

**Akademia Wychowania Fizycznego i Sportu im. Jędrzeja Śniadeckiego
w Gdańsku**



JOANNA JOLANTA SAMULAK

**Stężenie N-tlenku trimetyloaminy (TMAO) w osoczu krwi
ludzkiej w warunkach fizjologicznych i patologicznych**

PRACA DOKTORSKA

PROMOTOR: dr hab. Robert Olek

PROMOTOR POMOCNICZY: dr hab. n. med. Łukasz Lewicki

Praca częściowo wykonana w ramach realizacji projektu NCN
2014/15/B/NZ7/00893

Gdańsk, 2021

Spis treści

Streszczenie	4
1. Wstęp	5
1.1 Zdrowie	5
1.1.1 Aktywność fizyczna	5
1.1.2 Dieta	6
1.2 Trimetyloamina (TMA)	6
1.3 N-tlenek trimetyloaminy (TMAO)	7
1.3.1 Budowa	7
1.3.2 Funkcja	7
1.3.3 Występowanie	8
1.3.4 Determinanty wpływające na stężenie TMAO w osoczu	9
1.3.4.1 Mutacja genu FMO3	9
1.3.4.2 Wiek	9
1.3.4.3 Płeć	10
1.3.4.4 Dieta	10
1.3.4.5 Filtracja nerkowa	10
1.3.4.6 Reakcje wolno rodnikowe	11
1.4 Choroby sercowo-naczyniowe (ChSN)	12
1.4.1 Patogeneza miażdżycy	13
1.4.1.1 Profil lipidowy	13
1.4.1.2 Stan zapalny	13
1.4.1.3 Stres oksydacyjny	14
1.4.1.4 TMAO	15
1.4.2 Prewencja ChSN	16
1.4.2.1 Aktywność fizyczna	16
1.4.2.2 Dieta	16
1.4.3 Interwencja dietetyczno-treningowa a TMAO	17
1.5 L-karnityna	18
1.5.1 Działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne	18
1.5.2 Zastosowanie L-karnityny w ChSN	19
2. Cele	20
3. Materiały i metody	21
3.1 Badanie 1	21

3.1.1	Badanie 1A	21
3.1.2	Badanie 1B	25
3.2	Badanie 2	27
3.3	Badanie 3	34
4.	Wyniki	37
4.1	Badanie 1A	37
4.2	Badanie 1B	45
4.3	Badanie 2	47
4.4	Badanie 3	51
5.	Dyskusja	56
	Wnioski	64
6.	Piśmiennictwo	65
	Wykaz rycin	82
	Spis tabel	84
	Wykaz skrótów	85
	Abstrakt	88

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było I). określenie czy stężenie N-tlenku trimetyloaminy (TMAO) w osoczu krwi jest modyfikowane podczas długotrwałej suplementacji karnityną i po jej zaprzestaniu, oraz czy ma to wpływ na wybrane wskaźniki stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego u zdrowych ludzi; II). ustalenie czy 24-tygodniowy trening oporowy zmienia stężenie TMAO w osoczu, oraz w jakim stopniu włączenie suplementacji karnityną do procesu treningowego wpłynie na zmianę stężenia TMAO; III). określenie czy stężenie TMAO w osoczu u osób z chorobą sercowo-naczyniową (ChSN) różni się od stężenia tego związku u osób zdrowych.

W pracy zostały poddane analizie trzy oddzielne badania. Oznaczenia wykonane zostały we krwi ludzkiej, kobiet, w przedziale wieku 43-91 lat, u których nie zdiagnozowano trimetyloaminurii.

Główne wyniki tej pracy wskazują, że stężenie TMAO w osoczu krwi ludzkiej może ulegać modyfikacji pod wpływem suplementacji karnityną. Istotnych zmian w stężeniu TMAO nie stwierdzono po 24 tygodniach treningu oporowego. Nie zaobserwowano także różnic pomiędzy stężeniem TMAO w osoczu krwi kobiet z ChSN a grupą kobiet zdrowych. Należy także podkreślić, że pomimo istotnego podwyższenia stężenie TMAO w osoczu wynikającego z suplementacji karnityną, nie odnotowano zmian w profilu lipidowym oraz wybranych wskaźników stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego badanych. Co istotne, u osób z prawidłową funkcją nerek stężenie TMAO w osoczu wraca do wartości sprzed okresu suplementacji.

Karnityna i TMAO mają przeciwstawne właściwości. Karnityna cechuje się działaniem przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym. Z kolei TMAO posiada właściwości prozapalne i prooksydacyjne. Co ciekawe suplementacja karnityną podwyższa stężenie krążącego TMAO. Ponadto, powszechnie znane są korzystne właściwości regularnego wysiłku fizycznego, a nasze badania wykazały, że 24-tygodniowy proces treningowy nie wpłynął na stężenie TMAO w osoczu. Niemniej jednak, zaobserwowano różnice w stężeniu trimetyloaminy (TMA) pomiędzy osobami z ChSN a zdrowymi. Dlatego konieczne są dalsze badania w celu określenia potencjalnych korzyści lub szkodliwego działania metabolitów mikrobiomu jelitowego.

Wstęp

Zespoły komórek o podobnej budowie i funkcji łączą się w tkanki. Różne tkanki współpracują ze sobą, umożliwiając pełnienie określonych funkcji. Także narządy są odpowiednio pogrupowane i współdziałają ze sobą. W ten sposób powstają nadrzędne w stosunku do nich zespoły zwane układami narządów, tworząc najwyższy poziom organizacji: organizm.

W organizmie człowieka nieustannie zachodzą różnorodne procesy. Prawidłowo funkcjonujący organizm cieszy się zdrowiem. Zmiany chorobowe, to zaburzenie warunków fizjologicznych – warunki patologiczne.

1.1 Zdrowie

Zdrowie to stan, w którym wszystkie procesy życiowe przebiegają prawidłowo, działają wszystkie narządy i człowiek ma dobre samopoczucie. Na ten stan składają się zdrowie fizyczne, psychiczne i społeczne (WHO, 2020). Istotny wpływ na utrzymanie zdrowia ma tryb życia, a w szczególności regularna aktywność fizyczna i zbilansowana dieta (WHO, 2020).

1.1.1 Aktywność fizyczna

Aktywność fizyczna definiowana jest jako wymagający wydatku energetycznego ruch ciała (WHO, 2010). Zaangażowane w ten ruch mięśnie szkieletowe zużywają nagromadzone substraty energetyczne, a mechanizmy regulacyjne pozwalają na usprawnienie transportu glukozy do komórek mięśniowych. Systematyczna aktywność pozwala na prawidłowe funkcjonowanie układów krążeniowego i oddechowego. Ponadto aktywność fizyczna przynosi korzyści dla zdrowia psychicznego (Schuch i wsp. 2016), opóźnia wystąpienie demencji (Livingston i wsp. 2017) i może przyczyniać się do utrzymania prawidłowej masy ciała (WHO 2010) i ogólnego samopoczucia (Das i Horton, 2012).

Z kolei długotrwałe czuwanie w pozycji siedzącej, półleżącej lub leżącej, przy niskim zużyciu energii, określane jest siedzącym trybem życia (Tremblay i wsp. 2017).

Innowacje technologiczne, rosnące wykorzystanie transportu samochodowego oraz tryb pracy, często przed komputerem, przyczyniają się do zmiany wzorców aktywności fizycznej (WHO 2020). Udowodniono, że wysoki poziom siedzącego trybu życia jest związany z chorobami cywilizacyjnymi, oraz wynikającej z tych chorób, zwiększonej śmiertelności (Ekelund i wsp. 2019, Keadle i wsp. 2017). Szacuje się, że gdyby globalna populacja była bardziej aktywna od czterech do pięciu milionów zgonów rocznie można byłoby uniknąć (WHO 2010, Strain i wsp. 2020).

1.1.2 Dieta

Zbilansowana dieta dostarcza do organizmu niezbędnych składników pokarmowych, wykorzystywanych jako materiał energetyczny, budulcowy, czy też odgrywających istotną rolę regulacyjną. Błędy żywieniowe, takie jak nadmiar cukrów prostych, duża zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych to czynniki negatywnie wpływające na zdrowie człowieka. W ostatnich latach szczególną uwagę zwrócono na metabolity mikrobiomu jelitowego, modulujące stan zdrowia żywiciela (Yong i Pedersen 2021). Liczne badania wykazały pozytywny związek metabolitów mikrobiomu z rozwojem chorób cywilizacyjnych, takich jak nadciśnienie, miażdżyca tętnic, niewydolność serca, choroby neurodegeneracyjne, a także insulinooporność i cukrzyca (Coutinho-Wolino i wsp. 2021, Dambrowa i wsp. 2016).

1.2 Trimetyloamina (TMA)

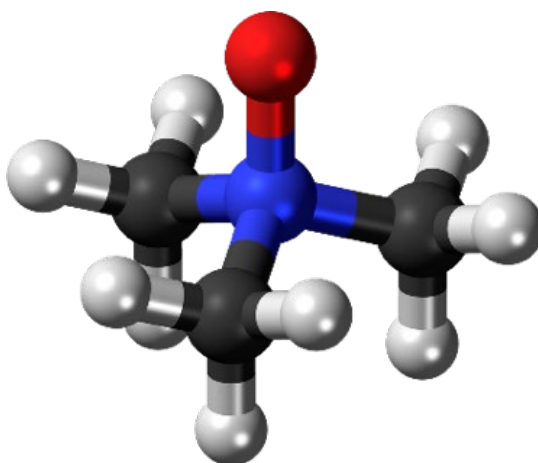
Jednym z metabolitów produkowanych przez mikrobiom jest trimetyloamina (TMA). Pierwsze informacje na temat metabolizmu tego związku pozyskiwane były na podstawie wyników badań pośrednich – poprzez pominięcie przewodu pokarmowego (iniekcje dożylną), lub wcześniejsze niszczenie mikrobiomu (zastosowanie antybiotyków o szerokim spektrum działania) (Rebouche i wsp. 1984). Obecnie wiadomo, że TMA może być produkowane przez 36 gatunków bakterii obecnych w jelitach, należących do gromady: Firmicutes, Proteobacteria i Actinobacteria (Falony i wsp. 2016). Bakterie te wykorzystują karnitynę, cholinę lub betainę jako źródło energii, co skutkuje powstaniem TMA. TMA dostaje się do wątroby, gdzie w reakcji katalizowanej przez flawinomonooksygenazę 3 (FMO3 ang.

flavin mono-oxygenase 3) ulega przemianie do N-tlenku trimetyloaminy (TMAO) (Kaysen i wsp. 2015, Tang i wsp. 2015).

1.3 N-tlenek trimetyloaminy (TMAO)

1.3.1 Budowa

TMAO (C_3H_9NO) jest małym związkiem organicznym z klasy tlenków amin o masie molowej 75.11, schematycznie przedstawiona na Rycinie 1.



Ryc. 1. Schemat budowy. Kolory reprezentują: niebieski – azot (N), czerwony – tlen (O), czarny – węgiel (C), biały – wodór (H).

