



Melita Ozola (Vidējā)

## **Trimetilamīna N-oksīda regulācija kardiometabolo slimību ārstēšanā**

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda  
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes  
Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija  
Apakšnozare – farmaceutiskā farmakoloģija

Rīga, 2023



RĪGAS STRADIŅA  
UNIVERSITĀTE

Melita Ozola (Vidējā)

ORCID 0000-0002-3453-0099

## Trimetilamīna N-oksīda regulācija kardiometabolo slimību ārstēšanā

Promocijas darba kopsavilkums zinātnes doktora grāda  
“zinātnes doktors (*Ph. D.*)” iegūšanai

Nozaru grupa – medicīnas un veselības zinātnes

Nozare – medicīnas bāzes zinātnes, tai skaitā farmācija

Apakšnozare – farmaceitiskā farmakoloģija

Rīga, 2023

Promocijas darbs izstrādāts Latvijas Organiskās sintēzes institūta  
Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā

Promocijas darba vadītāja:

*Dr. pharm.* profesore **Maija Dambrova**,  
Latvijas Organiskās sintēzes institūts, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

Zinātniskie konsultanti:

*Dr. pharm.* **Marina Makrečka-Kūka**, Latvijas Organiskās sintēzes institūts

*Dr. pharm.* **Jānis Kūka**, Latvijas Organiskās sintēzes institūts

Oficiālie recenzenti:

*Dr. pharm.* docente **Inga Urtāne**, Rīgas Stradiņa universitāte, Latvija

*Dr. habil. biol.* profesore **Ruta Muceniece**, Latvijas Universitāte

*Ph. D.* profesors **Robert Olek**, Poznaņas Sporta Universitāte

(*Poznan University of Physical Education*), Polija

Promocijas darbs tiks aizstāvēts Medicīnas bāzes zinātņu, tai skaitā farmācijas  
promocijas padomes atklātā sēdē 2023. gada 24. novembrī plkst. 10.00  
Hīpokrāta auditorijā, Dzirciema ielā 16 un attālināti, tiešsaistes platformā *Zoom*

Ar promocijas darbu var iepazīties RSU bibliotēkā un RSU tīmekļa vietnē:  
<https://www.rsu.lv/promocijas-darbi>

NACIONĀLAIS  
ATTĪSTĪBAS  
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA  
Eiropas Sociālais  
fonds

---

IEGULDĪJUMS TAVĀ NĀKOTNĒ

Šis pētījums tika izstrādāts ar Eiropas Sociālo fondu un Latvijas valsts budžeta  
finansējumu, projekta Nr. 8.2.2.0/20/I/004 “Atbalsts doktorantu iesaistei  
zinātniski pētnieciskajā un studiju darbā” ietvaros Rīgas Stradiņa universitātē

Promocijas padomes sekretāre:

*Dr. pharm.* asociētā profesore **Renāte Ranka**

# Satura rādītājs

Darbā izmantotie saīsinājumi .....	5
Ievads.....	7
Darba mērķis .....	8
Darba uzdevumi .....	8
Darba hipotēzes .....	8
Darba novitāte .....	9
1. Metodes .....	10
1.1. Akūtie TMAO efekti eksperimentālajos <i>ex vivo</i> un <i>in vivo</i> kardiovaskulārās funkcionalitātes modeļos.....	10
1.1.1. Reaģenti .....	10
1.1.2. Eksperimenta dzīvnieki.....	10
1.1.3. TMAO akumulācijas noteikšana .....	11
1.1.4. Vaskulārās reaktivitātes mērījumi.....	11
1.1.5. <i>Ex vivo</i> izolētās sirds funkcijas izvērtējums un izolētās sirds infarkta modelis .....	12
1.2. Ilgtermiņa TMAO ievadīšana eksperimentālajā labā kambara sirds mazspējas modelī žurkās .....	12
1.2.1. Eksperimenta dzīvnieki.....	12
1.2.2. Eksperimenta dizains .....	13
1.2.3. Ehokardiogrāfijas izmeklējums un tiešā LK spiediena mērījums .....	14
1.2.4. Mitohondriju funkcionalitātes mērījumi permeabilizētās sirds LK muskuļu šķiedrās .....	15
1.2.5. RNS izolēšana un qPQR analīze.....	16
1.3. Metformīna ietekme uz TMAO līmeni eksperimentālā peļu 2. tipa diabēta modelī .....	17
1.3.1. Eksperimenta dzīvnieki un pētījuma dizains .....	17
1.3.2. Baktēriālās kultūras, TMA ražošanas izvērtējums.....	18
1.4. Badošanas imitējoša diēta kā dzīvesveida stratēģija TMAO līmeņu regulācijai.....	19
1.4.1. Pētījuma dalībnieki .....	19
1.4.2. Pētījuma dizains.....	20
1.4.3. Bioķīmisko parametru mērījumi .....	21
1.5. TMA un TMAO mērījumi ar UPLC/MS/MS .....	22
1.6. Pētījuma ētiskie apsvērumi .....	22

2. Statistiskā analīze .....	23
3. Rezultāti.....	24
3.1. Akūtie TMAO efekti eksperimentālajos <i>ex vivo</i> un <i>in vivo</i> kardiovaskulārās funkcionalitātes modeļos.....	24
3.2. Ilgtermiņa TMAO ievadīšana eksperimentālajā labā kambara sirds mazspējas modelī žurkās .....	26
3.2.1. Sirds mazspējas smaguma pakāpe .....	26
3.2.2. Mitohondriju enerģijas metabolisms.....	29
3.3. Metformīna ietekme uz TMAO līmeni eksperimentālā peļu 2. tipa diabēta modelī .....	32
3.3.1. TMAO līmeņi db/db pelēs, kas barotas ar standarta laboratorijas barību vai uzturu, kas papildināts ar holīnu .....	32
3.3.2. Baktēriju spēja producēt TMA.....	34
3.4. Badošanos imitējoša diēta kā dzīvesveida stratēģija TMAO līmeņu regulācijai.....	36
4. Diskusija.....	39
4.1. Paaugstinātas TMAO koncentrācijas efekti eksperimentālos kardiovaskulāro un metabolo slimību modeļos.....	39
4.2. Metformīna ietekme uz uztura-mikrobioma-TMAO asi .....	43
4.3. Badošanos imitējoša diēta kā dzīvesveida stratēģija, lai uzlabotu metabolo veselību un samazinātu TMAO līmeņus..	45
4.4. Vispārējie apsvērumi par TMAO lomu kardiovaskulāro un metabolo slimību attīstībā .....	49
Secinājumi .....	54
Priekšlikumi.....	55
Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu .....	56
Literatūras saraksts .....	58
Pateicības.....	69

## Darbā izmantotie saīsinājumi

Ach	acetilholīns
ADP	adenozīndifosfāts
AmA	antimicīns A
ANOVA	dispersijas analīze ( <i>analysis of variance</i> )
AS	ateroskleroze
BNKN	būtiski nevēlami kardiovaskulārie notikumi
cDNS	komplementārā dezoksiribonukleīnskābe
F	no FAO atkarīgais ceļš
FAO	taukskābju oksidācija ( <i>fatty acid oxidation</i> )
FMD	badošanos imitējoša diēta ( <i>fasting mimicking diet</i> )
FMOs	flavīnmonooksigenāzes
HNS	hroniska nieru slimība
HOMA-IR	HOMA indekss, ko izmanto insulīna rezistences pakāpes novērtēšanai ( <i>Homeostatic Model Assessment for Insulin Resistance</i> )
K-H buferšķīdums	Krebsa-Henseleita buferšķīdums
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KVS	kardiovaskulārās slimības
LEAK	mitohondriju skābekļa patēriņš kavētas adenīna nukleotīda translokāzes apstākļos
LK	labais kambaris
LVDP	kreisā kambara attīstītais spiediens ( <i>left ventricular developed pressure</i> )
MCT	monokrotalīns
MetS	metabolais sindroms
N	no NADH atkarīgais ceļš
NADH	nikotīnamīda adenīndinukleotīda reducētā forma
NYHA	Ņujorkas Sirds asociācija ( <i>New York Heart Association</i> )

OXPHOS	oksidatīvā fosforilācija
P	piruvāts
<i>P. mirabilis</i>	<i>Proteus mirabilis</i>
PC	palmitoilkarnitīns
qPQR	kvantitatīvā polimerāzes ķēdes reakcija
RNS	ribonukleīnskābe
Rot	rotenons
ROX	atlikušais skābekļa patēriņš
RV	labais kambaris
S	sukcināts
SD	standartnovirze
SEM	vidējās vērtības standartkļūda
SNP	nātrija nitroprusīds
T2D	2. tipa diabēts
TMA	trimetilamīns
TMAO	trimetilamīna N-oksīds
UPLC/MS/MS	augstas izšķirtspējas šķidruma hromatogrāfija ar sekojošu tandēma spektrometriju
VEG	references grupa uztura intervences pētījumā, kas pakļauta paaugstinātai dārzeņu uzņemšanai uzturā

## Ievads

Kardiometabolās slimības, kurās ietilpst sirds un asinsvadu slimības, kā arī metabolie traucējumi, piemēram, aptaukošanās un diabēts, joprojām ir galvenais nāves cēlonis pasaulē. Papildus dažādiem iepriekš identificētiem biomarķieriem pēdējo gadu pētījumi norāda uz potenciālu saikni starp paaugstinātiem trimetilamīna N-oksīda (TMAO) līmeņiem un aterosklerozes attīstību (Wang et al., 2011; Koeth et al., 2013), 2. tipa diabētu (Dambrova et al., 2016), sirds mazspējas smaguma pakāpi (Tang et al., 2014) un nāvi sakarā ar būtiskiem nevēlamiem kardiovaskulārajiem notikumiem (BNKN) (Trøseid et al., 2015). TMAO ir metabolīts, kas veidojas zarnu mikrobioma metabolisma ierosinātu procesu rezultātā. Sākotnēji uzturvielās, piemēram, karnitīnu un holīnu, metabolizē zarnu baktērijas, veidojot trimetilamīnu (TMA), ko pēc tam saimniekorganisma aknu enzīmi oksidē līdz TMAO.

Preklīniskos pētījumos ir parādīts, ka TMAO veicina iekaisumu (Seldin et al., 2016; Sun et al., 2016) un oksidatīvo stresu (Li et al., 2017; Ke et al., 2018). Turklāt tas kavē reverso holesterīna transportu (Koeth et al., 2013) un paaugstina trombozes risku (Zhu et al., 2016). Tomēr konkrēti TMAO ietekmētie molekulārie mehānismi un tā kauzālā loma kardiometabolo slimību patoģenēzē joprojām nav pilnīgi skaidra. Šī iemesla dēļ padziļināta izpratne par TMAO ietekmētajiem signālceļiem un potenciālo terapeitisko mērķu identificēšana TMAO līmeņu regulēšanai var sniegt jaunu informāciju kardiometabolo slimību profilaksei un ārstēšanai.

Kaut gan vairāki preklīniskie pētījumi ir norādījuši, ka paaugstināti TMAO līmeņi var veicināt kardiometabolo slimību attīstību, ir ziņots arī par pretrunīgiem rezultātiem (Zeisel and Warriar, 2017). Piemēram, dažos pētījumos nav izdevies pierādīt saistību starp paaugstinātiem TMAO līmeņiem plazmā un sirds un asinsvadu slimību risku (Andraos et al., 2021; Koay et al., 2021), savukārt citi pat ziņo par protektīviem efektiem pēc ilgstoši paaugstinātas



TMAO koncentrācijas preklīniskajos modeļos (Huc et al., 2018; Gawrys-Kopczynska et al., 2020). Līdz ar to ir nepieciešami pētījumi, lai padziļināti izprastu sarežģīto mijiedarbību starp TMAO, zarnu mikrobiomu un saimniekorganisma metabolismu (Silke et al., 2021) kardiometabolo slimību attīstības procesā.

Lai skaidrotu šīs pretrunas un sniegtu plašāku izpratni par TMAO nozīmi kardiometabolajā veselībā, kā arī pētītu potenciālās stratēģijas TMAO līmeņa regulācijai, nepieciešami turpmāki pētījumi.

## **Darba mērķis**

Pētīt TMAO ietekmētos molekulāros signālceļus kardiometabolo slimību patoģenēzē un identificēt potenciālas stratēģijas TMAO līmeņa regulācijai.

## **Darba uzdevumi**

Promocijas darba mērķa sasniegšanai izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Pētīt paaugstināta TMAO līmeņa akūtos efektus *ex vivo* un *in vivo* eksperimentālajos modeļos, kas raksturo sirds un asinsvadu funkcionalitāti;
2. Pētīt ilgtermiņā paaugstināta TMAO līmeņa ietekmi eksperimentālā labā kambara sirds mazspējas modelī;
3. Izvērtēt metformīna potenciālu TMAO līmeņa regulācijai 2. tipa diabēta eksperimentālajā modelī;
4. Izpētīt un novērtēt badošanās imitējošas diētas efektivitāti TMAO līmeņa samazināšanai.

## **Darba hipotēzes**

- Paaugstināts TMAO līmenis var aktivēt signālceļus, kas ir iesaistīti kardiovaskulāro un metabolo slimību patoģenēzē.

- TMAO līmeni plazmā var ietekmēt, izmantojot gan uztura stratēģiju, gan farmakoloģisku pieeju.

## **Darba novitāte**

Saikne starp TMAO līmeni un kardiovaskulāro slimību risku pirmo reizi tika minēta 2011. gadā, strauji audzējot zinātnisko interesi par šo biomarķieri. Šobrīd ik gadu tiek publicēti vairāk nekā 300 raksti ar atslēgvārdu “TMAO”. Lai gan sākotnēji gandrīz visi prekliniskie pētījumi ziņoja par TMAO negatīvajiem efektiem kardiovaskulāro un metabolo slimību modeļos, nesen ir publicēti pētījumi, kas ziņo arī par TMAO protektīvajiem efektiem.

Šajās tēzēs mēs esam centušies identificēt atšķirīgos efektus, ko izraisa TMAO koncentrācijas palielināšanās akūti un ilgtermiņā. Šeit apkopotā informācija norāda, ka TMAO loma kardiometabolo slimību patogēnēzē ir atkarīga no konkrētiem apstākļiem un orgānu sistēmām, kā arī no ekspozīcijas ilguma.

Neskatoties uz pretrunīgajiem rezultātiem par paaugstinātu TMAO līmeņu kaitīgumu, pastāv pieaugoša interese par stratēģijām, kas mērķētas uz TMAO līmeņu samazināšanu, it īpaši modulējot zarnu mikrobiomu, kas ir būtisks posms TMAO biosintēzes ceļā. Šajā pētījumā prezentētie rezultāti liecina, ka metformīna lietošana ietekmē zarnu mikrobioma sastāvu un spēj samazināt TMA rašanās ātrumu. Kontekstā ar to, ka pacientiem ar kardiovaskulārajām un metabolajām slimībām klīniski nozīmīgu rezultātu sasniegšanai bieži tiek rekomendēts ieviest arī dzīvesveida izmaiņas, mūsu rezultāti liecina par to, ka badošanos imitējoša diēta var palīdzēt samazināt kardiovaskulāro risku, uzlabojot vielmaiņas parametrus un samazinot TMAO līmeņus asinīs.

## 1. Metodes

### 1.1. Akūtie TMAO efekti eksperimentālajos *ex vivo* un *in vivo* kardiovaskulārās funkcionalitātes modeļos

#### 1.1.1. Reaģenti

TMAO dihidrāts tika iegādāts no *Alfa Aesar* (Kandele, Vācija). Nātrija pentobarbitāla (*Dorminal*) šķīdums tika iegādāts no *Alfasan* (Vūrdene, Nīderlande). Heparīna nātrijs tika iegādāts no *Panpharma* (Fužēra, Francija). Acetonitrils un metanols tika iegādāti no *Merck* (Darmštate, Vācija), un 98 % skudrskābe tika iegādāta no *Fluka* (Buhsa, Šveice). Izoflurāns tika iegādāts *Chemical Point* (Deisenhofene, Vācija). Visi pārējie izmantotie reaģenti tika iegādāti no *Sigma-Aldrich* (Šnelldorfa, Vācija).

#### 1.1.2. Eksperimenta dzīvnieki

Trīsdesmit *Wistar* žurku tēviņi tika iegādāti no Tartu Universitātes laboratorijas Dzīvnieku centra (Tartu, Igaunija). TMAO līmeņa noteikšanai miokarda un asinsvadu audos tika izmantotas 12 žurkas. Sešas žurkas tika izmantotas, lai noteiktu TMAO ietekmi uz asinsvadu reaktivitāti pēc inkubācijas TMAO saturošā (100  $\mu$ M) buferšķīdumā, un 12 žurkas tika izmantotas izolētās sirds eksperimentos, lai noteiktu sirds funkcionalitāti un infarkta izmēru pēc perfūzijas ar 1 mM TMAO saturošu buferšķīdumu.

Lai iegūtu sirds un asinsvadu audus *ex vivo* eksperimentiem, žurkas tika anestezētas ar nātrija pentobarbitāla (60 mg/kg) un heparīna (1000 SV/kg) intraperitoneālu injekciju. Pēc anestēzijas iedarbošanās krūškurvis tika atvērts un sirds kopā ar aortu tika izgrieztas un ievietotas ledus aukstā *Krebs-Henseleit* (K- H) buferšķīdumā (sastāvs (mmol/L): NaCl 118, CaCl<sub>2</sub> 2,5, MgCl<sub>2</sub> 1,64, NaHCO<sub>3</sub> 24,88, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,18, glikoze 10, un EDTA 0,05; pH 7,4 37 °C temperatūrā) līdz tālākai audu apstrādei.

### 1.1.3. TMAO akumulācijas noteikšana

Žurku sirdis tika perfuzētas, un aortu gredzeni no katra dzīvnieka iemērkti K-H buferšķīdumā ar TMAO pievienošanu vai bez tā (100 μM gala koncentrācija). Pēc vienas stundas perfūzijas vai inkubācijas audu gabali tika noskaloti, lai atbrīvotos no TMAO saturošā buferšķīduma atlikuma, un audi tika sagatavoti TMAO līmeņu mērījumiem.

### 1.1.4. Vaskulārās reaktivitātes mērījumi

Aortas reaktivitātes izvērtējumam tika izmantota iepriekš aprakstīta metode (Vilskersts et al., 2015). Īsumā, izgrieztā žurku krūšu aorta tika sadalīta 3–4 mm gredzenos, kas tika ievietoti starp diviem nerūsējošā tērauda āķiem 10 ml orgānu vannā, piepildītā ar K-H bufera šķīdumu, piesātinātu ar 95 % O<sub>2</sub> un 5 % CO<sub>2</sub>. No viena dzīvnieka tika sagatavoti četri paralēlie paraugi. Katra aortu gredzena maksimālā kontrakcijas spēka noteikšanai tika pievienots 60 mM kālija hlorīds. Pēc noskalošanas pusei aortu gredzenu uz vienu stundu tika pievienots 100 μM TMAO. Pēc tam aortas gredzeni tika vēlreiz noskaloti ar buferšķīdumu un prekontrahēti ar fenilefrīnu līdz 70–80 % no maksimālā kontrakcijas spēka. Endotēlija atkarīgā relaksācija tika novērtēta, pievienojot kumulatīvas acetilholīna (Ach) koncentrācijas (10<sup>-9</sup> līdz 10<sup>-5</sup> mol/L). Endotēlija neatkarīgā relaksācija tika novērtēta, pievienojot kumulatīvas nātrija nitroprusīda (SNP) koncentrācijas (10<sup>-10</sup> līdz 10<sup>-5</sup> mol/L).

Apzarņa artērijas gredzenus sagatavoja atbilstoši iepriekš aprakstītai metodei (Bridges et al., 2011). Turpmāka endotēlija atkarīgās un neatkarīgās funkcijas izvērtēšana pēc inkubācijas ar 100 μM TMAO tika veikta tāpat kā aortai.

### **1.1.5. *Ex vivo* izolētās sirds funkcijas izvērtējums un izolētās sirds infarkta modelis**

Izolētās sirds infarktu veikšanai izmantoja Langendorfa metodi un iepriekš aprakstītu protokolu (Kuka et al., 2012) ar dažām modifikācijām. Infarktu eksperimentiem žurku sirdis tika perfuzētas ar K-H buferšķīdumu ar vai bez 1 mM TMAO pievienošanas, izmantojot konstantu 60 mmHg perfūzijas spiedienu. Sirds ritmu, kreisā kambara beigu diastolisko spiedienu un kreisā kambara attīstīto spiedienu (LVDP) reģistrēja nepārtraukti. Koronāro plūsmu mērija, izmantojot ultraskaņas plūsmas detektoru (HSE) un *PowerLab* sistēmu no *AD Instruments* (Sidneja, Austrālija). Izolētās žurku sirdis adaptēja 30 min., tad uz 30 min. okludēja kreiso lejupejošo koronāro artēriju, kam sekoja 120 min. reperfūzija. Tālākā analīze tika veikta, kā aprakstīts iepriekš (Liepinsh et al., 2022). Īsumā, kreiso lejupejošo koronāro artēriju atkal okludēja un perfuzēja ar 0,1 % metilēnzilā šķīdumu. Pēc tam sirds tika sagriezta 2 mm biezos šķērsgriezumos, apstrādāta ar trifēniltetrazolija hlorīdu un fotografēta. Datorizēta planimetriskā attēlu analīze tika veikta, izmantojot *Image-Pro Plus* v6.3 programmu (*Media Cybernetics Inc.*, Rokvillā, ASV), lai noteiktu riska zonas un nekrozes zonas laukumu. Laukums tika izteikts kā procentuālā daļa no visa kreisā kambara laukuma. Infarkta izmērs tika aprēķināts kā procentuālā daļa no riska zonas atbilstoši formulai:  $\text{Infarkta izmērs} = \frac{\text{Nekrozes zona}}{\text{Riska zona}} \times 100 \%$ .

