

## STRESZCZENIE

Niewydolność serca (NS) jest schorzeniem o złym rokowaniu, pochłaniającym olbrzymie koszty w systemach opieki zdrowotnej krajów rozwiniętych. Pomimo postępów w stosowaniu nowoczesnych metod leczenia, wciąż wielu pacjentów rozwija zaawansowaną niewydolność serca cechującą się m.in. poważną nietolerancją wysiłku oraz znacznymi zaburzeniami metabolicznymi. Istotny element patofizjologii NS stanowi dysfunkcja mięśni, zarówno sercowego jak i mięśni szkieletowych. Istnieją przesłanki, iż powstające na poziomie molekularnym zaburzenia skutkują nieprawidłowym metabolizmem energetycznym, ze znacznym ograniczeniem przemian tlenowych. Warto wspomnieć, iż ograniczenie metabolizmu tlenowego w kardiomiocytach i miocytach szkieletowych przedstawia wytwarzanie energii z fosforylacji oksydacyjnej na mniej wydajną beztlenową glikolizę, co prowadzi do wzrostu produkcji mleczanów.

Żelazo jest pierwiastkiem kluczowym dla tlenowego metabolizmu energetycznego kardiomiocytów i miocytów szkieletowych, biorącym udział w magazynowaniu tlenu oraz wchodzącym w skład aż 4 z 5 mitochondrialnych kompleksów zaangażowanych w proces fosforylacji oksydacyjnej. Dzięki możliwości swobodnego przechodzenia pomiędzy dwoma stopniami utlenienia ( $Fe^{2+} \leftrightarrow Fe^{3+}$ ) mikroelement ten umożliwia zachodzenie reakcji redoks prowadzących do wydajnej produkcji ATP. Dane kliniczne wskazują na częste współwystępowanie niedoboru żelaza (ID, z ang. *iron deficiency*) u pacjentów z NS i jego związek ze zwiększoną śmiertelnością u tych pacjentów. Z drugiej strony suplementacja żelaza jest związana z poprawą zarówno objawów, jak i wydolności wysiłkowej u chorych z niewydolnością serca. Jednakże pomimo danych sugerujących wpływ ID na pogarszanie się funkcji mitochondriów w mięśniu sercowym, czy też ukazujących, iż niedobór żelaza towarzyszy męczliwości mięśni i nietolerancji wysiłku u pacjentów z NS, wciąż niejasne są patomechanizmy tłumaczące te obserwacje.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu zarówno zredukowanej, jak i zwiększonej dostępności żelaza na geny zaangażowane w ścieżki metabolizmu tlenowego i beztlenowego w pierwszorzędowych kardiomiocytach ludzkich hodowanych w warunkach imitujących pracę mięśnia sercowego. Ponadto celem było opisanie potencjalnych wspólnych patomechanizmów molekularnych niekorzystnego wpływu niedoboru żelaza na osłabiony metabolizm energetyczny mięśni szkieletowych obserwowany w chorobach przewlekłych, takich jak niewydolność serca, przewlekła obturacyjna choroba płuc czy cukrzyca typu II.

W publikacji „**Iron depletion affects genes encoding mitochondrial electron transport chain and genes of non-oxidative metabolism, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase, in primary human cardiac myocytes cultured upon mechanical stretch**” (*Cells*. 2018 Oct; 7(10):

**175)** badania wykonano na modelu pierwszorzędowych kardiomiocytów ludzkich, które hodowano przez 48 godzin: 1) w warunkach stacjonarnych bądź 2) w warunkach pracy mechanicznej, przy zredukowanym, optymalnym lub zwiększonym stężeniu żelaza w środowisku hodowlanym. Analizie poddano ekspresję podjednostek mitochondrialnych kompleksów enzymatycznych (kompleksy I-V) oraz enzymów metabolizmu beztlenowego, kinazy pirogronianowej (PKM2) i dehydrogenazy mleczanowej (LDHA) zarówno na poziomie mRNA (qRT-PCR), jak i białka (Western Blotting). Oceniono również stężenie mleczanów wydzielanych do medium hodowlanego.