1.3.2 Funkcja

TMAO pełni ważne funkcje fizjologiczne. W żywych organizmach morskich TMAO przyczynia się do osmoregulacji głównie poprzez wpływ na przepuszczalność błony komórkowej. Uważa się, że wysokie stężenie TMAO u ryb polarnych obniża temperaturę zamarzania płynów ustrojowych poprzez zwiększenie stężenia osmotycznego (Nordlie, 2009). TMAO wykazuje również zdolność do ochrony enzymów przed działaniem wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (Yancey i wsp. 2004). Co ważniejsze, TMAO chroni białka przed różnymi czynnikami

destabilizującymi, takimi jak mocznik (Ganguly i wsp. 2018). Ma to szczególne znaczenie wśród organizmów morskich, które zachowują wysoki poziom mocznika w swoich płynach ze względu na właściwości izoosmotyczne z wodą morską. Jednak mocznik może powodować destabilizację w układach enzymatycznych (Zhang i wsp. 2017).

Badania *in vitro* wykazały, że TMAO stabilizuje strukturę łańcuchów ciężkich miozyny (Kumemoto i wsp. 2012). Ponadto, TMAO moduluje aktywność ATPazy miozynowej. W przypadku braku filamentów aktynowych aktywność ATPazy jest wzmacniana przez TMAO (Kumemoto i wsp. 2012). Natomiast aktywność ATPazy aktywowanej aktyną oraz prędkość poślizgu zmniejszają się wraz ze wzrostem stężenia TMAO (Kumemoto i wsp. 2012).

TMAO jako związek opiekuńczy (chemiczny czaperon) (Shepshelovich i wsp. 2005), hamuje tworzenie agregatów białkowych, a przez to może odgrywać istotną rolę w rozwoju chorób neurodegeneracyjnych (Paul, 2007).

1.3.3 Występowanie

Ze względu na swoją funkcję, TMAO w dużych stężeniach występuje w tkankach ryb morskich. Udowodniono, że stężenie wzrasta proporcjonalnie do głębokości środowiska naturalnego (Yancey, 2005). Znany jest gatunek ryby żyjącej na głębokości około 8000 metrów (*Pseudoliparis amblystomopsis*), który ma najwyższy wśród znanych ryb poziom TMAO (Yancey i wsp. 2002).

Tabela 1. Stężenie TMAO w osoczu i mięśniach ryb dorszokształtnych w zakresach głębokości występowania różnych gatunków (Gillett i wsp. 1997).

<i>gatunek</i>	<i>zakres głębokości</i>	<i>osocze (mM)</i>	<i>mięśnie (mmol/kg)</i>
A. microlepis	530-2940 m	159 ± 46	211 ± 14
C. leptolepis	2000-3900 m	1.5 ± 0.5	158 ± 20
C. fillifer	2000-3000 m	15.0 ± 4.0	177 ± 8
C. armatus	3000-5200 m	4.4 ± 2.8	173 ± 5
C. cinereus	225-2830 m	15.1 ± 6.1	121 ± 11
A. pectoralis	200-2200 m	3.8 ± 1.7	83 ± 10
wartość p		<0.001	<0.001

Ostatnie badanie wykazało obecność TMAO również w mięśniach szkieletowych człowieka. Co więcej, TMAO podany doustnie zwiększa stężenie tego związku w mięśniach (Taesuwan i wsp. 2017).

1.3.4 Determinanty wpływające na stężenie TMAO w osoczu

Stężenie TMAO w osoczu zależy od wielu czynników i dlatego obserwowane są różnice międzyosobnicze (Romano i wsp. 2015) oraz zmienności wewnątrzosobnicza (Kühn i wsp. 2017). Badania wśród zdrowych osób (n=349) wykazały, że stężenie TMAO w osoczu na czczo mieści się w zakresie 0.73-126 μM , z medianą 3.45 μM (zakres międzykwartylowy, 2.25-5.79 μM) (Wang i wsp. 2014). Jak wspomniano powyżej, TMAO powstaje w reakcji katalizowanej przez FMO3, w związku z czym aktywność tego enzymu jest jednym z kluczowych czynników decydującym o stężeniu TMAO.

1.3.4.1 Mutacja genu FMO3

Badania genetyczne oszacowały, że częstość występowania heterozygotycznych nosicieli genu FMO3 wynosi od 0.5 do 11 procent w zależności od badanego pochodzenia etnicznego. Zgłaszano przypadki z niemal wszystkich części świata i obu płci, chociaż wydaje się, że kobiety, zwłaszcza pochodzenia afrykańskiego, mogą być częściej dotknięte taką modyfikacją (Messenger i wsp. 2013). Powoduje ona zaburzenie w syntezie enzymu FMO3, a tym samym brak możliwości przemiany TMA w TMAO, co powoduje jego wzrost stężenia. Z organizmu, wraz z moczem czy z potem usuwany jest TMA – który posiada specyficzny zapach, charakterystyczny dla ryb. Schorzenie to nosi nazwę trimetyloaminurii, potocznie nazywane jest zespołem zapachu rybiego (Dolphin i wsp. 1997).

1.3.4.2 Wiek

Porównanie grupy młodych dorosłych (przedział wiekowy 18-44 lata, n = 109) z osobami starszymi (powyżej 65 lat, n = 77) wykazało, że stężenie TMAO w osoczu jest istotnie wyższe w grupie osób starszych (odpowiednio $2.93 \pm 2.89 \mu\text{M}$

i $10.52 \pm 8.09 \mu\text{M}$). Należy przy tym nadmienić, że nie odnotowano znaczących różnic pomiędzy grupami w cechach klinicznych, takich jak: płeć, wskaźnik masy ciała (BMI), trójglicerydy (TG), cholesterol całkowity (TCh), lipoproteiny o niskiej gęstości (LDL), lipoproteiny o wysokiej gęstości (HDL), aminotransferaza alaninowa (ALT), aminotransferaza asparaginianowa (AST), poziom glukozy na czczo (FBG), kreatynina czy mocznik, a także rozkurczowe ciśnienie krwi (DBP). Jedynie skurczowe ciśnienie krwi (SBP) było wyższe w grupie osób starszych w porównaniu z młodszą grupą (Ke i wsp. 2018).

1.3.4.3 Płeć

Ekspresja wątrobowego FMO3 jest zależna od płci – u kobiet zaobserwowano zarówno większe ilości mRNA jak i samego białka (Meijuan i wsp. 2017). Niemniej jednak w niektórych badaniach obserwowano zależność stężenia TMAO w osoczu od płci (Obeid i wsp. 2017, Manor i wsp. 2018, Barrea i wsp. 2019), podczas gdy inne badania takich różnic nie wykazują (Wang i wsp. 2014, Rohrmann i wsp. 2016).

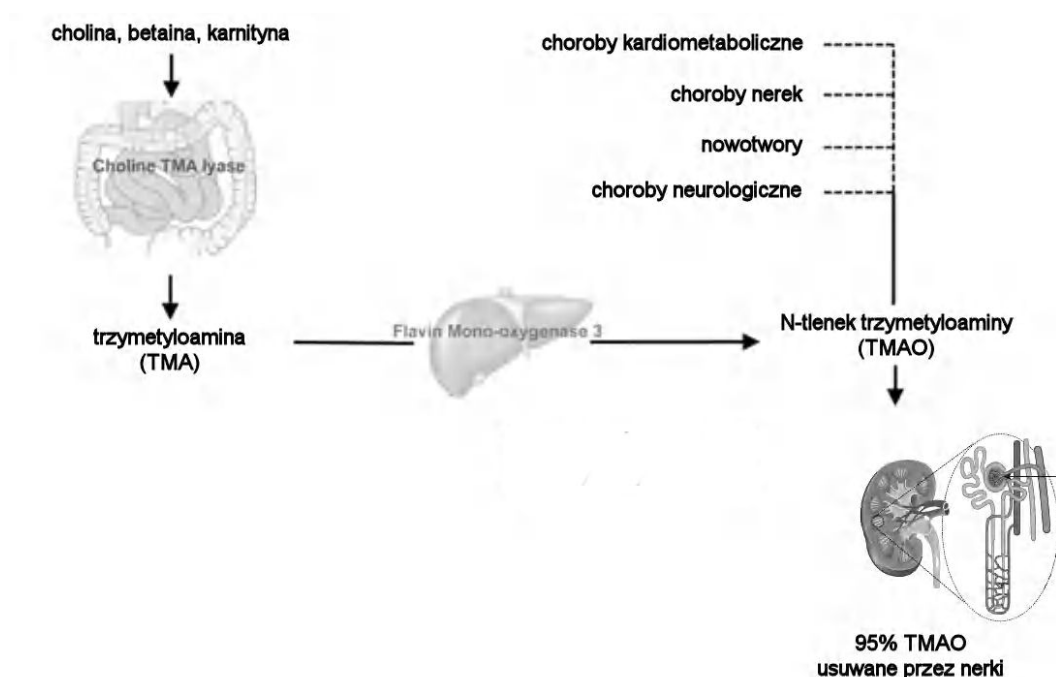
1.3.4.4 Dieta

Wzrost spożycia produktów zawierających TMAO, takich jak ryby i owoce morza, oraz prekursorów TMAO, takich jak jaja czy wołowina powoduje wzrost poziomu TMAO we krwi i moczu (Cho i wsp. 2017). Jednak nie wszystkie badania wykazywały związek między dietą a poziomem TMAO (Kühn i wsp. 2017). Zwyczajowe spożywanie czerwonego, przetworzonego lub białego mięsa nie ma wpływu na stężenie TMAO w osoczu populacji osób dorosłych żyjących w Bawarii (Rohrmann i wsp. 2016). Ponadto, porównując wegetarian i osoby odżywiające się bez żadnych wyłączeń nie wykazano różnic w TMAO osocza (Lin, 2019). Co więcej spożywanie sześciu jajek tygodniowo przez 8 tygodni nie miało wpływu na TMAO w osoczu na czczo (West i wsp. 2014).

1.3.4.5 Filtracja nerkowa

W warunkach fizjologicznych, krążący TMAO jest filtrowane przez nerki i usuwane wraz z moczem (Wranne, 1956). Wysoki wskaźnik klirensu nerkowego

TMAO wskazuje, że oprócz przesączania kłębuszkowego, co najmniej 50% jego nerkowego wydalania może zachodzić przez wydzielanie kanalikowe. Poziom krążącego TMAO rośnie wraz z pogorszeniem funkcji nerek (Kaysen i wsp. 2015, Mueller i wsp. 2015, Missailidis i wsp. 2016). U pacjentów z przewlekłą niewydolnością nerek (CKD) hemodializa lub przeszczep nerki powoduje znaczne zmniejszenie stężenia TMAO (Stubbs i wsp. 2016). Podczas jednej sesji hemodializy następuje znaczne obniżenie (około 60%) stężenia TMA i TMAO w osoczu (Stubbs i wsp. 2016).

