
TEZĂ DE DOCTORAT - REZUMAT

Noi factori de risc în patologia
cardiovasculară – influența microbiomului
intestinal și a metaboliților acestuia în
ateroscleroză și fibrilația atrială

Doctorand **Florea Cristian-Marius**

Conducător de doctorat Prof.dr. **Filip Gabriela Adriana**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

ABREVIERI	11
INTRODUCERE	15
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	
1. Microbiomul intestinal - Aspecte generale	
1.1. Introducere	19
1.2. Compoziția și diversitatea microbiotei intestinale	19
1.3. Funcțiile microbiotei intestinale	
1.3.1. Funcția metabolică	22
1.3.2. Funcția de barieră și apărare contra agenți patogeni	25
1.3.3. Funcția imunologică	27
1.4 Disbioza intestinală	28
2. Rolul microbiomului și al TMAO în bolile cardiometabolice	
2.1. Axa intestin-cord	31
2.2. Boala aterosclerotică cardiovasculară	33
2.3. Hipertensiunea arterială	37
2.4. Insuficiența cardiacă	39
2.5. Fibrilația atrială	40
2.6. Boli metabolice asociate afecțiunilor cardiovasculare	41
2.6.1. Dislipidemia	42
2.6.2. Diabetul zaharat de tip 2	42
2.6.3. Boala hepatică metabolică	43
2.7. Perspective de viitor	45
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	
1. Ipoteza de lucru/obiective	49
2. Metodologie generală	50
3. Studiul 1. Administrarea orală cronică de Trimetilamină-N-Oxid induce ateroscleroză incipientă experimentală la șoareci nemodificați genetic	
3.1. Introducere	53
3.2. Ipoteza de lucru/obiective	54
3.3. Material și metodă	54
3.4. Rezultate	56
3.5. Discuții	62
3.6. Concluzii	66
4. Studiul 2. Efectul acut al Trimetilamină-N-Oxidului asupra funcției vasculare, stresului oxidativ și inflamației vasculare aortice	
4.1. Introducere	67
4.2. Ipoteza de lucru/obiective	68
4.3. Material și metodă	68

4.4. Rezultate	71
4.5. Discuții	75
4.6. Concluzii	78
5. Studiul 3. Impactul administrării cronice de Trimetilamină N-oxid asupra stresului oxidativ, inflamației și fibrozei hepatice	
5.1. Introducere	79
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	80
5.3. Material și metodă	80
5.4. Rezultate	83
5.5. Discuții	88
5.6. Concluzii	91
6. Studiul 4. Impactul Trimetilamină N-oxidului asupra fibrilației atriale la pacienții cu boală cardiovasculară	
6.1. Introducere	93
6.2. Ipoteza de lucru/obiective	94
6.3. Material și metodă	94
6.4. Rezultate	95
6.5. Discuții	100
6.6. Concluzii	102
7. Discuții generale	103
8. Concluzii generale	106
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	107
REFERINȚE	109

CUVINTE CHEIE: TMAO, microbiom, inflamație, stres oxidativ, fibroză, ateroscleroză, fibrilație atrială

INTRODUCERE

Bolile cardiovasculare (BCV) reprezintă o problema majoră pentru sănătatea publică, fiind principala cauză de deces și dizabilitate la nivel mondial. Acestea cuprind o serie de patologii larg răspândite în populație cum ar fi boala aterosclerotică cardiovasculară, insuficiența cardiacă, aritmiile și accidentul vascular cerebral. Aceste patologii duc adeseori la complicații pe termen lung, calitate redusă a vieții și costuri ridicate asociate îngrijirii medicale. Prevalența BCV este în creștere fiind determinată de diverși factori precum îmbătrânirea populației, stilul de viață nesănătos (alimentația, fumat, sedentarism) care duc la creșterea incidenței factorilor de risc cardiovasculari precum hipertensiunea, diabetul și obezitatea. Este important de menționat totuși faptul că factorii de risc tradiționali cardiovasculari nu reușesc să explice integral incidența crescândă a bolilor cardiace și nici evoluția acestora. Din aceste considerente, este importantă explorarea unor noi factori de risc pentru a descoperi o imagine mai corectă și completă a cauzelor ce duc la apariția bolilor cardiovasculare și pentru a perfecționa abordările de prevenție și tratament.