## **1.2. Ilgtermiņa TMAO ievadišana eksperimentālajā labā kambara sirds mazspējas modelī žurkās**

### **1.2.1. Eksperimenta dzīvnieki**

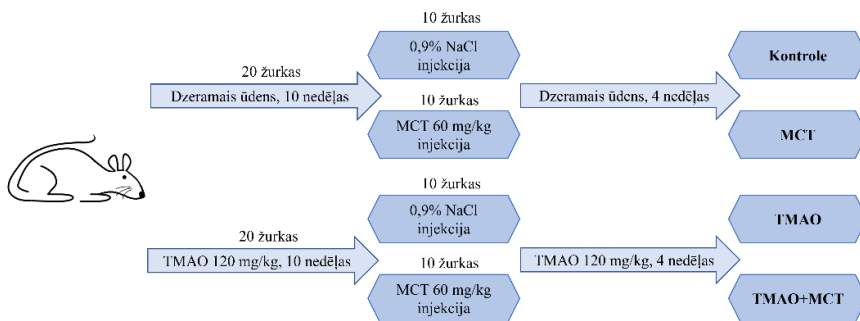
*Wistar* žurku tēviņi ( $n = 40$ ) (6–8 nedēļas veci) tika iegādāti no Tartu Universitātes laboratorijas Dzīvnieku centra (Tartu, Igaunija). Balstoties uz iepriekšējiem eksperimentiem, kuros izvērtējam labā kambara (LK)

funkcionalitāti, tika nolemts, ka būtu nepieciešami 8–10 dzīvnieki grupā, lai sasniegtu statistiski nozīmīgus rezultātus paredzamās interindividuālās variabilitātes dēļ. Tāpēc pētījumam tika izvēlēts dzīvnieku skaits grupā  $n = 10$ . Dati no iepriekš veiktajiem mitohondriju funkcionalitātes mērījumiem tika izmantoti statistiskās jaudas aprēķiniem (*GPower* programma, Diseldorfa, Vācija). Aprēķini liecināja, ka mitohondriju funkcionalitātes mērījumiem nepieciešami 5–6 paraugi no katras grupas, lai sasniegtu rezultātus ar vēlamo statistisko jaudu  $> 0,95$ .

### 1.2.2. Eksperimenta dizains

Šī pētījuma mērķis bija izpētīt ilgtermiņa TMAO lietošanas ietekmi eksperimentālajā žurku modelī, izraisot sirds LK disfunkciju. Mērķa sasniegšanai tika nolemts izmantot monokrotalīna (MCT) izraisīto LK sirds mazspējas modeli. Lai atdarinātu hroniski paaugstinātu TMAO līmeni plazmā un audos, eksperimenta dzīvniekiem TMAO tika dots jau 10 nedēļas pirms MCT injekcijas. Pētījuma dizaina shēma ir parādīta 1.1. attēlā. Eksperimentālos dzīvniekus randomizēti sadalīja četrās grupās: kontroles grupā ( $n = 10$ ), TMAO grupā ( $n = 10$ ), MCT grupā ( $n = 10$ ) un TMAO + MCT grupā ( $n = 10$ ). TMAO grupas un TMAO + MCT grupas dzīvnieki saņēma TMAO devā 120 mg/kg dzeramajā ūdenī katru dienu 10 nedēļu garumā. Lai izraisītu plaušu hipertensiju un sirds LK remodelēšanu un disfunkciju, MCT grupas un TMAO + MCT grupas dzīvniekiem tika veikta viena zemādas MCT (*Sigma-Aldrich*, Šnelldorfa, Vācija) injekcija devā 60 mg/kg. TMAO pievienošana dzeramajam ūdenim tika turpināta līdz eksperimenta beigām abām grupām, kas arī iepriekš saņēma TMAO. Ņemot vērā, ka laiks no MCT injekcijas līdz sirds LK mazspējas attīstībai būtiski atšķiras (Hardziyenka et al., 2006), balstoties uz mūsu pilotpētījumiem šajā modelī, tika izvēlēts četru nedēļu laika punkts pēc MCT injekcijas, lai novērtētu sirds LK funkcionalitāti ar ehokardiogrāfiju un veiktu

invazīvu tiešo sirds LK spiediena mērījumu. Pēc sirds funkcionalitātes novērtējuma dzīvnieki tika eitanazēti un ievākti LK audu un plazmas paraugi, kas tika uzglabāti  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  temperatūrā līdz turpmākai analīzei. Papildus tika veikti mitohondriju funkcionalitātes pētījumi, izmantojot sirds LK muskuļu šķiedras.



1.1. attēls. Shematisks pētījuma dizaina attēlojums

### 1.2.3. Ehokardiogrāfijas izmeklējums un tiešā LK spiediena mērījums

Žurkas tika anestezētas, izmantojot 5 % izoflurāna un skābekļa gāzu maisījumu. Pēc anestēzijas iedarbošanās izoflurāna koncentrācija tika samazināta līdz 2,5 %. Eksperimentālie dzīvnieki tika novietoti horizontālā pozīcijā un krūškurvis un augšējā vēdera daļa tika noskūta. Dzīvnieki tika pieslēgti *Philips* iE33 ultrasonogrāfam (*Philips Healthcare*, Andovera, ASV), lai reģistrētu EKG no II novadījuma. Tad žurku novietoja uz kreisā sāna, un, izmantojot *Philips* S12-4 detektoru (*Philips Healthcare*, Andovera, ASV), no apikālā skatpunkta tika ierakstīts četru kambaru skats. Elektrokardiogramma tika izmantota, lai noteiktu precīzu LK sistoles un diastoles laiku, reģistrējot LK beigu diastolisko laukumu un LK beigu sistolisko laukumu. Šie mērījumi tālāk tika izmantoti laukuma izmaiņu frakcijas aprēķinam.

Pēc ehokardiogrāfijas izvērtējuma tika veikts invazīvs tiešais LK spiediena mērījums. Anestezētās žurkas intubēja, izmantojot 16 G intravenozu katetru, un mehāniski ventilēja ar 2 % izoflurāna un skābekļa gāzu maisījumu (1,5 ml/100 g). Pēc tam tika atvērts vēdera dobums un veikts iegriezums diafragmā, lai atklātu pleiras dobumu. Krūškurvja abās pusēs tika veikts izgriezums ribās, lai piekļūtu sirdij. Spiediena detektors (*AD Instruments*, Sidneja, Austrālija) tika pievienots 18 G adatai un ievietots labā kambara dobumā caur sirds galotni. LK spiediens tika mērīts līdz stabilai spiediena rādījuma iegūšanai.

#### **1.2.4. Mitohondriju funkcionalitātes mērījumi permeabilizētās sirds LK muskuļu šķiedrās**

Mitohondriju funkcijas izvērtējums tika veikts permeabilizētās LK sirds muskuļu šķiedrās, kas sagatavotas pēc iepriekš aprakstītas metodes (Kuka et al., 2012). Mitohondriju funkcionalitātes mērījumi tika veikti MiR05 vidē (110 mM saharoze, 60 mM K-laktobionāts, 0,5 mM EGTA, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM taurīns, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 20 mM HEPES, pH 7,1, 0,1 % no taukskābēm brīvs vērša seruma albumīns) 37 °C temperatūrā, izmantojot oksigrāfu *Oxygraph-2k* (O2k; *Oroboros Instruments*, Insbruka, Austrija). Šie eksperimenti tika veikti, izmantojot iepriekš aprakstītu respirometrijas protokolu (Makrecka-Kuka et al., 2020).

Lai noteiktu katra enerģijas substrāta ieguldījumu mitohondriju skābekļa patēriņa ātrumā, plūsmas kontroles koeficienti tika aprēķināti pēc šādas formulas:

$$1 - \frac{\text{Elpošanas ātrums pirms substrāta pievienošanas}}{\text{Elpošanas ātrums pēc substrāta pievienošanas}}$$



### 1.2.5. RNS izolēšana un qPĶR analīze

Kopējais RNS no LK audiem tika izolēts, izmantojot TRI reaģentu (*Sigma*, Sentluisa, ASV) atbilstoši ražotāja instrukcijām. cDNS sintēze tika veikta, izmantojot komerciāli pieejamu augstas ietilpības cDNS reversās transkripcijas reaģentu komplektu (*Applied Biosystems*, Fostersitija, ASV) atbilstoši ražotāja instrukcijām. Kvantitatīvās polimerāzes ķēdes reakcijas (qPĶR) maisījums sastāvēja no *SYBR® Green* fluorescentās krāsvielas (*Applied Biosystems*, Fostersitija, ASV), sintezētā parauga cDNS un praimeriem, kas specifiski *BNP*, *αMHC* un *βMHC* gēniem. Šie gēni tika izvēlēti, lai raksturotu sirds mazspējas smaguma pakāpi un miokarda hipertrofiju. Reakcija tika veikta *Prism 7500* ierīcē (*Applied Biosystems*, Fostersitija, ASV) atbilstoši ražotāja rekomendētajam protokolam. Relatīvie gēnu ekspresijas līmeņi tika aprēķināti pēc  $\Delta\Delta Ct$  metodes un normalizēti pret *VCP* gēna ekspresijas līmeni. Eksperimentā izmantoto qPĶR analīzes praimeru sekvenses apkopotas 1.1. tabulā.

1.1. tabula

#### qPĶR izmantoto praimeru sekvenses

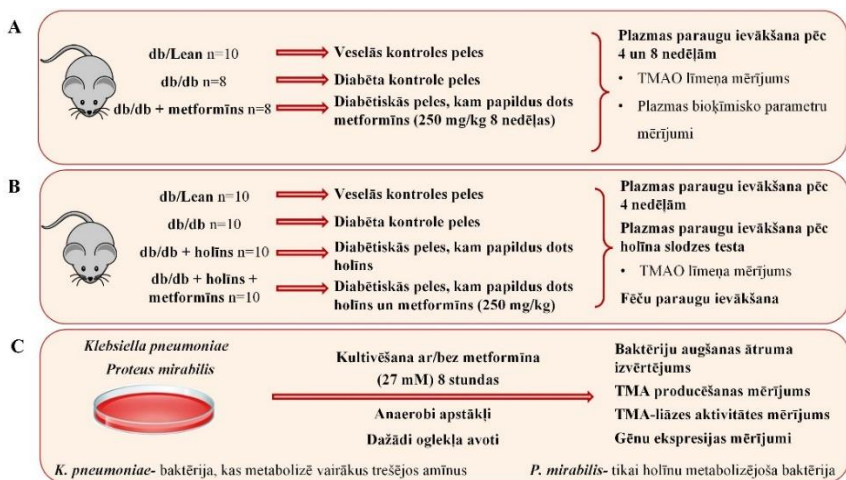
Gēna simbols	Pilnais nosaukums	Praimeru sekvence (5'→3')
<i>VCP</i>	Valoziņu saturošais proteīns	F- AATATTTGACAAGGCACGACAAG
		R- CCGGTTGGTAGCTCCAATGAT
<i>BNP</i>	B tipa nātrijurētiskais peptīds	F- TAGCCAGTCTCCAGAGCAATTC
		R- TTGGTCCTTCAAGAGCTGTCTC
<i>αMHC</i>	Smagās ķēdes miozīns 6	F- CTCCATCTCTGACAACGCCTATC
		R- CTCCGGATTCTCCAGTGATGA
<i>βMHC</i>	Smagās ķēdes miozīns 7	F- GGAGCTGATGCACCTGTAGACA
		R- AGTGCGGACACGGTCTGAA

### 1.3. Metformīna ietekme uz TMAO līmeni eksperimentālā peļu 2. tipa diabēta modelī

#### 1.3.1. Eksperimenta dzīvnieki un pētījuma dizains

Sešpadsmit db/db (BKS.Cg-+Leprdb/+Leprdb/OlaHsd) peļu tēviņi un 10 nediabētiski db/Lean (db/+ (BKS.Cg-+Leprdb/+OlaHsd)) peļu tēviņi (10 nedēļas veci) tika iegādāti no *Envigo* (Venreja, Nīderlande). Db/db peles tika randomizēti sadalītas divās grupās un saņēma vai nu ūdeni (db/db kontroles grupa, n = 8), vai metformīna šķīdumu devā 250 mg/kg (db/db metformīna grupa, n = 8) astoņas nedēļas. Db/Lean peles (n = 10) tika izmantotas kā veselās kontroles (1.2.A attēls). Plazmas paraugi tika ievākti četras un astoņas nedēļas pēc eksperimenta sākuma.

Balstoties uz rezultātiem, kas iegūti pirmajā eksperimenta daļā, eksperimenta turpinājumam tika iegādāti vēl 30 db/db peļu tēviņi un 10 nediabētiski db/Lean peļu tēviņi (10 nedēļas veci) (*Envigo* (Venreja, Nīderlande)). Šī eksperimenta galvenais mērķis bija noskaidrot metformīna efektivitāti paaugstinātas TMAO prekursoru uzņemšanas gadījumā. Holīns tika izvēlēts kā visbiežāk pārtikā sastopamais TMAO prekursors. Db/db peles tika randomizēti sadalītas trijās grupās un četras nedēļas saņēma ikdienas devu ar ūdeni (db/db kontrole, n = 10), 0,5 % holīna šķīdumu dzeramajā ūdenī (db/db + holīns, n = 10) vai 0,5 % holīna šķīdumu dzeramajā ūdenī un 250 mg/kg metformīna (db/db + holīns + metformīns, n = 10). Db/Lean peles (n = 10) kalpoja kā veselā kontrole (1.2.B attēls). Pēc četrām nedēļām peles saņēma holīnu bolus devā (100 mg/kg), lai novērtētu kopējo TMAO ražošanas kapacitāti, kā arī metformīna spēju ietekmēt TMAO līmeņus akūtas prekursoru slodzes gadījumā. Plazmas paraugi tika ievākti tieši pirms un divas stundas pēc holīna slodzes testa. Paraugi tika glabāti -80 °C temperatūrā līdz tālākai analīzei.



## 1.2. attēls. Pētījuma dizaina shematisks attēlojums

### 1.3.2. Bakteriālās kultūras, TMA ražošanas izvērtējums

Lai novērtētu baktēriju spēju ražot TMA, tika izmantotas divas baktēriju sugas: *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*) (iegūtas no Latvijas Mikroorganismu kultūru kolekcijas (LMKK), celma numurs 535) un *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) (LMKK, celma numurs 590). Lai pārbaudītu metformīna ietekmi uz TMA ražošanu no holīna, baktērijas tika audzētas standarta apstākļos, pievienojot 27 mM holīnu kā vienīgo oglekļa avotu, 27 mM metformīnu vai bez tā pievienošanas (1.2.C attēls). Šāda metformīna koncentrācija izvēlēta tāpēc, ka tā atspoguļo zāļu līmeni, kas varētu tikt sasniegts zarnās pēc augstas ( $\geq 850$  mg) metformīna devas lietošanas pacientiem (Bailey, Wilcock and Scarpello, 2008; Proctor, Bourdet and Thakker, 2008).

Baktērijas tika audzētas anaerobos apstākļos pēc iepriekš aprakstītas metodes (Kuka et al., 2014). Paraugi tika ievākti četras un astoņas stundas pēc inkubācijas sākuma, fiksējot tos ar 5 % skudrskābi un centrifugējot. Virsnogulšņu šķīdums tika savākts un uzglabāts ( $-80$  °C) turpmākām analizēm.

Metformīna ietekmi uz baktēriju augšanu novērtēja, spektrofotometriski fiksējot *K. pneumoniae* un *P. mirabilis* augšanas dinamiku anaerobās mēģenēs (Seim et al., 1982). Īsumā, baktēriju šūnas tika audzētas, izmantojot glikozi kā vienīgo oglekļa avotu. Šūnas tika savāktas, centrifugētas, noskalotas un resuspendētas svaigā augšanas vidē, kas satur vai nu glikozi, vai holīnu (27 mM), ar metformīna (27 mM) klātbūtni vai bez tās. Šķidrums hromatogrāfijas pudelītes tika papildītas ar mikrobu suspensiju, hermētiski noslēgtas un atstātas inkubētās +37 °C temperatūrā. Mikrobu suspensiju absorbcijas mērījumi tika iegūti, izmantojot WPA kolorimetru (*Biochrom*, Apvienotā Karaliste), kas iestatīts uz 595 nm viļņa garumu.

## **1.4. Badošanos imitējoša diēta kā dzīvesveida stratēģija TMAO līmeņu regulācijai**

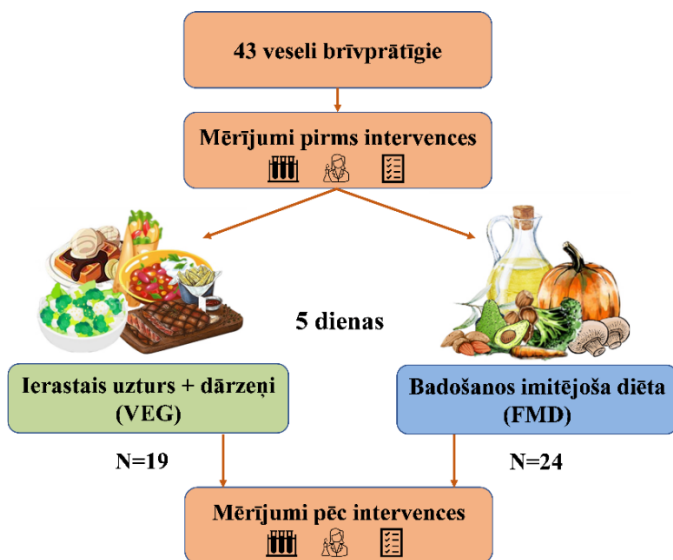
### **1.4.1. Pētījuma dalībnieki**

Uztura intervences pētījumā tika iesaistīti 44 brīvprātīgie, kas neievēro specifiskas uztura stratēģijas (visēdāji). Pirms pētījuma uzsākšanas tika veiktas asins analīzes visu brīvprātīgo vispārējās veselības novērtēšanai. Izslēgšanas kritēriji bija šādi: ķermeņa masas indekss < 18,5 kg/m<sup>2</sup>; asins analīžu rezultāti, kas norāda uz smagām veselības problēmām; antibiotiku, probiotiku vai TMAO prekursorus saturošu uztura bagātinātāju lietošana pēdējo divu mēnešu laikā pirms uztura intervences uzsākšanas. Visiem brīvprātīgajiem tika sniegta informācija par pētījuma mērķi un norises gaitu. Brīvprātīgo atlase un pētījuma veikšana norisinājās no 2019. gada decembra līdz 2021. gada jūnijam.

## 1.4.2. Pētījuma dizains

Pētījuma dizaina shematisks attēlojums apkopts 1.3. attēlā. Sākotnējie antropometriskie mērījumi un bioķīmiskās analīzes tika veiktas pirms plānotās uztura intervences tukšā dūšā. Visiem dalībniekiem tika lūgts pārtraukt pārtikas uzņemšanu vismaz  $\geq 10$  stundas pirms paraugu ņemšanas, šajā laikā bija atļauts dzert tikai ūdeni. Tā kā zivju patēriņš varētu ietekmēt TMAO līmeņa mērījumus, dalībniekiem tika lūgts atturēties no zivju un jūras velšu patēriņa divas dienas pirms paraugu ņemšanas. Pētījums tika veikts kā paralēlu grupu pētījums, un dalībnieki uz piecām dienām tika iekļauti vai nu references grupā (VEG), vai badošanos imitējošas diētas (FMD) grupā. Tukšas dūšas glikozes mērījums tika izvēlēts kā galvenais parametrs dalībnieku randomizācijai.

FMD kā uztura režīms balstījās uz plānu, kuru izstrādājis prof. Valters D. Longo un viņa zinātniskā grupa (Brandhorst et al., 2015). Īsumā, FMD grupas dalībnieki tika pakļauti piecu dienu diētai ar samazinātu kaloriju daudzumu, kas nodrošināja 34–54 % no parastā kaloriju daudzuma uzņemšanas (aptuveni 1100 kcal pirmajā dienā un aptuveni 800 kcal četrās nākamajās dienās). FMD grupas dalībniekiem tika lūgts galvenokārt uzņemt saliktos ogļhidrātus un nepiesātinātos taukus, bet ierobežot olbaltumvielu uzņemšanu (vēlamā kaloriju uzņemšana ar šīm barības vielām tika sadalīta šādi: attiecīgi 40–45 %; 45–50 %; 10–15 %). FMD grupas brīvprātīgo dalībnieku ēdienkarte galvenokārt sastāvēja no dārzeņiem, sēklām, riekstiem un augu eļļām. Pākšaugi bija atļauti tikai pirmajā dienā, jo tie tiek uzskatīti par olbaltumvielu avotu.



1.3. attēls. Pētījuma dizaina shematisks attēlojums

Brīvprātīgajiem, kas tika iekļauti VEG grupā, tika lūgts ievērot ierastos uztura paradumus, taču uzturā papildus iekļaut četras porcijas (katra aptuveni 100–125 grami) dārzeņu dienā. Nekādu papildu ierobežojumu porciju izmēra, uzņemto kaloriju daudzuma vai uzturvielu izvēles ziņā šīs grupas brīvprātīgajiem nebija.

