



Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu

Wydział Biologii

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Adrianna Budzińska

Wpływ bisfosfonianów stosowanych w terapii osteoporozy na
metabolizm tlenowy komórek śródbłónka

The effects of bisphosphonates used in osteoporosis therapy on
aerobic metabolism of endothelial cells

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Wiesławy Jarmuszkiewicz

Poznań 2025

Podziękowania

Przede wszystkim składam podziękowania prof. dr hab. Wiesławie Jarmuszkiewicz za nieustającą pomoc, cenne uwagi merytoryczne oraz okazję do rozwoju naukowego.

Szczególnie dziękuję mgr Krzysztofowi Wójcickiemu, dr Grzegorzowi Figurze i dr Łukaszowi Gałgańskiemu za pomoc w wykonaniu doświadczeń. Dziękuję również wszystkim pracownikom Zakładu Bioenergetyki za wszelką pomoc i życzliwą atmosferę w pracy.

Chciałabym również podziękować mojej rodzinie oraz partnerowi za wspieranie mnie na każdym etapie mojej pracy.

Finansowanie

Badania wykonano w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki OPUS11 NCN (2016/21/B/NZ3/00333) „Powiązanie pomiędzy produkcją reaktywnych form tlenu i stopniem redukcji koenzymu Q w mitochondriach”, 2016-2021

oraz

OPUS19 NCN (2020/37/B/NZ1/01188) „Adaptacja metabolizmu tlenowego do niedoboru koenzymu Q w mózgu; wpływ statyn” 2021-2026



NARODOWE CENTRUM NAUKI

Spis treści

1.	Streszczenie	1
2.	Summary.....	3
3.	Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej	5
4.	Wprowadzenie	6
5.	Cele pracy	10
6.	Wyniki	11
7.	Podsumowanie wyników i wnioski	25
8.	Oświadczenia autora oraz współautorów publikacji składających się na rozprawę doktorską	28
9.	Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.....	34
10.	Dodatek - publikacje niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej	38

1. Streszczenie

Osteoporoza jest najczęstszą chorobą metabolizmu kości, głównie wśród kobiet w wieku pomenopauzalnym. Najczęściej stosowanymi lekami zmniejszającymi resorpcję kości są bisfosfoniany zawierające azot (N-BPs). Mechanizm działania N-BPs opiera się na blokowaniu enzymu syntazy farnesylopirofosforanu (FPPS) w szlaku mewalonowym. Szlak mewalonowy odgrywa ważną rolę w wielu procesach komórkowych takich jak prenylacja białek i modyfikacje potranslacyjne a także synteza cząsteczek zawierających jednostki izoprenoidowe, w tym hemów *a* (grup prostetycznych kompleksu IV) czy koenzymu Q (CoQ). CoQ jest kluczowym przenośnikiem elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym oraz ważnym przeciwutleniaczem chroniącym przed uszkodzeniami peroksydacyjnymi, obecnym we wszystkich błonach komórki, głównie mitochondrialnych. Komórki śródbłónka wyściełają naczynia krwionośne, co sprawia, że mają ciągły kontakt z substancjami transportowanymi przez krew, w tym lekami.

Praca doktorska koncentruje się na wieloaspektowym wpływie N-BPs na metabolizm tlenowy komórek śródbłónka naczyń krwionośnych. Rozprawa złożona jest z dwóch prac doświadczalnych i jednej pracy przeglądowej, które prezentują analizę mechanizmów, za pomocą których N-BPs, takie jak alendronian i zoledronian, wpływają na metabolizm energetyczny, stres oksydacyjny i funkcjonowanie mitochondriów w komórkach.

Materiałem badawczym użytym w pracach doświadczalnych były ludzkie komórki śródbłónka EA.hy926, traktowane przez sześć dni 5 μ M alendronianem lub 1 μ M zoledronianem, oraz izolowane mitochondria z tych komórek. Analiza zmian metabolizmu energetycznego wywołanych przez N-BPs została przeprowadzona w dwóch etapach tj. na poziomie komórkowym (Publikacja 1) oraz mitochondrialnym (Publikacja 2).

Doświadczenia przeprowadzone na całych komórkach śródbłónka (Publikacja 1) pokazały, że N-BPs wywołują spadek żywotności komórek, nasilony stres oksydacyjny i stan zapalny oraz obniżenie aktywności szlaku sygnałowego ERK1/2 zależnego od prenylacji. Stwierdzono także istotne zmiany w metabolizmie energetycznym komórek polegające na zwiększeniu oddychania beztlenowego, obniżeniu mitochondrialnego utleniania głównych substratów oddechowych (oprócz kwasów tłuszczowych) i spadku poziomu ATP. Po raz pierwszy pokazano, że zahamowanie szlaku mewalonowego przez N-BPs wywołuje w komórkach śródbłónka znaczny spadek poziomu całkowitego CoQ oraz utratę jego zredukowanej puli. Zmianom tym towarzyszy wzrost produkcji reaktywnych form tlenu (RFT).

Badania wskazują, że N-BPs zmieniają także dynamikę mitochondriów poprzez redukcję ich fragmentacji. A zatem, N-BPs modulują metabolizm energetyczny komórek śródbłónka prowadząc do zmian w statusie energetycznym komórek, homeostazie redoks CoQ, aktywności metabolizmu tlenowego i kontroli jakości mitochondriów.

Kolejne badania prowadzone na poziomie mitochondriów izolowanych z komórek śródbłónka poddanych sześciodniowej hodowli z N-BPs (Publikacja 2) koncentrowały się na adaptacji bioenergetyki mitochondriów do dużego ponad 40% spadku poziomu mitochondrialnego CoQ (mtCoQ) wywołanego zahamowaniem szlaku mewalonowego. W mitochondriach komórek traktowanych N-BPs w porównaniu do mitochondriów kontrolnych, obniżeniu całkowitej puli i utracie zredukowanej puli mtCoQ towarzyszy większa produkcja RFT i aktywacja systemów antyoksydacyjnych. Niedobór mtCoQ prowadzi do obniżonego utleniania substratów oddechowych (oprócz kwasów tłuszczowych), obniżonej aktywności kompleksów II i III oraz syntazy ATP, spadku potencjału błonowego mitochondriów, efektywności syntezy ATP oraz reorganizacji superkompleksów łańcucha oddechowego. Większa produkcja RFT związana jest z większym poziomem redukcji mtCoQ. Po raz pierwszy zaobserwowano, że N-BPs mogą prowadzić do obniżenia poziomu hemów *a* w mitochondriach. A zatem wyniki te wskazują, że wywołane przez N-BPs zaburzenie homeostazy redoks mtCoQ może istotnie wpływać na aktywność bioenergetyczną mitochondriów komórek śródbłónka.

Praca przeglądowa przedstawiona w ramach rozprawy (Publikacja 3) zbiera wyniki dotychczasowych badań, wskazujące na szerokie spektrum działania N-BPs poza tkanką kostną – w tym ich wpływ na organizację cytoszkieletu, apoptozę zależną od mitochondriów, gospodarkę wapniową oraz procesy związane z kontrolą jakości mitochondriów. N-BPs, jako inhibitory szlaku mewalonowego, powodują szereg skutków ubocznych zarówno na poziomie całej komórki jak i dotyczących funkcjonowania mitochondriów. Dalsze badania nad złożonym powiązaniem pomiędzy szlakiem mewalonowym, funkcjonowaniem mitochondriów a ogólną homeostazą komórkową mogą być istotne dla optymalizacji klinicznego zastosowania N-BPs, być może uwzględniającego suplementację CoQ10, i ograniczenia efektów ubocznych w tkankach niebędących celem terapii.

Wnioski z pracy doktorskiej podkreślają istotne, potencjalnie niepożądane skutki działania N-BPs na komórki niezwiązane z kośćcem, na przykładzie komórek śródbłónka. Przedstawione badania sugerują, że efekty te mogą przyczyniać się do powikłań sercowo-naczyniowych u pacjentów leczonych N-BPs, a mechanizmy mitochondrialne mogą stanowić istotny punkt docelowy dalszych badań oraz potencjalnych strategii ochronnych.

2. Summary

Osteoporosis is the most common disease of bone metabolism, mainly among postmenopausal women. The most commonly used drugs to reduce bone resorption are nitrogen-containing bisphosphonates (N-BPs). The mechanism of action of N-BPs is based on blocking the enzyme farnesylpyrophosphate synthase (FPPS) in the mevalonate pathway. The mevalonate pathway plays an important role in many cellular processes such as protein prenylation and post-translational modifications as well as the synthesis of molecules containing isoprenoid units, including *a*-hemes (prosthetic groups of complex IV) or coenzyme Q (CoQ). CoQ is a key electron carrier in the mitochondrial respiratory chain and an important antioxidant present in all cell membranes, mainly mitochondrial, that protects against peroxidative damage. Endothelial cells line blood vessels, which means they are in constant contact with substances transported by the blood, including drugs.

The doctoral thesis focuses on the multifaceted influence of N-BPs on the oxidative metabolism of vascular endothelial cells. The dissertation consists of two experimental papers and one review paper, which present an analysis of the mechanisms by which N-BPs, such as alendronate and zoledronate, affect energy metabolism, oxidative stress and mitochondrial function in cells.

The research material used in the experiments were human endothelial cells EA.hy926, treated for six days with 5 μ M alendronate or 1 μ M zoledronate, and isolated mitochondria from these cells. The analysis of changes in energy metabolism induced by N-BPs was carried out in two stages, i.e., at the cellular level (Publication 1) and the mitochondrial level (Publication 2).

Experiments conducted on whole endothelial cells (Publication 1) showed that N-BPs cause a decrease in cell viability, increased oxidative stress and inflammation, and a decrease in the activity of the prenylation-dependent ERK1/2 signaling pathway. Significant changes in cell energy metabolism were also observed, consisting in increased anaerobic respiration, decreased mitochondrial oxidation of the main respiratory substrates (except fatty acids) and a decrease in ATP level. For the first time, it has been shown that inhibition of the mevalonate pathway by N-BPs induces a significant decrease in the level of total CoQ and a loss of its reduced pool in endothelial cells. These changes are accompanied by an increase in the production of reactive oxygen species (ROS). Studies indicate that N-BPs also change the dynamics of mitochondria by reducing their fission. Thus, N-BPs modulate the energy

metabolism of endothelial cells leading to changes in the energy status of cells, CoQ redox homeostasis, the activity of oxygen metabolism and mitochondrial quality control.