Numeroase cercetări au demonstrat faptul că funcția și compoziția microbiotei pot influența dezvoltarea și progresia BCV. Apariția unui dezechilibru în compoziția microbiotei, cunoscută sub denumirea de disbioză, poate afecta multiple mecanisme fiziopatologice implicate în apariția bolilor cardiovasculare. Mai mult, anumite bacterii intestinale pot metaboliza componente dietetice în metaboliți activi precum trimetilamina N-oxidul, care a fost asociat cu un risc crescut de ateroscleroză și evenimente cardiovasculare majore. Înțelegerea interacțiunilor microbiotă-organism uman poate deschide posibilități pentru dezvoltarea unor strategii terapeutice noi având ca scop modularea microbiotei pentru prevenția și tratamentul bolilor cardiovasculare. Astfel, microbiota intestinală nu este doar un domeniu fascinant de cercetare, ci și o țintă promițătoare pentru prevenirea și gestionarea bolilor cardiace.

Această lucrare a fost realizată printr-o colaborare multidisciplinară și interinstituțională de succes și abordează un subiect complex și de mare actualitate în domeniul medical, concentrându-se pe efectele Trimetilamină N-oxidului (TMAO) asupra patologiei, în special pe implicațiile în procesele aterosclerotice, oxidative și inflamatorii din cord, vase și ficat.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Această parte a fost divizată în două capitole majore:

În primul capitol este prezentată importanța microbiotei intestinale și felul în care aceasta influențează starea de sănătate în general. Este subliniat faptul că tractul digestiv uman este populat de o cantitate uriașă de microorganisme iar numărul acestora depășește numărul celulelor umane proprii. Complexul format din gazdă și microorganismele colonizatoare este frecvent descris ca un „superorganism”. Din punct de vedere funcțional, microbiota este considerată un adevărat organ endocrin datorită multitudinii de substanțe metabolice bioactive pe care acesta le generează. Interacțiunea dintre gazdă și microbiotă este astfel crucială atât pentru menținerea stării de sănătate cât și pentru patogeneza bolilor. Microbiota funcționează în simbioză cu gazda, contribuind la o serie de funcții esențiale precum consolidarea integrității tractului gastrointestinal, formarea epitelului

intestinal, participarea în diverse procese metabolice și generarea de energie din alimente, apărarea împotriva agenților patogeni, cât și prin modularea imunității gazdei. De aceea, perturbarea acestor funcții prin schimbarea compoziției microbiene, disbioza, poate contribui la apariția unei game variate de patologii umane.

În cel de al doilea capitol este prezentată interacțiunea dintre microbiotă și sistemul cardiovascular, cât și implicarea acestuia specifică într-o serie de patologii cardiometabolice larg răspândite în populație, cum ar fi ateroscleroza, hipertensiunea arterială, insuficiența cardiacă, fibrilația atrială, diabetul zaharat de tip 2, dislipidemia și boala hepatică metabolică. Microbiota interacționează cu organismul uman prin intermediul suprafeței mucoasei intestinale. Totuși, componente bacteriene pot fi în diverse situații translocate ceea ce poate duce la identificarea lor în sângele pacienților cu BCV. În principal, microbiota intestinală afectează fiziologia umană prin producția de metaboliți care acționează la distanță. Acești metaboliți pătrund în circulația sanguină și influențează diverse procese celulare, având efecte atât benefice, cât și dăunătoare asupra funcționalității sistemului cardiovascular. Dintre metaboliții produși de microbiota, TMA și TMAO, acizii biliari, AGLS și aminoacizii aromatizați sunt considerați cu importanța cea mai mare în fiziopatologia BCV la om.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Această parte a fost divizată în patru capitole, formate din trei studii experimentale și unul clinic efectuate în cadrul cercetării personale:

În cadrul primului nostru experiment, scopul a fost să investigăm impactul administrării pe termen lung de TMAO asupra dezvoltării aterosclerozei la șoareci fără modificări genetice, prin evaluarea histologică și imunohistochimică a aortei după 3 luni de administrare zilnică a TMAO prin gavaj gastric. Legătura dintre TMAO și precursorii săi cu ateroscleroza a fost demonstrată până în prezent în mare parte la șoarecii modificați genetic predispuși la ateroscleroză. Acest studiu a inclus analiza unor mecanisme conexe precum dislipidemia (prin evaluarea valorilor serice ale colesterolului total, LDLc, HDLc, și a trigliceridelor), alterările glicemice, stresul oxidativ (prin evaluarea MDA) și inflamația (prin evaluarea hsCRP, IL- β , TNF- α). Prin această abordare, am urmărit să descoperim efectele proaterogene ale TMAO într-un mediu controlat, replicând impactul unei disbioze intestinale tipice prezentă într-o dietă de tip occidental, caracterizată prin niveluri ridicate de TMAO în ser.

