

**Medical University of Bialystok**  
**Faculty of Pharmacy**  
**with the Division of Laboratory of Medicine**



**Joanna Sutkowska-Skolimowska**

**The effect of rosemary and lemon balm extracts and rosmarinic acid  
on collagen type I metabolism in fibroblasts from Osteogenesis  
Imperfecta patients**

Doctoral dissertation based on a series of scientific publications

in the field of medical and health sciences

*the discipline of pharmaceutical sciences*

Bialystok 2022

**Promoter**

**Dr hab. n. med. Anna Galicka**

Department of Medical Chemistry,

Medical University of Bialystok,

15-222 Bialystok

## STRESZCZENIE

Osteogenesis imperfecta (OI) to dziedziczna choroba tkanki łącznej objawiająca się głównie defektami układu kostnego (łamliwość kości, deformacje szkieletu, obniżona gęstość mineralna kości, niski wzrost), ale także szeregiem objawów pozaszkieletowych, takich jak niebieska twardówka, zaburzenia słuchu, kruchość skóry, wiotkość stawów, osłabienie mięśni, nieprawidłowości zębów (dentinogenesis imperfecta), wady sercowo-oddechowe i upośledzenie czynności płuc. Częstość występowania OI szacuje się na 1 na 15 000 do 20 000 żywych urodzeń. Mechanizmy molekularne leżące u podstaw choroby są również złożone. Zdecydowana większość przypadków (85-90%) jest spowodowana dominującymi mutacjami w genach *COL1A1* i *COL1A2* kodujących kolagen typu I. Klasyfikacja OI spowodowanej mutacjami kolagenu typu I obejmuje cztery klinicznie zdefiniowane typy, których fenotyp waha się od łagodnego niedeformującego typu I, umiarkowanego typu IV, ciężkiego deformującego typu III do śmiertelnego typu II. Wiele innych mutacji recesywnych występujących w genach niekolagenowych koduje białka zaangażowane w biosyntezę kolagenu typu I, modyfikacje, kontrolę jakości, sekrecję kolagenu oraz różnicowanie osteoblastów i mineralizację kości.

Mutacje genów kolagenu typu I, w zależności od typu, mogą powodować ilościowe lub strukturalne defekty kolagenu typu I. Spadek biosyntezy strukturalnie prawidłowego kolagenu typu I w OI typu I jest spowodowany brakiem ekspresji allelu *COL1A1* z powodu przedwcześnie wprowadzonego kodonu stop. Przyczyną ciężkich postaci choroby są głównie podstawienia reszt glicyny innym aminokwasem (80%) i są definiowane jako dominujące negatywne. Zmutowany kolagen jest wydzielany do ECM, ale również gromadzi się wewnątrz komórki, co może powodować związany z fenotypem stres ER. Komórka może aktywować UPR i poprawić konformację zmutowanego kolagenu lub przeznaczyć do degradacji najczęściej poprzez szlak autofagii lub ERAD. Podczas przewlekłego stresu ER promuje apoptozę komórek.

Obecnie stosowane leczenie antyresorpcyjne polega głównie na podawaniu bisfosfonianów. Wiele różnych podejść pozostaje eksperymentalnych. Według najnowszych doniesień dużym zainteresowaniem cieszy się 4-PBA, którego celem molekularnym jest stres ER wywołany wewnątrzkomórkową akumulacją zmutowanego kolagenu.

W badaniu tym postawiono hipotezę, że ekstrakty z rozmarynu (*Rosmarinus officinalis* L.) i melisy (*Melissa officinalis* L.) oraz kwas rozmarynowy jako jeden z ich głównych składników, które przyciągają szczególną uwagę farmaceutów ze względu na ich wysoki potencjał terapeutyczny, mogą poprawić ilościowy defekt prawidłowego kolagenu typu I w OI

typu I i/lub zminimalizować akumulację zmutowanego kolagenu w fibroblastach OI typu II i III z podstawieniami glicyny w łańcuchu  $\alpha 1(I)$ .

RE i LBE w stężeniach 0,1, 1 i 10  $\mu\text{g/ml}$  oraz RA w stężeniach 0,1, 1 i 10  $\mu\text{M}$  znacząco zmniejszyły lub całkowicie wyeliminowały ilościowy defekt kolagenu typu I w fibroblastach OI typu I poprzez stymulujący wpływ na biosyntezę kolagenu i hamujący wpływ na aktywność MMP (MMP-1, MMP-2 i MMP-9).

RE w stężeniach 50 i 100  $\mu\text{g/ml}$  istotnie obniżał poziom nagromadzonego zmutowanego kolagenu typu I w fibroblastach pacjentów z ciężką postacią OI typu III i śmiertelną OI typu II poprzez indukcję autofagii. O aktywacji tego procesu świadczy wzrost stosunku LC3-II/LC3-I i degradacja p62 oraz lokalizacja kolagenu typu I we frakcji lizosomalnej i jego kolokalizacja z markerami autofagii (LC3-II) i lizosomu (LAMP2A) za pomocą konfokalnej mikroskopii fluorescencyjnej. Indukowany przez RE spadek wewnątrzkomórkowej akumulacji zmutowanego kolagenu typu I był związany ze spadkiem ekspresji białek UPR, co sugeruje złagodzenie stresu komórkowego. Zostało to potwierdzone przez znaczne obniżenie poziomu ekspresji markerów proapoptotycznych (Bax, CHOP i aktywnej kaspazy 3) pod wpływem RE.

RE, pomimo częściowego zahamowania aktywności proteasomu, zwiększał również degradację niesfałdowanych łańcuchów prokolagenowych w komórkach OI z mutacją w C-propeptydzie, natomiast nie wpływał na poziom całkowitego białka w lizatach. Uzyskane wyniki ujawniają nowe klinicznie istotne właściwości RA i ekstraktów (RE i LBE), które mogą mieć pewne implikacje w terapii OI, ale muszą zostać potwierdzone w przyszłych eksperymentach *in vivo*.