Further studies conducted at the level of mitochondria isolated from endothelial cells cultured for six days with N-BP (Publication 2) focused on the adaptation of mitochondrial bioenergetics to the large decrease of more than 40% in mitochondrial CoQ (mtCoQ) levels caused by the inhibition of the mevalonate pathway. In mitochondria of cells treated with N-BPs, compared with control mitochondria, the decrease in the total pool and the loss of the reduced pool of mtCoQ are accompanied by greater production of ROS and activation of antioxidant systems. mtCoQ deficiency leads to decreased oxidation of respiratory substrates (except fatty acids), decreased activity of complexes II and III and ATP synthase, decreased mitochondrial membrane potential, efficiency of ATP synthesis and reorganization of respiratory chain supercomplexes. Increased ROS production is associated with higher reduction level of mtCoQ. It was observed for the first time that N-BPs can lead to decreased level of heme *a* in mitochondria. Therefore, these results indicate that N-BP-induced disruption of mtCoQ redox homeostasis can significantly affect bioenergetic activity of endothelial mitochondria.

The review presented in the dissertation (Publication 3) summarizes the results of previous studies indicating a wide spectrum of N-BP action outside bone tissue – including their effects on cytoskeletal organization, mitochondrial-dependent apoptosis, calcium metabolism and processes related to mitochondrial quality control. N-BPs, as inhibitors of the mevalonate pathway, cause a number of side effects both at the cellular level and mitochondrial function. Further studies on the complex relationship between the mevalonate pathway, mitochondrial function and overall cellular homeostasis may be important to optimize the clinical use of N-BPs, possibly including CoQ10 supplementation, and to limit side effects in off-target tissues.

The conclusions of the doctoral thesis highlight the significant, potentially adverse effects of N-BP on non-skeletal cells, exemplified by endothelial cells. The studies presented suggest that these effects may contribute to cardiovascular complications in patients treated with N-BP, and mitochondrial mechanisms may be an important target for further research and potential protective strategies.

3. Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Publikacja 1:

Budzinska A, Galganski L, Jarmuszkiewicz W (2023) The bisphosphonates alendronate and zoledronate induce adaptations of aerobic metabolism in permanent human endothelial cells, *Scientific Reports*, 13(1), (IF_{sy} 4,3), doi: [10.1038/s41598-023-43377-3](https://doi.org/10.1038/s41598-023-43377-3)

Publikacja 2:

Budzinska A, Galganski L, Wojcicki K, Jarmuszkiewicz W (2025) Adaptation of mitochondrial bioenergetic activity associated with coenzyme Q deficiency in human endothelial cells after chronic exposure to bisphosphonates, alendronate and zoledronate, *Scientific Reports*, 15, (IF_{sy} 4,3), doi: [10.1038/s41598-025-02710-8](https://doi.org/10.1038/s41598-025-02710-8)

Publikacja 3:

Budzinska A, Jarmuszkiewicz W (2025) Consequences of inhibition of mevalonate pathway by bisphosphonates at cellular and mitochondrial levels, manuskrypt wysłany (16.06.2025) do czasopisma *Pharmaceuticals*, w recenzji, zdeponowany w preprints.org, doi: [10.20944/preprints202506.2071.v1](https://doi.org/10.20944/preprints202506.2071.v1)

4. Wprowadzenie

Osteoporoza jest najczęstszą chorobą metabolizmu kości, głównie wśród kobiet w wieku pomenopauzalnym. Wraz ze zwiększeniem liczby starszych osób w społeczeństwie mówi się o powstawaniu zjawiska globalnej epidemii osteoporozy. Już 10 lat temu oceniano, iż osteoporozą jest dotkniętych 200 milionów osób na świecie, w tym co trzecia kobieta powyżej 50 roku życia [1]. Proces przebudowywania kości opiera się głównie na trzech typach komórek: osteoblastach nadbudowujących kości, osteoklastach resorbujących kości oraz osteocytach. W wyniku działania czynników genetycznych i środowiska równowaga między nadbudowywaniem i resorpcją kości może być zaburzona.

W leczeniu osteoporozy najpopularniejszym podejściem jest zmniejszenie tempa resorpcji kości. Najczęściej stosowanymi lekami antyresorpcyjnymi są bisfosfoniany. Leki te dzielą się na dwie grupy: niezawierające azotu oraz zawierające azot (N-BPs). Lecznicze działanie N-BPs opiera się na blokowaniu enzymu syntazy farnesylpifosforanu (FPPS) w szlaku mewalonowym w komórkach osteoklastów. Prenylacja białek będąca efektem szlaku mewalonowego jest niezbędna do osiągnięcia aktywności resorpcyjnej osteoklastów. Zahamowanie tego szlaku powoduje zwiększoną apoptozę osteoklastów, zmniejszając tym samym tempo resorpcji kości [2].

Szlak mewalonowy odgrywa ważną rolę w wielu procesach komórkowych takich jak prenylacja białek i modyfikacje potranslacyjne oraz synteza cząsteczek zawierających jednostki izoprenoidowe, w tym cholesterolu, hemów *a* (grup prostetycznych kompleksu IV) czy koenzymu Q (CoQ), obecnego we wszystkich błonach komórkowych, głównie w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. CoQ to rozpuszczalny w tłuszczach, wytwarzany endogennie przeciwutleniacz, chroniący przed stresem oksydacyjnym i peroksydacją lipidów, białek czy DNA [3]. Neutralizując wolne rodniki, takie jak anionorodnik ponadtlenkowy, zredukowana forma CoQ (CoQH₂) zapobiega rozprzestrzenianiu się stresu oksydacyjnego [4]. Ponadto, CoQH₂ wspomaga regenerację puli innych przeciwutleniaczy, takich jak witamina E i C, poprzez redukcję ich utlenionych form. Duży potencjał antyoksydacyjny CoQ wynika z jego obfitego rozmieszczenia w różnych błonach komórkowych oraz efektywnych procesów redukcji odnawiających jego zredukowaną pulę [3].

Główną funkcją CoQ jest transport elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym i tym samym zasilanie produkcji ATP. Mitochondrialny CoQ (mtCoQ) przenosi elektrony między dehydrogenazami (kompleksem I i II) i utleniającym go kompleksem III,

stanowiąc istotny etap w procesie fosforylacji oksydacyjnej. Jednakże, mtCoQ może także przyczyniać się do powstawania reaktywnych form tlenu w mitochondriach (RFT). Przy niepełnej redukcji mtCoQ, dochodzi do powstania rodnika semichinonowego, który wchodząc w interakcję z tlenem tworzy anionorodnik ponadtlenkowy, będący prekursorem innych RFT. Nadmiar RFT prowadzi do stresu oksydacyjnego, który może przyczyniać się do starzenia komórek czy powstawania różnych chorób [4].

Biodostępność N-BPs podczas podania doustnego jest bardzo niska (~1%). 99% przyjętego leku jest usuwane z organizmu. W związku z tym, w cięższych przypadkach chorób kostnych, zaleca się dożylne podawanie tych terapeutów. N-BPs silnie wiążą się do hydroksyapatytu, obecnego w miejscach o zwiększonej resorpcji kości. Podczas procesu resorpcji N-BPs są uwalniane do krwiobiegu w celu wydalenia z moczem. W zależności od typu N-BP i siły jego penetracji w głąb kości, jego uwalnianie może trwać nawet do 10 lat po zakończonej terapii [5]. Dlatego też, komórkami mającymi długotrwały kontakt z tymi lekami są komórki śródbłónka czy nerek.

Śródbłonek wyściela wszystkie naczynia krwionośne, od serca do naczyń włosowatych. Kontroluje przepływ substancji do i z krwiobiegu. Wszystkie tkanki są zależne od dostępu do krwi, czyniąc je zależnymi od komórek śródbłónka. Dysfunkcja tych komórek wpływa na wiele tkanek i narządów oraz jest podłożem wielu chorób cywilizacyjnych [6]. Obecnie coraz więcej uwagi poświęca się roli mitochondriów w procesach patofizjologicznych obejmujących dysfunkcję śródbłónka. Komórki śródbłónka, opierające swój metabolizm głównie na glikolizie, posiadają mniejszą niż komórki innych tkanek liczbę mitochondriów, działających przede wszystkim jako organelle sygnałowe. Dysfunkcja komórek śródbłónka jest powiązana z reumatoidalnym zapaleniem stawów, cukrzycą, hipercholesterolemią czy chorobą wieńcową.

Mitochondria są organelami odpowiedzialnymi za uzyskiwanie energii w procesie fosforylacji oksydacyjnej, zlokalizowanym w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Proces jest niezbędny do produkcji ATP, który zapewnia energię niezbędną do prawidłowego funkcjonowania komórki. Oprócz tego mitochondria biorą udział w apoptozie, sygnalizacji komórkowej oraz uczestniczą w procesach buforowania wapnia [7]. Zaburzenie delikatnej homeostazy w mitochondriach może prowadzić do zmniejszenia żywotności komórek poprzez uwolnienie cytochromu *c* i następnie aktywację mitochondrialnej ścieżki apoptozy [8]. Mitochondria to dynamiczne organelle podlegające ciągłym procesom fragmentacji, fuzji, biogenezie czy mitofagii co wpływa na ich funkcjonowanie. Badania dysfunkcji

mitochondriów różnych komórek, wynikającej z działania N-BPs, pozwoliłyby wyjaśnić procesy patofizjologiczne efektów ubocznych stosowania terapii antyresorpcyjnej.

