther*. wrzesień 2019;Volume 13:3425–37.
 29. Bougelet C, Roland IH, Ninane N, Arnould T, Remacle J, Michiels C. Effect of aescine on hypoxia induced neutrophil adherence to umbilical vein endothelium. *Eur J Pharmacol*. 1998;345(1):89–95.
 30. Yang Y, Wang L, Yuan M, Yu Q, Fu F. Anti-Inflammatory and Gastroprotective Effects of Escin. *Nat Prod Commun*. 1 grudzień 2020;15(12):1934578X20982111.
 31. <https://www.rivm.nl/en/tobacco/harmful-substances-in-tobacco-smoke>.
 32. Gallelli L, Cione E, Wang T, Zhang L. Glucocorticoid-Like Activity of Escin: A New Mechanism for an Old Drug. *Drug Des Devel Ther*. luty 2021;Volume 15:699–704.

33. Du Y, Song Y, Zhang L, Zhang M, Fu F. Combined treatment with low dose prednisone and escin improves the anti-arthritic effect in experimental arthritis. *Int Immunopharmacol.* luty 2016;31:257–65.
34. Maghsoudi H, Hallajzadeh J, Rezaeipour M. Evaluation of the effect of polyphenol of escin compared with ibuprofen and dexamethasone in synoviocyte model for osteoarthritis: an in vitro study. *Clin Rheumatol.* wrzesień 2018;37(9):2471–8.
35. Keatings VM, Collins PD, Scott DM, Barnes PJ. Differences in interleukin-8 and tumor necrosis factor- α in induced sputum from patients with chronic obstructive pulmonary disease or asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* luty 1996;153(2):530–4.
36. Sullivan RC, Rockstrom MD, Schmidt EP, Hippensteel JA. Endothelial glycocalyx degradation during sepsis: Causes and consequences. *Matrix Biol Plus.* grudzień 2021;12:100094.
37. Piotti A, Novelli D, Meessen JMTA, Ferlicca D, Coppolecchia S, Marino A, i in. Endothelial damage in septic shock patients as evidenced by circulating syndecan-1, sphingosine-1-phosphate and soluble VE-cadherin: a substudy of ALBIOS. *Crit Care.* 19 marzec 2021;25(1):113.
38. Xin W, Zhang L, Fan H, Jiang N, Wang T, Fu F. Escin attenuates acute lung injury induced by endotoxin in mice. *Eur J Pharm Sci.* styczeń 2011;42(1–2):73–80.
39. Tian B, Yang J, Zhao Y, Ivanciuc T, Sun H, Wakamiya M, i in. Central Role of the NF- κ B Pathway in the *Scgb1a1* -Expressing Epithelium in Mediating Respiratory Syncytial Virus-Induced Airway Inflammation. Dutch RE, redaktor. *J Virol.* czerwiec 2018;92(11):e00441-18.
40. Salinas FM, Vázquez L, Gentilini MV, O'Donohoe A, Regueira E, Nabaes Jodar MS, i in. *Aesculus hippocastanum* L. seed extract shows virucidal and antiviral activities against respiratory syncytial virus (RSV) and reduces lung inflammation in vivo. *Antiviral Res.* kwiecień 2019;164:1–11.
41. Salinas FM, Vázquez L, Gentilini MV, O'Donohoe A, Regueira E, Nabaes Jodar MS, i in. *Aesculus hippocastanum* L. seed extract shows virucidal and antiviral activities against respiratory syncytial virus (RSV) and reduces lung inflammation in vivo. *Antiviral Res.* kwiecień 2019;164:1–11.
42. Gallelli L, Zhang L, Wang T, Fu F. Severe Acute Lung Injury Related to COVID-19 Infection: A Review and the Possible Role for Escin. *J Clin Pharmacol.* lipiec 2020;60(7):815–25.
43. Cheong DHJ, Arfuso F, Sethi G, Wang L, Hui KM, Kumar AP, i in. Molecular targets and anti-cancer potential of escin. *Cancer Lett.* maj 2018;422:1–8.
44. Patlolla JMR, Rao CV. Anti-inflammatory and Anti-cancer Properties of β -Escin, a Triterpene Saponin. *Curr Pharmacol Rep.* czerwiec 2015;1(3):170–8.
45. Majumder D, Nath P, Debnath R, Maiti D. Understanding the complicated relationship between antioxidants and carcinogenesis. *J Biochem Mol Toxicol.* luty 2021;35(2):e22643.
46. Yassin FEZSED. Aldehyde dehydrogenase (ALDH1A1) delineating the normal and cancer stem cells in spectral lung lesions: An immunohistochemical appraisal. *Pathol - Res Pract.* maj 2016;212(5):398–409.
47. Patlolla JMR, Qian L, Biddick L, Zhang Y, Desai D, Amin S, i in. β -Escin Inhibits NNK-Induced Lung Adenocarcinoma and ALDH1A1 and RhoA/Rock Expression in A/J Mice and Growth of H460 Human Lung Cancer Cells. *Cancer Prev Res (Phila Pa).* 1 października 2013;6(10):1140–9.
48. Fazliev S, Tursunov K, Razzokov J, Sharipov A. Escin's Multifaceted Therapeutic Profile in Treatment and Post-Treatment of Various Cancers: A Comprehensive Review. *Biomolecules.* 7 luty 2023;13(2):315.
49. Szumilak M, Stańczak A (2014) Repozycjonowanie leków, czyli jak przekuć porażkę w sukces. *Farm Pol* 70: 579-587.

50. Wu, Z., Wang, Y., & Chen, L. (2013). Network-based drug repositioning. *Molecular BioSystems*, 9(6), 1268.doi:10.1039/c3mb25382a .
51. Gao S, Lin H, Yu W, Zhang F, Wang R, Yu H, i in. LncRNA LCPAT1 is involved in DNA damage induced by CSE. *Biochem Biophys Res Commun*. styczeń 2019;508(2):512–5.
52. Comer DM, Elborn JS, Ennis M. Inflammatory and cytotoxic effects of acrolein, nicotine, acetaldehyde and cigarette smoke extract on human nasal epithelial cells. *BMC Pulm Med*. grudzień 2014;14(1):32.
53. Sikorska M, Dutkiewicz M, Zegrocka – Stendel O, Kowalewska M, Grabowska I, Koziak K. Beneficial effects of β -escin on muscle regeneration in rat model of skeletal muscle injury. *Phytomedicine*. grudzień 2021;93:153791.