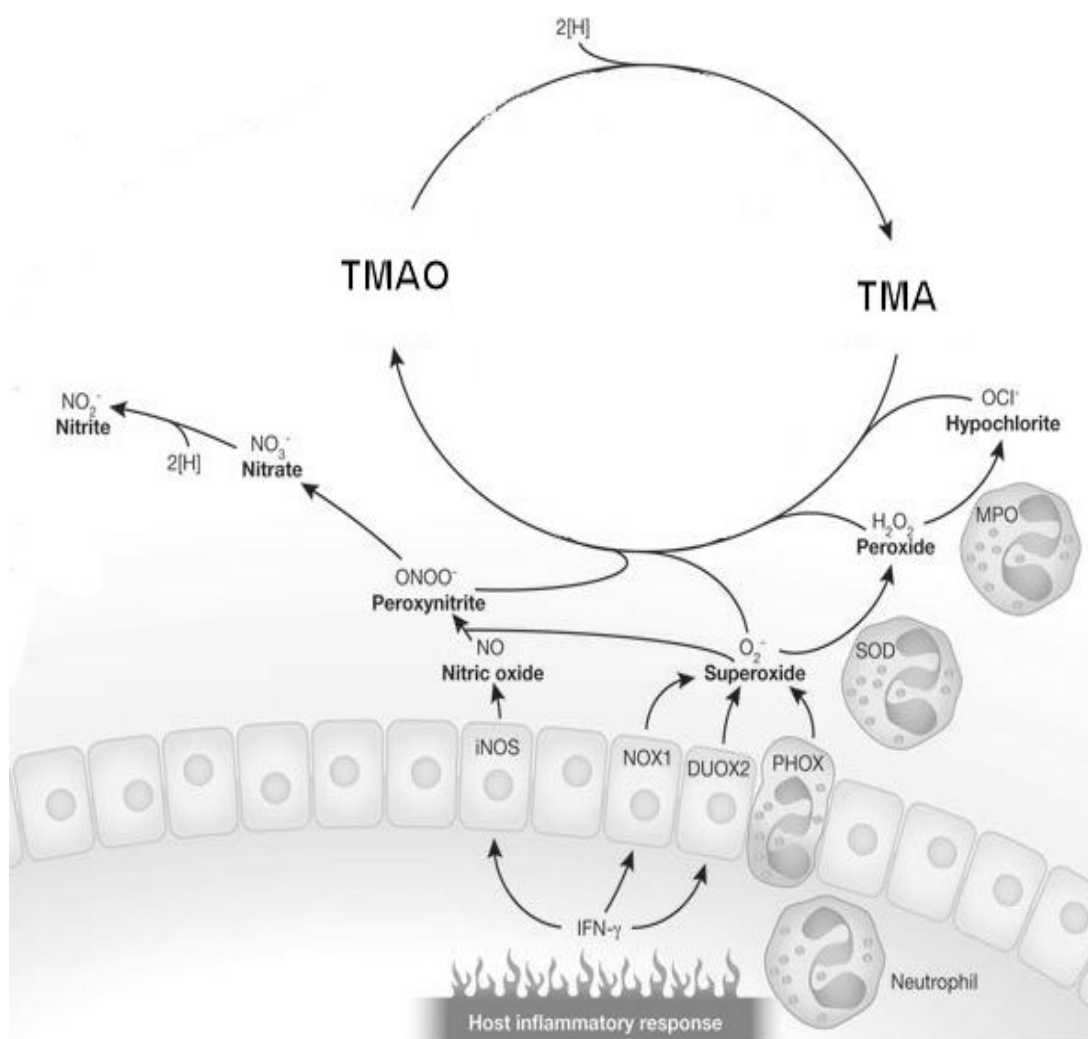


Ryc. 2. Uproszczony schemat metabolizmu TMA; potencjalne działanie TMAO (Chhibber-Goel i wsp. 2017; zmodyfikowane).

1.3.4.6 Reakcje wolnorodnikowe

Wykazano również, że źródłem TMAO może być reakcja TMA z anionem ponadtlenkowym, nadtlenkiem wodoru, kwasem podchlorawym czy

nadtlenoazotynem, eliminując w ten sposób reaktywne formy tlenu (ROS) i azotu (RNS) (ryc. 3).



Ryc. 3. Uproszczony schemat przemiany TMA w TMAO przy udziale ROS i RNS (Winter i wsp. 2013; zmodyfikowane).

Ostatnie badania sugerują, że TMAO ma związek z różnymi stanami patologicznymi (ryc. 2).

1.4 Choroby sercowo-naczyniowe (ChSN)

Wraz z rozwojem cywilizacji doszło do zwiększonej zachorowalności na choroby układu krążenia. Do grupy chorób sercowo-naczyniowych zalicza się wiele

różnych jednostek chorobowych. Wiele z nich jest związanych z procesem miażdżycowym w naczyniach krwionośnych.

1.4.1 Patogeneza miażdżycy

Postępujący proces miażdżycowy prowadzi do gromadzenia się w błonie wewnętrznej lipidów, kolagenu i złogów wapnia. Z nagromadzonego materiału powstaje blaszka miażdżycowa.

1.4.1.1 Profil lipidowy

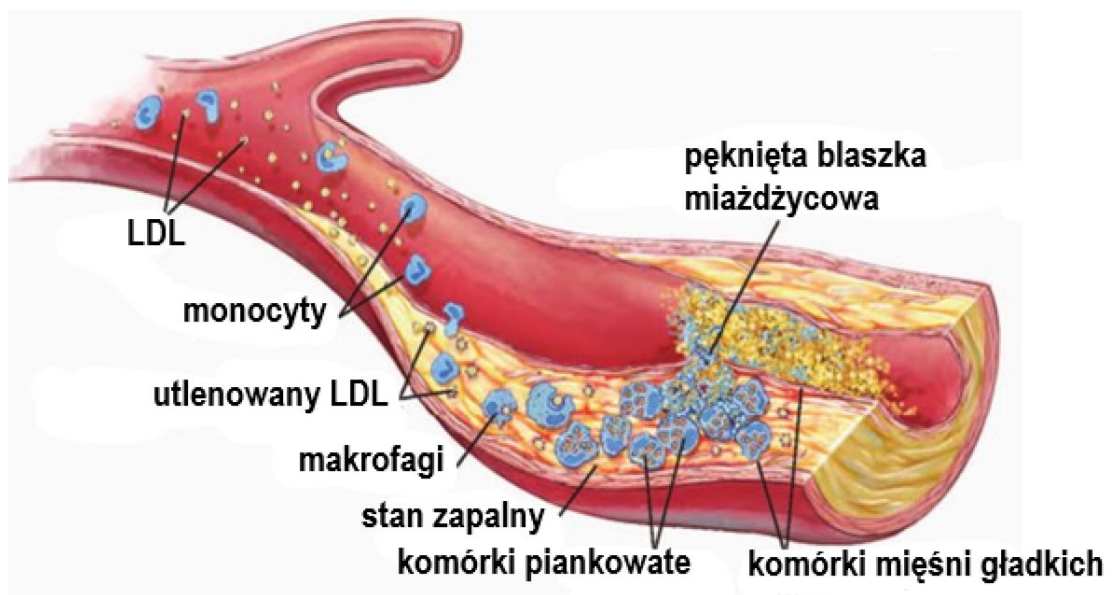
Wczesne zmiany miażdżycowe charakteryzują się nagromadzeniem komórek piankowych pochodzących głównie z makrofagów obciążonych cholesterolem (Yousuf i wsp. 2013). W związku z tym zainteresowania kliniczne skupiły się na wskaźnikach krążących lipidów, takich jak: TG, TCh, HDL, LDL, TCh/HDL (Daniels i wsp. 2009).

1.4.1.2 Stan zapalny

Wiadomo także, że kluczową rolę w występowaniu i rozwoju zmian miażdżycowych odgrywa stan zapalny. Komórki krwi (leukocyty i płytki krwi) indukują wydzielanie cytokin prozapalnych (Patzelt i Langer, 2012; Pamukcu i wsp. 2010). Zwiększone poziomy markerów zapalnych w osoczu, w tym białka C-reaktywnego (CRP), interleukiny-6 (IL-6), czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α) i selektyny L (SELL) są uważane za markery aktywacji immunologicznej leukocytów i makrofagów, podczas gdy selektyna P (SELP) jest markerem aktywacji płytek krwi (Blann i wsp. 2003). Krwiopochodne mediatory zapalne powodują uszkodzenie śródbłónka tętniczego. Częsteczki adhezyjne, takie jak częsteczka adhezji komórek naczyniowych-1 (VCAM-1) i częsteczka adhezji międzykomórkowej-1 (ICAM-1), są wykorzystywane jako markery dysfunkcji śródbłónka (Hwang i wsp. 1997).

1.4.1.3 Stres oksydacyjny

Istnieją dwie koncepcje przedstawiające udział stresu oksydacyjnego w powstawaniu miażdżycy (Stocker i Keaney, 2004). Pierwsza jako przyczynę wskazuje stres oksydacyjny indukowany czynnikami sercowo-naczyniowymi. Druga koncepcja przedstawia czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego jako przyczynę powstawania procesu zapalnego, wywołującego stres oksydacyjny. Koncepcja ta zakłada również, że pod wpływem procesu zapalnego następuje produkcja wolnych rodników, które przyczyniają się do remodelingu tkankowego (Stocker i Keaney, 2004). Niezależnie od tego, która koncepcja jest poprawna, stres oksydacyjny jest związany z miażdżycą, a w połączeniu ze stanem zapalnym odgrywa ważną rolę nie tylko w inicjowaniu miażdżycy, ale także w zwiększaniu jej nasilenia, prowadząc do destabilizacji blaszek miażdżycowych (Förstermann i wsp. 2017, Teng i wsp. 2017, Violi i wsp. 2017).



Ryc. 4. Czynniki przyczyniające się do rozwoju miażdżycy indukowane stresem oksydacyjnym (Runge i wsp. 2010, zmodyfikowany).

Dobrze zdefiniowanym mediatorem dysfunkcji śródbłónka jest utleniony LDL (ox-LDL), który prowadzi do powstawania „komórek piankowatych” (Berliner i Heinecke 1996, Kita i wsp. 2001). Głównym utleniaczem odpowiedzialnym za oksydację LDL jest kwas podchlorawy wytwarzany przez mieloperoksydazę (MPO) (Podrez i wsp. 200, Malle i wsp. 2006, Abdo i wsp. 2017). Enzym ten uwalniany jest przez neutrofile i monocyty podczas aktywacji komórek zapalnych. MPO inicjuje oraz podtrzymuje ostry i przewlekły stan zapalny prowadząc do uszkodzenia tkanek w wyniku nasilania stresu oksydacyjnego (Malle i wsp. 2006, Winterbourn i wsp. 2000, Lau i Baldus, 2006). MPO jest uznawane za marker łączący proces zapalny ze stresem oksydacyjnym, jak również za niezależny od innych parametrów czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego (Brennan i wsp. 2003, Tang i wsp. 2006, Tang i wsp. 2009, Sinning i wsp. 2008).

Ostatnie badania wykazały, że wyższy poziom MPO w surowicy jest rozpoznawany jako czynnik ryzyka rozwoju choroby wieńcowej (Teng i wsp. 2017).

1.4.1.4 TMAO

W 2011 Wang i wsp. zasugerowali, że TMAO może uczestniczyć w rozwoju miażdżycy – poprzez zmniejszenie odwrotnego transportu cholesterolu TMAO podnosi wychwyt cholesterolu w ścianie naczynia, co prowadzi do tworzenia komórek piankowatych makrofagów i rozwoju zmian miażdżycowych (Wang i wsp. 2011). Od tego czasu liczne badania przedstawiały związek między wyższym ryzykiem zaburzeń sercowo-naczyniowych a podwyższonym poziomem TMAO w osoczu. Ostatnie meta-analizy wykazały, że u pacjentów z wysokim stężeniem TMAO w osoczu częstość występowania poważnych niepożądanych zaburzeń sercowo-naczyniowych jest znacznie wyższa niż u pacjentów z niskim stężeniem TMAO (Heianza i wsp. 2017), a na każde 10 μ M przyrostu TMAO śmiertelność wzrasta o 7,6% (Schiattarella i wsp. 2017).