N-BPs, hamując szlak miewalonowy, oprócz pożądanego zmniejszania prenylacji białek kluczowych dla aktywności osteoklastów, mogą obniżać syntezę CoQ. Dotąd odnotowano jedynie obniżony poziom CoQ w surowicy kobiet w wieku pomenopauzalnym, leczonych N-BPs [9]. Brakuje badań opisujących obniżony przez N-BPs poziom CoQ w komórkach, tkankach czy narządach. Podobnie nikt wcześniej nie badał wpływu N-BPs na poziom mtCoQ i wynikające z niego konsekwencje metaboliczne i energetyczne. Dotąd nie badano dysfunkcji mitochondriów wywołanej przez N-BPs, ze szczególnym uwzględnieniem funkcjonowania łańcucha oddechowego oraz mechanizmów kontroli jakości mitochondriów. Niezbadane jest także powiązanie hamowanie szlaku miewalonowego przez N-BPs z funkcjonowaniem mitochondriów i ogólną homeostazą energetyczną komórkową komórek innych kostne.

Literatura:

- [1] T. Sözen, L. Özişik, and N. Ç. Başaran, “An overview and management of osteoporosis,” *European Journal of Rheumatology*, vol. 4, no. 1, pp. 46–56, Mar. 2017, doi: 10.5152/eurjrheum.2016.048.
- [2] A. A. Reszka, J. M. Halasy-Nagy, P. J. Masarachia, and G. A. Rodan, “Bisphosphonates act directly on the osteoclast to induce caspase cleavage of mst1 kinase during apoptosis: a link between inhibition of the mevalonate pathway and regulation of an apoptosis-promoting kinase,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 274, no. 49, pp. 34967–34973, 1999, doi: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.49.34967>.
- [3] F. Pallotti, C. Bergamini, C. Lamperti, and R. Fato, “The roles of coenzyme Q in disease: direct and indirect involvement in cellular functions.,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 23, no. 1, Dec. 2021, doi: 10.3390/ijms23010128.
- [4] K. Dominiak, A. Koziel, and W. Jarmuszkiewicz, “The interplay between mitochondrial reactive oxygen species formation and the coenzyme Q reduction level.,” *Redox Biology*, vol. 18, pp. 256–265, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.redox.2018.07.018.
- [5] S. Cremers, M. T. Drake, F. H. Ebetino, J. P. Bilezikian, and R. G. G. Russell, “Pharmacology of bisphosphonates.,” *British Journal of Clinical Pharmacology*, vol. 85, no. 6, pp. 1052–1062, Jun. 2019, doi: 10.1111/bcp.13867.

- [6] X. Tang, Y.-X. Luo, H.-Z. Chen, and D.-P. Liu, “Mitochondria, endothelial cell function, and vascular diseases.,” *Frontiers in Physiology*, vol. 5, p. 175, 2014, doi: 10.3389/fphys.2014.00175.
- [7] K. Dominiak and W. Jarmuszkiewicz, “Different faces of the mitochondrial coenzyme Q,” *Postepy Biochemii*, vol. 65, pp. 271–277, Jan. 2020, doi: 10.18388/pb.2019_289.
- [8] L. D. Osellame, T. S. Blacker, and M. R. Duchon, “Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function.,” *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 26, no. 6, pp. 711–723, Dec. 2012, doi: 10.1016/j.beem.2012.05.003.
- [9] S. Kalyan *et al.*, “Nitrogen-bisphosphonate therapy is linked to compromised coenzyme Q10 and vitamin e status in postmenopausal women,” *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, vol. 99, no. 4, pp. 1307–1313, Apr. 2014, doi: 10.1210/jc.2013-3648.

5. Cele pracy

Celem pracy doktorskiej było zbadanie wpływu dwóch popularnych N-BPs, zoledronianu (Zol) i alendronianu (Ale) na metabolizm tlenowy komórek śródbłonka. Materiałem użytym w badaniach były komórki ludzkiego śródbłonka EA.hy926 oraz izolowane z nich mitochondria. Komórki hodowano przez 6 dni w obecności 5 μ M Ale lub 1 μ M Zol.

W ramach badań zrealizowano następujące zadania:

1. Opis zmian w metabolizmie tlenowym komórek śródbłonka hodowanych w obecności N-BPs w odniesieniu do zawartości CoQ, produkcji RFT oraz dynamiki mitochondriów – badania na poziomie komórkowym (Publikacja 1)
2. Opis zmian w aktywności bioenergetycznej mitochondriów izolowanych z komórek śródbłonka hodowanych w obecności N-BPs w odniesieniu do zawartości/stopnia redukcji mtCoQ, produkcji mtRFT oraz molekularnej organizacji łańcucha oddechowego – badania na poziomie izolowanych mitochondriów (Publikacja 2)
3. Zebranie aktualnych danych literaturowych na temat wpływu hamowania szlaku miewalonowego przez N-BPs na poziomie komórkowym i mitochondrialnym (Publikacja 3)

Badania na poziomie komórkowym i mitochondrialnym (Zadanie 1 i 2) pozwoliły na pełniejszy obraz zmian w funkcjonowaniu mitochondriów w komórkach śródbłonka wywołanych przez N-BPs. Badania te pokazują, w jaki sposób komórki śródbłonka, które mają niewielką ilość mitochondriów oraz są pierwszymi komórkami narażonymi *in vivo* na dożylnie podawane N-BPs (na przykład podczas leczenia osteoporozy), przystosowują się do chronicznego stresu oksydacyjnego wywołanego przez te związki poprzez hamowanie szlaku miewalonowego.

6. Wyniki

Publikacja 1: Budzinska A, Galganski L, Jarmuszkiewicz W, (2023), The bisphosphonates alendronate and zoledronate induce adaptations of aerobic metabolism in permanent human endothelial cells, *Scientific Reports*, 13(1), (IF_{5y} 4,3), doi: [10.1038/s41598-023-43377-3](https://doi.org/10.1038/s41598-023-43377-3)

W pracy tej opisano zmiany w metabolizmie tlenowym komórek śródbłónka EA.hy926 hodowanych w obecności Zol lub Ale przez 6 dni. Stosowane w tych badaniach N-BPs zostały wybrane ze względu na popularność w terapii antyresorpcyjnej (Ale) oraz ze względu na szczególnie silne działanie (Zol). Mikromolarne stężenia N-BPs użyte w wykonanych badaniach zostały wybrane na podstawie danych literaturowych podających stężenia tych substancji w osoczu pacjentów przyjmujących bisfosfoniany w ramach terapii osteoporozy.

W testach żywotności użyte zostały stężenia Ale w przedziale 1-10 μM i 0,5-5 μM dla Zol. Wyższe stężenia (od 7,5 μM dla Ale i 2,5 μM dla Zol) obniżały żywotność komórek śródbłónka. Zbadano również poziom CoQ (CoQ10) w komórkach śródbłónka hodowanych w obecności N-BPs. Stężenia 1 μM Zol i 5 μM Ale wywoływały ~30% spadek poziomu CoQ. Do dalszych badań wybrano te stężenia, ponieważ dawały istotny spadek poziomu CoQ, jednocześnie nie wykazując działania na żywotność komórek śródbłónka. Do tej pory, opublikowane badania pokazywały jedynie spadek CoQ w osoczu pacjentek w wieku pomenopauzalnym przyjmujących N-BPs. Natomiast w tych badaniach wykazano po raz pierwszy dla komórek, nie tylko komórek śródbłónka, obniżenie poziomu CoQ związane z zastosowaniem N-BPs.

W komórkach hodowanych w obecności N-BPs obniżeniu poziomu całkowitego CoQ (formy zredukowanej plus utlenionej) towarzyszył zanik zredukowanej formy – CoQH_2 , która w komórkach kontrolnych wynosiła ~8% całej puli CoQ. W wyniku całkowitego zaniku zredukowanej formy, która działa jako antyoksydant, w komórkach traktowanych doszło do zwiększenia produkcji RFT, zarówno mitochondrialnych jak i komórkowych. W komórkach traktowanych N-BPs, odnotowano również 15-20% wzrost poziomu białek antyoksydacyjnych tj. dysmutazy ponadtlencowej (SOD1) czy reduktazy glutationowej (GR), co wskazuje na niewystarczającą pulę antyoksydantów w komórkach traktowanych N-BPs i konieczność uruchomienia dodatkowych mechanizmów w celu niwelowania powstałego przez N-BPs stresu oksydacyjnego.

Nasze badania pokazały, że 1 μ M Zol zwiększył w komórkach śródbłónka poziom markerów zapalnych: cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM1) i interleukiny 6 (IL-6), jednak 5 μ M Ale nie wywołał żadnych zmian. Co więcej, w obu typach komórek traktowanych N-BPs o $\sim 20\%$ spadł poziom markera hipoksji tj. czynnika indukowanego hipoksją 1 α (HIF1 α). Ponadto w komórkach tych aż 6-krotnie wzrósł poziom lizynospetyficznego demetylazu 6A (KDM6A), działającej jak sensor tlenu regulujący transkrypcję genów. Wyniki te wskazują, że w warunkach zwiększonego poziomu tlenu, o czym świadczy obniżony poziom HIF1 α , może dochodzić do zależnych od KDM6A zmian w poziomie białek kontrolujących los komórki oraz organizacji chromatyny. W tej sytuacji zwiększony poziom tlenu, prawdopodobnie w wyniku obniżenia zużycia tlenu przez metabolizm tlenowy, może prowadzić do zwiększenia stresu oksydacyjnego i adaptacji metabolizmu tlenowego komórki.

Przeprowadzona analiza enzymów syntazy cytrynianowej (CS) oraz kompleksu IV (COX) wykazała wzrost zarówno aktywności jak i poziomu obu enzymów ($\sim 12-17\%$), świadczący o zwiększonej pojemności oddechowej cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego komórek traktowanych N-BPs. Co ciekawe, zmianom tym towarzyszył $\sim 16-20\%$ wzrost poziomu i $\sim 25-35\%$ wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej (LDH), a także $\sim 27\%$ wzrost poziomu heksokinazy-1 (HK1). Adaptacje te sprzyjające zwiększeniu produkcji ATP, zarówno poprzez metabolizm tlenowy i beztlenowy, okazały się niewystarczające, ponieważ w komórkach poddanych działaniu N-BPs poziom ATP był niższy niż w komórkach kontrolnych.

