

STRESZCZENIE

Niewydolność serca (NS), jest schorzeniem o złym rokowaniu oraz stanowi jedno z większych wyzwań, zarówno zdrowotnych, jak i społeczno-ekonomicznych, jakie stoją przed współczesną cywilizacją. Istotnym elementem patofizjologii tej choroby są zaburzenia strukturalne na poziomie komórkowym oraz makroskopowym zachodzące zarówno w mięśniu sercowym jak i w mięśniach szkieletowych. Skutkują one niezdolnością do poprawnego funkcjonowania mięśnia sercowego jako pompy a także swoistej miopatii szkieletowej prowadzącej do poważnej nietolerancji wysiłku. W obliczu wysokiej chorobowości na NS, szczególne znaczenie mają badania dotyczące nowych, celowanych terapii ukierunkowanych na poprawę jakości życia i zmniejszenie kardynalnych objawów tej choroby.

Żelazo, będąc kofaktorem licznych białek oraz enzymów, jest zaangażowane w wiele niezbędnych dla przeżycia procesów komórkowych takich jak metabolizm energetyczny, obrona antyoksydacyjna czy transport i magazynowanie tlenu. W związku z tym, zarówno nadmiar jak i niedobór żelaza (ID, ang. iron deficiency) prowadzą do zaburzeń strukturalnych oraz funkcjonalnych w różnych typach komórek. Co istotne, optymalny poziom dostępności żelaza jest szczególnie krytyczny dla poprawnego funkcjonowania komórek o wysokim zapotrzebowaniu energetycznym, w tym w szczególności dla budujących mięsień sercowy kardiomiocytów oraz miocytów budujących mięśnie szkieletowe. Dane kliniczne wykazują, że współwystępowanie ID u pacjentów z NS jest bardzo częste i wiąże się z zaburzoną funkcją mięśnia sercowego, zwiększoną męczliwością mięśni szkieletowych oraz pogorszoną tolerancją wysiłku, niezależnie od współistniejącej niedokrwistości. Dodatkowo wykazano, że dożylna suplementacja żelazem pacjentów z NS i współistniejącym ID skutkuje poprawą zarówno objawów, jak i wydolności wysiłkowej. Jednakże mechanizmy stojące zarówno za szkodliwym wpływem ID jak i korzystnym efektem suplementacji żelazem u chorych pozostają w dużej mierze niejasne.

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu zarówno ograniczonego, jak i zwiększonego dostępu miocytów szkieletowych do żelaza na ich morfologię, strukturę oraz ekspresję genów zaangażowanych w proces atrofii mięśniowej w warunkach hipoksji imitujących niedotlenienie występujące w patofizjologii NS. Ponadto celem niniejszej rozprawy było opisanie patologicznych zmian strukturalnych oraz funkcjonalnych zachodzących w mięśniu sercowym w

warunkach niedoboru żelaza w oparciu o dane kliniczne i modele eksperymentalne, a także omówienie potencjalnych patomechanizmów stojących za nimi.

W publikacji oryginalnej „**Iron limitation promotes the atrophy of skeletal myocytes, whereas iron supplementation prevents this process in the hypoxic conditions**” (*Int J Mol Med.* 2018 May;41(5):2678-2686) badania wykonano *in vitro* na modelu szczurzych miocytów szkieletowych (L6G8C5), które hodowano przez 48 godzin: 1) w warunkach normoksji bądź 2) w warunkach hipoksji, przy zredukowanym, optymalnym lub zwiększonym stężeniu żelaza w środowisku hodowlanym. Analizie poddano poziom wewnątrzkomórkowego stężenia żelaza oraz oceniono morfologię komórek. Ponadto zmierzono ekspresję specyficznych markerów atrofii mięśniowej (*Atrogina-1* oraz *MuRF1*), genu związanego z równowagą pomiędzy atrofią a hipertrofią (*SMAD4*), a także budującej filamenty pośrednie typu III w miocytach szkieletowych *desminy*, zarówno na poziomie mRNA (RT-qPCR), jak i białka (Western Blotting oraz znakowanie immunocytochemiczne). Komórki hodowane w warunkach niedoboru żelaza charakteryzowały się zmienioną, atroficzną morfologią a także znacząco podwyższonym poziomem ekspresji markerów atrofii mięśniowej (*Atrogina-1* oraz *MuRF1*) zarówno w warunkach normoksji jak i hipoksji (wszystkie $P < 0.05$), wskazując na aktywację szlaku ubiquitynowo-proteasomowego związanego z degradacją białek podczas atrofii mięśniowej. Obniżona dostępność żelaza połączona z warunkami niedotlenienia spowodowała również spadek ekspresji *SMAD4* ($P < 0.001$), sugerując zmiany w homeostazie komórek prowadzące do atrofii. Miocyty szkieletowe wystawione na zwiększone stężenie żelaza podczas hipoksji wykazywały się odwrotną tendencją prowadzącą do obniżonej ekspresji obu markerów atrofii (wszystkie $P < 0.05$). Poziom ekspresji *desminy* był zwiększony w przypadku zarówno zwiększonego jak i zmniejszonego stężenia żelaza, jednakże jej nadekspresja była największa w przypadku łączonych warunków niedoboru żelaza z hipoksją (wszystkie $P < 0.05$). Co więcej, zwiększona ekspresja *Atroginy-1* oraz *MuRF1* w warunkach hipoksji była związana ze zwiększoną ekspresją *receptora transferyny 1*, odzwierciedlającego zwiększone zapotrzebowanie komórek na żelazo (odpowiednio $R = 0.76$, $P < 0.01$ oraz $R = 0.86$, $P < 0.01$). Podsumowując, w pracy wykazano, iż połączone warunki hipoksji oraz niedoboru żelaza miały najbardziej szkodliwy wpływ na miocyty szkieletowe, co ukazane zostało poprzez atroficzne zmiany w morfologii komórek, maladaptacyjną przebudowę strukturalną komórek oraz zwiększoną ekspresję markerów atrofii