1.4.2 Prewencja ChSN

1.4.2.1 Aktywność fizyczna

Towarzystwa naukowe zalecają wykonywanie regularnych ćwiczeń w celu osiągnięcia sprawności fizycznej, pożądanej masy ciała i zdrowia układu sercowo-oddechowego. Regularne ćwiczenia sprzyjają ochronie przed miażdżycą poprzez zmniejszenie lub zapobieganie stresowi oksydacyjnemu i redukcji stanu zapalnego (Szostak i Laurant, 2011). Regularne ćwiczenia prowadzą do obniżenia aktywności oksydazy NADPH i produkcji anionorodnika ponadtlenkowego. Zmniejszenie generacji ROS zachowuje biodostępność tlenu azotu co w efekcie działa przeciwmiażdżycowo (Szostak i Laurant, 2011). Skurcz mięśni szkieletowych uwalnia cytokiny przeciwzapalne, takie jak interleukina-6 (IL-6) (Szostak i Laurant, 2011). IL-6 hamuje wytwarzanie TNF- α (ang. tumor necrosis factor - α) w tkance tłuszczowej i makrofagach. Obniżenie poziomu krążącego TNF- α może również pośredniczyć w przeciwmiażdżycowym działaniu aktywności fizycznej (Szostak i Laurant, 2011).

Jako najkorzystniejszy rodzaj wysiłku sugerowany jest trening tlenowy, wytrzymałościowy. Jednak w pracy przeglądowej (Strasser i Schobersberger, 2011) stwierdzono, że trening oporowy jest co najmniej tak samo skuteczny jak trening wytrzymałości tlenowej w zmniejszaniu głównych czynników ryzyka chorób sercowo-naczyniowych. Główne korzyści treningu oporowego, obejmowały zmianę składu ciała, mobilizację trzewnej i podskórnej tkanki tłuszczowej, obniżenie spoczynkowego ciśnienia krwi, poprawę profilu lipidowego krwi oraz lepszą kontrolę glikemii. Przy czym należy podkreślić, że wysiłek fizyczny, aby był skutecznym elementem profilaktyki chorób sercowo-naczyniowych, musi być systematyczny.

1.4.2.2 Dieta

Składniki odżywcze, takie jak kwasy tłuszczowe omega-3, niektóre witaminy i polifenole zmniejszają lub łagodzą pojawianie się zmian miażdżycowych. Aktywność tych związków jest związana między innymi ze zmniejszeniem odpowiedzi zapalnej, migracji leukocytów, aktywacji cząsteczek adhezyjnych oraz właściwościami antyoksydacyjnymi przyczyniającymi się do redukcji utleniania LDL (Torres i wsp. 2015).

Naukowy Komitet Doradczy Amerykańskiego Towarzystwa Kardiologicznego (Scientific Advisory Committee of the American Heart Association) stwierdził, że imponujący wpływ na ChSN ma dieta śródziemnomorska (Martínez-González i wsp. 2019). Taki styl odżywiania opiera się na spożyciu dużej ilości warzyw i owoców, produktów pełnoziarnistych, oleju z pierwszego tłoczenia oraz orzechów. Umiarkowane spożycie dotyczy ryb i drobiu, natomiast małe nabrała, czerwonego mięsa oraz słodczy.

Zdrowe właściwości diety śródziemnomorskiej przypisuje się głównie addytywnemu lub synergistycznemu oddziaływaniu składników, takich jak kwas oleinowy (ω -9) i kwasy tłuszczowe α -linolenowe (ω -3), przeciwutleniacze i polifenole, które, jak wykazano, wywierają wpływ szczególnie na ciśnienie krwi, aktywność krzepnięcia i funkcje śródbłonna (Torres i wsp. 2015).

Ponieważ diety bogate w czerwone mięso są silnie związane z chorobami serca, zasugerowano, że istotnym czynnikiem sprawczym może być powstawanie TMAO z karnityny (Koeth i wsp. 2013). Zastanawiające jest jednak, że istotnym źródłem TMAO są ryby (Zhang i wsp. 1999), a spożycie ryb wiąże się z pozytywnym wpływem na układ sercowo-naczyniowy (Tong i wsp. 2019). Dlatego jest to dosyć kontrowersyjna kwestia w tym temacie (Landfald i wsp. 2017).

1.4.3 Interwencja dietetyczno-treningowa a TMAO

Badania sprawdzające efekty interwencji związanych ze stylem życia a poziomem TMAO są znikome. Troseid i wsp. (2016) stwierdzili, że trzy miesiące modyfikacji diety w połączeniu z zaleceniami dotyczącymi aktywności fizycznej nie miały wpływu na poziomy TMAO u 34 otyłych dorosłych przygotowujących się do operacji bariatrycznej (Troseid i wsp. 2016). Podobnie w innej obserwacji nie stwierdzono zmian w poziomie TMAO u 220 dorosłych po dziewięciu miesiącach interwencji dietetycznej w połączeniu z zaleceniem aktywności fizycznej (Randrianarisoa i wsp. 2016). Trudno jest interpretować wpływ efektów aktywności fizycznej na poziom TMAO na podstawie tych badań, ponieważ uczestnicy otrzymali jedynie zalecenia dotyczące zwiększenia poziomu aktywności fizycznej.

W badaniu Erickson i wsp. (2019), grupę osób starszych, otyłych, opornych na insulinę poddano 12 tygodniowej kontrolowanej interwencji treningowej w połączeniu z modyfikacją dietetyczną. Trening, oparty o wysiłek ciągły, 50-60 minut dziennie, na

bieżni mechanicznej lub ergometrze rowerowym, 5 razy w tygodniu, przy zachowaniu indywidualnych obciążeń. Dodatkowo grupa została podzielona na osoby spożywające dietę równoważną dziennemu zapotrzebowaniu (eukaloryczną) lub o obniżonej ilości kalorii -500 (hipokaloryczną). Ograniczenie spożycia kalorii w połączeniu z ćwiczeniami wpływa na zmniejszenie poziomu TMAO, podczas gdy dieta eukaloryczna w połączeniu z ćwiczeniami sprzyjała niewielkiemu wzrostowi. Mimo to, w grupie eukalorycznej zaobserwowano zmniejszenie masy ciała, otyłości brzusznej, poziomu trójglicerydów i cholesterolu, a także poprawę obwodowej insulinowrażliwości. Może to sugerować, iż indukowane dietą ograniczenie kalorii połączone z ćwiczeniami może w większym stopniu wpływać na zmiany poziomu TMAO, w porównaniu z dietą eukaloryczną i aktywnością fizyczną.

1.5 L-karnityna

L-karnityna jest witamino-podobnym związkiem o budowie zbliżonej do aminokwasów, który odgrywa ważną rolę w wspomaganiu czynności metabolicznych organizmu. Główną funkcją L-karnityny jest transport kwasów tłuszczowych do mitochondriów w celu przetworzenia ich w energię. (Wong i wsp.2016). Ponadto, L-karnityna może wpływać na masę mięśni szkieletowych poprzez spowalnianie procesu degradacji białek. W badaniach na modelu zwierzęcym wykazano, że suplementacja karnityną przyczynia się do zwiększenia stężenia insulinopodobnego czynnika wzrostu-1 (IGF-1) (Keller i wsp. 2013, Wong i wsp. 2016), doprowadzając do aktywacji szlaku sygnałowego i hamowania procesu proteolizy. Szczegółowy mechanizm został szerzej omówiony w pracy przeglądowej (Sawicka i wsp. 2020).

1.5.1 Działanie antyoksydacyjne i przeciwzapalne

Wiele badań *in vitro* i *in vivo* wykazało, że L-karnityna posiada właściwości antyoksydacyjne (Yu i wsp. 2011, Zhao i wsp. 2017, Ribas i wsp. 2014, Lee i wsp. 2014). Skutecznie usuwa ROS i RNS chroniąc przed peroksydacją lipidów, oraz przed utlenianiem grup tiolowych w związkach niskocząsteczkowych (glutation, cysteina i homocysteina) w ludzkim osoczu (Kolodziejczyk i wsp. 2011). Oprócz potencjału antyoksydacyjnego, L-karnityna charakteryzuje się właściwościami

przeciwzapalnymi (Winter i wsp. 1995). Meta-analiza badań na ludziach wykazuje potencjalne korzystne działanie L-karnityny obniżające poziom krążącego CRP (Sahebkar, 2015).

1.5.2 Zastosowanie L-karnityny w ChSN

Właściwości antyoksydacyjne i przeciwzapalne L-karnityny sugerują, że może ona poprawiać funkcję śródbłonna przeciwdziałać agregacji płytek krwi (Mohammadi i wsp. 2016). Ponadto, udział L-karnityny w metabolizmie energetycznym mięśnia sercowego, przyczynił się do przeprowadzenia wielu badań wśród pacjentów z ciężkimi zaburzeniami sercowo-naczyniowymi, takimi jak choroba wieńcowa, przewlekła niewydolność serca i choroba naczyń obwodowych (Ferrari i wsp. 2004, DiNicolantonio i wsp. 2013, Shang i wsp. 2014, Song i wsp. 2017, Wang i wsp. 2018). Meta-analiza obejmująca 13 kontrolowanych badań wykazała, że zastosowanie L-karnityny u pacjentów z ostrym zawałem mięśnia sercowego zmniejsza śmiertelność, arytmie komorową i objawy duszniczy bolesnej w porównaniu do placebo odpowiednio o 27%, 65% i 40% (DiNicolantonio i wsp. 2013). Z kolei meta-analiza Song i wsp. (2017) zestawiająca badania na pacjentach z przewlekłą niewydolnością serca pokazuje, że zastosowanie L-karnityny nie wpływa na redukcję śmiertelności. Niemniej jednak, autorzy zaobserwowali poprawę funkcji i budowy lewej komory, oraz niektórych wskaźników niewydolności serca po suplementacji L-karnityną (Song i wsp. 2017). Na uwagę zasługuje fakt, iż w jednym z badań u pacjentów po ostrym zawale mięśnia sercowego L-karnityna podawana była w ilości 6g/dziennie przez 12 miesięcy, łagodząc skutki ostrego zawału mięśnia sercowego (Iliceto i wsp. 1995).

Ponieważ TMAO sugerowany jest jako istotny czynnik w rozwoju i progresji stanów patologicznych (Wang i wsp. 2011, Suzuki i wsp. 2016, Gruppen i wsp. 2017), a L-karnityna wciąż jest stosowana jako suplement diety (Baltazar-Martins i wsp. 2019, Wardenaar i wsp. 2017), należy wyjaśnić jak długotrwałe stosowanie L-karnityny czy zwiększona aktywność fizyczna wpływa na stężenie TMAO w osoczu wśród zdrowych ludzi, oraz czy w warunkach patologicznych, takich jak stabilna choroba wieńcowa (SchW) oraz ostry zespół wieńcowy (OZW) stężenie TMAO w osoczu jest różne w porównaniu do osób zdrowych.

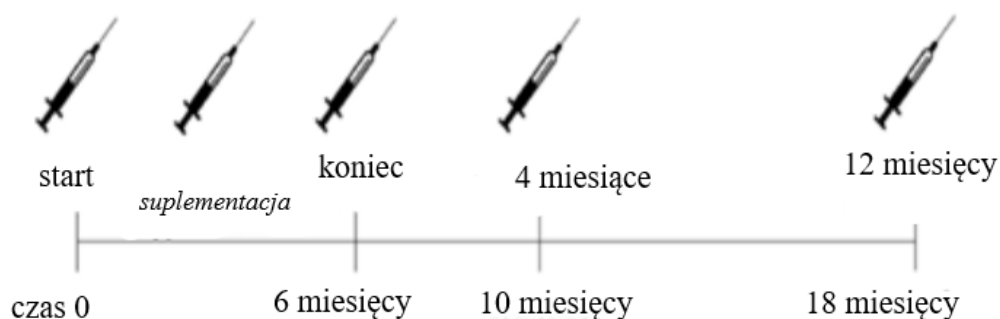
2. Cele:

1. Określenie czy stężenie TMAO w osoczu krwi jest modyfikowane podczas długotrwałej suplementacji karnityną i po jej zaprzestaniu, oraz czy ma to wpływ na wybrane wskaźniki stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego u zdrowych ludzi.
2. Ustalenie czy 24-tygodniowy trening oporowy zmienia stężenie TMAO w osoczu, oraz w jakim stopniu włączenie suplementacji karnityną do procesu treningowego wpłynie na zmianę stężenia TMAO.
3. Określenie czy stężenie TMAO w osoczu u osób z chorobą sercowo-naczyniową różni się od stężenia tego związku u osób zdrowych.