Zwiększenie aktywności białek CS oraz COX o $\sim 17\%$ oraz ich poziomu w komórkach poddanych działaniu N-BPs sugeruje, iż zawartość mitochondriów w tych komórkach jest większa. Poziomy białek kanału anionoselektywnego zależnego od napięcia 1 (VDAC1) oraz mitochondrialnego nieglikozylowanego białka (MT) były podwyższone o $\sim 10-15\%$. Nie zaobserwowano żadnych zmian w poziomie białek charakterystycznych dla biogenezy mitochondriów tj. PGC1 α (ang. *peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha*) i NRF2 (ang. *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Jednocześnie, poziom markerów fragmentacji mitochondriów znacząco wzrosły. Poziom czynnika fragmentacji mitochondriów (MFF, ang. *mitochondrial cleavage factor*) wzrósł o $\sim 25\%$, a poziom fosforylowanego białka zależnego od dynaminy (fosfo-DRP1) wzrósł o $\sim 12\%$, podczas gdy poziom markera fuzji tj. OPA1 (ang. *arthrosis protein-1*) pozostał na tym samym poziomie co w komórkach kontrolnych. Komórki poddane działaniu N-BPs posiadały również obniżony poziom fosforylowanej kinazy białkowej regulowanej sygnałem pozakomórkowym 1/2 (fosfo-ERK1/2). Niezmieniony poziom markerów fuzji w mitochondriach komórek traktowanych Zol

i Ale, wraz ze zwiększonym poziomem markerów fragmentacji oraz białek mitochondrialnych, wskazują na utrzymywanie puli mitochondriów w obliczu zmniejszonego poziomu CoQ. W tej pracy po raz pierwszy pokazano, iż hamowanie szlaku mewalonowego przez N-BPs i tym samym obniżenie prenylacji białek może mieć wpływ na dynamikę mitochondriów.

Badania zużycia tlenu przez całe komórki śródbłónka poddane działaniu Zol lub Ale wykazały liczne adaptacje dotyczące metabolizmu tlenowego. W warunkach rozprzegających, po podaniu glukozy lub palmitynianu do płynu pomiarowego, komórki traktowane N-BPs wykazywały zwiększoną szybkość zużycia tlenu (ang. *oxygen consumption rate* – OCR). Zarówno oddychanie bazowe jak i związane z produkcją ATP przy utlenianiu glukozy lub palmitynianu było wyższe w komórkach traktowanych Zol niż w komórkach kontrolnych. Jednocześnie, przy zastosowaniu substratów oddechowych takich jak glutamina, pirogronian czy mieszaniny wszystkich użytych w doświadczeniu substratów oddechowych (tj. glukoza, palmitynian, glutamina i pirogronian), zauważono ~20-35% spadek maksymalnej pojemności oddechowej mitochondriów (maksymalna OCR) oraz ~15-20% spadek OCR związanej z produkcją ATP. Co więcej, przy zastosowaniu mieszaniny wszystkich substratów oddechowych, zaobserwowano zwiększenie OCR niezwiązanej z produkcją ATP, świadczące o zwiększonym przecieku protonów. Najważniejsze wyniki uzyskane podczas tych doświadczeń wskazują na liczne adaptacje metabolizmu tlenowego komórek traktowanych N-BPs: zmniejszenie oddychania w komórkach traktowanych podczas utleniania „silniejszych” substratów (tj. glutaminy lub pirogronianu), zmniejszenie oddychania związanego z produkcją ATP czy zwiększenie przecieku protonów podczas utleniania mieszaniny substratów.

Permeabilizacja komórek śródbłónka za pomocą digitoniny umożliwiła badanie aktywności oddechowej mitochondriów przy zaangażowaniu poszczególnych dehydrogenaz substratowych. W permeabilizowanych komórkach traktowanych N-BPs oddychających w warunkach fosforylujących, zaobserwowano spadek utleniania bursztynianu podanego wraz z rotenonem (określenie aktywności kompleksu II przy jednoczesnym hamowaniu kompleksu I) na poziomie 11-15%, podczas gdy zmniejszenie szybkości zużycia tlenu podczas utleniania jabłczanu (substratu kompleksu I) wyniosło 22-30%. W permeabilizowanych komórkach śródbłónka poddanych działaniu N-BPs, współczynnik kontroli oddechowej (ang. *respiratory control ratio* - RCR) przy braku oligomycyny był znacząco zmniejszony po podaniu jabłczanu. W obecności oligomycyny RCR (RCR_{oligo}) był zmniejszony zarówno podczas utleniania jabłczanu (substratu kompleksu I) jak i bursztynianu (substratu kompleksu II). Opisane wyniki wskazują na zwiększone rozprzęgnięcie mitochondriów komórek traktowanych N-BPs, co

może wpływać na zmniejszenie wydajności fosforylacji oksydacyjnej, a także na dysfunkcję łańcucha oddechowego, szczególnie podczas utleniania jabłczanu.

Podsumowując, badania przeprowadzone na komórkach śródbłónka poddanych 6-dniowemu działaniu Zol lub Ale wskazują na adaptację metabolizmu tlenowego tych komórek w odpowiedzi na działanie N-BPs. Badania te pokazują po raz pierwszy obniżenie komórkowego poziomu CoQ w wyniku hamowania szlaku mewalonowego przez N-BPs. Zmiany stanu redoks CoQ wywołane tymi lekami wpływają na funkcjonowanie mitochondriów, stan energetyczny w komórkach śródbłónka czy biogenezę i dynamikę mitochondriów. A zatem, N-BPs prowadzą do przeprogramowania metabolicznego komórek śródbłónka w odpowiedzi na obniżenie poziomu CoQ, który jest ważnym przenośnikiem elektronów w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, a także ważnym komórkowym przeciwutleniaczem.

Publikacja 2: Budzinska A, Galganski L, Wojcicki K, Jarmuszkiewicz W, (2025), Adaptation of mitochondrial bioenergetic activity associated with coenzyme Q deficiency in human endothelial cells after chronic exposure to bisphosphonates, alendronate and zoledronate, Scientific Reports, 15, (IF5y 4,3), doi: [10.1038/s41598-025-02710-8](https://doi.org/10.1038/s41598-025-02710-8)

Badania opisane w tej publikacji stanowią pogłębienie poprzednich badań, w których opisano wpływ N-BPs, wynikający z hamowania szlaku mewalonowego, na adaptację metabolizmu tlenowego na poziomie całych komórek śródbłónka linii EA.hy926. Celem tej pracy było przyjrzenie się zmianom wywołanym przez 6-dniową hodowlę komórek śródbłónka EA.hy926 w obecności Zol lub Ale w ich metabolizmie tlenowym na poziomie mitochondrialnym i aktywności bioenergetycznej mitochondriów. W tym celu prowadzono badania na mitochondriach izolowanych z komórek śródbłónka traktowanych 5 μ M Ale lub 1 μ M Zol.

Do tej pory nie badano zmian poziomu mtCoQ wywołanego przez N-BPs. W pracy po raz pierwszy pokazano, że poziom całkowitego mtCoQ (mtCoQH₂ + mtCoQ utleniony) w mitochondriach komórek śródbłónka traktowanych N-BPs zmniejsza się o 45-50%. Dodatkowo zauważono ~20% spadek poziomu CoQ10B, białka niezbędnego do poprawnego funkcjonowania CoQ w łańcuchu oddechowym. Zaobserwowano także całkowitą utratę zredukowanej formy mtCoQ (mtCoQH₂) pełniącej funkcję przeciwutleniacza, która w komórkach kontrolnych stanowiła ~12% całej puli mtCoQ. Utracie mtCoQH₂ towarzyszył 10-20% wzrost poziomu dysmutazy nadtlenkowej 2 (SOD2), co wskazuje na zwiększenie obrony antyoksydacyjnej w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs.

Znaczne obniżenie przez N-BPs poziomu mtCoQ oznacza niedobór ważnego przenośnika elektronów w łańcuchu oddechowym. Następnym krokiem było zatem zbadanie utleniania różnych substratów oddechowych przez mitochondria izolowane z komórek traktowanych Ale lub Zol. Eksperymenty te pokazały, że w warunkach rozpręgających, przy maksymalnej aktywności łańcucha oddechowego, szybkość zużycia tlenu podczas utleniania palmitylokarnityny rosła o ~20% w porównaniu z mitochondriami komórek kontrolnych. Towarzyszyło temu zwiększenie poziomu enzymu dehydrogenazy acetylo-CoA (ACADS), biorącej udział w początkowych etapach β -oksydacji. Obserwacje te wskazują na wzrost wykorzystania kwasów tłuszczowych jako substratów w metabolizmie tlenowym mitochondriów komórek traktowanych N-BPs. Aczkolwiek, w mitochondriach komórek

traktowanych N-BPs zaobserwowano obniżenie szybkości zużycia tlenu przy utlenianiu glutaminianu o ~13% w porównaniu do mitochondriów kontrolnych. Dodatkowo, poziom enzymu dehydrogenazy glutaminianowej (GDH), odpowiedzialnej za przekształcanie glutaminianu do α -ketoglutaranu, który włącza się do cyklu Krebsa, obniżył się o ~13%. Maksymalna szybkość zużycia tlenu podczas utleniania silnych redukujących substratów obniżała się o ~17% w przypadku jabłczanu (substratu kompleksu I), o ~25% w przypadku bursztynianu (substratu kompleksu II) i o ~21% przy użyciu mieszaniny obu substratów.

Oceniono również bioenergetyczne parametry mitochondriów śródbłonka z komórek kontrolnych i traktowanych N-BPs podczas utleniania bursztynianu (w obecności rotenonu), jabłczanu oraz mieszaniny obu substratów oddechowych w warunkach fosforylujących i niefosforylujących. Długotrwała, 6-dniowa ekspozycja komórek śródbłonka na Zol lub Ale spowodowała, że parametry sprzężenia mitochondriów tj. współczynnik ADP/O oraz współczynnik kontroli oddechowej były obniżone o 13-19%, co świadczy o zmniejszonej wydajności systemu fosforylacji oksydacyjnej. Szybkość fosforylacji ADP w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs była niższa o ~30% przy użyciu jabłczanu jako substratu oddechowego, a przy użyciu bursztynianu o ~40%. Wyniki te wskazują na znacząco zmniejszoną syntezę ATP w mitochondriach komórek śródbłonka poddanych działaniu N-BPs.