Pēc piecu dienu uztura intervences pētījuma dalībnieki tika nosvērti un asins paraugi tika ievākti tukšā dūšā.

### 1.4.3. Bioķīmisko parametru mērījumi

Asins paraugu vākšana tika veikta tukšā dūšā, tieši pirms plānotās uztura intervences un nākamajā rītā pēc piecu dienu uztura režīma ievērošanas. Iegūtie paraugi tika glabāti ledū un nogādāti SIA “E. GULBJA LABORATORIJA” (Latvijas Nacionālais akreditācijas birojs, akreditācijas Nr. M-365) divu stundu laikā.

## 1.5. TMA un TMAO mērījumi ar UPLC/MS/MS

TMA koncentrāciju mērījumi tika veikti III publikācijas ietvaros, savukārt TMAO koncentrāciju mērījumi veikti visu tēzēs iekļauto publikāciju ietvaros.

TMA kvantifikācija tika veikta ar augstas izšķirtspējas šķidrums hromatogrāfija ar sekojošu tandēma spektrometriju (UPLC/MS/MS), izmantojot pozitīvās uzlādēšanas elektroizsmidzināšanas jonizāciju, pēc iepriekš aprakstītas metodes (Kuka et al., 2014). TMAO kvantifikācija tika veikta ar UPLC/MS/MS, izmantojot pozitīvās uzlādēšanas elektroizsmidzināšanas jonizāciju, pēc iepriekš aprakstītas metodes (Dambrova et al., 2013; Grinberga et al., 2015).

## 1.6. Pētījuma ētiskie apsvērumi

Visas eksperimentālās procedūras ar laboratorijas dzīvniekiem (I, II, III publikācija) tika veiktas saskaņā ar Eiropas Savienības direktīvu 2010/63/EU par dzīvnieku eksperimentu veikšanu, kā arī nacionālo likumisko regulējumu. Visas procedūras apstiprināja Pārtikas un veterinārā dienesta Zinātniskiem mērķiem izmantojamo dzīvnieku aizsardzības komiteja (Rīga, Latvija). Visi laboratorijas dzīvnieki tika turēti standarta apstākļos (21–23 °C, 12 stundu gaismas/tumsas cikli, relatīvais gaiss mitrums 45–65 %) ar neierobežotu pieeju barībai (R70, *Lactamin* AB, Kimstade, Zviedrija) un ūdenim. *Ex vivo* eksperimenti, kas aprakstīti I publikācijā, tika veikti saskaņā ar ētikas atļauju Nr. 82. Eksperimenti II publikācijai tika veikti, balstoties uz ētikas atļauju Nr. 105. Eksperimenti III publikācijā, tika veikti saskaņā ar ētikas atļauju Nr. 84. Visi pētījumu rezultāti, kas iekļauj dzīvnieku izmantošanu, tika ziņoti saskaņā ar ARRIVE vadlīnijām (Percie du Sert et al., 2020).

Uztura intervences pētījums ar veselīgiem brīvprātīgajiem (atspoguļots IV publikācijā) notika saskaņā ar pētījuma dizainu, kas tika apstiprināts Rīgas Stradiņa universitātes Pētījumu ētikas komitejā (Nr. 6-2/10/51).

## 2. Statistiskā analīze

Iegūto datu statistiskā analīze tika veikta, izmantojot *GraphPad Prism* statistikas programmu (*GraphPad, Inc.*, Sandjego, ASV). Dati ir attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  vidējās vērtības standartkļūda (SEM), izņemot datus no baktēriju kultūrām (III publikācija), kuri attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  standartnovirze (SD). IV publikācijā dati attēloti kā vidējā vērtība ar individuāliem datu punktiem no katra brīvprātīgā. Datu izkļedes atbilstība normālsadalījumam novērtēta ar Šapiro–Vilka testu.

Balstoties uz datu normālsadalījuma testa rezultātiem, statistiski nozīmīgas atšķirības starp grupām tika izvērtētas ar vienfaktora dispersijas analīzi (ANOVA) vai Kruskala–Volisa testu. Ja šie testi uzrādīja  $p$  vērtību zem 0,05, tika izmantoti Tukija (II publikācijā–Dunneta) vai Dunna pēctesti un atšķirības tika uzskatītas par nozīmīgām, ja  $p < 0,05$ . Divu neatkarīgu grupu salīdzināšanai tika izmantots Stjūdenta  $t$ -tests, savukārt, izvērtējot atšķirības vienai un tai pašai grupai dažādos laika punktos, tika izmantots atkārtoto mērījumu  $t$ -tests vai Vilkoksona pāru tests atkarībā no datu atbilstības normālsadalījumam. Rezultāti tika uzskatīti par statistiski nozīmīgiem, ja  $p$  vērtība bija zem 0,05. Neviens no dzīvnieku paraugiem (I, II, III publikācija) vai brīvprātīgo paraugiem (IV publikācija) netika izslēgts no datu analīzes.

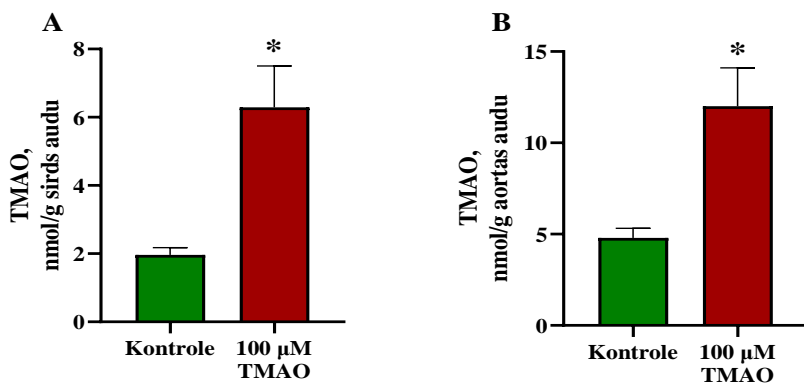
Lai aprēķinātu insulīna jutības un HOMA insulīna rezistences (HOMA-IR) indeksus IV publikācijā, tika izmantots HOMA2 kalkulators (versija 2.2.3, pieejams *online*, attīstīts Oksfordas universitātes Diabēta izpētes vienībā, Oksforda, Lielbritānija) (Wallace, Levy and Matthews, 2004).



### 3. Rezultāti

#### 3.1. Akūtie TMAO efekti eksperimentālajos *ex vivo* un *in vivo* kardiovaskulārās funkcionalitātes modeļos

Izmantojot buferšķīdumu ar paaugstinātu TMAO koncentrāciju, tika pētīta TMAO akumulācija audos (3.1. attēls). Šim mērķim *Wistar* līnijas žurku sirdis tika perfuzētas un aortu gredzeni iemērkti K-H buferšķīdumā. Pēc vienas stundas perfūzijas vai inkubācijas paraugi tika sagatavoti tālākai UPLC/MS/MS analīzei, lai noteiktu audu TMAO saturu. Perfuzējot sirdi ar TMAO saturošu buferšķīdumu, TMAO saturs audos pieauga trīs reizes (no  $2,0 \pm 0,2$  līdz  $6,3 \pm 1,2$  nmol/g audu). Arī pēc inkubācijas TMAO saturošā K-H buferšķīdumā aortas audu TMAO koncentrācija pieauga aptuveni 2,5 reizes (no  $4,8 \pm 0,5$  līdz  $12,0 \pm 1,2$  nmol/g audu).

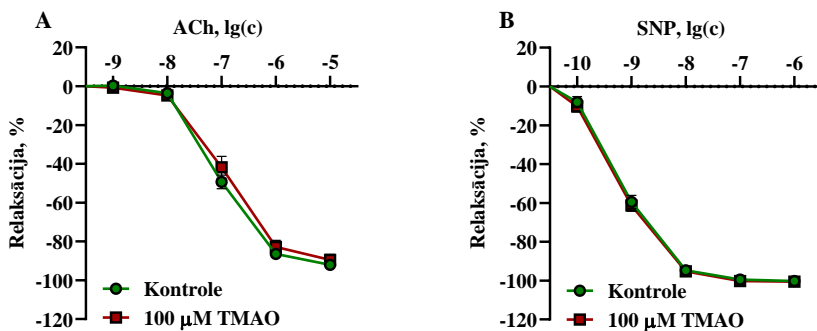


3.1. attēls. TMAO saturs sirds audos (A) pēc vienas stundas perfūzijas un aortas audos (B) pēc vienas stundas inkubācijas Krebsa-Henseleita buferšķīdumā ar TMAO pievienošanu 100 μM devā vai bez tās

Dati attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no pieciem individuāliem atkārtojumiem.

\*  $p < 0,05$  Stjudenta t-tests.

Tālāk tika novērtēta TMAO spēja ietekmēt asinsvadu reaktivitāti. Eksperimenti tika veikti izolēto orgānu vannā un žurku aortu gredzeni iemērkti K-H buferšķīdumā ar TMAO pievienošanu (100  $\mu$ M gala koncentrācija) uz vienu stundu vai bez tā pievienošanas, lai izvērtētu asinsvadu reaktivitāti uz Ach (endotēlija atkarīgā relaksācija) vai SNP (endotēlija neatkarīgā relaksācija) (3.2. attēls).



3.2. attēls. TMAO (100  $\mu$ M) ietekme uz endotēlija atkarīgo (A) un endotēlija neatkarīgo (B) relaksāciju aortu gredzenos

Dati attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  SEM no 12 aortu gredzeniem.  
Ach, acetilholīns, SNP, nātrija nitroprusīds.

Līdzīga procedūra tika veikta apzarņa artērijai, izmantojot stieples miogrāfiju. Gan aortas (3.2. attēls), gan apzarņa artērijas inkubācija ar TMAO saturošu buferšķīdumu neizraisīja izmaiņas endotēlija atkarīgajā un endotēlija neatkarīgajā relaksācijā.

Papildus šim tika veikti eksperimenti, lai izvērtētu paaugstinātu TMAO koncentrāciju ietekmi uz sirds funkciju. Sirds funkcionālie parametri tika izvērtēti Langendorfa izolētās sirds modelī, perfuzējot sirdis ar K-H buferšķīdumu. Vienai no grupām perfūzijas buferšķīdums saturēja TMAO (gala koncentrācija 1 mM) (3.1. tabula). Izolēto siržu perfūzija ar 1 mM TMAO saturošu buferšķīdumu neietekmēja sirds funkciju (sirdsdarbības ātrumu,

koronāro plūsmu, sirds kontraktilitāti, LVDP un sirds veikto darbu) ne sākumpunktā, ne išēmijas-reperfūzijas gaitā.

Pēc tam abās grupās tika izvērtēts infarkta izmērs. Pēc 30 min. kreisās lejupejošās koronārās artērijas oklūzijas ar sekojošu divu stundu reperfūziju abās grupās riska zona bija līdzīga. Turklāt nekrozes zona jeb infarkta izmērs (3.1. tabula) bija gandrīz identisks (aptuveni 40 % no riska zonas) abām grupām neatkarīgi no TMAO klātesamības buferšķīdumā.

3.1. tabula

**TMAO (1 mM) ietekme uz sirds funkciju un infarkta izmēru *ex vivo* modeli**

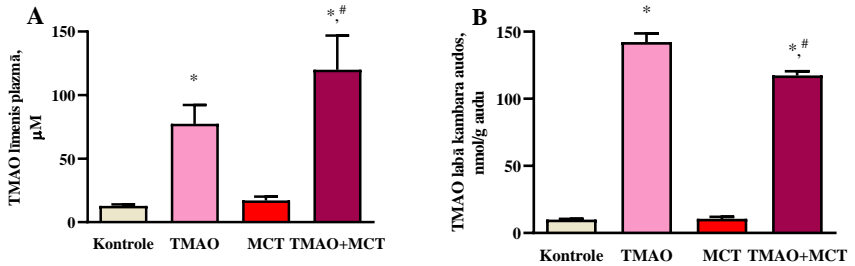
Mērītais parametrs	Kontrole	1 mM TMAO
Koronārā plūsma, ml/min.	12,4 ± 1,3	11,5 ± 0,8
LVDP, mmHg	15 5± 19	153 ± 17
Sirds darbības ātrums, sitienu minūtē	219 ± 12	230 ± 15
Kontraktilitāte, mmHg/sek.	5458 ± 347	5419 ± 399
Sirds veiktais darbs, kU	33 ± 4	34 ± 3
Infarkta izmērs, % no riska zonas	37,5 ± 3,0	41,2 ± 1,6

Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no sešām sirdīm.

### 3.2. Ilgtermiņa TMAO ievadīšana eksperimentālajā labā kambara sirds mazspējas modelī žurkās

#### 3.2.1. Sirds mazspējas smaguma pakāpe

TMAO ievadīšana devā 120 mg/kg ar dzeramo ūdeni 14 nedēļu garumā rezultējās ar seškārtīgu plazmas TMAO koncentrācijas pieaugumu (līdz pat 100 μM) gan TMAO, gan TMAO + MCT grupās (3.3.A attēls). Analizējot TMAO koncentrāciju LK audos, atklājās, ka šāds TMAO ievadīšanas režīms rezultējās ar 14 reīžu pieaugumu TMAO saturā LK audos (līdz 140 nmol/g audu) abās grupās, kas saņēma TMAO (3.3.B attēls).



### 3.3. attēls. TMAO koncentrācija plazmā (A) un labā kambara audos (B) pēc TMAO ievadīšanas ar dzeramo ūdeni devā 120 mg/kg 14 nedēļu garumā

Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  SEM no 8–9 dzīvniekiem. \* Norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību pret kontroles grupu (vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunneta pēctestu), # norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību pret MCT grupu (t-tests),  $p < 0,05$ .

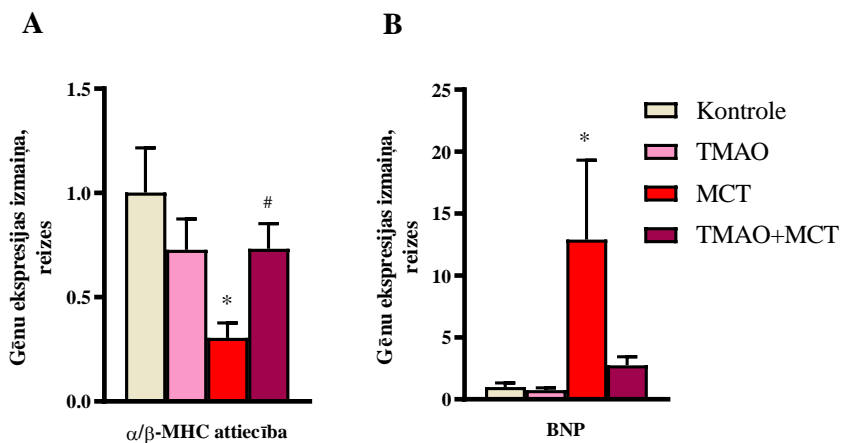
Ehokardiogrāfiskās analīzes rezultāti neatklāja nozīmīgas atšķirības sirds funkcijā starp kontroles un TMAO grupu. TMAO ievadīšana neatstāja ietekmi uz tiešo LK spiedienu, LK sistolisko un diastolisko laukumu vai LK laukuma izmaiņu (3.2. tabula). Salīdzinājumā ar kontroles grupu monokrotalīna ievadīšana izraisīja ievērojamu tiešā LK spiediena palielināšanos (apmēram par 50 %) (3.2. tabula). Turklāt MCT grupā tika novērota LK dilatācija, uz to norāda LK diastoliskā un sistoliskā laukuma palielināšanās attiecīgi par 34 % un 83 %. Sekojoši, LK laukuma izmaiņu frakcija MCT grupā bija ievērojami samazināta salīdzinājumā ar kontroles grupu. Salīdzinot ar mērījumiem MCT kontroles grupā, tiešais LK spiediens TMAO + MCT grupā bija par 22 % zemāks, LK diastoliskais un sistoliskais laukums tika samazināts par līdz pat 27 %. Tādējādi LK laukuma izmaiņu frakcija tika palielināta par 25 %. Neviens no mērītajiem parametriem TMAO + MCT grupā nebija būtiski atšķirīgs no rezultātiem kontroles grupā. Kopumā šie rezultāti liecina, ka ilgtermiņa TMAO ievadīšana neietekmē sirds funkcionalitāti. Savukārt patoloģiskos monokrotalīna izraisītās sirds mazspējas apstākļos TMAO ievadīšana saglabā miokarda mehānisko funkciju.

**Labā kambara funkcijas izvērtējums monokrotālīna izraisītas sirds  
mazspējas modelī pēc TMAO ievadīšanas 120 mg/kg devā  
14 nedēļu garumā**

<b>Mērītais parametrs</b>	<b>Kontrole</b>	<b>TMAO</b>	<b>MCT</b>	<b>TMAO + MCT</b>
Labā kambara spiediens, mmHg	21,9 ±2,0	22,7 ±1,3	33,5 ±5,3 *	26,1 ±1,8
Labā kambara diastoliskais laukums, cm <sup>2</sup>	0,37 ±0,02	0,33 ±0,02	0,50 ±0,07	0,40 ±0,04
Labā kambara sistoliskais laukums, cm <sup>2</sup>	0,20 ±0,01	0,21 ±0,02	0,36 ±0,07 *	0,26 ±0,03
Labā kambara laukuma izmaiņu frakcija, %	46,6 ±2,6	37,0 ±2,8	29,7 ±4,8 *	37,0 ±5,0

Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no 8–9 dzīvniekiem. \* Norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību pret kontroles grupu (vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunnetta pēctestu),  $p < 0,05$ .

Papildus tam ilgtermiņā TMAO ievadīšana neizraisīja izmaiņas gēnu ekspresijā LK audos gēniem, kas saistīti ar sirds mazspējas attīstību un miokarda hipertrofiju (3.4. attēls). MCT grupā  $\alpha/\beta$ -MHC gēnu ekspresijas attiecība bija samazināta 3 reizes (3.4.A attēls), kas norāda uz nobīdi par labu  $\beta$  izoformai, ko izraisa LK hipertrofija. Turklāt sirds mazspējas smaguma pakāpes marķiera, BNP, ekspresija MCT grupā bija 12 reizes paaugstināta (3.4.B. attēls). TMAO + MCT grupā,  $\alpha/\beta$ -MHC ekspresijas attiecība bija divkārt augstāka, kas liecina par mazāk izteiktu LK hipertrofiju, salīdzinot ar MCT grupu (3.4.A attēls). Arī BNP gēnu ekspresija TMAO + MCT grupā bija zemāka nekā MCT grupā (3.4.B attēls).



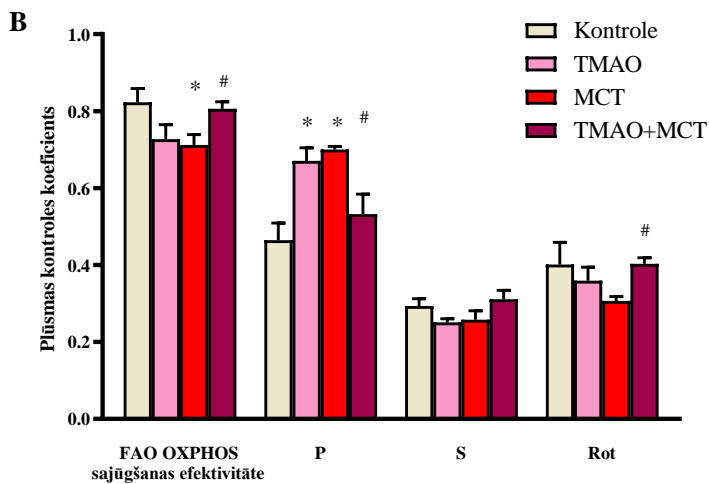
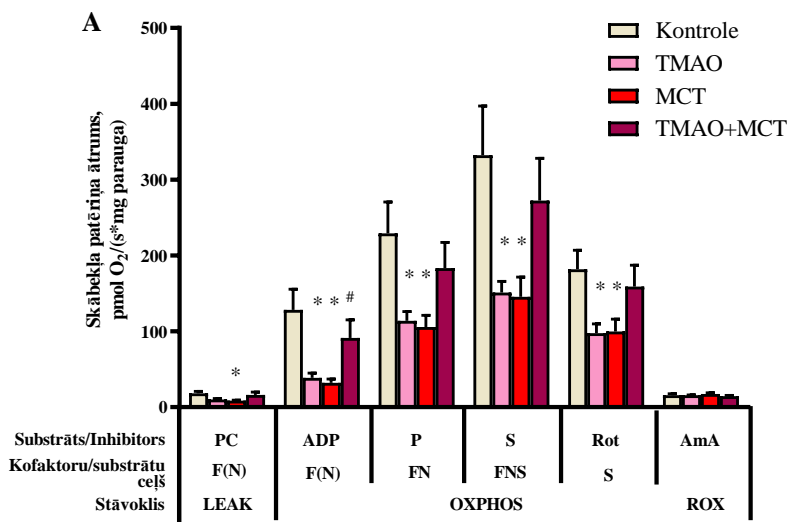
**3.4. attēls. TMAO (120 mg/kg, 14 nedēļas) ievadīšanas efekti uz sirds mazspējas smaguma pakāpi raksturojošo gēnu ekspresiju labā kambara audos**

Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  SEM no 6–8 dzīvniekiem. \* Norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību pret kontroles grupu (vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunneta pēttestu (A) vai Kruskala-Vollisa tests ar sekojošu Dunna pēttestu (B)), # norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību pret MCT grupu (t-tests),  $p < 0,05$ .