3. Materiały i metody

Przed rozpoczęciem badań wszyscy chętni zostali zapoznani z procedurą badawczą oraz wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w badaniach. Oznaczenia wykonane zostały we krwi ludzkiej, kobiet, w przedziale wieku 43-91 lat, u których nie zdiagnozowano trimetyloaminurii. Materiał został pobrany w latach 2016-2019.

3.1 Badanie 1



Ryc. 5. Schemat badania nr 1 (badanie 1A – 24 tygodnie suplementacji; badanie 1B – 12 miesięczna kontrola po zakończeniu suplementacji). Strzykawki wskazują terminy, w których pobierana była krew. Szczegóły procedur opisane są poniżej.

3.1.1 Badanie 1A

Protokół badania został zatwierdzony przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym NKBBN / 354-304/2015.

Badana grupa

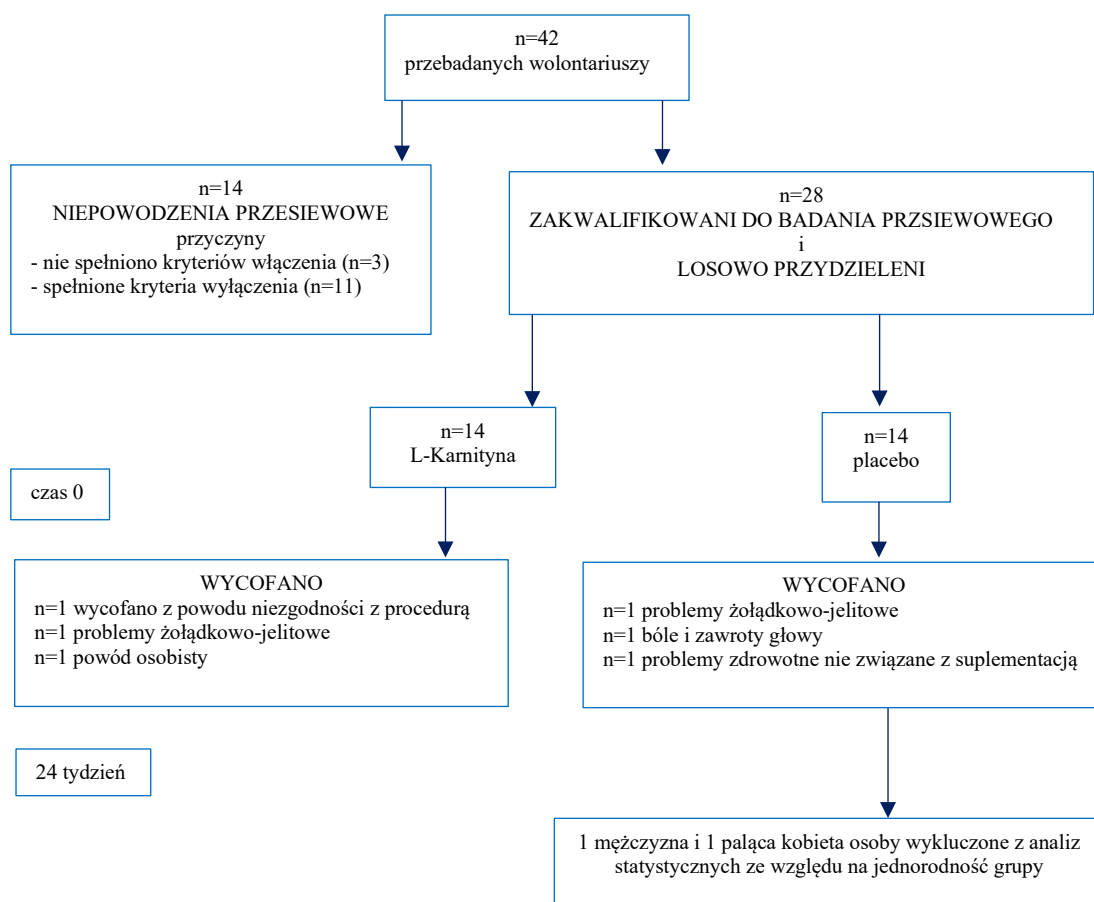
Do badań zrekrutowano zdrowe, niepalące, nie przyjmujące leków obniżających cholesterol, kobiety w wieku od 65 do 70 lat (osoby z ChSN; chorobami wątroby i nerek; zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi, w tym wrzody żołądka, nadżerki; chorobami nerwowo-mięśniowymi; cukrzycą i innymi przewlekłymi ciężkimi chorobami wykluczono z badania w trakcie rekrutacji).

Procedura badania

Uczestnicy badania zostali pierwotnie zrekrutowani do innego badania, którego celem była ocena wpływu suplementacji L-karnityną na funkcję mięśni szkieletowych (Sawicka i wsp. 2018).

Protokół badania został zatwierdzony przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN / 354-304/2015).

Wszyscy badani wyrazili świadomą pisemną zgodę przed rozpoczęciem procedury eksperymentalnej. Protokół wypełniło 20 niepalących, zdrowych, nie będących na diecie wegetariańskiej, aktywnych fizycznie kobiet, w wieku od 65 do 70 lat bez leczenia obniżającego cholesterol. Nastąpił podział na dwie grupy suplementacji L-karnityną ($n = 11$) i placebo ($n = 9$). Uczestniczki podzielono na dwie grupy: suplementowane L-karnityną i placebo. W czasie 24 tygodni badanym podawano dziennie 1500 mg L-winianu L-karnityny lub izoazotowe placebo. Badane poinstruowano, aby suplementy spożywane były po głównym posiłku. Suplementy zostały dostarczone przez firmę Tree Nutrition Ltd. (Gdynia, Polska). Wyniki tych badań zostały wcześniej opublikowane (Samulak i wsp. 2019a, Olek i wsp. 2019).



Ryc. 6. Schemat blokowy interwencji i pobierania próbek w badaniu 1.

Tabela 2. Charakterystyka badanych w badaniu 1.(Średnie $\pm$ odchylenie standardowe)

<i>zmienne</i>	<i>placebo</i>	<i>L-Karnityna</i>
wiek (lata)	66.4 $\pm$ 1.3	67.8 $\pm$ 2.3
wysokość (cm)	162.0 $\pm$ 5.3	159.0 $\pm$ 5.4
BMI (kg/m ²)	26.5 $\pm$ 4.4	27.5 $\pm$ 4.5

Pobieranie próbek krwi

W okresie suplementacji krew pobierana była trzykrotnie: na początku, po 12 i 24 tygodniach suplementacji. Próbkę krwi pobrano z żyły łokciowej, do probówek zawierających wersenian potasowy (EDTA) jako antykoagulant, lub na skrzep. Po odwirowaniu przy 2000 g w 4 °C przez 10 min otrzymano osocze i surowicę. Materiał przechowywany był do analizy w -80 °C.

Oznaczanie biochemiczne

Wolną L-karnitynę i TMAO oznaczano w osoczu metodą UPLC / MS / MS, jak opisano wcześniej (Grinberga i wsp. 2015).

Stężenia VCAM-1, ICAM-1, SELL, SELP, CRP, IL-6, TNF α w surowicy określono testami immunoenzymatycznymi (ELISA) przy użyciu dostępnych na rynku zestawów (IL-6, TNF- α - R&D Systems, Minneapolis, USA; VCAM-1, ICAM-1, SELL, SELP, CRP - Cloud-Clone Corp., Houston, USA; insulina - DRG Instruments GmbH, Marburg, Niemcy).

Stężenie cholesterolu całkowitego (TCh), cholesterolu HDL (HDL), cholesterolu LDL (LDL), trójglicerydów (TG) zostały określone przy użyciu standardowego automatycznego analizatora Cobas6000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy).

Stężenia ox-LDL i MPO w surowicy zostały określone za pomocą metody ELISA przy użyciu dostępnych na rynku zestawów (ox-LDL – Immunodiagnostik AG, Bensheim, Niemcy; MPO - Abnova Corp., Taipei, Tajwan); grupy karbonyłowe białek (PC), spektrofotometrycznie przy użyciu zestawu Protein Carbonyl Colorimetric Assay Kit (Cayman Chemical, Michigan, USA); homocysteina (Hcy), metodą immunochemiluminescencji z użyciem Immulite 2000 XPi (Siemens Healthcare Diagnostics Inc.); i kwas moczowy (UA), przy użyciu analizatora Cobas6000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy).

Aktywność aminotransferazy alaninowej (Alt), a także stężenia nieestryfikowanych kwasów tłuszczowych (NEFA) i glicerolu oznaczono przy użyciu standardowych zestawów (Randox Laboratories Ltd.). Testy przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru Super Aquarius CE9200 (Cecil Instruments Ltd.).

Analiza statystyczna

Obliczenia przeprowadzono za pomocą oprogramowania Statistica 13.1 (Dell Inc., Tulsa, OK, USA). Analiza wariancji (ANOVA) dla powtarzanych pomiarów została przeprowadzona w celu zbadania interakcji między suplementacją a czasem. W przypadku, gdy ANOVA dała znaczący efekt, do porównań post hoc zastosowano test post-hoc Tukey'a dla nierównej liczebności n. Ponadto analizę kontrastów zastosowano do oceny konkretnych, zaplanowanych wcześniej porównań, pomiędzy grupami w danym punkcie czasowym. Za statystycznie istotny uznano poziom prawdopodobieństwa $P < 0,05$. Wszystkie dane wyrażono jako średnią $\pm$ SE (błąd standardowy).

3.1.2 Badanie 1B

Protokół badania został zatwierdzony przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym NKBBN / 354-304/2015 i NKBBN/354-201/2017.

Badana grupa

Pomiary przeprowadzono na osobach, które ukończyły badanie oceniające wpływ suplementacji L-karnityną na pracę mięśni szkieletowych (Samulak i wsp. 2019b). Z powodów osobistych pomiary nie zostały przeprowadzone u dwóch osób. Dlatego w analizach statystycznych brano pod uwagę wyniki grupy 18 kobiet w wieku 65-70 lat, w podziale na dwie podgrupy: suplementacja L-karnityną ($n = 10$) i placebo ($n = 8$). Wyniki tych badań zostały wcześniej opublikowane (Samulak i wsp. 2019b).

Procedura badania

Osoby poddane suplementacji opisanej w badaniu 1A odwiedziły laboratorium 4 i 12 miesięcy po zaprzestaniu suplementacji. Protokół badania został zatwierdzony przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN / 354-304 / 2015 oraz NKBBN / 354-201 / 2017).