Mitochondria komórek śródbłonka hodowane w obecności N-BPs wykazały mniejszą szybkość zużycia tlenu podczas utleniania jabłczanu (~20%) jedynie w warunkach fosforylujących w porównaniu z mitochondriami komórek kontrolnych. Co więcej, podczas utleniania bursztynianu, w warunkach niefosforylujących spadek szybkości zużycia tlenu wynosił ~17%, a w warunkach fosforylujących obniżenie wynosiło ~30%. Przy zastosowaniu mieszaniny obu substratów oddechowych szybkość oddychania mitochondriów obniżyła się o ~13% w warunkach niefosforylujących i ~26% w warunkach fosforylujących. W mitochondriach komórek traktowanych Zol lub Ale, obniżeniu utleniania jabłczanu i bursztynianu w warunkach niefosforylujących towarzyszyło obniżenie mitochondrialnego potencjału błonowego ($\Delta\Psi$), szczególnie widoczne podczas utleniania bursztynianu. W warunkach fosforylujących, jedynie przy zastosowaniu bursztynianu zaobserwowano spadek $\Delta\Psi$. Zatem, mitochondria komórek śródbłonka poddanych działaniu Zol lub Ale w porównaniu do mitochondriów pochodzących z komórek kontrolnych prezentują mniejszą szybkość oddychania, mniejszy $\Delta\Psi$ i obniżoną wydajność systemu fosforylacji oksydacyjnej. Opisywane zmiany dotyczące funkcjonowania mitochondriów komórek traktowanych N-BPs były szczególnie wyraźne podczas utleniania bursztynianu w porównaniu do utleniania jabłczanu.

W mitochondriach komórek śródbłonka poddanych działaniu N-BPs produkcja H_2O_2 była wyższa w porównaniu z mitochondriami komórek kontrolnych w warunkach fosforylujących i niefosforylujących niezależnie od użytego substratu oddechowego. Produkcja H_2O_2 była szczególnie zwiększona podczas utleniania jabłczanu (~22-25%) w porównaniu do utleniania bursztynianu (~13-15%). Ponadto, w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs poziom redukcji mtCoQ (mtCoQH₂/mtCoQ całkowity) rósł o ~18% z jabłczanem i ~13% z bursztynianem. A zatem, w mitochondriach komórek śródbłonka traktowanych Zol lub Ale, wzrost produkcji mtRFT był związany z zwiększonym poziomem redukcji mtCoQ, wynikającym ze zmniejszonej puli mtCoQ.

W mitochondriach komórek kontrolnych i traktowanych N-BPs, w warunkach fosforylujących i niefosforylujących podczas utleniania jabłczanu i/lub bursztynianu, potwierdzono bezpośrednią zależność produkcji mitochondrialnych RFT (mtRFT) od poziomu redukcji mtCoQ. Wykres zależności produkcji mtRFT od $\Delta\Psi$ dla mitochondriów komórek poddanych działaniu N-BPs był przesunięty w stosunku do wykresu dla mitochondriów komórek kontrolnych w kierunku większych wartości produkcji H_2O_2 i niższych wartości $\Delta\Psi$, wskazując na hamowanie ścieżki utleniającej mtCoQH₂. Dodatkowo, aktywność kompleksu III była niższa w mitochondriach komórek traktowanych o ~20%, podczas gdy aktywność kompleksu IV pozostała taka sama. Zauważono również ~17% spadek redukcji cytochromów $a+a_3$ (wchodzących w skład kompleksu IV), co wskazuje na obniżenie poziomu hemów a , będących obok CoQ produktami szlaku mewalonowego hamowanego przez N-BPs.

Aby zrozumieć, dlaczego w mitochondriach komórek śródbłonka traktowanych N-BPs, utlenianie substratu kompleksu II powodowało silniejsze zmniejszenie oddychania i $\Delta\Psi$, ale słabszy wzrost produkcji mtRFT i poziomu redukcji mtCoQ - w porównaniu z utlenianiem substratu kompleksu I - zbadaliśmy zmiany w poszczególnych składnikach systemu fosforylacji oksydacyjnej oraz ich molekularnej organizacji. Analiza poziomów kompleksów łańcucha oddechowego pokazała ~20% spadek poziomu podjednostki SDHB (składowej kompleksu II), poziomu podjednostki Core 2 (składowej kompleksu III, CIII) i poziomu podjednostki α (składowej syntazy ATP) w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs. Poziom podjednostki NDUF8 (składowej kompleksu I, CI) i podjednostki COXII (składowej kompleksu IV, CIV) pozostał niezmienny. Dalsze eksperymenty wykazały spadek aktywności kompleksu II i syntazy ATP w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs. Aktywność kompleksu I we wszystkich jego superkompleksach pozostała niezmienną. Poziom superkompleksów obejmujących CI + CIII (I + III₂ + IV_(n) oraz I + III₂) nie zmieniał

się w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs. Natomiast poziom superkompleksu $\text{III}_2 + \text{IV}$ i dimeru III_2 zmniejszył się. Podczas badania aktywności enzymów w żelu zaobserwowano obniżenie aktywności kompleksu IV tylko w superkompleksie $\text{III}_2 + \text{IV}$. Aktywność innych superkompleksów/kompleksów związanych z kompleksem IV oraz poziom podjednostki COXII, wchodzącej w skład tego kompleksu, były niezmienione. Opisane zmiany oraz reorganizacja molekularnej struktury superkompleksów łańcucha oddechowego mogą być istotne dla efektywniejszego wykorzystania zmniejszonej puli mtCoQ wywołanej działaniem N-BPs.

Następnie zbadano czy zwiększona produkcja mtRFT w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs wpływa na mitochondrialne systemy rozpraszające energię tj. białka rozpręgające (UCP) oraz mitochondrialny kanał potasowy o dużym przewodnictwie regulowany Ca^{2+} (mitoBK_{Ca}). W mitochondriach komórek traktowanych N-BPs poziom UCP2 był o ~27% wyższy, podczas gdy poziom UCP3 nie uległ zmianie. Co więcej, poziom podjednostek kanału mitoBK_{Ca}, podjednostki porowej α i podjednostki regulacyjnej $\text{slo}\beta 2$, był niezmieniony. Badania aktywności obu systemów rozpraszających energię były zgodne z tymi obserwacjami. Nie obserwowano zmian w aktywności kanału mitoBK_{Ca} w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs w porównaniu do mitochondriów kontrolnych. Natomiast, pomiary kinetyczne wykazały zwiększoną o ~40% aktywność UCP indukowaną przez kwasy tłuszczowe i hamowaną przez GTP. Można przypuszczać, że zwiększona aktywność UCP wynikała ze zwiększonego poziomu UCP2. Podczas miareczkowania aktywności dehydrogenaz redukujących mtCoQ (kompleksów I i II), stopniowa depolaryzacja błony mitochondrialnej była związana z rosnącą wrażliwością aktywności UCP na GTP. Wyniki te potwierdzają, że niższy poziom redukcji mtCoQ prowadzi do większej inhibicji aktywności UCP przez nukleotydy purynowe. Wyniki te wskazują na to iż, w obliczu spadku poziomu mtCoQ i zwiększeniu produkcji mtRFT w mitochondriach komórek poddanych działaniu N-BPs, dochodzi do zwiększenia poziomu i aktywności UCP2, co może obniżać produkcję mtRFT w warunkach niedoboru mtCoQ.

Podsumowując, w komórkach śródbłónka poddanych działaniu Ale lub Zol, dochodzi do upośledzenia funkcjonowania mitochondrialnego łańcucha oddechowego oraz zmniejszenia wydajności fosforylacji oksydacyjnej. W mitochondriach komórek traktowanych N-BPs, zwiększony poziom redukcji mtCoQ (zwiększony stan redoks mtCoQ) prowadzi do zwiększenia produkcji mtRFT. N-BPs wywołują istotną reorganizację systemu fosforylacji oksydacyjnej oraz zwiększenie udziału utleniania kwasów tłuszczowych w mitochondriach.

Przedstawione badania stanowią pierwszy opis adaptacji bioenergetyki mitochondriów do niedoboru mtCoQ w komórkach poddanych długotrwałej ekspozycji na N-BPs.

Publikacja 3: Budzinska A, Jarmuszkiewicz W, (2025), Consequences of inhibition of mevalonate pathway by bisphosphonates at cellular and mitochondrial levels, manuskrypt wysłany (czerwiec 2025) do czasopisma *Pharmaceuticals*, w recenzji, zdeponowany w preprints.org, doi: [10.20944/preprints202506.2071.v1](https://doi.org/10.20944/preprints202506.2071.v1)

Poniżej opisano najważniejsze punkty omawiane w pracy przeglądowej bez podawania pozycji literaturowych.

Praca zbiera dotychczasową wiedzę dotyczącą bisfosfonianów (BPs) i ich wpływu na funkcjonowanie komórek i ich mitochondriów. Najnowsze doniesienia literaturowe zebrane są w poszczególne rozdziały, od historii i podziału BPs, przez mechanizm działania aż do ich wpływu na poziomie komórkowym i mitochondrialnym. Na początku opisano osteoporozę jako jednostkę chorobową, w leczeniu której powszechnie stosowane są BPs. Duży popyt na leki antyresorpcyjne doprowadził do powstawania coraz nowszych formuł oraz generacji BPs, które są coraz silniejsze oraz skuteczniejsze w leczeniu osteoporozy.

Opis budowy, jak i mechanizmu działania poszczególnych typów BPs wyjaśnia istotne różnice między nimi. Przedstawiono dwie klasy BPs: starej generacji (niezawierające azotu) oraz nowszych generacji (zawierające azot - N-BPs). Odejście od BPs starej generacji na rzecz N-BPs wynika z faktu, iż te posiadające azot wykazują większe powinowactwo do kryształów hydroksyapatytu, który w większych ilościach występuje w miejscach o dużym tempie kościogubienia.