**3.2.2. Mitohondriju enerģijas metabolisms**

Lai padziļināti izpētītu ilgtermiņa TMAO ievadīšanas ietekmi uz enerģijas metabolismu, tika veikti mitohondriju elpošanas mērījumi, izmantojot permeabilizētas LK muskuļu šķiedras. Ilgtermiņa TMAO lietošana samazināja no FAO atkarīgo elpošanas ātrumu oksidatīvās fosforilācijas (OXPHOS) stāvoklī par 69 % (3.5.A attēls). Šis efekts rezultējās ar 11 % samazinājumu no FAO atkarīgajā OXPHOS sajūgšanas efektivitātē (3.5.B attēls). Lai gan piruvāta metabolisma ieguldījums kopējā skābekļa patēriņa procesā TMAO grupā palielinājās par aptuveni 44 %, kā norāda plūsmas kontroles koeficientu analīze (3.5.B attēls), tas nebija pietiekami, lai atjaunotu FN un FNS saistīto mitohondriju elpošanu OXPHOS stāvoklī (3.5.A attēls). MCT grupā tika novērots 75 % samazinājums no taukskābju oksidācijas (FAO) atkarīgajā

elpošanas ātrumā OXPPOS stāvoklī (3.5.A attēls) un turpmāks 13 % samazinājums no FAO atkarīgajā OXPPOS sajūgšanas efektivitātē (3.5.B attēls). Līdzīgi TMAO grupai, MCT grupā piruvāta metabolisma ieguldījums elpošanā palielinājās par 50 % (3.5.B attēls), taču arī šis palielinājums nebija pietiekams, lai atjaunotu FN un FNS ceļa elpošanas procesu OXPPOS stāvoklī (3.5.A attēls). Atšķirībā no TMAO grupas, MCT grupā rotenona plūsmas kontroles koeficients bija samazināts ( $p = 0,06$ ), norādot uz daļēju I kompleksa disfunkciju (3.5.B attēls). Savukārt TMAO + MCT grupā tika novērots saglabāts mitohondriju enerģijas metabolisms, par ko liecina normalizēts elpošanas ātrums (3.5.A attēls), saglabāta no FAO atkarīgā OXPPOS sajūgšanas efektivitāte un sekojošs piruvāta metabolisma ieguldījuma samazinājums (3.5.B attēls).



**3.5. attēls. Mitochondriju elpošanas ātruma mērījumi (A) un plūsmas kontrolē koeficienti (B) labā kambara muskuļu šķiedrās pēc TMAO ievadīšanas monokrotalina izraisītā labā kambara sirds mazspējas modelī**

Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SEM no 6 dzīvniekiem. \* Norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību pret kontrolē grupu (vienfaktora ANOVA ar sekojošu Dunneta pēctestu), # norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību pret MCT grupu (t-tests),  $p < 0,05$ .



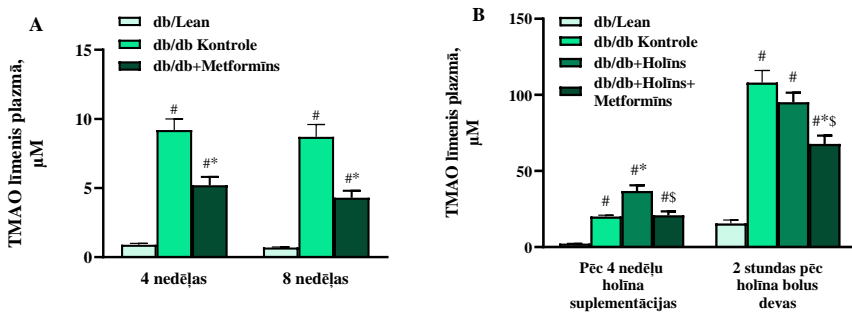
Kopumā iegūtie rezultāti liecina, ka ilgtermiņa TMAO lietošana saistīta ar mitohondriju metabolo prekondicionēšanu, izraisot pāreju no taukskābju izmantošanas uz piruvāta izmantošanu, taču neietekmējot elektronu pārnese sistēmas funkcionalitāti. Turklāt LK sirds mazspējas gadījumā TMAO ievadīšana palīdz saglabāt sirds mitohondriju enerģijas metabolismu.

### **3.3. Metformīna ietekme uz TMAO līmeni eksperimentālā peļu 2. tipa diabēta modelī**

#### **3.3.1. TMAO līmeņi db/db pelēs, kas barotas ar standarta laboratorijas barību vai uzturu, kas papildināts ar holīnu**

Lai pārbaudītu metformīna lietošanu kā farmakoloģisku pieeju TMAO līmeņu regulācijai, tika izmantots db/db peļu 2. tipa diabēta modelis. TMAO koncentrācija db/db kontroles grupas peļu plazmā, kuras baroja ar standarta ēdienu (R70), bija ievērojami augstāka (13,2 reizes) nekā veselo db/Lean peļu plazmā. Metformīna lietošana db/db pelēm (250 mg/kg, 8 nedēļas) ievērojami samazināja TMAO līmeņus līdz pat divām reizēm salīdzinājumā ar db/db kontroles grupas pelēm (3.6.A attēls).

Db/db dzīvniekiem bija būtiski palielinātas glikozes un insulīna plazmas koncentrācijas gan tukšas dūšas, gan ēdušā stāvoklī, taču šajā eksperimentālajā modelī metformīns minētos parametrus neietekmēja (dati nav parādīti). Tā kā metformīna ievadīšanai nebija glikozes pazeminoša un insulīna jutību uzlabojoša efekta db/db pelēm ar 2. tipa diabētu, šajā pētījumā novērotie efekti bija neatkarīgi no glikozes un insulīna plazmas koncentrācijām.



**3.6. attēls. Metformīna (250 mg/kg) ietekme uz TMAO koncentrāciju plazmā (A) db/db pelēm, kas 4 un 8 nedēļas barotas ar standarta laboratorijas diētu. Metformīna ietekme uz TMAO koncentrāciju plazmā pelēm, kuru uzturs 4 nedēļas papildināts ar holīnu (0,5 % ar dzeramo ūdeni) un pēc akūtas holīna ievadīšanas (100 mg/kg, bolus) (B)**

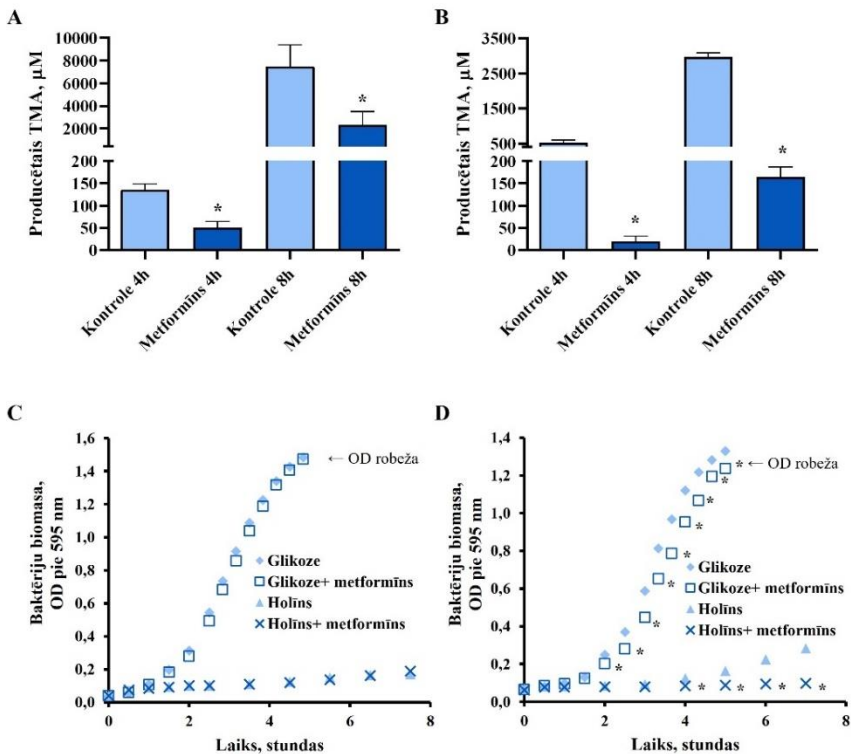
Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  SEM no 8 dzīvniekiem db/db un db/db + metformīna grupā un 10 dzīvniekiem db/Lean grupā (A). Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība  $\pm$  SEM no 10 dzīvniekiem grupā (B). \* Statistiski nozīmīgi atšķiras no db/db kontroles grupas. # Statistiski nozīmīgi atšķiras no db/Lean grupas. § Statistiski nozīmīgi atšķiras no db/db + holīna grupas (ANOVA ar Tukija pēctestu;  $p < 0,05$ ).

Tā kā TMA un sekojošā TMAO producēšana ir ļoti atkarīga no uztura sastāva, nākamajā solī mēs izvērtējam, vai metformīna ievadīšana var ietekmēt hroniskas un akūtas holīna slodzes izraisīto TMAO līmeņa paaugstināšanos. Balstoties uz secinājumiem no pirmās pētījuma daļas, kur metformīna efektivitāte bija līdzīga pēc četrām un astoņām eksperimenta nedēļām, turpmākajiem pētījumiem tika izvēlēta metformīna ievadīšana četru nedēļu garumā. Uztura papildināšana ar holīnu db/db pelēm pēc četrām nedēļām rezultējās ar 1,8 reizes paaugstinātu bazālo TMAO līmeni (36,9 µM) salīdzinājumā ar db/db pelu grupu, kuras lietoja standarta uzturu (3.6.B attēls), un 16,8 reizes augstāku TMAO līmeni nekā kontroles grupas db/Lean pelēm. Divas stundas pēc akūtas holīna slodzes TMAO līmenis plazmā paaugstinājās visās eksperimenta grupās, un augstākās koncentrācijas, līdz pat 108 µM, tika novērotas db/db kontroles grupā un grupā, kas saņēma uzturu, kurš papildināts ar holīnu. Neskatoties uz paaugstināto holīna saturu uzturā, metformīns db/db

pelēm spēja samazināt gan bazālos TMAO līmeņus, gan TMAO līmeņus divas stundas pēc akūtas holīna slodzes (3.6.B attēls).

### 3.3.2. Baktēriju spēja producēt TMA

Tā kā metformīna ievadīšana ievērojami samazināja TMAO līmeņus diabētiskās pelēs gan normālos apstākļos, gan pēc holīna slodzes, mēs testējām, vai šis efekts varētu būt saistīts ar izmainītu mikrobioma baktēriju spēju ražot TMA, kas nepieciešams, lai saimniekorganisma aknās tiktu sintezēts TMAO. Šim nolūkam mēs izvēlējāmies divas cilvēka gremošanas trakta baktēriju sugas: *K. pneumoniae* un *P. mirabilis*. *K. pneumoniae* suga tika izvēlēta tāpēc, ka tā var producēt TMA no visiem galvenajiem prekursoriem – holīna (caur CutC/D (holīna-TMA-liāzes kompleksu)) un karnitīna/GBB (caur CntA/B (karnitīna monooksidāzes kompleksu)), savukārt *P. mirabilis* suga tika izvēlēta tāpēc, ka tai ir tikai CutC/D un tā var ražot TMA tikai no holīna (Kuka et al., 2014; Wu et al., 2019). Metformīns ievērojami samazināja TMA koncentrāciju *K. pneumoniae* 3,25 reizes (3.7.A attēls), taču *K. pneumoniae* baktēriju augšana netika ietekmēta (3.7.C attēls), izmantojot holīnu vai glikozi kā vienīgo oglekļa avotu kultūrā. Metformīns ievērojami samazināja *P. mirabilis* producēto TMA (līdz 26 reizēm) (3.7.B attēls). Atšķirībā no *K. pneumoniae* metformīns ievērojami samazināja *P. mirabilis* baktēriju biomasas augšanu, izmantojot holīnu kā vienīgo oglekļa avotu (3.7.D attēls). Lai arī mazāk izteikts, šis efekts joprojām bija novērojams, kad *P. mirabilis* tika audzēts kultūrā ar glikozi kā vienīgo oglekļa avotu.



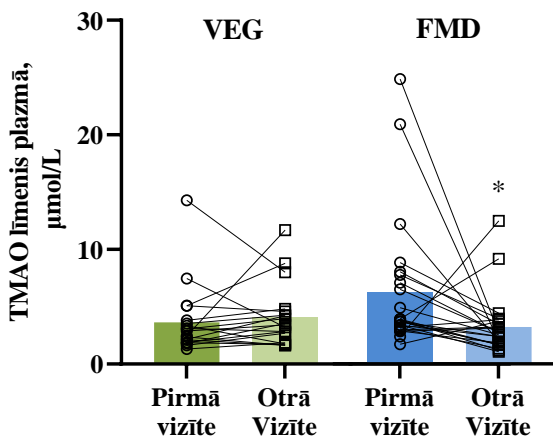
3.7. attēls. **Metformīna (27 mM) ietekme uz TMA produkciju no holīna (A, B) un baktēriju augšanu (C, D) *K. pneumoniae* (A, C) un *P. mirabilis* (B, D) baktēriju kultūrā**

Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība ± SD no 3 (A) vai 4 (B,C,D) individuāliem atkārtojumiem. \*  $p < 0,05$  pret atbilstošā laika punkta kontroli (t-tests).

Kopumā šie dati sniedz pierādījumus tam, ka metformīns var samazināt TMA producēšanas ātrumu divos izvēlētajos baktēriju celmos, izmantojot divus atšķirīgus mehānismus. Šis efekts ir diezgan sarežģīts, un mūsu dati norāda, ka metformīna ietekme, samazinot TMAO veidošanos baktēriju kultūrās, netiek īstenota, izmantojot holīna-TMA-liāzes kompleksu.

### **3.4. Badošanos imitējoša diēta kā dzīvesveida stratēģija TMAO līmeņu regulācijai**

Lai pārbaudītu FMD kā iespējamo dzīvesveida stratēģiju TMAO līmeņu samazināšanai, tika veikts klīniskais pētījums ar veselīgiem brīvprātīgajiem. Vidējais TMAO koncentrācijas līmenis brīvprātīgo plazmā pētījuma sākumā bija  $5,08 \pm 0,74 \mu\text{mol/L}$ . Pēc uztura intervences plazmas TMAO līmeņa mērījumi atklāja, ka piecas dienas parastā uztura, kas papildināts ar četrām porcijām dārzeņu dienā (VEG), neizraisīja būtiskas izmaiņas plazmas TMAO līmenī (3.8. attēls), ar vidējo pieaugumu par  $0,43 \pm 0,70 \mu\text{mol/L}$ . Šajā grupā 8 no 19 brīvprātīgajiem novērojām plazmas TMAO līmeņa samazināšanos pēc uztura intervences; tomēr 11 brīvprātīgajiem tika novērots paaugstināts plazmas TMAO līmenis. Pretēji tam 75 % (24 no 18) brīvprātīgo, kuri ievēroja FMD, novērojām ievērojamu plazmas TMAO līmeņa samazināšanos. Tiem brīvprātīgajiem no FMD grupas, kam bazālie TMAO līmeņi pētījuma sākumpunktā bija augstāki, novēroja arī izteiktāku plazmas TMAO līmeņa samazināšanos pēc uztura intervences ( $r = -0,9226$ ,  $p < 0,0001$ ). Turklāt vidējais plazmas TMAO līmenis FMD grupā otrajā vizītē bija par  $3,01 \pm 1,43 \mu\text{mol/L}$  zemāks nekā pirmajā vizītē (3.8. attēls).



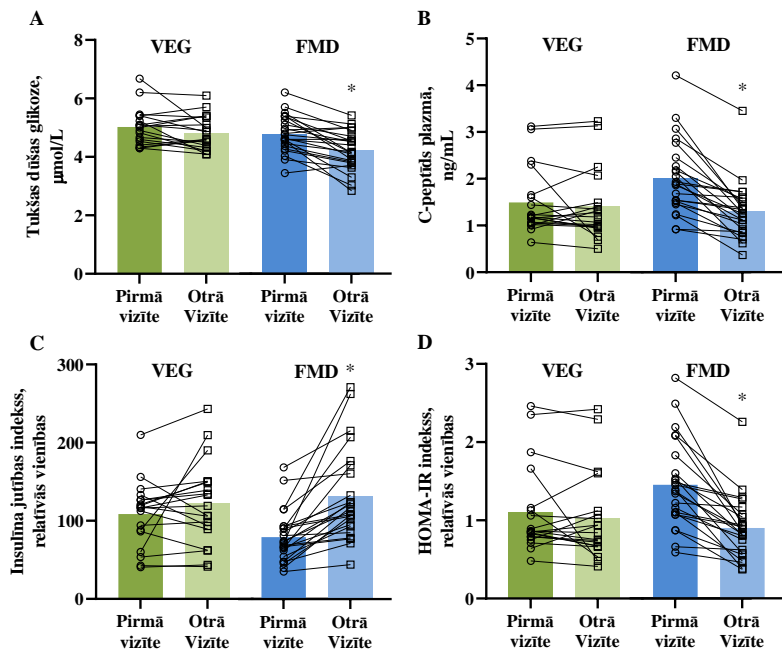
**3.8. attēls. Piecu dienu uztura intervences ietekme uz plazmas TMAO līmeni: ierastais uzturs papildināts ar 4 porcijām dārzeņu dienā (VEG) vai badošanos imitējošu diētu (FMD)**

Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība un individuālās vērtības no 19 brīvprātīgajiem VEG grupā un 24 brīvprātīgajiem FMD grupā. \* Norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību pret attiecīgās grupas rezultātiem pirmajā vizītē (Vilkoksona pāru tests),  $p < 0,05$ .

Tālāk mēs izvērtējam VEG diētas un FMD piecu dienu cikla ietekmi uz metabolajiem parametriem. Tukšas dūšas plazmas glikozes līmenis (3.9.A attēls) VEG grupā uztura intervences ietekmē samazinājās par  $0,22 \pm 0,12$  mmol/L. Savukārt FMD grupā glikozes samazināšanās bija 2,7 reizes izteiktāka (samazinājums par  $0,57 \pm 0,11$  mmol/L). Līdzīgs efekts bija novērojams plazmas C-peptīda līmenī (3.9.B attēls), kur FMD grupā tika novērots būtisks plazmas C-peptīda samazinājums salīdzinājumā ar VEG grupu (samazinājums attiecīgi par  $0,72 \pm 0,11$  ng/mL un  $0,09 \pm 0,11$  ng/mL).

Sekojoši, brīvprātīgajiem FMD grupā tika novērots arī uzlabots insulīna jutības indekss (3.9.C attēls). Insulīna jutības pieaugums bija 3,8 reizes lielāks nekā VEG grupā un pārsniedza sākotnējo mērījumu par vairāk nekā 60 %. FMD priekšrocības bija vēl izteiktākas, aprēķinot HOMA-IR indeksu, kas definē insulīna rezistences pakāpi (3.9.D attēls). VEG grupā novērojām minimālu HOMA-IR samazināšanos par  $0,08 \pm 0,08$  vienībām, kamēr katram no FMD

grupas brīvprātīgajiem tika novērots samazināts HOMA-IR indekss (vidējais samazinājums par  $0,55 \pm 0,08$  vienībām).



### 3.9. attēls. Izmaiņas tukšas dūšas plazmas glikozes (A), plazmas C-peptīda (B) un insulīn jutības indeksa (C) un HOMA-IR indeksa (D) līmeņos pēc 5 dienu ierastā uztura, kas papildināts ar dārzeņiem (VEG) vai badošanos imitējošas diētas (FMD) cikla

Rezultāti attēloti kā vidējā vērtība un individuālās vērtības no 19 brīvprātīgajiem VEG grupā un 24 brīvprātīgajiem FMD grupā. \* Norāda uz statistiski nozīmīgu atšķirību pret attiecīgās grupas rezultātiem pirmajā vizītē (Vilkoksona pāru tests),  $p < 0,05$ .

## 4. Diskusija

Šo tēžu rezultāti liecina, ka īstermiņa TMAO koncentrācijas paaugstināšanās neizraisa kaitīgu ietekmi uz sirds vai asinsvadu funkciju *ex vivo* un *in vivo* eksperimentālajos modeļos. Pārsteidzoši tika atklāts, ka specifiskos apstākļos žurku LK sirds mazspējas modelī ilgtermiņa TMAO ievadīšana izraisa prekondicionējošus efektus, kas izpaužas kā saglabāta taukskābju oksidācijas kapacitāte un aizsargāta sirds funkcija. Tādējādi darba pirmā hipotēze netika apstiprināta, jo mēs nenovērojām kaitīgo molekulāro signālceļu aktivāciju vai sirds un asinsvadu funkcijas pasliktināšanos pēc TMAO ievadīšanas grauzēju eksperimentālajos modeļos. Lai citiem pētniekiem nodrošinātu atbilstošas references vērtības *ex vivo* un *in vivo* modeļos, visa datu kopa no I publikācijas ir pieejama brīvpieejas režīmā. Līdz ar to šajā darbā iegūtos datus var izmantot salīdzinošiem pētījumiem, kuru mērķis ir pētīt paaugstinātu TMAO koncentrāciju īstermiņa un ilgtermiņa ietekmi uz enerģijas substrātu metabolismu, sirds funkcionalitāti un asinsvadu reaktivitāti. Savukārt darba otrā hipotēze tika apstiprināta, jo mēs demonstrējam cirkulējošā TMAO līmeņa samazināšanos asinīs, izmantojot metformīnu, eksperimentālā 2. tipa diabēta dzīvnieku modelī. Turklāt mēs parādījām, ka piecu dienu FMD ir efektīva dzīvesveida stratēģija, lai samazinātu TMAO līmeni un uzlabotu kopējo metabolo stāvokli veselīem brīvprātīgajiem.