Pobieranie próbek krwi

Próbki krwi pobrano z żyły łokciowej. Liczbę białych krwinek (WBC) określano w pełnej krwi za pomocą automatycznego analizatora hematologicznego (Sysmex XT 2000, Global Medical Instrumentation, Inc; Mundelein, IL, USA). Surowicę i osocze (pobrane na EDTA) otrzymano przez odwirowanie przy 2000 g w 4°C przez 10 min. Materiał do analizy przechowywano w temperaturze - 80°C.

Oznaczanie biochemiczne

TMAO w osoczu określono metodą UPLC / MS / MS, w Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN (Warszawa) jak opisano wcześniej (Jaworska i wsp. 2017). Stężenie TCh, HDL, LDL i TG oznaczono przy użyciu Cobas6000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy).

Zwyczajowe spożycia ryb

Do oceny częstotliwości spożycia ryb, została skonstruowana ankieta, na podstawie wcześniej zastosowanej metody (Kasielski i wsp. 2016). Ankieta przedstawia częstotliwości spożywania rodzajów ryb i owoców morza:

F0 - nigdy / sporadycznie,

F1 - 1–2 razy w miesiącu,

F2 - raz w tygodniu,

F3 - 2–5 razy w tygodniu,

F4 - codziennie.

Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.1 (Dell Inc., Tulsa, OK, USA). Uzyskane wyniki poddano analizie ANOVA dla powtarzanych pomiarów z porównaniami post hoc Tukey'a dla nierównej liczebności n. Poziom prawdopodobieństwa $p < 0.05$ uznano za istotny statystycznie. Wszystkie dane wyrażono jako średnią $\pm$ SE.

3.2 Badanie 2

Protokół badania został zatwierdzony przez Niezależną Komisję Bioetyczną ds. Badań Naukowych przy Gdańskim Uniwersytecie Medycznym (NKBBN / 354-201 / 2017).

Badana grupa

Do badań zrekrutowano zdrowe, niepalące, nie przyjmujące leków obniżających cholesterol, kobiety w wieku od 65 do 70 lat (z rekrutacji wyłączono osoby z ChSN; chorobami wątroby i nerek; zaburzeniami żołądkowo-jelitowymi, w tym wrzody żołądki nadżerki; chorobami nerwowo-mięśniowymi; cukrzycą i innymi przewlekłymi ciężkimi chorobami oraz z przeciwwskazaniami do wykonywania badania rezonansu magnetycznego). Ponadto badane przedstawiły zaświadczenia lekarskie o braku przeciwwskazań do regularnego wysiłku fizycznego.

Procedura badania

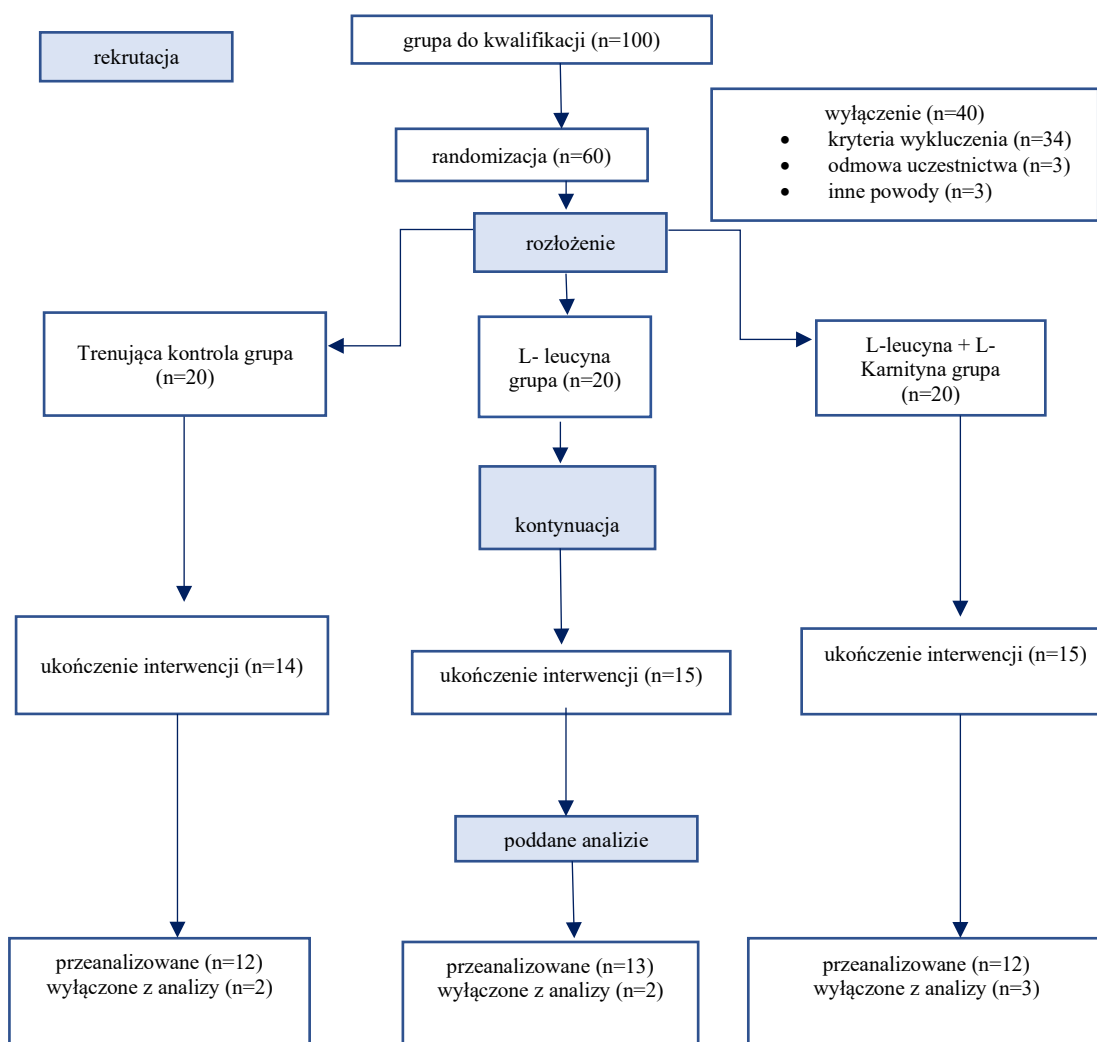
Uczestniczki podzielono na trzy grupy (tab. 3).

Tabela 3. Charakterystyka badanych w badaniu 2 z podziałem na podgrupy (średnia $\pm$ SEM).

	<i>trenująca kontrola</i>	<i>L-leucyna</i>	<i>L-leucyna + L- karnityna</i>
wiek (lata)	67.1 $\pm$ 0.7	67.8 $\pm$ 0.7	67.8 $\pm$ 0.7
masa ciała (kg)	72.8 $\pm$ 2.8	70.2 $\pm$ 2.8	69.3 $\pm$ 2.8
wysokość (cm)	162.0 $\pm$ 1.0	159.0 $\pm$ 1.0	158.0 $\pm$ 1.0
BMI (kg/m ²)	27.9 $\pm$ 1.0	27.7 $\pm$ 1.0	27.5 $\pm$ 1.0
tkanka tłuszczowa (%)	36.5 $\pm$ 2.0	36.3 $\pm$ 2.0	36.4 $\pm$ 2.0

Przez 24 tygodnie wszystkie badane uczestniczyły dwa razy w tygodniu w programie treningu oporowego zgodnie z protokołem opisanym wcześniej (Bell

i wsp. 2017). Grupa trenująca kontrolna uczestniczyła w protokole treningowym bez żadnej suplementacji, podczas gdy dwie inne grupy otrzymywały albo 4000 mg L-leucyny dziennie albo 1000 mg L-winianu L-karnityny w połączeniu z 3000 mg L-leucyny dziennie przez cały czas trwania badania. okres (ryc.6).



Ryc. 7. Schemat blokowy interwencji i pobierania próbek w badaniu 2

Wszystkie grupy przeszły ten sam protokół treningowy. Treningi odbywały się w grupach do 12 osób, dwa razy w tygodniu, w poniedziałki i środy lub we wtorki i czwartki na komercyjnej siłowni. Każde zajęcia odbywały się pod kontrolą. W ciągu 24 tygodni badani planowo powinni uczestniczyć w 48 jednostkach treningowych po 45 - 60 min. Do analizy zostały włączone osoby, które uczestniczyły w minimum 80% zajęć. Sesje treningowe rozpoczynano od 10-minutowej rozgrzewki na bieżni (marsz),

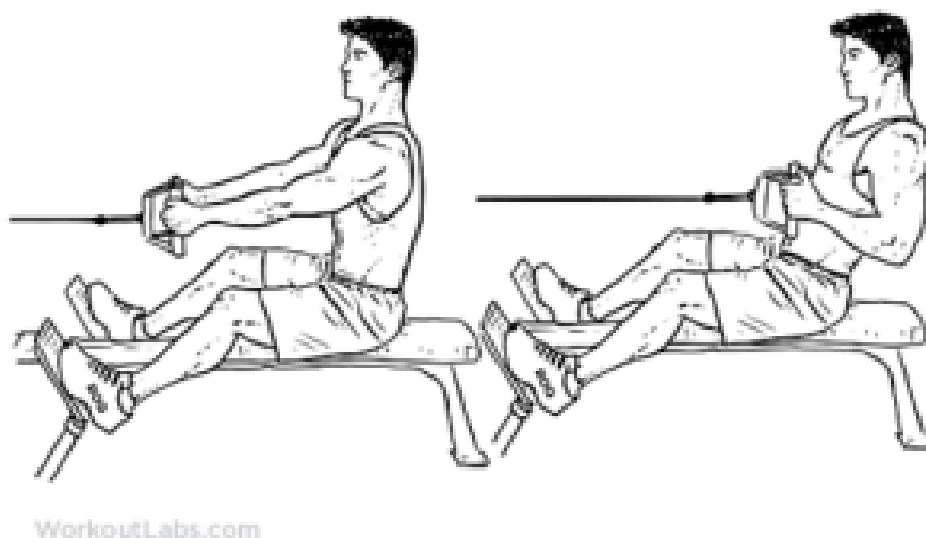
a następnie uczestnicy wykonywali 3 zestawy po 4 ćwiczenia: wypychanie ciężaru na suwnicy (ryc.8), wyprost nóg z obciążeniem (ryc.9), przyciąganie drążka wyciągu dolnego w siadzie (ryc.10), ściąganie drążka wyciągu górnego z szerokim uchwytem (ryc.11), wyciskanie sprzed klatki piersiowej siedząc (ryc.12), wyciskanie nad głowę siedząc (ryc.13).



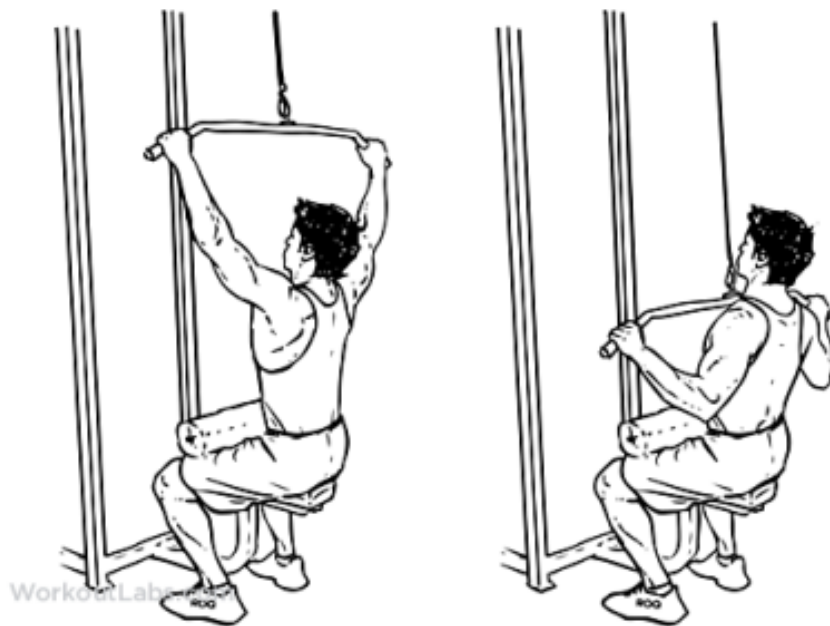
Ryc. 8. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „wypychanie ciężaru na suwnicy”.