Następnie, opisano szlak mewalonowy, który blokują N-BPs. Podrozdział ten skupia się kolejno na każdym ważniejszym produkcie szlaku i jego roli. Poznanie skutków hamowania szlaku przez N-BPs ułatwia zrozumienie szerokiego zakresu efektów ubocznych ich działanie na różne układy i narządy. Szlak mewalonowy jest kluczowym nie tylko do osiągnięcia przez osteoklasty aktywności resorpcyjnej, ale również jest niezbędny do prawidłowego funkcjonowania szeregu innych komórek. Aczkolwiek, oprócz negatywnych skutków inhibicji tego szlaku, podkreślono również potencjał terapeutyczny użycia N-BPs w przypadku leczenia nowotworów. Jednocześnie wskazano na potrzebę dopracowania formuły N-BPs, która umożliwiałaby ominięcie wysokiego powinowactwa do kości i pozwalała na terapię celowaną.

Zebrana dostępna wiedza na temat działania N-BPs na komórki łączy skutki niedoboru produktów szlaku mewalonowego z mechanizmem działania N-BPs. Opisane efekty

hamowania szlaku wpływają na funkcjonowanie całego organizmu. Oprócz obniżenia poziomu ważnego antyoksydanta, CoQ, leki te zapobiegają prenylacji białek sygnałowych, takich jak Ras czy Rho, niezbędnych do transdukcji sygnałów w komórce. Biorąc pod uwagę poszczególne produkty szlaku miewalonowego i ich rolę w procesach komórkowych, opisano negatywne działanie N-BPs poprzez hamowanie szlaku miewalonowego w zdrowych komórkach, jednocześnie wskazując potencjał leczniczy N-BPs w terapii antynowotworowej.

Badania dotyczące komórek kości dostarczają najwięcej danych o tym jak działają na nie N-BPs. Ponieważ osteoklasty stanowią główny cel terapii antyresorpcyjnej, zbadano jak N-BPs działają nie tylko na nie, ale również na komórki nadbudowujące kość (osteoblasty) oraz na komórki różnicujące do osteoklastów. Pierwsze doniesienia o hamowaniu kanałów wapniowych przez N-BPs w komórkach prekursorowych osteoklastów otwiera nowy kierunek badania skutków ubocznych tych leków.

Kolejno opisano efekty obejmują wpływ N-BPs na komórki inne niż komórki kości. Porównywanie między sobą badań opartych na różnych liniach komórkowych z potencjalnym wpływem *in vivo* jest niemożliwe, ponieważ często stężenia użyte w tych badaniach przekraczają stężenia używane w terapiach chorób kostnych. Efekt antynowotworowy N-BPs udowodniony jest przez szereg opublikowanych prac, głównie skupiających się na zmniejszeniu prenylacji białek, takich jak Ras i Rho, poprzez hamowanie szlaku miewalonowego. Zmniejszona prenylacja tych białek negatywnie wpływa na polimeryzację cytoszkieletu aktynowego w komórkach nowotworowych ale także może mieć podobny wpływ na zdrowe komórki fibroblastów czy komórki mięśni gładkich naczyń krwionośnych.

N-BPs są wydalone z organizmu przez nerki. W związku z tym, powstało wiele badań oceniających potencjalną toksyczność tych związków dla komórek nerek, głównie poprzez wywoływanie stresu oksydacyjnego i apoptozy.

Poprzez wpływ na szlak sygnałowy EGFR/Akt/PI3K, N-BPs wywołują aktywację jądrowego czynnika NF κ B, który stymuluje odpowiedź zapalną oraz apoptozę komórki. Oprócz wzrostu cytokin prozapalnych, N-BPs, poprzez zahamowanie prenylacji w wyniku blokowania szlaku miewalonowego, powodują zmniejszenie poziomu białek mających za zadanie niwelować odpowiedź zapalną.

W pracy opisano także najnowsze dane dotyczące efektów blokowania szlaku miewalonowego przez N-BPs związanych z obniżeniem poziomu CoQ w komórkach. Do niedawna, jedynie zaobserwowano obniżony poziom CoQ w surowicy kobiet w wieku

pomenopauzalnym przyjmujących N-BPs w ramach terapii antyresorpcyjnej. Publikacja naszej grupy opisuje po raz pierwszy zmiany metabolizmu tlenowego wywołane zmniejszonym poziomem CoQ w komórkach śródbłonka traktowanych N-BPs. Badania te podkreślają powiązanie obniżonego poziomu tego ważnego komórkowego przeciwutleniacza ze stresem oksydacyjnym. Wywołane przez N-BPs zmniejszenie zużycia tlenu przez komórki śródbłonka może prowadzić do zwiększonego poziomu tlenu, przyczyniając się do zwiększenia produkcji RFT i indukowania stresu oksydacyjnego.

Jak dotąd słabo poznano wpływ N-BPs na metabolizm lipidów. W wątrobie myszy karmionych dietą wysokotłuszczową, Zol zmniejszał poziom lipidów i zwiększał ekspresję genów związanych z utlenianiem kwasów tłuszczowych. W komórkach śródbłonka obserwowano wzrost utleniania palmitynianu po traktowaniu Zol lub Ale, co wskazuje na przesunięcie metabolizmu w kierunku katabolizmu kwasów tłuszczowych. Jednakże inne badania wykazały, że Zol może powodować akumulację kwasów tłuszczowych w komórkach nerkowych, co może prowadzić do nefrotoksyczności, włóknienia tkanek lub chorób nerek.

Zaburzenia autofagii są powiązane z silnym ograniczeniem prenylacji białek, co może prowadzić do aktywacji inflamasyonu i śmierci komórki. Mimo że N-BPs, jako inhibitory szlaku mewalonowego, mogą wpływać na autofagię, ich działanie w komórkach innych niż kostne jest słabo poznane. Szlak mewalonowy wspiera prenylację małych GTPaz, m.in. białek Rab, istotnych dla kontroli jakości mitochondriów, w tym ich fragmentacji i mitofagii. Dotychczas tylko jedno badanie opisuje, że N-BPs mogą wpływać na dynamikę i obrót mitochondriów. W komórkach śródbłonka traktowanych N-BPs zauważono spadek poziomu markerów fragmentacji mitochondriów przy jednoczesnym braku zmian w poziomie markerów biogenezy i fuzji mitochondriów, sugerujące ograniczoną degradację mitochondriów przez mitofagię, prawdopodobnie w wyniku osłabienia sygnalizacji ERK1/2.

N-BPs mogą obniżać poziom wapnia we krwi poprzez hamowanie resorpcji kości, co zmniejsza uwalnianie wapnia do krwiobiegu. Obecnie istnieją ograniczone dowody na to, że N-BPs zaburzają gospodarkę wapniową w innych tkankach niż kości i krew. W jednym z badań wykazano, że Ale wpływa na wewnątrzkomórkową dynamikę wapnia w kardiomiocytach w warunkach in vitro.

Następny podrozdział omawia nieliczne badania dotyczące wpływu N-BPs na poziomie mitochondrialnym. Działanie N-BPs na poziomie mitochondrialnym może wynikać z zahamowania szlaku mewalonowego i obniżenia poziomu jego produktów istotnych dla

funkcjonowania mitochondriów, takich jak hemy *a* oraz mtCoQ, a także zaburzenia mitochondrialnej homeostazy wapniowej.

Wykorzystując izolowane mitochondria, zbadano mechanizm apoptozy wywołanej przez Zol w ludzkich komórkach chłoniaka grudkowego HF28RA. Badanie to pokazało, iż Zol powodował zwiększoną przepuszczalność błony mitochondrialnej, uwolnienie cytochromu *c* do cytoplazmy, aktywację kaspazy-3 i fragmentację DNA – charakterystyczne cechy apoptozy zależnej od mitochondriów. Co ciekawe, suplementacja geranylgeraniol (GGOH), przywracająca prenylację białek, chroniła komórki chłoniaka przed apoptozą, co podkreśla znaczenie prenylowanych białek w utrzymaniu integralności mitochondriów i przeżywalności komórek.

W literaturze nie ma wielu danych dotyczących wpływu N-BPs na gospodarkę wapniową mitochondriów. Tak na przykład, w izolowanych mitochondriach komórek nerkowych, zaobserwowano zmniejszone uwalnianie wapnia z mitochondriów *in vitro* oraz zwiększenie jego poziomu *in vivo*. Natomiast etidronian (BP niezawierający azotu) wykazał działanie ochronne na nerki w warunkach niedokrwienia, prawdopodobnie poprzez zwiększoną sekwestrację wapnia w mitochondriach.

Do tej pory niewiele wiadomo było na temat zmian poziomu hemów *a* (składników niezbędnych dla funkcjonowania kompleksu IV łańcucha oddechowego) w mitochondriach w wyniku działania N-BPs. W mitochondriach komórek śródbłónka traktowanych N-BPs zaobserwowano spadek cytochromów *a* + *a*₃, co wskazuje na zmniejszoną zawartość hemów *a*, choć aktywność enzymatyczna kompleksu IV pozostała niezmienną.

Niewiele badań dotyczy wpływu N-BPs na funkcje oddechowe mitochondriów, jednak dostępne dane wskazują na ich negatywne działanie. W mitochondriach izolowanych z nerek szczurów traktowanych Zol stwierdzono spadek aktywności dehydrogenaz, depolaryzację błony mitochondrialnej, jej zwiększoną przepuszczalność i zmniejszenie poziomu ATP. W mitochondriach komórek śródbłónka poddanych działaniu N-BPs obserwowano obniżoną aktywność oddechową (z wyjątkiem zwiększonego utleniania kwasów tłuszczowych), mniejszy potencjał błonowy oraz niższą efektywność syntezy ATP. Dodatkowo wykazano reorganizację superkompleksów łańcucha oddechowego, co wskazuje na zaburzenie struktury i funkcjonowania łańcucha oddechowego przez N-BPs.

