

Warszawa, 09 sierpnia 2025

**RECENZJA**

**Rozprawy doktorskiej Pani lek. Malwiny Sołtysiak**

**„Ocena cytoprotekcyjnego działania  $\beta$ -escyny przed szkodliwym wpływem  
dymu tytoniowego na drogi oddechowe”**

---

Szkoła Główna Gospodarstwa  
Wiejskiego w Warszawie

Katedra Nauk Przedklinicznych

ul. Ciszewskiego 8  
02-786 Warszawa  
+48 22 593 60 27  
knp@sggw.edu.pl  
[www.sggw.edu.pl](http://www.sggw.edu.pl)

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

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

## **1. Wprowadzenie**

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

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

## **2. Struktura pracy**

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

## **3. Część teoretyczna**

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

## **4. Metodologia**

### **Praca 1: $\beta$ -escin activates ALDH and prevents cigarette smoke-induced cell death**

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

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

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

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

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

## **5. Wyniki i ich interpretacja**

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

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

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

#### Uwagi do metodologii

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

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

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

## 6. Wartość naukowa pracy

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

### Uwagi do interpretacji wyników

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

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

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

*Uwagi dotyczące dalszych badań*

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

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

## **7. Uwagi redakcyjne**

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

## **8. Podsumowanie i wniosek**

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

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

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

Poprawność nieznana

Dokument podpisany przez  
Arkadiusz Paweł Szterk  
Data: 2025.08.09 08:05:13 CEST