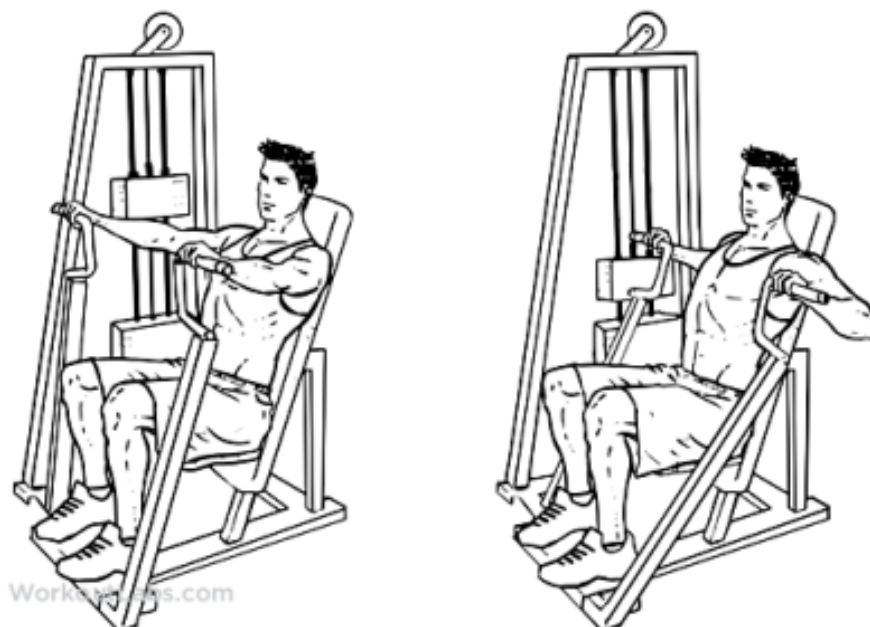
Ryc. 9. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „wyprost nóg z obciążeniem”.



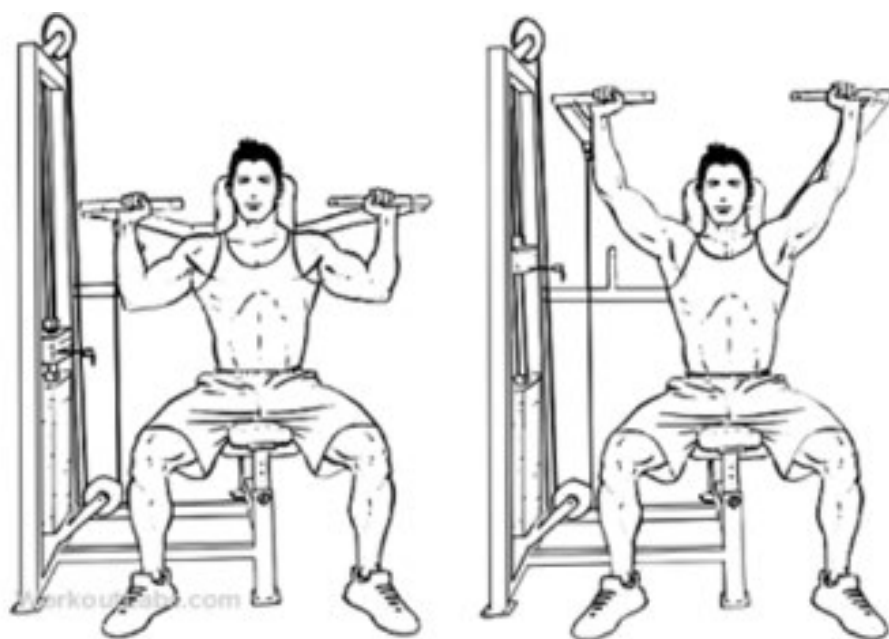
Ryc. 10. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „przyciąganie drążka wyciągu dolnego w siadzie”.



Ryc. 11. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „ściągnięcie drążka wyciągu górnego z szerokim uchwytem”.



Ryc. 12. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „wyciskanie sprzed klatki piersiowej siedząc”.



Ryc. 13. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „wyciskanie nad głowę siedząc”.

Wypychanie ciężaru na suwnicy i wyprost nóg z obciążeniem były przeprowadzane na każdej sesji treningowej, a wyciskanie sprzed klatki piersiowej siedząc i przyciąganie drążka wyciągu dolnego w siadzie tylko w poniedziałek / wtorek, podczas gdy wyciskanie nad głowę siedząc i ściąganie drążka wyciągu górnego z szerokim uchwytem tylko w środę / czwartek. Każda sesja kończyła się 10 minutowym rozluźnieniem na ergometrze rowerowym. Przez pierwsze dwa tygodnie uczestnicy wykonywali ćwiczenia z obciążeniem 65% jednego maksymalnego powtórzenia (1RM), każde ćwiczenie 10-12 powtórzeń w 3 seriach. Po dwóch tygodniach obciążenie pracą zwiększono do 80% 1RM, każde ćwiczenie 6-8 powtórzeń w 3 seriach. Obciążenie treningowe było indywidualnie dostosowane i modyfikowane w trakcie realizacji programu treningowego. Program ćwiczeń był zgodny z wcześniej opisanym protokołem (Bell i wsp. 2017).

Pobieranie próbek krwi

Próbki krwi na czczo pobierano z żyły łokciowej przed badaniem (tydzień 0), po 12 i 24 tygodniach suplementacji. Liczbę białych krwinek (WBC) określano

w pełnej krwi za pomocą automatycznego analizatora hematologicznego (Sysmex XT 2000, Global Medical Instrumentation, Inc; Mundelein, IL, USA). Surowicę i osocze (pobrane na EDTA) otrzymano przez odwirowanie przy 2000 g w 4°C przez 10 min. Materiał do analizy przechowywano w temperaturze - 80°C.

Oznaczanie biochemiczne

TMAO, asymetryczna dimetyloarginina (ADMA), symetryczna dimetyloarginina (SDMA), w osoczu, argininę, ornitynę, cytrulinę i prolinę oznaczono metodą UPLC / MS / MS w Laboratorium Spektrometrii Mas Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN (Warszawa). Oprzyrządowanie składało się z ultrasprawnego chromatografu cieczowego Waters Acquity połączonego ze spektrometrem masowym z potrójnym kwadropolem Waters TQ-S. Rozdział chromatograficzny prowadzono stosując kolumnę Waters HILIC (1,7 μ m, 2,1 mm x 50 mm). Faza ruchoma A była wodą Mili-Q z dodatkiem 1ml 25% NH₄OH na 1000ml wody, a fazą ruchomą B był 1ml kwasu mrówkowego w 1000ml acetonitrylu. Spektrometr mas pracował w trybie monitorowania wielu reakcji (MRM) - dodatnia jonizacja przez elektrozpylanie (ESI+). Dla wszystkich analizowanych związków zoptymalizowane ustawienia spektrometru mas były następujące: napięcie kapilary 108 = 2,5kV, temperatura desolwatacji = 380°C, przepływ gazu desolwatacyjnego = 300 l / h, przepływ gazu stożkowego = 150 l / h, ciśnienie gazu nebulizatora = 7,0 bar, temperatura źródła = 150 ° C. Stężenia CRP, IL-6, TNF- α w surowicy określono metodą enzymatycznego testu immunologicznego przy użyciu dostępnych w handlu zestawów (IL-6, TNF- α - R&D Systems, Minneapolis, USA; CRP - DRG Instruments GmbH, Marburg, Niemcy). Stężenie TCh, HDL i TG określono za pomocą standardowego automatycznego analizatora Cobas6000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy). Wzór Friedewalda został wykorzystany do obliczenia poziomów cholesterolu lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) przy użyciu cholesterolu TCh, TG i HDL.

Analiza statystyczna

Wszystkie obliczenia wykonano przy użyciu oprogramowania Statistica 13.1 (Dell Inc., Tulsa, OK, USA). Normalność rozkładu została ustalona testem Shapiro-Wilka. W danych o rozkładzie normalnym wykonano analizę ANOVA, natomiast

w przypadku braku normalności rozkładu test Kruskala-Wallisa. W przypadku zaobserwowania znaczącego efektu zastosowano test wielokrotnych porównań Dunna. Za statystycznie istotny uznano poziom prawdopodobieństwa $p < 0,05$. Dane wyrażono jako średnią $\pm$ SE (lub jako mediana przy braku normalności rozkładu).

3.3 Badanie 3

Badanie zostało zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Gdańsku (KB-27/16 i KB 32-17).

Badana grupa

Kryterium włączenia pacjentów z ChSN była kwalifikacja do angiografii wieńcowej. Populacja badana składała się z kolejnych pacjentów ze stabilną dusznicą bolesną, którzy zostali w zakwalifikowani do konwencjonalnej koronarografii ($n=200$), a także pacjentów z OZW, którzy zostali przyjęci do szpitala z bólem w klatce piersiowej ($n=200$). Grupa kontrolna ($n=200$) pacjentów z niskim i średnim ryzykiem choroby wieńcowej, bez incydentów OZW w przeszłości. Kryterium wykluczenia byli nieprzytomni pacjenci. Kontrole rekrutowano w tym samym regionie wśród badanych bez własnej historii chorób sercowo-naczyniowych. Częściowo wyniki tych badań zostały wcześniej opublikowane (Bordoni i wsp. 2020a, Bordoni i wsp. 2020b, Bordoni i wsp. 2021)

Z populacji zostały wyselekcjonowane 3 grupy pacjentów jako kryterium kwalifikacji przyjęto płeć żeńską oraz wykluczono chore na cukrzycę:

- 1). Grupa kobiet z ostrym zespołem wieńcowym (OZW) ($n=23$).
- 2). Grupa kobiet ze stabilną chorobą wieńcową (SChW), zakwalifikowana do konwencjonalnej koronarografii ($n=25$).
- 3). Grupa kobiet z niskim ryzykiem choroby wieńcowej ($n=35$), (Kontrola).