N-BPs, jako inhibitory szlaku mewalonianowego, mogą zaburzać syntezę CoQ, w tym mtCoQ – kluczowego przenośnika elektronów w łańcuchu oddechowym. Po raz pierwszy, na

przykładzie mitochondriów izolowanych z komórek śródbłónka traktowanych N-BPs wykazano, że Zol i Ale wywołują silny niedobór całkowitego mtCoQ i zanik jego zredukowanej formy (CoQH₂), pełniącej funkcję antyoksydacyjną. Towarzyszący tym zmianom wzrost ekspresji mitochondrialnych białek antyoksydacyjnych (SOD2, UCP2), nie zapobiega wzrostowi produkcji nadtlenu wodoru (H₂O₂), co wskazuje na zakłócenie równowagi redoks i nasilony stres oksydacyjny. Takie zaburzenia mogą uszkadzać mitochondria i zaburzać homeostazę komórkową, co może przyczyniać się do rozwoju chorób, m.in. sercowo-naczyniowych, neurodegeneracyjnych a także do przyspieszonego starzenia się organizmu.

Podsumowując, praca zbiera dotychczas dostępną wiedzę na temat efektów hamowania szlaku mewalonowego przez N-BPs na poziomie komórkowym i mitochondrialnym. W zależności od zastosowania tych leków, efekty te są pożądane, jak w przypadku terapii wspomagającej przy leczeniu nowotworów lub niepożądane jak podczas terapii antyresorpcyjnej pacjentów z osteoporozą. Biorąc pod uwagę proponowane użycie N-BPs przeciwko komórkom nowotworowym, zwrócono uwagę na rozwinięcie nowoczesnych rozwiązań formułacji leków, w sposób aby prezentowały jak najmniej skutków ubocznych. Jednocześnie podkreślono konieczność rozwinięcia badań nad wpływem N-BPs na komórki inne niż kości, do czego skłaniają badania potwierdzające ich negatywny wpływ na komórki śródbłónka czy nerek.

Na koniec pracy przeglądowej określono przyszłe kierunki badań, które powinny obejmować analizę dysfunkcji mitochondriów wywołanej przez N-BPs, ze szczególnym uwzględnieniem funkcjonowania łańcucha oddechowego oraz mechanizmów kontroli jakości mitochondriów. Badania te powinny dotyczyć tkanek i narządów, które są szczególnie narażone na efekty uboczne N-BPs, takie jak nerki, mięśnie szkieletowe, serce czy mózg. Szczególną uwagę należy poświęcić ocenie suplementacji CoQ jako potencjalnej strategii ochronnej mającej na celu złagodzenie wywołanych przez N-BPs uszkodzeń mitochondriów oraz zaburzeń w metabolizmie energetycznym komórki. Dalsze badania nad złożonym powiązaniem pomiędzy szlakiem mewalonowym, funkcjonowaniem mitochondriów a ogólną homeostazą komórkową będą istotne dla optymalizacji klinicznego zastosowania N-BPs i ograniczenia efektów ubocznych w tkankach niebędących celem terapii.

7. Podsumowanie wyników i wnioski

Wyniki pracy doktorskiej podkreślają rolę CoQ jako przeciwutleniacza ale również jako istotnego elementu mitochondrialnego łańcucha oddechowego. Publikacje 1 i 2 jako pierwsze wiążą hamowanie szlaku mewalonowego przez N-BPs z obniżonym poziomem CoQ, który może być jednym z czynników powodujących stres oksydacyjny i zmniejszenie żywotności komórek śródbłónka. Obniżenie poziomu całkowitego CoQ i utrata jego zredukowanej puli na poziomie komórkowym i mitochondrialnym zaburza homeostazę redoks CoQ co istotnie wpływa na wzrost produkcji RFT w komórkach traktowanych N-BPs. Zwiększeniu produkcji RFT nie zapobiega uruchomienie białek antyoksydacyjnych zarówno w cytozolu (SOD1 i GR) jak i mitochondriach (UCP2, SOD2). Na zwiększony w komórkach śródbłónka stres oksydacyjny wywołany przez N-BPs wskazują obniżony poziom HIF1 α i kilkukrotnie podwyższony poziom KDM6A, białka markerowego poziomu tlenu.

W komórkach śródbłónka hodowla w obecności N-BPs powoduje hamowanie zależnej od prenylacji ścieżki sygnałowej ERK1/2 czemu towarzyszy zwiększenie odpowiedzi zapalnej (większej dla Zol niż Ale) oraz zmiana w dynamice mitochondriów. Pomimo zwiększenia poziomu mitochondrialnych białek markerowych (CS, COX, VDAC1), wskazujących na większą ilość mitochondriów, poziom markerów biogenezy mitochondriów (PGC1 α i NRF2), pozostał bez zmian. Zmniejszenie poziomu białek markerowych fragmentacji (MFF i fosfoDRP1), przy niezmiennym poziomie białka markerowych fuzji (OPA1), wskazuje na adaptację sieci mitochondrialnej do zmienionych warunków metabolicznych wywołanych przez N-BPs. Adaptacja ta może obejmować obniżoną mitofagię na co wskazuje zahamowanie ścieżki ERK1/2, regulującej procesy dynamiki mitochondriów i zależną od mitochondriów apoptozę.

N-BPs istotnie zmieniają metabolizm tlenowy komórek śródbłónka zarówno na poziomie komórkowym, jak i mitochondrialnym. Pomimo zwiększonej pojemności oddechowej komórek (większej aktywności CS i COX), prawdopodobnie wynikającej z większej ilości mitochondriów, w komórkach traktowanych N-BPs maleje utlenianie silnych substratów oddechowych (pirogronianu i glutaminy). Co ciekawe, w komórkach traktowanych N-BPs i w izolowanych z nich mitochondriach zwiększeniu ulega utlenianie palmitynianu, co wskazuje na przekierowanie metabolizmu w kierunku utleniania kwasów tłuszczowych. Obniżeniu utleniania pozostałych substratów oddechowych na poziomie komórkowym towarzyszy obniżenie utleniania substratów kompleksów I i II w mitochondriach komórek traktowanych N-BPs. Podczas utleniania tych substratów, obniżonej szybkości zużycia tlenu i

wartości $\Delta\Psi$ towarzyszy zwiększony poziom redukcji mtCoQ prowadzący do zwiększonej produkcji mtRFT. Obniżone mitochondrialne parametry sprzężeniowe (ADP/O i współczynnik kontroli oddechowej) oraz zmniejszony komórkowy poziom ATP wskazują na zmniejszoną przez N-BPs syntezę ATP i wydajność fosforylacji oksydacyjnej.

Wywołany przez N-BPs niedobór mtCoQ jest powiązany ze zmianą poziomu i aktywności kompleksów systemu fosforylacji oksydacyjnej i jego molekularnej organizacji. W mitochondriach komórek śródbłónka traktowanych N-BPs obserwowano obniżony poziom i aktywność kompleksów II, III i syntazy ATP oraz obniżony poziom superkompleksu $III_2 + IV$. Po raz pierwszy zaobserwowano także, że N-BPs mogą zmniejszać poziom hemów *a* czemu nie towarzyszy jednak obniżona maksymalna aktywność kompleksu IV.

Po raz pierwszy badano wpływ N-BPs na metabolizm energetyczny i aktywność bioenergetyczną mitochondriów w komórkach i izolowanych mitochondriach śródbłónka. Konsekwencje metaboliczne i energetyczne indukowane przez N-BPs, na poziomie komórkowym i mitochondrialnym w komórkach innych niż kostne, nie były dotąd szeroko badane, co opisuje praca przeglądowa (Publikacja 3).

Przedstawione rozprawie doktorskiej badania na komórkach śródbłónka pozwalają sformułować następujące wnioski końcowe:

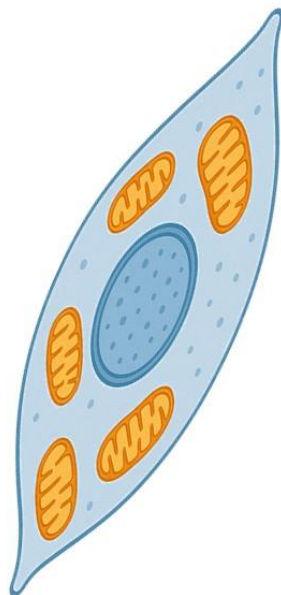
1. Badania stanowiące podstawę rozprawy doktorskiej podkreślają rolę mitochondriów w odpowiedzi komórek śródbłónka na N-BPs, powszechne leki antyresorpcyjne.
2. N-BPs wywołują adaptację metabolizmu tlenowego komórek śródbłónka obejmującą zmiany w utlenianiu substratów energetycznych.
3. Wywołane przez N-BPs zmiany w homeostazie redoks CoQ na poziomie komórkowym i mitochondrialnym prowadzą do zwiększonej produkcji RFT. Zmiany te obejmują zanik zredukowanej puli CoQ, pełniącej funkcję antyoksydacyjną, a także zwiększenie poziomu redukcji mtCoQ (stanu redoks mtCoQ), bezpośrednio związanego z produkcją mtRFT.
4. Zwiększona przez N-BPs produkcja RFT może być czynnikiem stymulującym adaptację metabolizmu tlenowego komórek śródbłónka towarzyszącą stresowi oksydacyjnemu.
5. Zahamowanie szlaku mewalonowego przez N-BPs, prowadzące do obniżenia poziomu CoQ i hemów *a* oraz do zmian w dynamice mitochondriów, może wywoływać dysfunkcję mitochondriów.

6. Obniżenie produkcji ATP i zaburzenie funkcjonowania łańcucha oddechowego mogą być istotnym elementem cytotoksycznego działania N-BPs na komórki śródbłónka.