Obniżone stężenie żelaza w warunkach stresu mechanicznego spowodowało zmniejszenie ekspresji kompleksów I-V (wszystkie  $p < 0.05$ ). Ekspresja PKM2 oraz LDHA, jak również stężenie mleczanów w medium hodowlanym, były podwyższone we wspomnianych warunkach (wszystkie  $p < 0.05$ ). Kardiomiocyty wystawione na zwiększone stężenie żelaza podczas wysiłku mechanicznego wykazywały zredukowaną ekspresję kompleksów mitochondrialnych I-V (wszystkie  $p < 0.05$ ), jednakże spadek był mniejszy niż w przypadku zastosowania chelatora żelaza (wszystkie  $p < 0.01$ ). Podwyższone stężenie żelaza w medium hodowlanym spowodowało zmniejszenie ekspresji LDHA ( $p < 0.05$ ), przy czym nie wpłynęło na zewnątrzkomórkową sekrecję mleczanów.

Podsumowując, w pracy wykazano, iż w pracujących kardiomiocytach ludzkich niedobór żelaza wywiera bardziej niekorzystny efekt niż zwiększone stężenie tego mikroelementu zarówno na geny metabolizmu tlenowego, jak i na produkcję mleczanów. Co więcej, podwyższone stężenie żelaza w środowisku hodowlanym pracujących kardiomiocytów zdaje się posiadać pewne właściwości protekcyjne w kontekście genów metabolizmu beztlenowego, nie wpływając przy tym na zewnątrzkomórkową sekrecję mleczanów.

W pracy „**Iron deficiency as energetic insult to skeletal muscle in chronic diseases**” (J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2018 Oct; 9(5): 802–815) opisano potencjalne patomechanizmy molekularne prowadzące do osłabienia przemian tlenowych metabolizmu energetycznego mięśni szkieletowych, co jest obserwowane u pacjentów z chorobami przewlekłymi takimi jak niewydolność serca, przewlekła obturacyjna choroba płuc oraz cukrzyca typu II. Podkreślono, iż patomechanizmy na poziomie komórkowym występujące w wymienionych chorobach są podobne. Zwrócono również uwagę na fakt częstego współwystępowania u tych chorych niedoboru żelaza, który poprzez opisane patomechanizmy wywiera niekorzystny wpływ na maszynię molekularną metabolizmu tlenowego i jako istotny czynnik może przyczyniać się do pogorszenia energetyki mięśni szkieletowych i miopatii szkieletowej obserwowanej w niewydolności serca, przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc i cukrzycy typu II.

Otrzymane wyniki w znacznym stopniu przyczyniły się do rozwoju wiedzy na temat wpływu zmiennej dostępności żelaza na geny metabolizmu tlenowego i beztlenowego w kardiomiocytach ludzkich hodowanych w warunkach imitujących pracę serca. Niniejsza rozprawa rzuca również

światło na kluczową rolę niedoboru żelaza w osłabionym metabolizmie energetycznym mięśni szkieletowych, który w istotny sposób przyczynia się do miopatii szkieletowej obserwowanej u pacjentów z niewydolnością serca, przewlekłą obturacyjną chorobą płuc oraz cukrzycą typu II. Rezultaty niniejszej pracy doktorskiej mogą stanowić uzasadnienie molekularne prowadzenia dożylniej terapii żelazem u chorych z niewydolnością serca i współistniejącym niedoborem żelaza.

## SUMMARY

Carrying substantial mortality and cost-consuming heart failure (HF) represents a considerable challenge to health-care systems in developed countries. Importantly, although many advances in the availability and application of modern algorithms of HF management have been reached, the proportion of patients continue to develop the advanced stage of disease with i.a. dramatically reduced exercise tolerance and marked metabolic derangements. Cardiac and skeletal muscle dysfunction constitutes an important pathophysiological feature of HF that significantly contributes to debilitating symptomatology of this syndrome. There are premises that derangements that occur at molecular level result in impaired energy metabolism with significant limitation of aerobic pathway. It is worth of mentioning that restriction of aerobic metabolism shifts the cardiac and skeletal muscle energy production towards less favourable anaerobic glycolysis which results mostly in lactate production.