În cel de-al doilea experiment, ne-am propus să investigăm efectul vasoactiv acut al TMAO asupra vaselor de sânge și să explorăm legătura acestuia cu stresul oxidativ și inflamația arterială. Scopul a fost să dezvăluim mecanismele care ar putea sta la baza impactului pe termen lung proaterogen și proinflamator al TMAO. Studiul și-a propus evaluarea efectului acut al unor concentrații diferite de TMAO asupra reactivității vasculare și a markerilor de stres oxidativ, pe inelele de aortă prelevate de la șobolani sănătoși. A fost investigat impactul diferitelor doze de TMAO asupra expresiei factorilor de transcripție NF κ B, pNF κ B și NRF2 și asupra enzimelor iNOS și SOD1 în

corelație cu răspunsul vascular la agenți vasoconstrictori, fenilefrină, și vasodilatatori respectiv nitroprusiatul de sodiu.

În cel de-al treilea experiment murin, am analizat impactul expunerii pe termen lung la TMAO asupra ficatului, un organ cheie în contextul patologiei cardiometabolice. TMAO, compusul natural întâlnit în diverse organisme marine și sintetizat în ficatul uman, a fost obiectul unor studii aprofundate în contextul patologiei cardiovasculare. Totuși, implicațiile sale pe termen lung asupra ficatului, în special în ceea ce privește patologia hepatică metabolică și complicațiile acesteia, nu au fost suficient investigate. Studiul își propune să aprofundeze înțelegerea efectelor TMAO dincolo de sfera patologiei cardiovasculare, prin evaluarea consecințelor sale posibile asupra sănătății hepatice. În acest sens, s-au analizat efectele suplimentării cronice orale de TMAO asupra stresului oxidativ hepatic (prin evaluarea MDA, GSH, GSSG, CAT, GPx și 8-oxo-dG), inflamației (prin evaluarea COX-2, iNOS, IL-1 α , TGF- α , TNF- α , IL-10, histologie și imunohistochimie) și fibrozei hepatice (histologie și imunohistochimie, markeri fibroza α -SMA, collagen-3), utilizând un model murin tratat 3 luni cu TMAO.

În ultimul studiu, printr-o abordare clinică transversală, propus evaluarea unei legături potențiale între metaboliții derivați din microbiota intestinală și aritmiile cardiace prin identificarea asocierilor care pot exista între AF și TMAO. În mod specific, s-a căutat să se determine o corelație între nivelurile serice ale TMAO și fibrilația atrială la pacienții cu boli cardiovasculare, precum și asocierea TMAO cu boli cardiometabolice, cu inflamația sistemică (TLR, IL-1 α , IL-1 β) și cu parametri ecocardiografici legați de incidența și progresia fibrilației atriale (parametrii de funcție diastolică, fracție ejeție ventricul stâng).

CONCLUZII GENERALE

1. Administrarea orală, zilnică, a TMAO este asociată cu absorbția în tractul digestiv și cu creșterea valorilor serice ale acestuia.
2. Suplimentarea zilnică a alimentației normale a șobolanilor nemodificați genetic (pentru a fi predispuși la ateroscleroză) cu TMAO timp de 3 luni induce modificări aterosclerotice vasculare incipiente
3. Modificările aterosclerotice evidențiate se asociază cu inflamație cronică sistemică manifestată prin creșterea valorilor serice ale IL-1 α , hsCRP, TNF α , cu stres oxidativ exprimat prin creșterea valorilor serice ale MDA, și cu dislipidemie aterogenă exprimată prin scăderea HDLc și creșterea trigliceridelor serice
4. TMAO în doze suprafiziologice nu are efecte directe acute asupra vasoreactivității inelelor de aortă la șobolan, nici asupra vasoconstricției mediată de Phe sau vasorelaxării non-endotelial dependente mediată de SNP
5. TMAO induce în mod acut (după incubare timp de 1 oră în băiță de organ) stres oxidativ și inflamație tisulară vasculară, exprimate prin creșteri ale MDA, SOD-1, iNOS, cât și prin creșteri ale factorilor de transcripție NFR2, NFkB, pNFkB