Wpływ N-BPs na komórki śródbłónka

Poziom komórkowy:

- ↓ żywotność komórek
- ↑ stan zapalny
- ↓ szlak sygnalizacyjny ERK 1/2
- ↓ poziom ATP
- ↑ produkcja RFT
- ↓ poziom całkowitego CoQ, utrata CoQH₂
- Zmiana dynamiki mitochondriów:
 - ↓ fizja, ↔ fuzja, ↑ ilość mitochondriów
- ↑ pojemność oddechowa
- Adaptacje metabolizmu tlenowego:
 - ↑ utlenianie kw. tłuszczowych i glukozy
 - ↓ utlenianie glutaminy i pirogronianu



Poziom mitochondrialny:

- ↓ poziom całkowitego mtCoQ, utrata mtCoQH₂
- ↓ utlenianie większości substratów oddechowych
- ↑ utlenianie kwasów tłuszczowych
- ↓ szybkość oddychania, $\Delta\Psi$, parametry sprzężenia
- ↑ produkcja mtRFT, poziom redukcji mtCoQ
- ↑ poziom UCP2, ↔ mitoBK_{Ca}
- ↑ SOD2
- ↓ poziom hemów *a*
- Zmiana aktywności i organizacji łańcucha oddechowego

Schemat podsumowujący wyniki opisane w publikacjach doświadczalnych składających się na rozprawę doktorską

8. Oświadczenia autora oraz współautorów publikacji składających się na rozprawę doktorską



Poznań, 16.06.2025

Adrianna Budzińska
Laboratorium Biochemii Mitochondriów
Zakład Bioenergetyki
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Oświadczenie określające wkład w powstanie artykułu

1. The bisphosphonates alendronate and zoledronate induce adaptations of aerobic metabolism in permanent human endothelial cells (2023) *Scientific Reports* 13(1), DOI:10.1038/s41598-023-43377-3

Budzińska A., Galganski L., Jarmuszkiewicz W.

Udział doktorantki w badaniach opisanych w tej publikacji obejmował:

- uczestniczenie w przygotowaniu koncepcji badań;
- przygotowanie homogenatów i izolację mitochondriów;
- przeprowadzenie pomiarów zużycia tlenu, ilości i poziomu redukcji koenzymu Q, produkcji RFT, poziomu ATP, aktywności enzymów;
- uczestniczenie w immunodetekcji białek;
- analizę danych, udział w przygotowaniu tekstu i rysunków manuskryptu.

2. Adaptation of mitochondrial bioenergetic activity associated with coenzyme Q deficiency in human endothelial cells after chronic exposure to bisphosphonates, alendronate and zoledronate (2025) *Scientific Reports* 15, DOI: 10.1038/s41598-025-02710-8

Budzińska A., Galganski L., Wojcicki K., Jarmuszkiewicz W.

Udział doktorantki w badaniach opisanych w tej publikacji obejmował:

- uczestniczenie w przygotowaniu koncepcji badań;
- przygotowanie homogenatów i izolację mitochondriów;
- przeprowadzenie pomiarów zużycia tlenu, potencjału błonowego, ilości i poziomu redukcji koenzymu Q, produkcji H₂O₂, redukcji cytochromu a + a₃;
- uczestniczenie w immunodetekcji białek;
- analizę danych, udział w przygotowaniu tekstu i rysunków manuskryptu;



3. Consequences of inhibition of mevalonate pathway by bisphosphonates at cellular and mitochondrial levels, manuskrypt gotowy do wysłania

Budzinska A., Jarmuszkiewicz W.

Udział doktorantki w badaniach opisanych w tej publikacji obejmował:

- zebranie danych literaturowych i napisanie pierwszej wersji manuskryptu.

*Adrianna
Budzinska*.....

mgr. inż. Adrianna Budzińska



Poznań, 04.06.2025

Dr Łukasz Gałgański
Laboratorium Biochemii Mitochondriów
Zakład Bioenergetyki
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Oświadczenie określające wkład w powstanie artykułu

Oświadczam, że mój wkład w powstanie wymienionych artykułów:

1. The bisphosphonates alendronate and zoledronate induce adaptations of aerobic metabolism in permanent human endothelial cells (2023) *Scientific Reports* 13(1), DOI:10.1038/s41598-023-43377-3
Budzińska A., Gałgański L., Jarmuszkiewicz W.
2. Adaptation of mitochondrial bioenergetic activity associated with coenzyme Q deficiency in human endothelial cells after chronic exposure to bisphosphonates, alendronate and zoledronate (2025) *Scientific Reports* 15, DOI: 10.1038/s41598-025-02710-8
Budzińska A., Gałgański L., Wojcicki K., Jarmuszkiewicz W.

polegał na uczestniczeniu w wykonaniu analizy immunologicznej, BN-PAGE i pomiarze aktywności enzymów w żelu (in-gel activity) oraz opracowaniu wyników tych doświadczeń.

Łukasz Gałgański



Krzysztof Wójcicki
Zakład Bioenergetyki
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
Poznań

Poznań 30.05.2025

Oświadczenie określające wkład w powstanie artykułu

Niniejszym oświadczam, że mój wkład w powstanie artykułu: Budzinska A, Galganski L, Wojcicki K, Jarmuszkiewicz W, Adaptation of mitochondrial bioenergetics to coenzyme Q deficiency in human endothelial cells after chronic exposure to bisphosphonates. *Scientific Reports* DOI : 10.1038/s41598-025-02710-8 polegał na uczestniczeniu w zbieraniu komórek i izolacji mitochondriów oraz pomocy w badaniach funkcjonalnych.

Wójcicki



Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz
Laboratorium Biochemii Mitochondriów
Zakład Bioenergetyki
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
ul. Uniwersytetu Poznańskiego 6
61-614 Poznań

Poznań, 16.06.2025

Oświadczenie określające wkład w powstanie artykułów

Oświadczam, że mój wkład w powstanie wymienionych artykułów polegał na:

1. The bisphosphonates alendronate and zoledronate induce adaptations of aerobic metabolism in permanent human endothelial cells (2023) *Scientific Reports* 13(1), DOI:10.1038/s41598-023-43377-3
Budzińska A., Galganski L., Jarmuszkiewicz W.
 - przygotowaniu koncepcji badań;
 - przygotowaniu manuskryptu;
 - opiece merytorycznej oraz finansowaniu badań poprzez kierowany przeze mnie projekt NCN.
2. Adaptation of mitochondrial bioenergetic activity associated with coenzyme Q deficiency in human endothelial cells after chronic exposure to bisphosphonates, alendronate and zoledronate (2025) *Scientific Reports* 15, DOI: 10.1038/s41598-025-02710-8
Budzińska A., Galganski L., Wojcicki K., Jarmuszkiewicz W.
 - przygotowaniu koncepcji badań;
 - przygotowaniu manuskryptu;
 - opiece merytorycznej oraz finansowaniu badań poprzez kierowany przeze mnie projekt NCN.
3. Consequences of inhibition of mevalonate pathway by bisphosphonates at cellular and mitochondrial levels, manuskrypt gotowy do wysłania
Budzińska A., Jarmuszkiewicz W.
 - krytycznym czytaniu manuskryptu i jego przygotowaniu.

Prof. dr hab. Wiesława Jarmuszkiewicz

9. Kopie publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

Publikacja 1:

Budzinska A, Galganski L, Jarmuszkiewicz W, (2023), The bisphosphonates alendronate and zoledronate induce adaptations of aerobic metabolism in permanent human endothelial cells, *Scientific Reports*, 13(1), (IF_{5y} 4,3), doi: [10.1038/s41598-023-43377-3](https://doi.org/10.1038/s41598-023-43377-3)

[Supplementary Figure S1](#)

[Supplementary Figure S2](#)

[Supplementary Figure S3](#)

[Supplementary Figure S4](#)

[Supplementary Figure S5a](#)

[Supplementary Figure S5b](#)

Publikacja 2:

Budzinska A, Galganski L, Wojcicki K, Jarmuszkiewicz W, (2025), Adaptation of mitochondrial bioenergetic activity associated with coenzyme Q deficiency in human endothelial cells after chronic exposure to bisphosphonates, alendronate and zoledronate, *Scientific Reports*, 15, (IF_{5y} 4,3), doi: [10.1038/s41598-025-02710-8](https://doi.org/10.1038/s41598-025-02710-8)

[Supplementary material](#)

Publikacja 3:

Budzinska A, Jarmuszkiewicz W, (2025), Consequences of inhibition of mevalonate pathway by bisphosphonates at cellular and mitochondrial levels, manuskrypt wysłany (czerwiec 2025) do czasopisma *Pharmaceuticals*, w recenzji, zdeponowany w preprints.org, doi: [10.20944/preprints202506.2071.v1](https://doi.org/10.20944/preprints202506.2071.v1)

10. Dodatek - publikacje niewchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Dominiak K, Galganski L, **Budzinska A**, Woyda-Ploszczyca A, Zoladz J, Jarmuszkiewicz W (2022) Effects of Endurance Training on the Coenzyme Q Redox State in Rat Heart, Liver, and Brain at the Tissue and Mitochondrial Levels: Implications for Reactive Oxygen Species Formation and Respiratory Chain Remodeling, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 2, (IF_{5y} 5,6)

Kciuk M, Gielecinska A, **Budzinska A**, Mojzych M, Kontek R (2022) Metastasis and MAPK Pathways, *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 7, (IF_{5y} 5,6)

Jarmuszkiewicz W, Dominiak K, **Budzinska A**, Wojcicki K, Galganski L (2023) Mitochondrial Coenzyme Q Redox Homeostasis and Reactive Oxygen Species Production, *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 28, 3, (IF_{5y} 3,6)

Fuchs H, Malecka A, **Budzinska A**, Jarmuszkiewicz W, Ciszewska L, Staszak A, Kijowska-Oberc J, Ratajczak E (2023) High-throughput method for Oxygen Consumption Rate measurement (OCR) in plant mitochondria, *BMC Plant Biology*, 23, 1, (IF_{5y} 5,2)

Wojcicki K, **Budzinska A**, Jarmuszkiewicz W (2024) Effects of Atorvastatin and Simvastatin on the Bioenergetic Function of Isolated Rat Brain Mitochondria, *International Journal of Molecular Sciences*, 25, 15, (IF_{5y} 5,6)

Dominiak K, Galganski L, **Budzinska A**, Jarmuszkiewicz W (2024) Coenzyme Q deficiency in endothelial mitochondria caused by hypoxia; remodeling of the respiratory chain and sensitivity to anoxia/reoxygenation, *Free Radical Biology and Medicine*, 214, (IF_{5y} 7,9)