mięśniowej. Co więcej, suplementacja miocytów szkieletowych *in vitro* zdaje się posiadać pewne protekcyjne w kontekście powyższych zmian.

W pracy przeglądowej „**Structural and functional abnormalities in iron-depleted heart**” (**Heart Fail Rev. 2019 Mar;24(2):269-277**) opisano zaburzenia strukturalne oraz funkcjonalne zachodzące w mięśniu sercowym w warunkach niedoboru żelaza. W oparciu o dane kliniczne a także modele eksperymentalne szczegółowo opisano patologiczne zmiany zachodzące na poziomie molekularnym, komórkowym, tkankowym oraz całego mięśnia sercowego. Co więcej, krytycznie przeanalizowano dane pochodzące ze zwierzęcych modeli eksperymentalnych odzwierciedlających zarówno systemowy niedobór żelaza jak i lokalny niedobór żelaza specyficzny wyłącznie dla mięśnia sercowego. Analiza dostępnych danych pozwoliła na stwierdzenie, że niedobór żelaza wywołuje negatywne zmiany strukturalne oraz funkcjonalne niezależnie od systemowego niedoboru żelaza lub/i niedokrwistości. Dodatkowo podkreślono korzystny wpływ suplementacji żelazem zarówno u pacjentów z NS jak i w omówionych eksperymentalnych modelach niedoboru żelaza, gdzie powodowała ona poprawienie funkcjonowania mięśnia sercowego oraz łagodziła niekorzystny fenotyp wywołany niedoborem żelaza.

Wyniki niniejszej pracy przyczyniły się w rozwoju wiedzy na temat wpływu dostępności żelaza na morfologię, strukturę oraz ekspresję markerów atrofii mięśniowej w miocytach szkieletowych w warunkach niedotlenienia. Dodatkowo, niniejsza rozprawa w oparciu o opublikowane badania kliniczne oraz zaawansowane modele eksperymentalne ukazują również szereg dowodów na niekorzystny wpływ niedoboru żelaza na funkcjonowanie oraz strukturę mięśnia sercowego. Co, więcej rozprawa po raz pierwszy podsumowuje, że niekorzystne zaburzenia w obrębie mięśnia sercowego narażonego na niedobór żelaza, zachodzą niezależnie współistnienia systemowego ID oraz niedokrwistości. Wyniki niniejszej pracy stanowią merytoryczne uzasadnienie niekorzystnego efektu ID u chorych z niewydolnością serca a także korzyści ze stosowania u nich dożylniej terapii suplementacji żelazem

SUMMARY

Heart failure (HF) is a disease with poor prognosis and remains one of the major health and socioeconomic challenges facing modern civilization. Structural abnormalities, which occurs at the cellular and macroscopic level of both myocardium and skeletal muscle, are important features of HF pathophysiology. The ongoing muscle remodeling results in the inability of the heart to function properly as a pump, as well as results in development of specific skeletal myopathy, which leads to severe exercise intolerance. Thus, in the face of high prevalence of HF, research on the novel targeted therapies aimed at the improvement of quality of life and reduction of cardinal symptoms of this disease is of particular importance.