6. Suplimentarea zilnică timp de 3 luni a alimentației șobolanilor cu TMAO se asociază cu stres oxidativ exprimat prin creșterea valorilor MDA, scăderea GSH, creșterea valorilor GSSG, scăderea raportului GSH/GSSG, scăderea activității enzimelor GPx și CAT și creșterea markerilor inflamatorii α SMA și COX2, fără modificarea prezenței IL-1 α , TNF α , și TGF- β , în țesutul hepatic
7. Modificările tisulare pro-oxidative și pro-inflamatorii nu se asociază însă cu steatoză, steatohepatită sau fibroză, în urma examenului histologic sau la evaluarea prin western blot a expresiei markerilor de fibroză α SMA și collagen-3
8. Nu s-a evidențiat o asociere între valorile serice ale TMAO la pacienți cunoscuți cu BCV și FA în niciuna dintre formele ei clinice
9. În urma analizei multivariabile, la pacienții cu BCV, TMAO seric se corelează cu numărul de comorbidități, cu boala aterosclerotică și cu disfuncția renală cronică
10. La pacienții cu BCV, TMAO seric nu se asociază cu markerii serici de inflamație sistemică IL-1 α , IL-1 β , sau TLR

SUMMARY OF THE DOCTORAL THESIS

New risk factors in cardiovascular pathology
– the influence of the gut microbiota and its
metabolites in atherosclerosis and atrial
fibrillation

PhD Student **Florea Cristian-Marius**

PhD Scientific Coordinator Prof.dr. **Filip Gabriela Adriana**

TABLE OF CONTENTS

ABBREVIATIONS	11
INTRODUCTION	15
CURRENT STATE OF THE ART	
1. The gut microbiome – general aspects	
1.1. Introduction	19
1.2. The composition and diversity of the gut microbiota	19
1.3. The functions of the gut microbiota	
1.3.1. Metabolic function	22
1.3.2. Barrier function and defense against pathogens	25
1.3.3. Immunologic function	27
1.4 Gut dysbiosis	28
2. The role of the microbiome and TMAO in cardiometabolic disease	
2.1. The gut-heart axis	31
2.2. Atherosclerotic cardiovascular disease	33
2.3. Arterial hypertension	37
2.4. Heart failure	39
2.5. Atrial fibrillation	40
2.6. Metabolic Diseases Associated with Cardiovascular Conditions	41
2.6.1. Dyslipidemia	42
2.6.2. Type 2 Diabetes Mellitus	42
2.6.3. Metabolic liver disease	43
2.7. Future perspectives	45
PERSONAL CONTRIBUTION	
1. Working hypothesis/Objectives	49
2. General methodology	50
3. Study 1. Chronic oral Trimethylamine-N-oxide administration induces experimental incipient atherosclerosis in non-genetically modified mice	
3.1. Introduction	53
3.2. Objectives	54
3.3. Materials and Methods	54
3.4. Results	56
3.5. Discussions	62
3.6. Conclusions	66
4. Study 2. The acute effect of trimethylamine-N-oxide on vascular function, oxidative stress, and inflammation in rat aortic rings	
4.1. Introduction	67
4.2. Objectives	68
4.3. Materials and Methods	68

4.4. Results	71
4.5. Discussions	75
4.6. Conclusions	78
5. Study 3. The impact of chronic Trimethylamine N-oxide administration on liver oxidative stress, inflammation, and fibrosis	
5.1. Introduction	79
5.2. Objectives	80
5.3. Materials and Methods	80
5.4. Results	83
5.5. Discussion	88
5.6. Conclusion	91
6. Study 4. The impact of trimethylamine N-oxide on atrial fibrillation occurrence in patients with cardiovascular disease	
6.1. Introduction	93
6.2. Objectives	94
6.3. Materials and Methods	94
6.4. Results	95
6.5. Discussion	100
6.6. Conclusion	102
7. General Discussions	103
8. General Conclusions	106
9. Originality and Innovative Contributions of the Thesis	107
REFERENCES	109

KEY WORDS: TMAO, microbiome, inflammation, oxidative stress, fibrosis, atherosclerosis, atrial fibrillation