### 4.1. Paaugstinātas TMAO koncentrācijas efekti eksperimentālos kardiovaskulāro un metabolo slimību modeļos

Līdz šim dati no dažādām pacientu kohortām par TMAO iesaisti kardiometabolo slimību attīstībā ir bijuši diezgan vienbalsīgi, izvirzot TMAO kā biomarķieri, kas palīdz paredzēt kardiovaskulāro un metabolo slimību risku (Li et al., 2022). Rezultāti no preklīniskajiem pētījumiem vismaz daļēji pamato TMAO iesaisti kardiovaskulāro slimību (KVS) patoģenēzē. Daži pētījumi ir



norādījuši uz saistību starp TMAO un aterosklerozes (AS) attīstību (Koeth et al., 2013; Geng et al., 2018; Liu and Dai, 2020), kas ir viens no galvenajiem KVS cēloņiem. Citi mehānismi, kas identificēti preklīniskajos pētījumos un varētu saistīt TMAO ar KVS patoģenēzi, ir trombocītu aktivācija, kas paaugstina trombozes risku (Zhu et al., 2016), vaskulārā iekaisuma aktivācija (Chen et al., 2017; Ma et al., 2017) un angiotenzīna II hipertensīvo efektu paildzināšana (Ufnal et al., 2014).

Tomēr pēdējos gados vairāki preklīniskie pētījumi ir ziņojuši par TMAO izraisīto efektu neesamību KVS patoģenēzē pat ievērojami paaugstinātu tā koncentrāciju gadījumā. Ir pierādīts, ka pat 100 reizu liels TMAO koncentrācijas pieaugums asinsritē (līdz pat 60  $\mu\text{M}$ ) neietekmēja sirds funkcionalitāti žurkās (Ufnal et al., 2014). Līdzīgi nenovēroja nekādu efektu uz sirds funkcionālajiem parametriem pelēs pēc 0,12 % TMAO pievienošanas barībā uz trim nedēļām (Organ et al., 2016). Turklāt nesēn ir parādīts, ka TMAO līdz pat 10 mM koncentrācijās neietekmē žurku kardiomiocītu dzīvotspēju, mitohondriju membrānas potenciālu vai reaktīvo skābekļa radikāļu veidošanos (Querio et al., 2019). Turklāt pētījumi liecina, ka paaugstinātas TMAO koncentrācijas nesaasina jau esošu stresa faktoru efektus (Querio et al., 2019), piemēram, ūdeņraža peroksīda gadījumā, kas ir galvenais oksidatīvā stresa izraisītājs (Nita and Grzybowski, 2016), un doksorubicīna gadījumā, kas izraisa līdzīgus traucējumus sirds enerģijas substrātu metabolismā, kādi ir novēroti sirds mazspējas attīstības laikā (Wu et al., 2016). Mūsu eksperimentālie rezultāti no akūtas TMAO pievienošanas *ex vivo* un *in vivo* modeļos liecina, ka TMAO nevajadzētu uzskatīt par primāro sirds bojājumu cēloni, jo mēs nenovērojam kaitīgu TMAO ietekmi uz sirds funkciju žurku izolētās sirds modelī ne normālos apstākļos, ne išēmijas-reperfūzijas apstākļos (3.1. tabula).

Protams, mēs nevaram uzskatīt, ka visi šūnu veidu un orgānu sistēmas uz tik augstām TMAO devām reaģētu līdzīgi. Katrā konkrētajā gadījumā jāņem vērā atšķirīgie efekti, kas ir atkarīgi no izmantotās TMAO devas, ievadīšanas ilguma un izmantotā šūnu veida. Iepriekš veiktie pētījumi grauzēju dabiskās un paātrinātās novecošanās modeļos ir parādījuši TMAO kaitīgo ietekmi (līdz pat 14  $\mu\text{M}$ ) uz endotēlija šūnām, veicinot šūnu novecošanu un izraisot oksidatīvo stresu (Li et al., 2017; Ke et al., 2018), kas ir svarīgi patoģenēzes mehānismi asinsvadu novecošanās procesā. Šie rezultāti arī pamato TMAO iesaisti AS attīstībā, jo nevēlama ietekme uz endotēlija šūnām ir viens no AS patoģenēzes palaidējmehānismiem. Tomēr pretēji gaidītajam mūsu iegūtie rezultāti neparādīja akūtu TMAO ietekmi uz vadītspējas vai pretestības asinsvadu endotēlija atkarīgo vai neatkarīgo reaktivitāti (3.2. attēls). Līdzīgi rezultāti novēroti arī citos iepriekš publicētajos pētījumos (Matsumoto et al., 2020; Oakley et al., 2020; Florea et al., 2023). Šie novērojumi liecina, ka ietekme uz endotēlija šūnām nav akūts TMAO izraisīts efekts, bet gan parādās hroniski paaugstinātu TMAO līmeņu gadījumā, kā arī parādīts iepriekš (Ke et al., 2018; Brunt et al., 2022).

Mūsu rezultāti no labās kambara sirds mazspējas modeļa, kur TMAO tika ievadīts žurkām ar dzeramo ūdeni 14 nedēļas, norāda, ka TMAO līmenis sirds audos var sasniegt līdz pat 140 nmol/g audu (3.3. attēls). Mūsu rezultāti pierāda, ka ilgstoša TMAO līmeņu paaugstināšanās plazmā (līdz 100  $\mu\text{M}$ ) un sekojoši arī sirds audos sirds funkciju neietekmē (3.2. tabula). Mūsu eksperimentālajā modelī ilgstoša TMAO ievadīšana novirzīja mitohondriju enerģijas substrātu izmantošanu no taukskābju oksidācijas uz glikozes metabolismu, bet atšķirībā no sirds mazspējas grupas TMAO grupā nenotika izmaiņas mitohondriju elektronu pārneses sistēmas funkcionalitātē (3.5. attēls). Ņemot vērā, ka pāreja no kompensētas sirds hipertrofijas uz sirds mazspēju parasti sākas ar elpošanas kompleksu I un II disfunkciju (Griffiths et al., 2010), neizmainīta kompleksu I un

II funkcija varētu izskaidrot mūsu novērojumus par saglabātu sirds funkcionalitāti gadījumā, kad TMAO tika lietots 14 nedēļas (3.5. attēls, 3.2. tabula). Kopumā mūsu rezultāti liecina, ka ilgstošs TMAO līmeņa paaugstinājums žurku plazmā un sirds audos kaitīgu ietekmi uz sirds funkciju neizraisa, neskatoties uz novērotajām izmaiņām mitohondriju enerģijas metabolismā.

Papildus agrāk ziņotajām TMAO protektīvajām īpašībām mūsu pētījums piedāvā saglabātu sirds enerģijas metabolismu kā iespējamo mehānismu, kas skaidro novēroto TMAO protektīvo efektu. Sirds ir spējīga pielāgoties gan fizioloģiskiem, gan patoloģiskiem stresa faktoriem, pārslēdzoties no FAO kā dominējoša enerģijas avota uz pastiprinātu glikozes izmantošanu (Brown et al., 2017). Fizioloģiskos stāvokļos šāda pāreja var tikt uzskatīta par nosacītu prekondicionēšanas stratēģiju, jo tādējādi sirds ir labāk sagatavota nākotnes stresa apstākļiem, piemēram, kad hipoksijas gadījumā sirds spēj labāk izmantot efektīvākus enerģijas avotus (Karwi et al., 2018). Pēc ilgstošas TMAO lietošanas tika novērota FAO samazināšanās un paaugstināts pīruvāta metabolisma ieguldījums (3.5. attēls), nemainoties sirds funkcijai (3.2. tabula). Ilgstošs TMAO koncentrācijas pieaugums spēj inducēt šo metabolo pāreju, iespējams, tieši inhibējot  $\beta$ -oksidāciju un novedot pie efektīvāka substrātu metabolisma procesa stresa apstākļos. Tas nodrošina saglabātu enerģijas metabolismu un sekojoši uzlabotu sirds funkciju TMAO + MCT grupā. Jāatzīst, ka šādi TMAO aizsargājošie efekti netika novēroti pēc īstermiņa TMAO līmeņa paaugstināšanas izolētās žurku sirds eksperimentos (3.1. tabula). Kopumā metabolās elastības uzturēšana un saglabāta FAO ir svarīgas stratēģijas sirds bioenerģētiskā līdzsvara atjaunošanai (Kolwicz et al., 2012; Karwi et al., 2018), un mūsu rezultāti liecina, ka ilgstošs TMAO pieaugums izraisa metabolajai prekondicionēšanai līdzīgus efektus sirds mazspējas gadījumā, izmantojot abas iepriekš minētās stratēģijas.

Kopumā šeit prezentētie rezultāti sniedz pierādījumus tam, ka akūta TMAO līmeņa paaugstināšanās nevar tikt uzskatīta par tiešu sirds vai asinsvadu bojājuma izraisītāju. Taču TMAO izraisītie efekti ir atkarīgi no intervences ilguma. Ilgstoša TMAO ievadīšana aizsargā sirds funkciju, saglabājot mitohondriju enerģijas metabolismu eksperimentālajā monokrotālā izraisītajā labā kambara sirds mazspējas modelī, kur TMAO darbojas kā prekondicionējošs faktors.

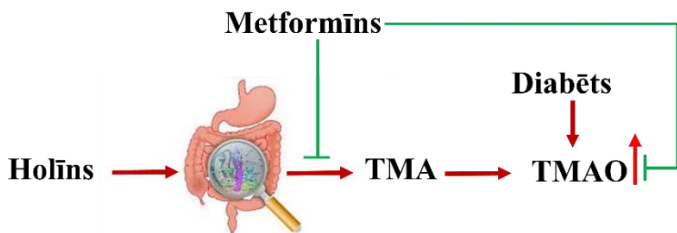
## **4.2. Metformīna ietekme uz uztura-mikrobioma-TMAO asi**

Zināšanas par metformīna pretdiabēta darbības mehānismu gadu gaitā ir kļuvušas arvien plašākas: no kompleksa I inhibīcijas aknās (Owen, Doran, and Halestrap, 2000) līdz glikoneoģenēzes nomākšanai, inhibējot mitohondriju glicerolfosfāta dehidrogenāzi (Madiraju et al., 2014), mijiedarbībai ar zarnu mikrobiomu (Forsslund et al., 2015; McCreight, Bailey and Pearson, 2016) un metformīna iespējamai dzelzs jonu saistīšanas aktivitātei (Stynen et al., 2018). Mūsu pētījumā pierādījām, ka metformīns var tieši inhibēt baktēriju TMA producēšanu un samazināt plazmas TMAO koncentrāciju pelēs. Šajā pētījumā db/db pelēm bija izteikta hiperglikēmija un aptaukošanās. Mūsu eksperimenta apstākļos metformīna ievadīšana neietekmēja glikozes un insulīna līmeņus db/db pelēm, kas norāda, ka metformīna izraisītās TMAO līmeņu izmaiņas ir vismaz daļēji neatkarīgas no glikozes un insulīna plazmas koncentrācijām.

Iepriekš tika parādīts, ka 12 nedēļas vecām db/db pelēm ir ievērojami, līdz 9  $\mu\text{M}$ , paaugstināts TMAO līmenis (Dambrova et al., 2016). Translējot šo rezultātu uz pacientiem, tas norāda uz ievērojami palielinātu BNKN risku, jo TMAO plazmas līmenis pārsniedz riska sliekšni 6,18  $\mu\text{M}$  (Tang et al., 2013). Arī šajā eksperimentā db/db kontroles grupas pelēm, kuras barotas ar standarta R70 laboratorijas barību, TMAO līmenis plazmā bija ievērojami virs 6,18  $\mu\text{M}$  (3.6.A, B attēls). Metformīna ievadīšana samazināja TMAO līmeni aptuveni divas

reizes, sasniedzot līmeņus, kas ir zemāki par sliksni, kas saistīts ar BNKN risku. Dzīvniekiem, kuru uzturs ikdienā bija papildināts ar holīnu, metformīna ievadīšana ievērojami samazināja TMAO plazmas koncentrāciju gandrīz 1,8 reizes (3.6.B attēls), tomēr TMAO plazmas līmenis palika augstāks par KVS riska sliksni.

Mūsu rezultāti norāda, ka metformīna akūtie efekti izraisa TMAO koncentrācijas samazinājumu, ierobežojot baktēriju TMA ražošanu (3.7. attēls). Šie rezultāti pierāda, ka metformīns kavē baktēriju spēju ražot TMA no holīna (4.1. attēls); metformīns nav spējīgs samazināt *K. pneumoniae* TMA ražošanu gadījumā, kad holīna vietā kā vienīgais substrāts tiek izmantots karnitīns (nepublicēti novērojumi). Interesanti, ka vienādos eksperimentālajos apstākļos metformīnam nebija ietekmes uz *K. pneumoniae* anaerobo augšanu (baktēriju suga, kas spējīga metabolizēt vairākus trešējos amīnus), bet ievērojami aizkavēja (bakteriostatisks efekts) *P. mirabilis* augšanu (tikai holīnu metabolizējošās baktēriju suga) (3.7. attēls), norādot uz vismaz diviem dažādiem metformīna darbības mehānismiem uz zarnu mikrobiomu. Metformīna ietekme uz TMA sintēzi ir diezgan sarežģīta. Holīna degradācija līdz TMA baktērijās notiek speciālos mikronodalījumos, kas satur holīna-TMA-liāzi (Herring et al., 2018). Mūsu dati liecina, ka metformīns ietekmē citus komponentus vai procesus, piemēram, kofaktoru pārstrādi šajos mikronodalījumos, bet ne pašu holīna-TMA-liāzes enzīmu, samazinot TMA ražošanu. Neskatoties uz to, nepieciešami turpmāki pētījumi, lai parādītu, kā rezultāti no *in vitro* pētījumiem un dati no db/db peļu modeļa tiek translēti klīniskajā vidē un kā metformīna ārstēšana ietekmē to baktēriju sastopamību, kas ražo TMA no ar uzturu uzņemtiem trešējiem amīniem pacientos.



4.1. attēls. **Metformīna spēja samazināt paaugstinātos TMAO līmeņus 2. tipa diabēta modeli**

Kopumā mēs ieguvām pierādījumus, kas norāda, ka metformīns var izraisīt ievērojamas TMAO līmeņa izmaiņas, iespējams, tieši neletāli inhibējot baktēriju spēju producēt TMA. Turklāt šie efekti ir neatkarīgi no glikozes un insulīna plazmas koncentrācijām, un tie varētu kalpot kā papildu mehānisms, kas izskaidro metformīna terapijas kardiovaskulāros efektus. Lai gan metformīns spēj samazināt TMAO koncentrāciju peļu plazmā zem KVS riska sliekšņa, būtu nepieciešami turpmāki pētījumi pacientu populācijā, lai noskaidrotu, kā šie rezultāti translējas klīnikas vidē. Turklāt pacientiem, visticamāk, būtu nepieciešamas arī papildu uztura izmaiņas, lai sasniegtu klīniski nozīmīgus rezultātus.

### 4.3. **Badošanos imitējoša diēta kā dzīvesveida stratēģija, lai uzlabotu metabolo veselību un samazinātu TMAO līmeņus**

Uztura izvēles būtiskā loma TMAO koncentrāciju regulēšanā ir neapstrīdama. TMAO līmeņu regulācijai izmantojot farmakoloģiskas pieejas, parasti netiek normalizēti citi metaboliskie parametri, kas raksturo kardiovaskulāro un metabolo veselību. Tādēļ ir būtiski izpētīt un veicināt uztura un dzīvesveida stratēģiju izmantošanu, kas būtu labvēlīgas TMAO līmeņu regulācijai un kopējai metabolojai veselībai. Šajā pētījumā iegūtie rezultāti liecina, ka piecu dienu FMD ir efektīva uztura stratēģija, lai samazinātu plazmas

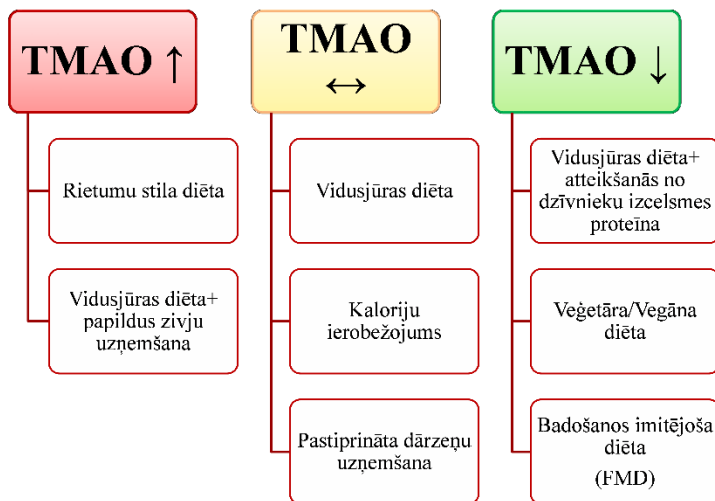
TMAO līmeņus. TMAO līmeņa samazinājumu un pārējo metabolo parametru uzlabošanas veselīem brīvprātīgajiem izraisīja periodisks uzturvielu ierobežojums un atteikšanās no dzīvnieku izcelsmes olbaltumvielu patēriņa, nevis palielināts dārzeņu patēriņš.

Mūsu pētījumā brīvprātīgo raksturojums eksperimenta sākumpunktā parādīja, ka dažiem brīvprātīgajiem bija ļoti augsti plazmas TMAO līmeņi (3.8. attēls), kas bija daudz augstāki (līdz pat 24  $\mu\text{mol/L}$ ) par KVS riska sliekšni. Tomēr, ievērojot FMD, 75 % no brīvprātīgajiem plazmas TMAO līmeņi ievērojami samazinājās (3.8. attēls). Pētījuma nobeigumā 22 no 24 brīvprātīgajiem FMD grupā plazmas TMAO līmeņi bija zem KVS riska sliekšņa. Iepriekš publicēts pētījums ziņoja, ka FMD labvēlīgie efekti ir izteiktāki cilvēkiem ar augstāku hronisko kardiovaskulāro un metabolo slimību risku nekā tiem, kuru metabolie marķieri jau atrodas normālajā diapazonā (Wei et al., 2017). Mūsu pētījumā tas attiecas arī uz TMAO līmeņiem, jo visizteiktākais TMAO koncentrāciju samazinājums tika novērots brīvprātīgajiem no FMD grupas ar augstākiem sākotnējiem plazmas TMAO līmeņiem.

Lai gan dati no novērojuma pētījumiem liecina, ka palielināts augļu un dārzeņu patēriņš ir saistīts ar mazāku metabolo slimību risku (Mamluk et al., 2017; Tian et al., 2018), šie secinājumi nav neapšaubāmi pierādīti uztura intervences pētījumos (Kuzma, Schmidt and Kratz, 2017). Mūsu rezultāti liecina, ka īstermiņa augļu un dārzeņu patēriņa palielināšana, kā pētījuma VEG grupā, var nebūt pietiekama, lai samazinātu plazmas TMAO līmeņus un sniegtu pamanāmu labvēlīgu ietekmi attiecībā uz metabolo veselību (3.8., 3.9. attēls). Turklāt VEG grupas brīvprātīgie tika aicināti turpināt ievērot sava ierastā kaloriju daudzuma uzņemšanu un uztura paradumus attiecībā uz gaļas patēriņu, kas ir saistīts ar paaugstinātu metabolā sindroma risku (Kim and Je, 2018; Guo et al., 2021) un 2. tipa diabētu (Yang et al., 2020). Alternatīva FMD, kas paredz ierobežotu dzīvnieku izcelsmes produktu patēriņu, būtu vegānā diēta. Nesenā

pētījumā vegānā diēta parādīja daudzsoļošus rezultātus un samazināja plazmas TMAO līmeņus jau nedēļu pēc pārejas uz augu izcelsmes diētu (Argyridou et al., 2021). Tomēr TMAO koncentrācija atgriezās iepriekšējā līmenī pēc ierastās diētas atjaunošanas (Argyridou et al., 2021), norādot, ka vegāno diētu vajadzētu izmantot kā pastāvīgu uztura režīmu, lai uzturētu TMAO līmeņus normālā diapazonā. Vēl viena uztura intervence, kas balstās uz augu izcelsmes produktiem kopā ar mērenu zivju un putnu gaļas patēriņu, ir Vidusjūras diēta. Šī diēta ir plaši apspriesta TMAO regulēšanas kontekstā, jo zivju un jūras produktu patēriņš ir labvēlīgs kardiovaskulārajai un metabolajai veselībai (Estruch et al., 2018; Jimenez-Torres et al., 2021). Tomēr zivju patēriņš var arī ievērojami paaugstināt TMAO līmeņus (Krüger et al., 2017; Costabile et al., 2021). Neatkarīgi no tā nesen ir ziņots, ka Vidusjūras diēta ir saistīta ar zemākiem TMAO līmeņiem, taču tikai tad, kad ir samazināts arī dzīvnieku izcelsmes olbaltumvielu (Barrea et al., 2019), īpaši sarkanās gaļas, patēriņš (Krishnan et al., 2021). Vairāku populāru uztura režīmu ietekme uz TMAO līmeņu regulāciju apkopota 4.2. attēlā. Kopumā līdz šim publicētie un mūsu pētījumā iegūtie rezultāti pierāda dzīvnieku izcelsmes olbaltumvielu patēriņa samazināšanas un kaloriju ierobežojuma nozīmi, lai panāktu TMAO līmeņu samazināšanu, kā tas ir pierādījies FMD izmantošanas gadījumā.