Iron, as a cofactor of numerous proteins and enzymes, is involved in distinct cellular processes such as energy metabolism, antioxidant defense, and oxygen transport and storage, which are critical for cell survival. Therefore, both iron deficiency (ID) and iron excess leads to structural and functional abnormalities in various cell types. Importantly, the optimal level of iron availability is critical for the optimal functioning of cells with high-energy demands, especially in cardiomyocytes and skeletal myocytes. Clinical trials show that the co-occurrence of ID in HF patients is very frequent and is associated with impaired cardiac function as well as increased skeletal muscle fatigue and exercise intolerance, independently of the presence of anaemia. Moreover, it has been shown that intravenous iron supplementation in patients with HF and concomitant ID results in an improvement in both cardiac symptoms and exercise capacity. However, the pathomechanisms standing behind both the detrimental effects of ID and the phenomena of beneficial effects of iron supplementation in HF patients remains largely unclear.

The aim of this study was to investigate the influence of both limited and increased iron availability on the: i) morphology; ii) structure; and iii) expression of key protein markers involved in the muscle atrophy process in skeletal myocytes cultured in hypoxia conditions that mimic the low oxygen availability in skeletal muscles occurring in the course of HF. In addition, the purpose of this doctoral thesis was to discuss the structural and functional abnormalities occurring in the iron-depleted cardiac muscle, based on clinical data and novel experimental models of systemic and cardiac-specific ID.

The experiments presented in publication **"Iron limitation promotes the atrophy of skeletal myocytes, whereas iron supplementation prevents this process in the hypoxic conditions"** (Int J Mol Med. 2018 May;41(5):2678-2686) were performed on the *in vitro* model

of rat skeletal myocytes (L6G8C5) cultured for 48 hours in normoxia or hypoxia at optimal, reduced or increased iron concentrations. The level of intracellular iron concentration was analysed, and the cell morphology was assessed. Moreover, the expression of muscle specific atrophy markers [*Atrogin1* and muscle-specific RING-finger 1 (*MuRF1*)], a gene associated with the atrophy/hypertrophy balance [mothers against decapentaplegic homolog 4 (*SMAD4*)] and a muscle class-III intermediate filament protein (*Desmin*) was measured at the mRNA (RT-qPCR) and protein level (Western Blotting and immunocytochemical staining).

Cells cultured under iron-deficient conditions exhibited atrophic morphology as well as significantly increased expression of muscle *Atrogin-1* and *MuRF1* both in normoxia and hypoxia (all $P < 0.05$), which indicated activation of the ubiquitin proteasome pathway associated with protein degradation during muscle atrophy. Reduced iron availability combined with hypoxia also caused a decrease in *SMAD4* expression ($P < 0.001$), suggesting changes in cell homeostasis leading to atrophy. Conversely, skeletal myocytes exposed to increased iron availability during hypoxia showed an opposite effect on the expression of both atrophy markers (*Atrogin-1* and *MuRF1*; both $P < 0.05$). *Desmin* upregulation was observed in cells subjected to both increased and reduced iron availability, however the greatest augmentation occurred when iron depletion was combined with hypoxia (all $P < 0.05$). Furthermore, a significant relationship between increased expression of muscle atrophy markers (*Atrogin-1* and *MuRF1*) and increased expression of the *transferrin receptor 1* was observed under hypoxic conditions, reflecting its association with intracellular iron demand ($R = 0.76$, $P < 0.01$ and $R = 0.86$, $P < 0.01$, respectively).

This study showed that the combined conditions of hypoxia and ID had the most detrimental effects on skeletal myocytes, which was demonstrated by atrophic changes in cell morphology, maladaptive structural remodeling and increased expression of muscle atrophy markers. In contrast, iron supplementation in *in vitro* conditions acted in a protective manner on these cells.

The review “**Structural and functional abnormalities in iron-depleted heart**” (**Heart Fail Rev. 2019 Mar;24(2):269-277**) describes structural and functional changes occurring in the iron-deficient myocardium. Based on data from clinical trials as well as on experimental models, this review describes the pathological changes occurring within the myocardium at the molecular, cellular and macroscopic level. Furthermore, data from animal experimental models reflecting both systemic and cardiac-specific ID were thoroughly analysed, leading to the conclusion that ID induces detrimental structural and functional changes irrespective of systemic ID and anaemia. In

addition, the beneficial effects of iron supplementation in patients with HF and concomitant ID as well as in aforementioned experimental ID models were specified, where it improved myocardial function and alleviated the adverse phenotype caused by iron deficiency.

The results of this work have significantly contributed to the expansion of knowledge on the impact of iron availability on morphology, structure and expression of muscle atrophy markers in skeletal myocytes under normoxic and hypoxic conditions. In addition, the present doctoral thesis, based on published clinical studies and advanced experimental models, also shows a range of evidence for the detrimental effects of ID on myocardial function and structure. Moreover, this dissertation strongly suggests that the iron-depletion-induced abnormalities within the myocardium occur independently of systemic ID and anaemia. Finally, the results of this study provide substantive justification for using intravenous iron supplementation therapy in patients with HF.