INTRODUCTION

Cardiovascular diseases (CVD) represent a major public health issue, being the leading cause of death and disability worldwide. They encompass a wide range of pathologies that are prevalent in the population, such as cardiovascular atherosclerotic disease, heart failure, arrhythmias, and stroke. These pathologies often lead to long-term complications, reduced quality of life, and high costs associated with medical care. The prevalence of CVD is increasing, driven by various factors such as population aging, unhealthy lifestyles (diet, smoking, physical inactivity), which lead to an increase in the incidence of cardiovascular risk factors such as hypertension, diabetes, and obesity. However, it is important to note that traditional cardiovascular risk factors do not fully explain the increasing incidence of heart diseases nor their progression. For these reasons, exploring new risk factors is important to discover a more accurate and complete picture of the causes leading to the development of cardiovascular diseases and to refine prevention and treatment approaches.

Numerous research studies have demonstrated that the function and composition of the microbiota can influence the development and progression of CVD. The emergence of an imbalance in the composition of the microbiota, known as dysbiosis, can affect multiple pathophysiological mechanisms involved in the onset of cardiovascular diseases. Furthermore, certain gut bacteria can metabolize dietary components into active metabolites such as trimethylamine N-oxide, which has been associated with an increased risk of atherosclerosis and major cardiovascular events. Understanding the interactions between the microbiota and the human body may open possibilities for developing new therapeutic strategies aimed at modulating the microbiota for the prevention and treatment of cardiovascular diseases. Thus, the gut microbiota is not only a fascinating area of research but also a promising target for the prevention and management of heart diseases.

This work was carried out through a successful multidisciplinary and interinstitutional collaboration and addresses a complex and highly relevant subject in the medical field, focusing on the effects of Trimethylamine N-oxide (TMAO) on pathology, especially its implications in atherosclerotic, oxidative, and inflammatory processes in the heart, blood vessels, and liver.

CURRENT STATE OF THE ART

This section is divided into two major chapters:

The first chapter discusses the importance of the gut microbiota and how it influences overall health. It highlights that the human digestive tract is populated by a vast amount of microorganisms, and their number exceeds that of human cells. The complex formed by the host and the colonizing microorganisms is often described as a "superorganism." Functionally, the microbiota is considered a true endocrine organ due to the multitude of bioactive metabolic substances it generates. The interaction between the host and microbiota is crucial both for maintaining health and for the pathogenesis of diseases. The microbiota functions in symbiosis with the host,

contributing to a range of essential functions such as reinforcing the integrity of the gastrointestinal tract, forming the intestinal epithelium, participating in various metabolic processes and energy generation from food, defending against pathogens, and by modulating the host immunity. Therefore, the disruption of these functions through changes in microbial composition, dysbiosis, can contribute to a wide variety of human pathologies.

The second chapter presents the interaction between the microbiota and the cardiovascular system, as well as its specific involvement in a series of widely prevalent cardiometabolic pathologies in the population, such as atherosclerosis, arterial hypertension, heart failure, atrial fibrillation, type 2 diabetes mellitus, dyslipidemia, and metabolic liver disease. The microbiota interacts with the human body through the intestinal mucosal surface. However, bacterial components can be translocated in various situations, which can lead to their identification in the blood of patients with CVD. Primarily, the gut microbiota affects human physiology through the production of metabolites that act at a distance. These metabolites enter the bloodstream and influence various cellular processes, having both beneficial and harmful effects on the functionality of the cardiovascular system. Among the metabolites produced by the microbiota, TMA and TMAO, bile acids, SCFAs, and aromatized amino acids are considered of utmost importance in the pathophysiology of CVD in humans.

PERSONAL CONTRIBUTION

This part was divided into four chapters, consisting of three experimental studies and one clinical study constituting the personal research and contribution:

In the first experiment, the goal was to investigate the long-term impact of TMAO administration on the development of atherosclerosis in non-genetically modified mice, by histological and immunohistochemical evaluation of the aorta after 3 months of daily TMAO administration via gastric lavage. The link between TMAO and its precursors with atherosclerosis has so far been demonstrated largely in genetically modified mice predisposed to atherosclerosis. This study included the analysis of related mechanisms such as dyslipidemia (by assessing serum levels of total cholesterol, LDLc, HDLc, and triglycerides), glycemic alterations, oxidative stress (by evaluating MDA), and inflammation (by assessing hsCRP, IL- β , TNF- α). Through this approach, we aimed to uncover the proatherogenic effects of TMAO in a controlled environment, replicating the impact of a typical intestinal dysbiosis present in a Western diet, characterized by elevated TMAO levels in serum.