4.2. attēls. Uztura intervencu ietekme uz cirkulējošā TMAO koncentrācijām cilvēkos

Mūsu uztura intervences pētījuma galvenais ierobežojums ir intervences īstermiņa raksturs (tikai piecu dienu periods), kas imitē akūtu uztura izmaiņu. Tomēr jau ir ziņots, ka šādi piecu dienu cikli ar FMD varētu kalpot arī kā ilgtermiņa stratēģija, ja tie tiek atkārtoti katru mēnesi (Brandhorst et al., 2015). Tā kā mūsu pilotdati liecina, ka vismaz daļēji TMAO līmeņu samazinājumu brīvprātīgo plazmā var novērot arī nedēļu pēc FMD cikla pabeigšanas, būtu jāveic turpmākie pētījumi, lai novērtētu FMD labvēlīgo ietekmi uz TMAO līmeņiem plazmā pēc atgriešanās pie ierastās diētas. Tā kā TMA producēšana ir pilnībā atkarīga no mikrobioma sastāva, vēl viens šī pētījuma ierobežojums ir fakts, ka mums nebija iespējas savākt un analizēt paraugus, lai novērtētu FMD ietekmi uz zarnu mikrobiomu. Daži pētījumi norāda, ka mikrobioma sastāva izmaiņas un palielināta TMA ražojošo baktēriju sastopamība varētu būt mehānisms, kādēļ plazmas TMAO līmeņi palielinās 2. tipa diabēta pacientiem (Al-Obaide et al., 2017). Tomēr nesenie pētījumi liecina, ka dažas no tipiskajām izmaiņām zarnu mikrobioma sastāvā pacientiem ar 2. tipa diabētu

(Turnbaugh et al., 2008; Dávila, 2018) vai AS (Wang et al., 2015) var novērst, ievērojot FMD (Wei et al., 2018; Rangan et al., 2019), līdz ar to, iespējams, samazinot TMA rašanos un KVS riskus. Kopumā šie dati norāda, ka FMD labvēlīgo ietekmi uz TMAO līmeņu regulāciju nevar izskaidrot tikai ar TMAO prekursoru uzņemšanas samazinājumu (Koeth et al., 2019; Wang et al., 2019; Wu et al., 2019), bet jāņem vērā arī ietekme uz zarnu mikrobioma sastāvu. Ir pierādīts, ka daži no pozitīvajiem efektiem uz zarnu mikrobioma sastāvu tiek novēroti tikai pēc ierastās diētas atsākšanas (Rangan et al., 2019). Tādēļ lielu interesi raisītu arī turpmāki pētījumi, lai noskaidrotu konkrētu TMA ražojošu baktēriju ģinšu daudzuma izmaiņas pēc FMD cikla ievērošanas un ierastās diētas atjaunošanas.

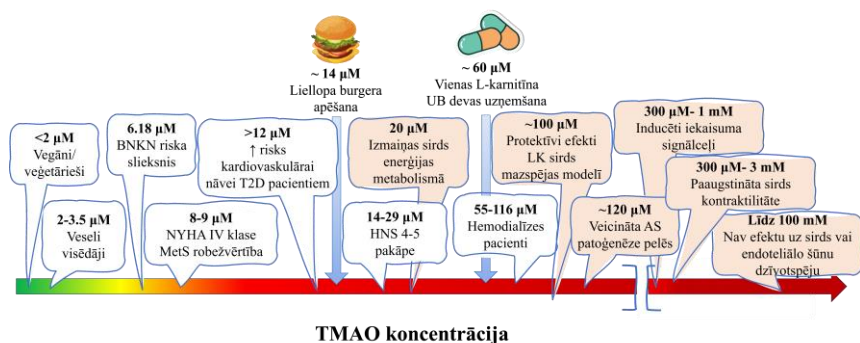
Kopumā mūsu rezultāti liecina, ka FMD – augu izcelsmes produktos bāzēta intervālu badošanās variācija ar kaloriju ierobežojumu un dzīvnieku izcelsmes olbaltumvielu izslēgšanu – ir efektīva stratēģija plazmas TMAO līmeņu samazināšanai. Mūsu rezultāti sniedz jaunu ieskatu par to, ka FMD spēj ietekmēt cilvēka metabolo stāvokli, un liecina, ka TMAO samazinājums būtu jāuzskata par vienu no būtiskajiem FMD izraisītajiem labvēlīgajiem efektiem attiecībā uz metabolo veselību. Tomēr nepieciešami turpmāki pētījumi, lai novērtētu FMD potenciālu un iespējamo ietekmi uz TMAO līmeņiem pēc vairākiem diētas cikliem, kā arī pēc ierastās diētas atjaunošanas.

#### **4.4. Vispārējie apsvērumi par TMAO lomu kardiovaskulāro un metabolo slimību attīstībā**

Viedokļi par TMAO lomu kardiometabolo slimību patoģenēzē ir nevienprātīgi, un pētījumi, kas cenšas noskaidrot TMAO ietekmētos molekulāros mehānismus, ir pretrunīgi. Ir vairāki faktori, kas jāņem vērā, kritiski izvērtējot iepriekš publicēto pētījumu rezultātus.

Pirmais un, iespējams, viens no svarīgākajiem faktoriem ir koncentrāciju diapazons, kas novērojams klīniskajos pētījumos, kur tiek mērīts cirkulējošais TMAO līmenis, un tās koncentrācijas, kas tiek izmantotas darbības mehānismu pētījumu veikšanā, ievadot TMAO (apkopots 4.3. attēlā). Vidējais plazmas TMAO līmenis veselam cilvēkam ir aptuveni 3  $\mu\text{M}$  ar nelielām nobīdēm, kas atkarīgas no ierastā uztura (Wu et al., 2019), cilvēka vecuma (Li et al., 2018) un dzimuma (Manor et al., 2018). Ģeogrāfiskā atrašanās vieta un etniskā piederība ir saistīta ar lielāku TMAO līmeņa variabilitāti (Yazaki et al., 2019, 2020). Piemēram, Japānas iedzīvotāju vidējais plazmas TMAO līmenis ir ievērojami augstāks ( $\sim 10 \mu\text{M}$ ) un atkarīgs no dzīvesvietas teritorijas, ar trīs reizes augstākiem plazmas TMAO līmeņiem tiem, kas dzīvo tuvu piekrastei, salīdzinot ar iekšzemes iedzīvotājiem (Yano et al., 2018). Tas varētu tikt skaidrots ar lielāku zivju patēriņu Japānas iedzīvotāju vidū. Turklāt svarīgs ir arī zivju vai jūras produktu veids, jo TMAO līmeņu paaugstināšanās pēc dažādu zivju sugu produktu patēriņa ievērojami atšķiras (Wang et al., 2022). Apēdot vienu liellopa burgeru, TMAO līmeņi paaugstinās aptuveni līdz 14  $\mu\text{M}$ , savukārt vienas ieteicamās dienas devas karnitīna uztura bagātinātāja lietošana TMAO līmeni paaugstina līdz apmēram 60  $\mu\text{M}$  (nepublicēti dati). Vairāki pētījumi ir ziņojuši, ka TMAO koncentrācijas sasniedz maksimumu apmēram 24 stundas pēc prekursoru uzņemšanas (Koeth et al., 2013; Krüger et al., 2017; Wu et al., 2019), kas saskan ar mūsu novērojumiem. Šī informācija uzsver uztura kontroles nozīmi pēdējās divās dienās pirms TMAO mērījumu veikšanas, ja mēs vēlamies izvērtēt TMAO kā biomarķieri. Vairāki pētījumi ir noteikuši TMAO plazmas un seruma līmeņus dažādās pacientu kohortās ar dažādām diagnozēm, cenšoties noteikt skaidru fizioloģiski nozīmīgu TMAO koncentrāciju diapazonu. Līdz šim TMAO koncentrācijas, kas saistītas ar KVS izplatību un smagumu un BNKN risku, ir zemās mikromolārās robežās, parasti aptuveni 6–15  $\mu\text{M}$  (Heianza et al., 2017). Augstāki TMAO līmeņi ir novēroti pacientiem ar samazinātu nieru funkciju,

īpaši tiem, kam nepieciešama dialīze; šiem pacientiem plazmas TMAO līmeņi var sasniegt vairāk nekā 100  $\mu\text{M}$  koncentrācijas (Pelletier et al., 2019). Interesanti, tikai daži preklīniskie pētījumi ir veikti, izmantojot tik zemas koncentrācijas, kā tās, kuras novērojamas klīniskajā vidē. Daudzos *in vitro* un *ex vivo* pētījumos ir izmantotas ievērojami augstākas koncentrācijas, bieži vien augstā mikromolārā vai pat augstā milimolārā diapazonā, efektus novērojot laika posmā līdz pat 60 dienām (Ke et al., 2018). Būtu ieteicams gan *in vitro*, gan *in vivo* pētījumos iekļaut TMAO koncentrācijas mērījumus mērķaudos vai mērķa šūnās. Šāda pieeja ne tikai sniegtu būtisku informāciju, bet arī palīdzētu izstrādāt atbilstošu devas izvēles stratēģiju nākotnes pētījumiem.



#### 4.3. attēls. Dažādie efekti, kas novēroti paaugstinātu TMAO koncentrāciju dēļ preklīniskajā (bēšs) un klīniskajā (balts) vidē

BNKN, būtiski nevēlami kardiovaskulāri notikumi; NYHA, Ņujorkas Sirds asociācija (*New York Heart Association*); MetS, metabolais sindroms; T2D, 2. tipa diabēts; HNS, hroniska nieru slimība; LK, labais kambaris; AS, ateroskleroze.

Pieejamā literatūra liecina, ka nepieciešams plašāk pētīt nieru funkcijas un TMAO līmeņu saistību. Lai arī ir zināms, ka TMAO renālais klīrenss pasliktinās līdz ar nieru funkcijas samazināšanos (Zeisel and Warriar, 2017), pašlaik nav skaidru pierādījumu, kas norādītu uz to, ka TMAO izraisa vai veicina

hronisku nieru slimību (HNS). Lielākā daļa preklīnisko pētījumu, kas veikti dzīvnieku modeļos, lai pētītu paaugstinātas TMAO koncentrācijas efektus, izmanto paaugstinātu TMAO prekursoru uzņemšanu, kas prasa obligātu zarnu mikrobioma metabolismu (Tang et al., 2015; Gupta et al., 2020; Xie et al., 2022). Līdz ar to šie pētījumi nevar sniegt skaidrus pierādījumus par tiešu TMAO iesaisti HNS progresēšanā. Turklāt jāuzsver, ka paaugstināti TMAO līmeņi KVS pacientiem var būt saistīti ar sākotnēju nieru funkcijas pasliktināšanos, jo vairāki pētījumi ir identificējuši nieru funkciju kā ietekmējošo faktoru (Tang et al., 2015; Kim et al., 2016). TMAO audu koncentrācijas mērījumi grauzēju modeļos ir mums snieguši idejas nākotnes pētniecībai šajā virzienā, jo esam novērojuši būtiski augstāku TMAO uzkrāšanos nierēs, kas nierēs ietekmē mitohondriju funkciju (Videja et al., 2022) un maina TMAO transportieru ekspresiju (nepublicēti dati). Šī informācija iedvesmo turpmākiem pētījumiem, lai noskaidrotu mehānismus, kas saista augstākus TMAO līmeņus ar nieru funkcijas pasliktināšanos un, cerams, palīdzētu pārnest secinājumus no preklīniskajiem modeļiem uz klīnisko vidi, potenciāli palīdzot nieru mazspējas pacientiem.

Ņemot vērā nesenās atziņas par TMAO protektīvajiem efektiem dažos eksperimentālajos modeļos, paliek daudz neatbildētu jautājumu par to, kāda ir TMAO loma KVS attīstībā un vai mums patiešām jāsamazina TMAO līmeņi. Pirmkārt, uzturs, kas saistīts ar paaugstinātām TMAO koncentrācijām, ir bagāts ar dzīvnieku izcelsmes produktiem (Lombardo et al., 2022), apstrādātiem pārtikas produktiem un augsta tauku satura piena produktiem un tiek uzskatīts par neveselīgu vairāku būtisko faktoru dēļ (Martinez, Leone and Chang, 2017; Clemente-Suárez et al., 2023). Otrkārt, līdz šim nav stabila pierādījumu tam, ka zemi TMAO līmeņi būtu saistīti ar negatīvām sekām veselībai, liekot apšaubīt TMAO fizioloģisko lomu. Protams, literatūrā minētas konkrētas situācijas, kas aprakstītas arī šajās tēzēs (II publikācija), kur TMAO uzrāda protektīvus efektus. Tomēr ir jāņem vērā, ka daudzi protektīvie efekti tiek novēroti preklīniskajos

dzīvnieku modeļos, kas ne vienmēr precīzi attēlo slimības attīstības gaitu cilvēkos. Lai arī šie modeļi sniedz vērtīgas atziņas, ir svarīgi ņemt vērā ierobežojumus un bioloģisko procesu atšķirības starp grauzējiem un cilvēkiem. Treškārt, TMAO var būt arī neitrāla loma. Viedoklis par zarnu mikrobioma lomu neinfekciozo slimību patoģenēzē ir kļuvis arvien populārāks (Byndloss and Bäumler, 2018), un ir parādījies uzskats, ka cirkulējošie TMAO līmeņi asinīs varētu kalpot kā noderīgs marķieris zarnu mikrobioma sastāvam (Silke et al., 2021). Šī teorija varētu pamatot dažādos novērojumus saistībā ar paaugstinātiem TMAO līmeņiem klīniskajā vidē.

Varam secināt, ka ir vairāki faktori, kas jāņem vērā, veidojot viedokli par TMAO lomu kardiovaskulāro un metabolo slimību patoģenēzē. Svarīgi ir definēt atbilstošu koncentrāciju diapazonu, lai pētītu TMAO ietekmētos molekulāros mehānismus, īpaši ņemot vērā orgānu specifiskos efektus, kā tas ir nieru gadījumā. Turklāt sarežģītais mijiedarbības modelis starp zarnu mikrobiomu un saimniekorganisma kardiometabolo veselību prasa turpmāku izpēti, lai precizētu TMAO lomu kardiovaskulāro un metabolo slimību patoģenēzē.

## Secinājumi

1. Augstas TMAO koncentrācijas īstermiņā neizraisa nevēlamus efektus uz sirds un asinsvadu funkcionalitāti *ex vivo* un *in vivo* grauzēju modeļos, kas raksturo kardiometabolo veselību.
2. Eksperimentālā labā kambara sirds mazspējas modelī žurkām TMAO pievienošana uzturam izraisīja prekondicionējošus efektus un ļāva saglabāt mitohondriju enerģijas metabolismu labā kambara audos.
3. Metformīns pazemina paaugstinātos TMAO līmeņus eksperimentālā 2. tipa diabēta modelī, ietekmējot zarnu mikrobioma sastāvu un samazinot TMAO producēšanas ātrumu.
4. Badošanos imitējoša diēta ir efektīva stratēģija, lai samazinātu TMAO līmeņus un uzlabotu kopējo kardiometabolo stāvokli veselīgiem brīvprātīgajiem.
5. TMAO ietekme uz kardiovaskulāro un metabolo slimību patoģenēzi ir atkarīga no konkrētā slimības modeļa vai pētītās orgānu sistēmas, zarnu mikrobioma sastāva, izmantotās TMAO vai tā prekursoru koncentrācijas un ekspozīcijas ilguma.

## Priekšlikumi

1. Pastāv ievērojamas atšķirības starp eksperimentālajiem slimību modeļiem grauzējos un slimību patoģenēzes gaitu cilvēkiem, kas jāņem vērā, translējot rezultātus no preklīniskās uz klīnisko vidi. Tas ir vēl svarīgāk, interpretējot efektu, ko izraisa TMAO, kas rodas zarnu mikrobioma metabolisma procesā, jo starp laboratorijas grauzējiem un cilvēkiem ir būtiskas atšķirības standarta uzturā un zarnu mikrobioma sastāvā.
2. Uztura izvēles var ievērojami ietekmēt cirkulējošos TMAO līmeņus. Tāpēc ēdiena patēriņa kontrole divas dienas pirms TMAO mērījumiem ir obligāta, lai nodrošinātu kvalitatīvu TMAO kā biomarķiera mērījumu klīniskajos pētījumos. Tāpat uztura anketās vajadzētu precizēt datus par dažāda veida gaļas un zivju produktu patēriņu, jo to ietekme uz TMAO līmeņiem būtiski atšķiras.
3. Dzīvnieku izcelsmes olbaltumvielu avotu, īpaši sarkanās gaļas, patēriņa samazināšana ir efektīva pieeja TMAO līmeņu regulēšanai. Turklāt šo efektu var panākt, izmantojot dažādas populāras uztura stratēģijas, piemēram, veģetāru vai vegānu diētu, badošanos imitējošu diētu vai Vidusjūras diētu.
4. Ir nepieciešami papildu pētījumi, lai paplašinātu mūsu zināšanas par saikni starp paaugstinātiem TMAO līmeņiem un nieru funkciju, jo tas var uzlabot TMAO diagnostisko un prognostisko vērtību, paredzot ar nieru funkciju saistītos veselības iznākumus un kopējās veselības riskus.



## Publikāciju, ziņojumu un patentu saraksts par promocijas darba tēmu

### Publikācijas:

1. **Videja, M.**, Vilskersts, R., Sevostjanovs, E., Liepinsh, E., Dambrova, M. 2023. Data on cardiac and vascular functionality in ex vivo and in vivo models following acute administration of trimethylamine N-oxide. *Data in Brief*. 108890, ISSN 2352-3409. doi: 10.1016/j.dib.2023.108890.
2. **Videja, M.**, Vilskersts, R., Korzh, S., Cirule, H., Sevostjanovs, E., Dambrova, M., Makrecka-Kuka, M. 2021. Microbiota-Derived Metabolite Trimethylamine N-Oxide Protects Mitochondrial Energy Metabolism and Cardiac Functionality in a Rat Model of Right Ventricle Heart Failure. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8:622741. doi: 10.3389/fcell.2020.622741.
3. Kuka, J., **Videja, M.**, Makrecka-Kuka, M., Liepins, J., Grinberga, S., Sevostjanovs, E., Vilks, K., Liepinsh, E., Dambrova, M. 2020. Metformin decreases bacterial trimethylamine production and trimethylamine N-oxide levels in db/db mice. *Scientific Reports*, 10(1):14555. doi: 10.1038/s41598-020-71470-4.
4. **Videja, M.**, Sevostjanovs, E., Upmale-Engela, S., Liepinsh, E., Konrade, I., Dambrova, M. 2022. Fasting-Mimicking Diet Reduces Trimethylamine N-Oxide Levels and Improves Serum Biochemical Parameters in Healthy Volunteers. *Nutrients*, 14(5):1093. doi: 10.3390/nu14051093.

### Referāti un tēzes starptautiskos kongresos un konferencēs:

1. **Ozola (Videja), M.**, Dambrova, M. Trimethylamine N-oxide: Cardiometabolic Disease Risk Factor or Just an Osmolyte? Rīga Stradiņš University Research Week (RSU RW 2023). Knowledge for Use in Practice. March 29–31, 2023, Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia.
2. **Videja, M.**, Makrecka-Kuka, M., Korzh, S., Sevostjanovs, E., Cirule, H., Liepinsh, E., Dambrova, M. Accumulation of trimethylamine N-oxide in renal tissue induces mitochondrial dysfunction in insulin-resistant mice. 58<sup>th</sup> EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. Stockholm, Sweden, September 19–23, 2022. In: doi: 10.1007/s00125-022-05755-w.
3. Petersone, G., **Videja, M.** Trimethylamine N-oxide vastly accumulates in renal tissue without affecting kidney function in insulin-resistant mice. RSU International student conference 2022, Rīga Stradiņš university, March 24–25, 2022.
4. **Videja, M.**, Kuka, J., Makrecka-Kuka, M., Liepins, J., Grinberga, S., Sevostjanovs, E., Vilks, K., Liepinsh, E., Dambrova, M. Metformin decreases the plasma concentration of pro-atherogenic metabolite trimethylamine N-oxide in an experimental model of type 2 diabetes. Research Week (RW2021). Knowledge for Use in Practice. March 24–26, 2021, Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia.