Iron is presumed to be fundamental to aerobic metabolism of cardiac and skeletal myocytes in the context of both efficient oxygen storage and an undisturbed functioning of 4 mitochondrial enzymes involved in oxidative phosphorylation. Due to the existence of iron in two interchangeable oxidative states ( $\text{Fe}^{2+} \leftrightarrow \text{Fe}^{3+}$ ), it constitutes an indispensable co-factor for the sequential oxidation-reduction reactions which yield in oxidative production of ATP. Data from clinical studies indicates that iron deficiency (ID) constitutes a frequent co-morbid condition in patients with chronic heart failure (HF) and is associated with higher mortality rates in these patients. On the other hand, iron supplementation improves symptoms and exercise capacity in HF patients. However, although there are data both on the unfavourable effects of ID on cardiac mitochondria and indicating that muscle fatigue and exercise intolerance in patients with HF is assisted by ID, the precise mechanisms of these clinical findings remain unclear.

The aim of this work was to investigate the influence of either reduced or increased iron availability on the expression of genes involved in oxidative and non-oxidative metabolic pathways in primary human cardiac myocytes cultured in the conditions that mimic the physiological work of the heart. Further, the doctoral thesis was aiming in proposing the common molecular pathomechanisms of unfavourable effects of iron deficiency on decreased skeletal muscle energy metabolism seen in chronic diseases such as heart failure, chronic obstructive pulmonary disease or type II diabetes.

The experiments presented in paper „**Iron depletion affects genes encoding mitochondrial electron transport chain and genes of non-oxidative metabolism, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase, in primary human cardiac myocytes cultured upon mechanical stretch**” (Cells. 2018 Oct; 7(10): 175) were performed on the *in vitro* model of primary human cardiomyocytes cultured for 48 hours: 1) in static conditions; 2) upon mechanical stretch; at the optimal versus reduced versus increased iron concentration. The analysis of both subunits of mitochondrial complexes (I-V) and enzymes of non-oxidative metabolism, pyruvate kinase (PKM2) and lactate dehydrogenase (LDHA) was carried out at mRNA (qRT-PCR) and protein (Western Blotting) level. The concentration of lactates secreted to the culture media was also assessed.

Reduced iron concentration during mechanical work caused a decreased expression of complexes I-V (all  $p < 0.05$ ). The expression of PKM2 and LDHA as well as the medium concentration of lactates were increased in those conditions (both  $p < 0.05$ ). HCM exposed to increased iron concentration during mechanical effort demonstrated a decreased expression of mitochondrial complexes (all  $p < 0.01$ ), however, a decrement was smaller than in case of iron chelation ( $p < 0.05$ ). Iron-enriched medium caused a decrease in expression of LDHA and did not influence the extracellular secretion of lactates.

In conclusion, it was demonstrated that, in working human cardiac myocytes, ID has a more negative impact on both the genes of oxidative metabolism and lactate production than increased iron availability. Moreover, the iron-enriched environment seems to have some protective properties for working cardiomyocytes illustrated by an influence on intracellular protein machinery of non-oxidative metabolism with no effect on the extracellular lactate concentration.

The review „**Iron deficiency as energetic insult to skeletal muscle in chronic diseases**” (J Cachexia Sarcopenia Muscle. 2018 Oct; 9(5): 802–815) indicated the possible molecular pathomechanisms leading to the loss of oxidative capacity seen in skeletal muscle in patients with chronic diseases such as heart failure, chronic obstructive pulmonary disease (COPD) and type II diabetes (T2DM). It was emphasized that pathomechanisms that occur at cellular level in these syndromes are similar. Further, the close attention was paid to frequent concomitance of ID in HF, COPD and T2DM patients which through the described mechanisms may exert unfavourable effects on oxidative metabolism, thus significantly contributes to the deterioration of muscle energetics and skeletal myopathy observed in HF, COPD and T2DM.

The obtained results significantly expand the knowledge on the influence of different iron availability on genes of oxidative and non-oxidative metabolism in human cardiac myocytes cultured in the conditions that mimic the work of the heart. The present doctoral thesis highlights the crucial role of iron deficiency in decreased skeletal muscle energy metabolism which significantly contributes to skeletal myopathy observed in patients with heart failure, chronic obstructive pulmonary disease

and type 2 diabetes mellitus. These findings may serve as a molecular substantiation of beneficial effects of iron therapy reported in patients with heart failure and concomitant iron deficiency.