In the second experiment, we aimed to investigate the acute vasoactive effect of TMAO on blood vessels and to explore its connection with oxidative stress and arterial inflammation. The goal was to reveal the mechanisms that could underlie the long-term proatherogenic and proinflammatory impact of TMAO. The study aimed to assess the acute effect of different concentrations of TMAO on vascular reactivity and markers of oxidative stress, on aortic rings harvested from healthy rats. The impact of various doses of TMAO on the expression of transcription

factors NFκB, pNFκB, and NRF2, and on the enzymes iNOS and SOD1 was investigated in correlation with the vascular response to vasoconstrictive agents, phenylephrine, and vasodilators, namely sodium nitroprusside.

In the third murine experiment, we analyzed the impact of long-term exposure to TMAO on the liver, a key organ in the context of cardiometabolic pathology. TMAO, a natural compound found in various marine organisms and synthesized in the human liver, has been the subject of in-depth studies in the context of cardiovascular pathology. However, its long-term implications on the liver, especially regarding metabolic liver pathology and its complications, have not been sufficiently investigated. The study aims to deepen the understanding of TMAO's effects beyond the sphere of cardiovascular pathology, by assessing its possible consequences on liver health. In this regard, the effects of chronic oral supplementation with TMAO on hepatic oxidative stress (by evaluating MDA, GSH, GSSG, CAT, GPx, and 8-oxo-dG), inflammation (by assessing COX-2, iNOS, IL-1α, TGF-α, TNF-α, IL-10, histology and immunohistochemistry), and liver fibrosis (histology and immunohistochemistry, fibrosis markers α-SMA, collagen-3), using a murine model treated with TMAO for 3 months, were analyzed.

In the last study, through a cross-sectional clinical approach, we aimed to evaluate a potential link between metabolites derived from the gut microbiota and cardiac arrhythmias by identifying associations that may exist between AF and TMAO. Specifically, it sought to determine a correlation between serum levels of TMAO and atrial fibrillation in patients with cardiovascular diseases, as well as the association of TMAO with cardiometabolic diseases, with systemic inflammation (TLR, IL-1α, IL-1β), and with echocardiographic parameters related to the incidence and progression of atrial fibrillation (diastolic function parameters, left ventricular ejection fraction).

GENERAL CONCLUSIONS

1. Oral, daily administration of TMAO is associated with its absorption in the digestive tract and with an increase in its serum levels.
2. Daily supplementation of the normal diet of non-genetically modified rats (to predispose them to atherosclerosis) with TMAO for 3 months induces early vascular atherosclerotic changes.
3. The demonstrated atherosclerotic changes are associated with systemic chronic inflammation manifested by increased serum levels of IL-1α, hsCRP, TNFα, with oxidative stress expressed by increased serum levels of MDA, and with atherogenic dyslipidemia expressed by decreased HDLc and increased serum triglycerides.
4. TMAO in supra-physiological doses does not have direct acute effects on the vasoreactivity of rat aortic rings, neither on Phe-mediated vasoconstriction nor on SNP-mediated non-endothelial dependent vasorelaxation.
5. TMAO acutely induces (after 1-hour incubation in organ baths) vascular tissue oxidative stress and inflammation, expressed by increases in MDA, SOD-1, iNOS, as well as increases in the transcription factors NRF2, NFκB, pNFκB.

6. Daily supplementation for 3 months of the rat diet with TMAO is associated with oxidative stress expressed by increased MDA values, decreased GSH, increased GSSG values, decreased GSH/GSSG ratio, decreased activity of the GPx and CAT enzymes, and increased inflammatory markers α SMA and COX2, without changing the presence of IL-1 α , TNF α , and TGF- β , in liver tissue.
7. Pro-oxidative and pro-inflammatory tissue changes, however, are not associated with steatosis, steatohepatitis, or fibrosis, following histological examination or western blot evaluation of fibrosis markers α SMA and collagen-3 expression.
8. No association was found between serum TMAO levels in patients known with CVD and AF in any of its clinical forms.
9. After multivariate analysis, in patients with CVD, serum TMAO correlates with the number of comorbidities, atherosclerotic disease, and chronic kidney dysfunction.
10. In patients with CVD, serum TMAO is not associated with systemic inflammation serum markers IL-1 α , IL-1 β , or TLR.