5. Ambarova, R., **Videja, M.** Pro-atherogenic metabolite trimethylamine N-oxide does not affect bone marrow-derived macrophage polarization. Riga Stradiņš University International Student Conference in “Health and Social Sciences” 2021, 22<sup>nd</sup>–23<sup>rd</sup> March, 2021, Rīga Stradiņš University, Dzirciema Street 16, Riga, Latvia.
6. **Videja, M.**, Kuka, J., Makrecka-Kuka, M., Liepins, J., Grinberga, S., Liepinsh, E., Dambrova, M. Metformin decreases bacterial trimethylamine production and plasma trimethylamine N-oxide concentration in experimental model of type 2 diabetes. 8<sup>th</sup> European Virtual Congress of Pharmacology (EPHAR 2021). December 6–8, 2021.
7. Cernihovica, A., Supervisors: Dambrova, M., Vilskersts, R., **Videja, M.**, Vilks, K. Acute effects of TMAO on vascular energy metabolism and reactivity. RSU International Students Conference 2020. Abstract book p.60. Rīga Stradiņš University, Riga, Latvia. March 27–28, 2020.
8. **Videja, M.**, Vilskersts, R., Korzh, S., Cirule, H., Sevostjanovs, E., Dambrova, M., Makrecka-Kuka, M. Trimethylamine N-oxide preserves mitochondrial energy metabolism in rat model of right ventricle heart failure. 4<sup>th</sup> Annual UCLA Mitochondria Symposium – Los Angeles, CA. Online. November 5–6, 2020.
9. **Videja, M.**, Sevostjanovs, E., Konrade, I., Dambrova, M. 5-day intermittent fasting reduces proatherogenic metabolite trimethylamine N-oxide level and improves serum biochemical parameters. 3<sup>rd</sup> International Conference “Nutrition and Health”, Riga, Latvia. Online. December 9-11, 2020. Abstract book page 93.
10. Mazule, M., **Videja, M.**, Gukalova, B., Erglis, A., Dambrova, M., Latkovskis, G. 2020. Angiotensin converting enzyme inhibitor and thiazide use is associated with higher plasma trimethylamine N-oxide levels in patients with type 2 diabetes. International Scientific Conference on Medicine organized within the frame of the 78th International Scientific Conference of the University of Latvia. Riga, Latvia. *Abstracts, Medicina*, Volume 56, Supplement 1, 47.
11. **Videja, M.**, Kuka, J., Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Liepins, J., Grinberga, S., Dambrova, M. 2019. Metformin decreases gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide production in diabetic animals. Poster presentation. FEBS3+ conference, Riga, Latvia, 96.
12. Dambrova, M., Kuka, J., **Videja, M.**, Konrade, I., Liepinsh, E. 2019. Trimethylamine-N-oxide: a microbiota-derived cardiometabolic risk marker. Rīga Stradiņš University International Conference on Medical and Health Care Sciences “Knowledge for Use in Practice”, Riga, Latvia, 482.
13. Dambrova, M., **Videja, M.**, Cirule, H., Krizhanovska, V., Kuka, J. Metformin decreases trimethylamine N-oxide levels in db/db mice but does not improve glycemic parameters. International Diabetes Federation Congress. Bussan, Korea, December 2–6, 2019. OP-0010.

## Literatūras saraksts

1. Al-Obaide, M. A. I., Singh, R., Datta, P., Rewers-Felkins, K. A., Salguero, M. V., Al-Obaidi, I., Kottapalli, K. R., Vasylyeva, T. L. 2017. Gut Microbiota-Dependent Trimethylamine-N-oxide and Serum Biomarkers in Patients with T2DM and Advanced CKD. *Journal of clinical medicine*. 6(9). doi:10.3390/jcm6090086
2. Andraos, S., Jones, B., Lange, K., Clifford, S. A., Thorstensen, E. B., Kerr, J. A., Wake, M., Saffery, R., Burgner, D. P., O'Sullivan, J. M. 2021. Trimethylamine N-oxide (TMAO) Is not Associated with Cardiometabolic Phenotypes and Inflammatory Markers in Children and Adults. *Current developments in nutrition*. 5(1), nzaa179. doi:10.1093/cdn/nzaa179
3. Argyridou, S., Davies, M. J., Biddle, G. J. H., Bernieh, D., Suzuki, T., Dawkins, N. P., Rowlands, A. V., Khunti, K., Smith, A. C., Yates, T. 2021. Evaluation of an 8-Week Vegan Diet on Plasma Trimethylamine-N-Oxide and Postchallenge Glucose in Adults with Dysglycemia or Obesity. *Journal of Nutrition*. 151(7), 1844–1853. doi:10.1093/jn/nxab046
4. Bailey, C. J., Wilcock, C., Scarpello, J. H. B. 2008, August. Metformin and the intestine. *Diabetologia*. . doi:10.1007/s00125-008-1053-5
5. Barrea, L., Annunziata, G., Muscogiuri, G., Laudisio, D., Di Somma, C., Maisto, M., Tenore, G. C., Colao, A., Savastano, S. 2019. Trimethylamine N-oxide, Mediterranean diet, and nutrition in healthy, normal-weight adults: also a matter of sex? *Nutrition*. 62, 7–17. doi:https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.11.015
6. Brandhorst, S., Choi, I. Y., Wei, M., Cheng, C. W., Sedrakyan, S., Navarrete, G., Dubeau, L., Yap, L. P., Park, R., Vinciguerra, M., Di Biase, S., Mirzaei, H., Mirisola, M. G., Childress, P., Ji, L., Groshen, S., Penna, F., Odetti, P., Perin, L., Conti, P. S., Ikeno, Y., Kennedy, B. K., Cohen, P., Morgan, T. E., Dorff, T. B., Longo, V. D. 2015. A Periodic Diet that Mimics Fasting Promotes Multi-System Regeneration, Enhanced Cognitive Performance, and Healthspan. *Cell Metabolism*. 22(1), 86–99. doi:10.1016/j.cmet.2015.05.012
7. Bridges, L. E., Williams, C. L., Pointer, M. A., Awumey, E. M. 2011. Mesenteric artery contraction and relaxation studies using automated wire myography. *Journal of Visualized Experiments*. (55), 1–5. doi:10.3791/3119
8. Brown, D. A., Perry, J. B., Allen, M. E., Sabbah, H. N., Stauffer, B. L., Shaikh, S. R., Cleland, J. G. F., Colucci, W. S., Butler, J., Voors, A. A., Anker, S. D., Pitt, B., Pieske, B., Filippatos, G., Greene, S. J., Gheorghade, M. 2017. Expert consensus document: Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. *Nature Reviews Cardiology*. 14(4), 238–250. doi:10.1038/nrcardio.2016.203

9. Brunt, V. E., Greenberg, N. T., Sapinsley, Z. J., Casso, A. G., Richey, J. J., VanDongen, N. S., Gioscia-Ryan, R. A., Ziemba, B. P., Neilson, A. P., Davy, K. P., Seals, D. R. 2022. Suppression of trimethylamine N-oxide with DMB mitigates vascular dysfunction, exercise intolerance, and frailty associated with a Western-style diet in mice. *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. 133(4), 798–813. doi:10.1152/jappphysiol.00350.2022
10. Byndloss, M. X., Bäumlner, A. J. 2018. The germ-organ theory of non-communicable diseases. *Nature Reviews Microbiology*. 16(2), 103–110. doi:10.1038/nrmicro.2017.158
11. Chen, K., Zheng, X., Feng, M., Li, D., Zhang, H. 2017. Gut Microbiota-Dependent Metabolite Trimethylamine N-Oxide Contributes to Cardiac Dysfunction in Western Diet-Induced Obese Mice. *Frontiers in physiology*. 8, 139. doi:10.3389/fphys.2017.00139
12. Clemente-Suárez, V. J., Beltrán-Velasco, A. I., Redondo-Flórez, L., Martín-Rodríguez, A., Tornero-Aguilera, J. F. 2023. Global Impacts of Western Diet and Its Effects on Metabolism and Health: A Narrative Review. *Nutrients*. . doi:10.3390/nu15122749
13. Costabile, G., Vetrani, C., Bozzetto, L., Giacco, R., Bresciani, L., Del Rio, D., Vitale, M., Della Pepa, G., Brighenti, F., Riccardi, G., Rivellese, A. A., Annuzzi, G. 2021. Plasma TMAO increase after healthy diets: results from 2 randomized controlled trials with dietary fish, polyphenols, and whole-grain cereals. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 114(4), 1342–1350. doi:https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab188
14. Dambrova, M., Latkovskis, G., Kuka, J., Strele, I., Konrade, I., Grinberga, S., Hartmane, D., Pugovics, O., Erglis, A., Liepinsh, E. 2016. Diabetes is Associated with Higher Trimethylamine N-oxide Plasma Levels. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 124(4), 251–256. doi:10.1055/s-0035-1569330
15. Dambrova, M., Skapare-makarova, E., Konrade, I., Pugovics, O., Grinberga, S., Tirzite, D., Petrovska, R., Kalvins, I., Liepins, E. 2013. Meldonium decreases the diet-increased plasma levels of trimethylamine n-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis. *Journal of Clinical Pharmacology*. 53(10), 1095–1098. doi:10.1002/jcph.135
16. Dávila, L. A. 2018. The Microbiome and the Epigenetics of Diabetes Mellitus. In: Pirela, V. B. (ed.), . Rijeka : IntechOpen, p. Ch. 2. doi:10.5772/intechopen.76201
17. Estruch, R., Ros, E., Salas-Salvadó, J., Covas, M. I., Corella, D., Arós, F., Gómez-Gracia, E., Ruiz-Gutiérrez, V., Fiol, M., Lapetra, J., Lamuela-Raventos, R. M., Serra-Majem, L., Pintó, X., Basora, J., Muñoz, M. A., Sorli, J. V., Martínez, J. A., Fitó, M., Gea, A., Hernan, M. A., Martínez-Gonzalez, M. A. 2018. Primary prevention of cardiovascular disease with a mediterranean diet supplemented with extra-virgin olive oil or nuts. *New England Journal of Medicine*. 378(25), 1–14. doi:10.1056/NEJMoa1800389

18. Florea, C. M., Baldea, I., Rosu, R., Moldovan, R., Decea, N., Filip, G. A. 2023. The Acute Effect of Trimethylamine-N-Oxide on Vascular Function, Oxidative Stress, and Inflammation in Rat Aortic Rings. *Cardiovascular toxicology*. 23(5–6), 198–206. doi:10.1007/s12012-023-09794-6
19. Forslund, K., Hildebrand, F., Nielsen, T., Falony, G., Le Chatelier, E., Sunagawa, S., Prifti, E., Vieira-Silva, S., Gudmundsdottir, V., Pedersen, H. K., Arumugam, M., Kristiansen, K., Voigt, A. Y., Vestergaard, H., Hercog, R., Costea, P. I., Kultima, J. R., Li, J., Jørgensen, T., Levenez, F., Dore, J., Nielsen, H. B., Brunak, S., Raes, J., Hansen, T., Wang, J., Ehrlich, S. D., Bork, P., Pedersen, O. 2015. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*. 528(7581), 262–266. doi:10.1038/nature15766
20. Gawrys-Kopczynska, M., Konop, M., Maksymiuk, K., Kraszewska, K., Derzsi, L., Sozanski, K., Holyst, R., Pilz, M., Samborowska, E., Dobrowolski, L., Jaworska, K., Mogilnicka, I., Ufnal, M. 2020. TMAO, a seafood-derived molecule, produces diuresis and reduces mortality in heart failure rats. (Mangoni, A. A., M. Barton & A. A. Mangoni, Eds.) *eLife*. 9, e57028. doi:10.7554/eLife.57028
21. Geng, J., Yang, C., Wang, B., Zhang, X., Hu, T., Gu, Y., Li, J. 2018. Trimethylamine N-oxide promotes atherosclerosis via CD36-dependent MAPK/JNK pathway. *Biomedicine and Pharmacotherapy*. 97(October 2017), 941–947. doi:10.1016/j.biopha.2017.11.016
22. Griffiths, E. R., Friehs, I., Scherr, E., Poutias, D., McGowan, F. X., del Nido, P. J. 2010. Electron transport chain dysfunction in neonatal pressure-overload hypertrophy precedes cardiomyocyte apoptosis independent of oxidative stress. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 139(6), 1609–1617. doi:10.1016/j.jtcvs.2009.08.060
23. Grinberga, S., Dambrova, M., Latkovskis, G., Strele, I., Konrade, I., Hartmane, D., Sevostjanovs, E., Liepinsh, E., Pugovics, O. 2015. Determination of trimethylamine- N -oxide in combination with l -carnitine and  $\gamma$  -butyrobetaine in human plasma by UPLC/MS/MS. *Biomedical Chromatography*. 29(11), 1670–1674. doi:10.1002/bmc.3477
24. Guo, H., Ding, J., Liang, J., Zhang, Y. 2021. Association of Red Meat and Poultry Consumption With the Risk of Metabolic Syndrome: A Meta-Analysis of Prospective Cohort Studies. *Frontiers in Nutrition*. 8(July), 1–10. doi:10.3389/fnut.2021.691848
25. Gupta, N., Buffa, J. A., Roberts, A. B., Sangwan, N., Skye, S. M., Li, L., Ho, K. J., Varga, J., Didonato, J. A., Tang, W. H. W., Hazen, S. L. 2020. Targeted Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine N-Oxide Production Reduces Renal Tubulointerstitial Fibrosis and Functional Impairment in a Murine Model of Chronic Kidney Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. (May), 1239–1255. doi:10.1161/ATVBAHA.120.314139

26. Hardziyenka, M., Campian, M. E., Rianne de Bruin-Bon, H. A. C. M., Michel, M. C., Tan, H. L. 2006. Sequence of Echocardiographic Changes During Development of Right Ventricular Failure in Rat. *Journal of the American Society of Echocardiography*. 19(10), 1272–1279. doi:10.1016/j.echo.2006.04.036
27. Heianza, Y., Ma, W., Manson, J. A. E., Rexrode, K. M., Qi, L. 2017. Gut microbiota metabolites and risk of major adverse cardiovascular disease events and death: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *Journal of the American Heart Association*. 6(7). doi:10.1161/JAHA.116.004947
28. Herring, T. I., Harris, T. N., Chowdhury, C., Mohanty, S. K., Bobik, T. A. 2018. A Bacterial Microcompartment Is Used for Choline Fermentation by *Escherichia coli* 536. *Journal of bacteriology*. 200(10). doi:10.1128/JB.00764-17
29. Huc, T., Drapala, A., Gawrys, M., Konop, M., Bielinska, K., Zaorska, E., Samborowska, E., Wyczalkowska-Tomasik, A., Pączek, L., Dadlez, M., Ufnal, M. 2018. Chronic, low-dose TMAO treatment reduces diastolic dysfunction and heart fibrosis in hypertensive rats. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. 315(6), H1805–H1820. doi:10.1152/ajpheart.00536.2018
30. Jimenez-Torres, J., Alcalá-Díaz, J. F., Torres-Peña, J. D., Gutierrez-Mariscal, F. M., Leon-Acuña, A., Gómez-Luna, P., Fernández-Gandara, C., Quintana-Navarro, G. M., Fernandez-Garcia, J. C., Perez-Martinez, P., Ordovas, J. M., Delgado-Lista, J., Yubero-Serrano, E. M., Lopez-Miranda, J. 2021. Mediterranean Diet Reduces Atherosclerosis Progression in Coronary Heart Disease: An Analysis of the CORDIOPREV Randomized Controlled Trial. *Stroke*. 52(11), 3440–3449. doi:10.1161/STROKEAHA.120.033214
31. Karwi, Q. G., Uddin, G. M., Ho, K. L., Lopaschuk, G. D. 2018. Loss of Metabolic Flexibility in the Failing Heart. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*. 5(June), 1–19. doi:10.3389/fcvm.2018.00068
32. Ke, Y., Li, D., Zhao, M., Liu, C., Liu, J., Zeng, A., Shi, X., Cheng, S., Pan, B., Zheng, L., Hong, H. 2018. Gut flora-dependent metabolite Trimethylamine-N-oxide accelerates endothelial cell senescence and vascular aging through oxidative stress. *Free radical biology & medicine*. 116, 88–100. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.007
33. Kim, R. B., Morse, B. L., Djurdjev, O., Tang, M., Muirhead, N., Barrett, B., Holmes, D. T., Madore, F., Clase, C. M., Rigatto, C., Levin, A. 2016. Advanced chronic kidney disease populations have elevated trimethylamine N-oxide levels associated with increased cardiovascular events. *Kidney international*. 89(5), 1144–1152. doi:10.1016/j.kint.2016.01.014
34. Kim, Y., Je, Y. 2018. Meat consumption and risk of metabolic syndrome: Results from the Korean population and a meta-analysis of observational studies. *Nutrients*. 10(4). doi:10.3390/nu10040390

35. Koay, Y. C., Chen, Y. C., Wali, J. A., Luk, A. W. S., Li, M., Doma, H., Reimark, R., Zaldivia, M. T. K., Habbitom, H. T., Franks, A. E., Fusco-Allison, G., Yang, J., Holmes, A., Simpson, S. J., Peter, K., O'Sullivan, J. F. 2021. Plasma levels of trimethylamine-N-oxide can be increased with 'healthy' and 'unhealthy' diets and do not correlate with the extent of atherosclerosis but with plaque instability. *Cardiovascular research*. 117(2), 435–449. doi:10.1093/cvr/cvaa094
36. Koeth, R. A., Wang, Z., Levison, B. S., Buffa, J. A., Org, E., Sheehy, B. T., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Li, L., Smith, J. D., Didonato, J. A., Chen, J., Li, H., Wu, G. D., Lewis, J. D., Warrier, M., Brown, J. M., Krauss, R. M., Tang, W. H. W., Bushman, F. D., Lusis, A. J., Hazen, S. L. 2013. Intestinal microbiota metabolism of l-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nature Medicine*. 19(5), 576–585. doi:10.1038/nm.3145
37. Koeth, R. A., Lam-Galvez, B. R., Kirsop, J., Wang, Z., Levison, B. S., Gu, X., Copeland, M. F., Bartlett, D., Cody, D. B., Dai, H. J., Culley, M. K., Li, X. S., Fu, X., Wu, Y., Li, L., DiDonato, J. A., Tang, W. H. W., Garcia-Garcia, J. C., Hazen, S. L. 2019. L-Carnitine in omnivorous diets induces an atherogenic gut microbial pathway in humans. *Journal of Clinical Investigation*. 129(1). doi:10.1172/JCI94601
38. Kolwicz, S. C., Olson, D. P., Marney, L. C., Garcia-Menendez, L., Synovec, R. E., Tian, R. 2012. Cardiac-specific deletion of acetyl CoA carboxylase 2 prevents metabolic remodeling during pressure-overload hypertrophy. *Circulation Research*. 111(6), 728–738. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.268128
39. Krishnan, S., O'Connor, L. E., Wang, Y., Gertz, E. R., Campbell, W. W., Bennett, B. J. 2021. Adopting a Mediterranean-style eating pattern with low, but not moderate, unprocessed, lean red meat intake reduces fasting serum trimethylamine N-oxide (TMAO) in adults who are overweight or obese. *The British journal of nutrition*. 128(9), 1–21. doi:10.1017/S0007114521004694
40. Krüger, R., Merz, B., Rist, M. J., Ferrario, P. G., Bub, A., Kulling, S. E., Watzl, B. 2017. Associations of current diet with plasma and urine TMAO in the KarMeN study: direct and indirect contributions. *Molecular nutrition & food research*. 61(11). doi:10.1002/mnfr.201700363
41. Kuka, J., Vilskersts, R., Cirule, H., Makrecka, M., Pugovics, O., Kalvinsh, I., Dambrova, M., Liepinsh, E. 2012. The Cardioprotective Effect of Mildronate is Diminished After Co-Treatment With l-Carnitine. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*. 17(2), 215–222. doi:10.1177/1074248411419502
42. Kuka, J., Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Liepins, J., Cirule, H., Gustina, D., Loza, E., Zharkova-Malkova, O., Grinberga, S., Pugovics, O., Dambrova, M. 2014. Suppression of intestinal microbiota-dependent production of pro-atherogenic trimethylamine N-oxide by shifting L-carnitine microbial degradation. *Life Sciences*. 117(2), 84–92. doi:https://doi.org/10.1016/j.lfs.2014.09.028

43. Kuzma, J. N., Schmidt, K. A., Kratz, M. 2017. Prevention of metabolic diseases: Fruits (including fruit sugars) vs. vegetables. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. 20(4), 286–293. doi:10.1097/MCO.0000000000000378
44. Li, D., Lu, Y., Yuan, S., Cai, X., He, Y., Chen, J., Wu, Q., He, D., Fang, A., Bo, Y., Song, P., Bogaert, D., Tsilidis, K., Larsson, S. C., Yu, H., Zhu, H., Theodoratou, E., Zhu, Y., Li, X. 2022. Gut microbiota-derived metabolite trimethylamine-N-oxide and multiple health outcomes: an umbrella review and updated meta-analysis. *The American journal of clinical nutrition*. 116(1), 230–243. doi:10.1093/ajcn/nqac074
45. Li, D., Ke, Y., Zhan, R., Liu, C., Zhao, M., Zeng, A., Shi, X., Ji, L., Cheng, S., Pan, B., Zheng, L., Hong, H. 2018. Trimethylamine-N-oxide promotes brain aging and cognitive impairment in mice. *Aging cell*. 17(4), e12768. doi:10.1111/acel.12768
46. Li, T., Chen, Y., Gua, C., Li, X. 2017. Elevated Circulating Trimethylamine N-Oxide Levels Contribute to Endothelial Dysfunction in Aged Rats through Vascular Inflammation and Oxidative Stress. *Frontiers in physiology*. 8, 350. doi:10.3389/fphys.2017.00350
47. Liepinsh, E., Kuka, J., Zvejniece, L., Vilskersts, R., Dambrova, M. 2022. Rodent Heart and Brain Tissue Preparation for Digital Macro Photography after Ischemia-reperfusion. *Journal of Visualized Experiments*. 2022(180), 1–12. doi:10.3791/62942
48. Liu, Y., Dai, M. 2020. Trimethylamine N-Oxide Generated by the Gut Microbiota Is Associated with Vascular Inflammation: New Insights into Atherosclerosis. *Mediators of Inflammation*. 2020. doi:10.1155/2020/4634172
49. Lombardo, M., Aulisa, G., Marcon, D., Rizzo, G. 2022. The Influence of Animal- or Plant-Based Diets on Blood and Urine Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) Levels in Humans. *Current Nutrition Reports*. 11(1), 56–68. doi:10.1007/s13668-021-00387-9
50. Ma, G. H., Pan, B., Chen, Y., Guo, C. X., Zhao, M. M., Zheng, L. M., Chen, B. X. 2017. Trimethylamine N-oxide in atherogenesis: Impairing endothelial self-repair capacity and enhancing monocyte adhesion. *Bioscience Reports*. 37(2). doi:10.1042/BSR20160244
51. Madiraju, A. K., Erion, D. M., Rahimi, Y., Zhang, X. M., Braddock, D. T., Albright, R. A., Prigaro, B. J., Wood, J. L., Bhanot, S., MacDonald, M. J., Jurczak, M. J., Camporez, J. P., Lee, H. Y., Cline, G. W., Samuel, V. T., Kibbey, R. G., Shulman, G. I. 2014. Metformin suppresses gluconeogenesis by inhibiting mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase. *Nature*. 510(7506), 542–546. doi:10.1038/nature13270
52. Makrecka-Kuka, M., Korzh, S., Videja, M., Vilskersts, R., Sevostjanovs, E., Zharkova-Malkova, O., Arsenyan, P., Kuka, J., Dambrova, M., Liepinsh, E. 2020. Inhibition of CPT2 exacerbates cardiac dysfunction and inflammation in experimental endotoxaemia. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. doi:10.1111/jcmm.15809



53. Mamluk, L., O'Doherty, M. G., Orfanos, P., Saitakis, G., Woodside, J. V., Liao, L. M., Sinha, R., Boffetta, P., Trichopoulou, A., Kee, F. 2017. Fruit and vegetable intake and risk of incident of type 2 diabetes: Results from the consortium on health and ageing network of cohorts in Europe and the United States (CHANCES). *European Journal of Clinical Nutrition*. 71(1), 83–91. doi:10.1038/ejcn.2016.143
54. Manor, O., Zubair, N., Conomos, M. P., Xu, X., Rohwer, J. E., Krafft, C. E., Lovejoy, J. C., Magis, A. T. 2018. A Multi-omic Association Study of Trimethylamine N-Oxide. *Cell Reports*. 24(4), 935–946. doi:10.1016/j.celrep.2018.06.096
55. Martinez, K. B., Leone, V., Chang, E. B. 2017. Western diets, gut dysbiosis, and metabolic diseases: Are they linked? *Gut microbes*. 8(2), 130–142. doi:10.1080/19490976.2016.1270811
56. Matsumoto, T., Kojima, M., Takayanagi, K., Taguchi, K., Kobayashi, T. 2020. Trimethylamine-N-oxide Specifically Impairs Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor-Type Relaxation in Rat Femoral Artery. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 43(3), 569–573. doi:10.1248/bpb.b19-00957
57. McCreight, L. J., Bailey, C. J., Pearson, E. R. 2016. Metformin and the gastrointestinal tract. *Diabetologia*. 59(3), 426–435. doi:10.1007/s00125-015-3844-9
58. Nita, M., Grzybowski, A. 2016. The Role of the Reactive Oxygen Species and Oxidative Stress in the Pathomechanism of the Age-Related Ocular Diseases and Other Pathologies of the Anterior and Posterior Eye Segments in Adults. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2016. doi:10.1155/2016/3164734
59. Oakley, C. I., Vallejo, J. A., Wang, D., Gray, M. A., Tiede-Lewis, L. M., Shawgo, T., Daon, E., Zorn, G. 3rd, Stubbs, J. R., Wacker, M. J. 2020. Trimethylamine-N-oxide acutely increases cardiac muscle contractility. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*. 318(5), H1272–H1282. doi:10.1152/ajpheart.00507.2019
60. Organ, C. L., Otsuka, H., Bhushan, S., Wang, Z., Bradley, J., Trivedi, R., Polhemus, D. J., Tang, W. H. W., Wu, Y., Hazen, S. L., Lefler, D. J. 2016. Choline Diet and Its Gut Microbe-Derived Metabolite, Trimethylamine N-Oxide, Exacerbate Pressure Overload-Induced Heart Failure. *Circulation: Heart Failure*. 9(1). doi:10.1161/CIRCHEARTFAILURE.115.002314
61. Owen, M. R., Doran, E., Halestrap, A. P. 2000. Evidence that metformin exerts its anti-diabetic effects through inhibition of complex 1 of the mitochondrial respiratory chain. *The Biochemical journal*. 348 Pt 3(Pt 3), 607–614.
62. Pelletier, C. C., Croyal, M., Ene, L., Aguesse, A., Billon-Crossouard, S., Krempf, M., Lemoine, S., Guebre-Egziabher, F., Juillard, L., Soulage, C. O. 2019. Elevation of Trimethylamine-N-Oxide in Chronic Kidney Disease: Contribution of Decreased Glomerular Filtration Rate. *Toxins*. 11(11). doi:10.3390/toxins11110635

63. Percie du Sert, N., Hurst, V., Ahluwalia, A., Alam, S., Avey, M. T., Baker, M., Browne, W. J., Clark, A., Cuthill, I. C., Dirnagl, U., Emerson, M., Garner, P., Holgate, S. T., Howells, D. W., Karp, N. A., Lasic, S. E., Lidster, K., MacCallum, C. J., Macleod, M., Pearl, E. J., Petersen, O. H., Rawle, F., Reynolds, P., Rooney, K., Sena, E. S., Silberberg, S. D., Steckler, T., Würbel, H. 2020. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *British Journal of Pharm.* Percie du Sert, N.; Hurst, V.; Ahluwalia, A.; Alam, S.; Avey, M.T.; Baker, M.; Browne, W.J.; Clark, A.; Cuthill, I.C.; Dirnagl, U.; et al. *The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. Br. J. Pharma.* 177(16), 3617–3624. doi:10.1111/bph.15193
64. Proctor, W. R., Bourdet, D. L., Thakker, D. R. 2008. Mechanisms underlying saturable intestinal absorption of metformin. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* 36(8), 1650–1658. doi:10.1124/dmd.107.020180
65. Querio, G., Antoniotti, S., Levi, R., Gallo, M. P. 2019. Trimethylamine n-oxide does not impact viability, ros production, and mitochondrial membrane potential of adult rat cardiomyocytes. *International Journal of Molecular Sciences.* 20(12). doi:10.3390/ijms20123045
66. Rangan, P., Choi, I., Wei, M., Navarrete, G., Guen, E., Brandhorst, S., Enyati, N., Pasia, G., Maesincee, D., Ocon, V., Abdulridha, M., Longo, V. D. 2019. Fasting-Mimicking Diet Modulates Microbiota and Promotes Intestinal Regeneration to Reduce Inflammatory Bowel Disease Pathology. *Cell Reports.* 26(10), 2704-2719.e6. doi:10.1016/j.celrep.2019.02.019
67. Seim, H., Löster, H., Claus, R., Kleber, H. P., Strack, E. 1982. Formation of  $\gamma$ -butyrobetaine and trimethylamine from quaternary ammonium compounds structure-related to l-carnitine and choline by *Proteus vulgaris*. *FEMS Microbiology Letters.* 13(2), 201–205.
68. Seldin, M. M., Meng, Y., Qi, H., Zhu, W., Wang, Z., Hazen, S. L., Lusic, A. J., Shih, D. M. 2016. Trimethylamine N-Oxide Promotes Vascular Inflammation Through Signaling of Mitogen-Activated Protein Kinase and Nuclear Factor- $\kappa$ B. *Journal of the American Heart Association.* 5(2). doi:10.1161/JAHA.115.002767
69. Silke, R., Katharina, R., Sven, K. B., Ulf, S., Marcus, D., Julia, M., Fabian, F., M., L. M., André, K., Mark, B., H., P. D., Marius, V. 2021. Higher Trimethylamine-N-Oxide Plasma Levels with Increasing Age Are Mediated by Diet and Trimethylamine-Forming Bacteria. *mSystems.* 6(5), 10.1128/msystems.00945-21. doi:10.1128/msystems.00945-21
70. Stynen, B., Abd-Rabbo, D., Kowarzyk, J., Miller-Fleming, L., Aulakh, S. K., Garneau, P., Ralser, M., Michnick, S. W. 2018. Changes of Cell Biochemical States Are Revealed in Protein Homomeric Complex Dynamics. *Cell.* 175(5), 1418-1429.e9. doi:10.1016/j.cell.2018.09.050

71. Sun, X., Jiao, X., Ma, Y., Liu, Y., Zhang, L., He, Y., Chen, Y. 2016. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 481(1–2), 63–70. doi:10.1016/j.bbrc.2016.11.017
72. Tang, W. H. W., Wang, Z., Fan, Y., Levison, B., Hazen, J. E., Donahue, L. M., Wu, Y., Hazen, S. L. 2014. Prognostic value of elevated levels of intestinal microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide in patients with heart failure: refining the gut hypothesis. *Journal of the American College of Cardiology*. 64(18), 1908–1914. doi:10.1016/j.jacc.2014.02.617
73. Tang, W. H. W., Wang, Z., Levison, B. S., Koeth, R. A., Britt, E. B., Fu, X., Wu, Y., Hazen, S. L. 2013. Intestinal Microbial Metabolism of Phosphatidylcholine and Cardiovascular Risk. *New England Journal of Medicine*. 368(17), 1575–1584. doi:10.1056/nejmoa1109400
74. Tang, W. H. W., Wang, Z., Kennedy, D. J., Wu, Y., Buffa, J. A., Agatista-Boyle, B., Li, X. S., Levison, B. S., Hazen, S. L. 2015. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circulation research*. 116(3), 448–455. doi:10.1161/CIRCRESAHA.116.305360
75. Tian, Y., Su, L., Wang, J., Duan, X., Jiang, X. 2018. Fruit and vegetable consumption and risk of the metabolic syndrome: A meta-analysis. *Public Health Nutrition*. 21(4), 756–765. doi:10.1017/S136898001700310X
76. Trøseid, M., Ueland, T., Hov, J. R., Svoldal, A., Gregersen, I., Dahl, C. P., Aakhus, S., Gude, E., Bjørndal, B., Halvorsen, B., Karlsen, T. H., Aukrust, P., Gullestad, L., Berge, R. K., Yndestad, A. 2015. Microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide is associated with disease severity and survival of patients with chronic heart failure. *Journal of internal medicine*. 277(6), 717–726. doi:10.1111/joim.12328
77. Turnbaugh, P. J., Bäckhed, F., Fulton, L., Gordon, J. I. 2008. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell host & microbe*. 3(4), 213–223. doi:10.1016/j.chom.2008.02.015
78. Ufnal, M., Jazwiec, R., Dadlez, M., Drapala, A., Sikora, M., Skrzypecki, J. 2014. Trimethylamine-N-Oxide: A Carnitine-Derived Metabolite That Prolongs the Hypertensive Effect of Angiotensin II in Rats. *Canadian Journal of Cardiology*. 30(12), 1700–1705. doi:10.1016/j.cjca.2014.09.010
79. Videja, M., Makrecka-Kuka, M., Korzh, S., Sevostjanovs, E., Cirule, H., Liepinsh, E., Dambrova, M. 2022. Accumulation of trimethylamine N-oxide in renal tissue induces mitochondrial dysfunction in insulin-resistant mice. 58th EASD Annual Meeting of the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetologia*. 65(1), 1–469. doi:10.1007/s00125-022-05755-w

80. Vilskersts, R., Kuka, J., Liepinsh, E., Makrecka-Kuka, M., Volska, K., Makarova, E., Sevostjanovs, E., Cirule, H., Grinberga, S., Dambrova, M. 2015. Methyl- $\gamma$ -butyrobetaine decreases levels of acylcarnitines and attenuates the development of atherosclerosis. *Vascular pharmacology*. 72, 101–107. doi:10.1016/j.vph.2015.05.005
81. Wallace, T. M., Levy, J. C., Matthews, D. R. 2004. Use and Abuse of HOMA Modeling. *Diabetes Care*. 27(6), 1487 LP – 1495. doi:10.2337/diacare.27.6.1487
82. Wang, Z., Klipfell, E., Bennett, B. J., Koeth, R., Levison, B. S., Dugar, B., Feldstein, A. E., Britt, E. B., Fu, X., Chung, Y. M., Wu, Y., Schauer, P., Smith, J. D., Allayee, H., Tang, W. H. W., DiDonato, J. A., Lusis, A. J., Hazen, S. L. 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 472(7341), 57–63. doi:10.1038/nature09922
83. Wang, Z., Roberts, A. B., Buffa, J. A., Levison, B. S., Zhu, W., Org, E., Gu, X., Huang, Y., Zamanian-Daryoush, M., Culley, M. K., Didonato, A. J., Fu, X., Hazen, J. E., Krajcik, D., Didonato, J. A., Lusis, A. J., Hazen, S. L. 2015. Non-lethal Inhibition of Gut Microbial Trimethylamine Production for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell*. 163(7), 1585–1595. doi:10.1016/j.cell.2015.11.055
84. Wang, Z., Bergeron, N., Levison, B. S., Li, X. S., Chiu, S., Xun, J., Koeth, R. A., Lin, L., Wu, Y., Tang, W. H. W., Krauss, R. M., Hazen, S. L. 2019. Impact of chronic dietary red meat, white meat, or non-meat protein on trimethylamine N-oxide metabolism and renal excretion in healthy men and women. *European Heart Journal*. 40(7), 583–594. doi:10.1093/eurheartj/ehy799
85. Wang, Z., Tang, W. H. W., O'Connell, T., Garcia, E., Jeyarajah, E. J., Li, X. S., Jia, X., Weeks, T. L., Hazen, S. L. 2022. Circulating trimethylamine N-oxide levels following fish or seafood consumption. *European Journal of Nutrition*. 61(5), 2357–2364. doi:10.1007/s00394-022-02803-4
86. Wei, M., Brandhorst, S., Shelehchi, M., Mirzaei, H., Cheng, C. W., Budniak, J., Groshen, S., Mack, W. J., Guen, E., Di Biase, S., Cohen, P., Morgan, T. E., Dorff, T., Hong, K., Michalsen, A., Laviano, A., Longo, V. D. 2017. Fasting-mimicking diet and markers/risk factors for aging, diabetes, cancer, and cardiovascular disease. *Science Translational Medicine*. 9(377), 8700. doi:10.1126/scitranslmed.aai8700
87. Wei, S., Han, R., Zhao, J., Wang, S., Huang, M., Wang, Y., Chen, Y. 2018. Intermittent administration of a fasting-mimicking diet intervenes in diabetes progression, restores  $\beta$  cells and reconstructs gut microbiota in mice. *Nutrition & Metabolism*. 15(1), 80. doi:10.1186/s12986-018-0318-3
88. Wu, R., Wang, H. L., Yu, H. L., Cui, X. H., Xu, M. T., Xu, X., Gao, J. P. 2016. Doxorubicin toxicity changes myocardial energy metabolism in rats. *Chemico-Biological Interactions*. 244, 149–158. doi:10.1016/j.cbi.2015.12.010

89. Wu, W. K., Chen, C. C., Liu, P. Y., Panyod, S., Liao, B. Y., Chen, P. C., Kao, H. L., Kuo, H. C., Kuo, C. H., Chiu, T. H. T., Chen, R. A., Chuang, H. L., Huang, Y. Te, Zou, H. B., Hsu, C. C., Chang, T. Y., Lin, C. L., Ho, C. T., Yu, H. T., Sheen, L. Y., Wu, M. S. 2019. Identification of TMAO-producer phenotype and host-diet-gut dysbiosis by carnitine challenge test in human and germ-free mice. *Gut*. 68(8), 1439–1449. doi:10.1136/gutjnl-2018-317155
90. Xie, F., Zhen, X., Liu, Z., Chen, X., Liu, Z., Zhou, M., Zhou, Z., Hu, Z., Zhu, F., Huang, Q., Zhang, L., Nie, J. 2022. Dietary choline, via gut microbe- generated trimethylamine-N- oxide, aggravates chronic kidney disease-induced cardiac dysfunction by inhibiting hypoxia-induced factor 1 $\alpha$ . *Frontiers in Physiology*. 13(November), 1–17. doi:10.3389/fphys.2022.996166
91. Yang, X., Li, Y., Wang, C., Mao, Z., Zhou, W., Zhang, L., Fan, M., Cui, S., Li, L. 2020. Meat and fish intake and type 2 diabetes: Dose–response meta-analysis of prospective cohort studies. *Diabetes and Metabolism*. 46(5), 345–352. doi:10.1016/j.diabet.2020.03.004
92. Yano, S., Notsu, Y., Yamaguchi, K., Abe, T., Yamada, K., Nagai, A., Tanabe, K., Nabika, T. 2018. Plasma level of trimethylamine-N-oxide is not correlated to the intima-media thickness in Japanese; Shimane cohre study. *Atherosclerosis*. 275(2018), e19. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2018.06.041
93. Yazaki, Y., Aizawa, K., Israr, M. Z., Negishi, K., Salzano, A., Saitoh, Y., Kimura, N., Kono, K., Heaney, L., Cassambai, S., Bernieh, D., Lai, F., Imai, Y., Kario, K., Nagai, R., Ng, L. L., Suzuki, T. 2020. Ethnic differences in association of outcomes with trimethylamine N-oxide in acute heart failure patients. *ESC heart failure*. 7(5), 2373–2378. doi:10.1002/ehf2.12777
94. Yazaki, Y., Salzano, A., Nelson, C. P., Voors, A. A., Anker, S. D., Cleland, J. G., Lang, C. C., Metra, M., Samani, N. J., Ng, L. L., Suzuki, T. 2019, October. Geographical location affects the levels and association of trimethylamine N-oxide with heart failure mortality in BIOSTAT-CHF: a post-hoc analysis. *European journal of heart failure*. . doi:10.1002/ejhf.1550
95. Zeisel, S. H., Warriar, M. 2017. Trimethylamine N-Oxide, the Microbiome, and Heart and Kidney Disease. *Annual review of nutrition*. 37, 157–181. doi:10.1146/annurev-nutr-071816-064732
96. Zhu, W., Gregory, J. C., Org, E., Buffa, J. A., Gupta, N., Wang, Z., Li, L., Fu, X., Wu, Y., Mehrabian, M., Sartor, R. B., McIntyre, T. M., Silverstein, R. L., Tang, W. H. W., DiDonato, J. A., Brown, J. M., Lusic, A. J., Hazen, S. L. 2016. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell*. 165(1), 111–124. doi:10.1016/j.cell.2016.02.011

## Pateicības

Pirmkārt un galvenokārt es vēlos no sirds pateikties savai zinātniskajai vadītājai prof. Maijai Dambrovai par viņas zināšanām, vadību un zinātniskajiem padomiem. Īpaša pateicība arī maniem zinātniskajiem konsultantiem Marinai Makreckai-Kūkai un Jānim Kūkam par vērtīgo atbalstu doktora studiju laikā.

Pateicos visiem saviem kolēģiem Farmaceutiskās farmakoloģijas laboratorijā par atbalstu. Īpašs paldies Edgaram Liepiņam, Reinim Vilšķērstam, Helēnai Cīrulei un Stanislavai Korzh, kas palīdzēja rezultātu ģenerēšanā un analīzē. Paldies par palīdzību analītikas meistariem Solveigai Grīnberga un Eduardam Sevostjanovam. Paldies arī maniem bijušajiem kolēģiem Kārlim Vilkam un Edijam Vāveram par atbalstu. Papildus pateicība arī Pāvelam Dimitrijevam, kurš bija lielisks kolēģis visu doktorantūras studiju laiku.

Īpaša pateicība Jānim Liepiņam par vērtīgo pieredzi darbā ar manām mazākajām pētījuma vienībām – izolētajiem mikroorganismiem. Tāpat vēlos pateikties Ilzei Konrādei un Sabīnei Upmale-Engelai par palīdzību darbā ar manām lielākajām pētījuma vienībām, veicot pirmo pētījumu klīniskajā vidē.

Jūtos pateicīga Rīgas Stradiņa universitātei, kas atbalstīja šo disertāciju ar doktorantūras grantiem. Šī disertācija tika izstrādāta ar ESF un Latvijas valsts budžeta finansējumu, projekta Nr. 8.2.2.0/20/1/004 “Atbalsts doktorantu iesaistei zinātniski pētnieciskajā un studiju darbā” ietvaros.

Šī disertācija nebūtu bijusi iespējama bez lieliskajiem apstākļiem, ko nodrošina Latvijas Organiskās sintēzes institūts, kā arī Latvijas Zinātnes padomes finansiālā atbalsta pētniecības projektam LZP-2018/1-0081. Esmu pateicīga par iespējām, ko sniedza arī projekts “FAT4BRAIN”, ko finansē ES Pētniecības un inovāciju programma “Apvārsnis 2020” saskaņā ar grantu vienošanos Nr. 857394.

Visbeidzot, es vēlos pateikties savai ģimenei par sapratni un nerimstošo atbalstu visu doktorantūras laiku. Paldies, ka ticējāt man!