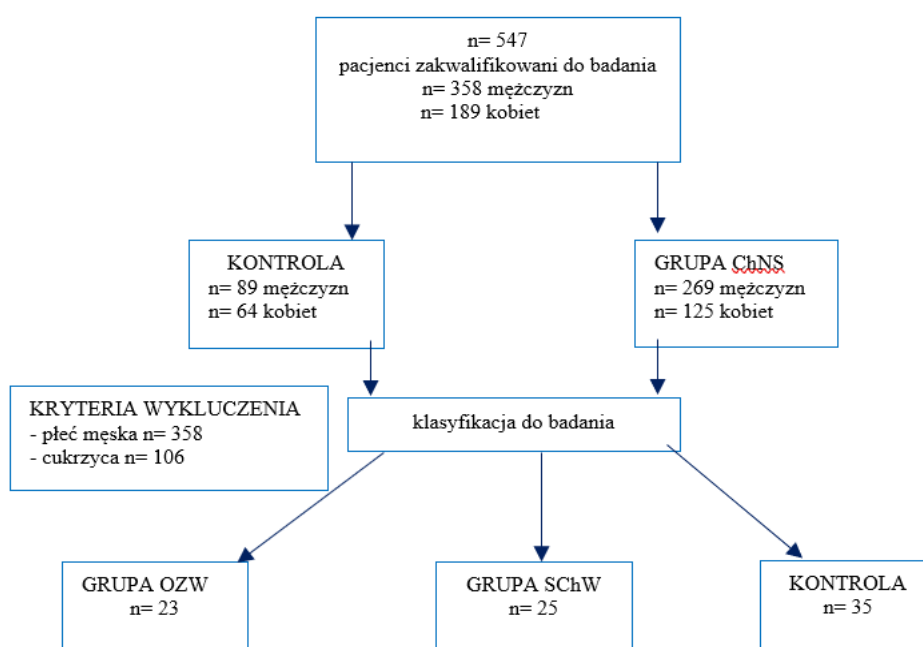
Tabela 4. Charakterystyka badanych w badaniu 3.

	<i>kontrola</i>	<i>OZW</i>	<i>SChW</i>
wiek (lata)	65.5 ± 6.3	68.8 ± 12.2	69.6 ± 10.5
wysokość (cm)	161.6 ± 5.7	162.4 ± 7.5	162.5 ± 7.6
masa ciała (kg)	67.4 ± 11.2	71.8 ± 11.6	71.8 ± 11.8
BMI (kg/m ²)	25.9 ± 3.9	27.7 ± 4.3	26.9 ± 3.7

Procedura badania

W grupie OZW i SChW przeprowadzono wywiad kliniczny, a następnie oceniono następujące czynniki ryzyka sercowo-naczyniowego:

- hipercholesterolemia (zdefiniowana jako stężenie cholesterolu całkowitego ≥ 5 mmol/ l lub leczenie lekami obniżającymi stężenie lipidów);
- otyłość (wskaźnik masy ciała ≥ 30 kg / m²);



Ryc.14. Schemat blokowy interwencji w badaniu 3.

Pobieranie próbek krwi

Próbki krwi żyłnej pobrano z żyły łokciowej bezpośrednio po przyjęciu do rutynowych pomiarów. Próbkę osocza przygotowano przez wirowanie przy 1300 g przez 10 minut w 18-25 ° C i trzymano zamrożone w -80 ° C do późniejszej analizy TMA i TMAO.

Oznaczanie biochemiczne

Stężenia TMA i TMAO w osoczu określono przy pomocy UPLC/MS/MS według metody opisane przez Bordoni i wsp. 2020b.

Stężenie TCh, HDL, LDL, TG, kreatynina, zostały określone przy użyciu standardowego automatycznego analizatora Cobas6000 (Roche Diagnostics, Mannheim, Niemcy).

Obliczenie wskaźnika aterogenności (ang. atherogenic index of plasma; AIP).

Wskaźnik wyliczany jest ze wzoru: (Cholesterol całkowity-HDL) -HDL.

Analiza statystyczna

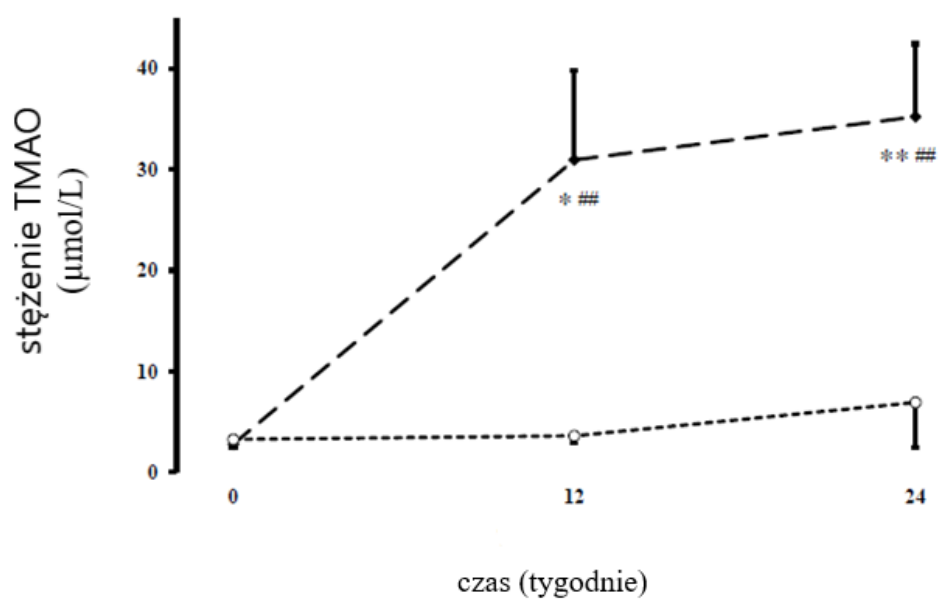
Przeprowadzono analizy statystyczne przy użyciu oprogramowania IBM SPSS Statistics 25. Do analiz wykonano wykresy skrzynkowe (ang. boxplot) przy pomocy języka programowania R oraz programu R Studio. W pierwszej kolejności sprawdzono podstawowe założenia testów parametrycznych takie jak równoliczność grup, normalność rozkładu analizowanych zmiennych oraz homogeniczność wariancji w badanych grupach. W tym celu wykorzystano odpowiednio analizę częstości, test normalności rozkładu Shapiro-Wilka oraz test Levene'a. Z racji spełnienia dla większości zmiennych ww. założeń wykonano ogólny wielowymiarowy model MANOVA (ang. multivariate analysis of variance), po czym przeprowadzono odrębne analizy dla każdej zmiennej oraz testy post-hoc HSD Tukeya. Jako globalny poziom istotności ustalono $p < 0.05$.

4. Wyniki

4.1. Badanie 1A

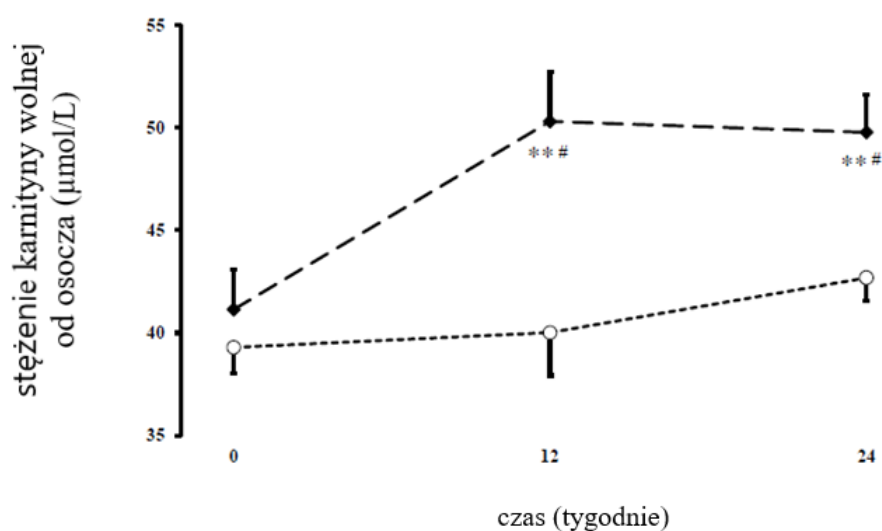
Stężenie TMAO i wolnej karnityny w osoczu

Dziesięciokrotne podwyższenie stężenia TMAO w osoczu odnotowano po 12 tygodniach suplementacji i utrzymało się na podobnym poziomie do 24 tygodnia suplementacji. W tym czasie w grupie placebo stężenie TMAO utrzymywało się na zbliżonym poziomie do wartości sprzed okresu suplementacji (ryc. 15).



Ryc. 15. Stężenie TMAO w osoczu grup placebo (o) oraz otrzymujących L karnitynę (♦); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ w porównaniu z placebo w tym samym czasie # $p < 0,005$, ## $p < 0,001$ w porównaniu do czasu 0 w tej samej grupie.

Zmianom tym towarzyszyło zwiększenie poziomu wolnej karnityny w grupie suplementowanej L-karnityną (ryc. 16).



Ryc. 16. Stężenie wolnej karnityny w osoczu placebo (o) oraz suplementowanych L-karnityną (♦); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ w porównaniu z placebo w tym samym czasie; # $p < 0,005$, ## $p < 0,001$ w porównaniu do czasu 0 w tej samej grupie.

Biomarkery stanu zapalnego

Nie stwierdzono statystycznie istotnych zmian w stężeniach VCAM-1, ICAM-1, SELP, CRP, IL-6 i TNF- α w surowicy w wyniku 24-tygodniowej suplementacji (Tab. 5). Zaobserwowano jedynie istotną różnicę między grupami w stężeniu CRP w surowicy (główny efekt grupy; $p = 0.04$).

Tabela 5. Biomarkery stanu zapalnego w surowicy w grupach L-karnityny i placebo przed i po 24 tygodniach suplementacji.

	L-Karnityna				placebo			ANOVA		
	przed	po	po	przed	przed	po	czas	grupa	czas*grupa	
VCAM-1 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	340 ± 14	329 ± 28		397 ± 36	397 ± 36	379 ± 36	.258	.187	.910	
ICAM ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	234 ± 28	228 ± 25		228 ± 17	228 ± 17	236 ± 22	.916	.982	.481	
SELL ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	373 ± 19	368 ± 23		394 ± 43	394 ± 43	366 ± 28	.391	.797	.530	
SELP ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	221 ± 17	206 ± 19		249 ± 19	249 ± 19	253 ± 33	.728	.186	.542	
CRP ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.6 ± 0.3	2.9 ± 0.4		1.8 ± 0.3	1.8 ± 0.3	1.7 ± 0.3	.666	.040	.439	
IL-6* ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	2.2 ± 0.3	1.9 ± 0.3		1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.2	1.6 ± 0.2	.103	.338	.963	
TNF- α ($\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$)	0,58 ± 0.10	0.65 ± 0.06		0.56 ± 0.09	0.56 ± 0.09	0.66 ± 0.15	.219	.964	.767	

VCAM-1: cząsteczka adhezji komórek naczyńiowych-1; ICAM-1: cząsteczka adhezji międzykomórkowej-1; SELL: L-selektyna; SELP: P-selektyna; CRPbiało C reaktywne; IL-6: interleukina 6; TNF- α : czynnik martwicy nowotworów α ; * wartości przekształcone logarytmicznie do analizy

Metabolity lipidów

Podobnie protokół suplementacji nie wpłynął na stężenie wskaźników profilu lipidowego w surowicy krwi (Tab. 6). Niemniej jednak zaobserwowano istotne obniżenie stężenia TCh, LDL i TG w obu grupach w czasie (główny efekt czasowy; odpowiednio $p = 0.007$, $p = 0.021$, $p = 0.033$).

Tabela 6. Metabolity lipidów w surowicy w grupach L-karnityny i placebo przed i po 24 tygodniach suplementacji.

	<i>L-Karnityna</i>		<i>placebo</i>		<i>ANNOVA</i>		
	<i>przed</i>	<i>po</i>	<i>przed</i>	<i>po</i>	<i>czas</i>	<i>grupa</i>	<i>czas*/grupa</i>
TCh (mg·dL ⁻¹)	233 ± 13	221±14	221 ± 13	196 ±14	.007	.312	.278
HDL (mg·dL ⁻¹)	69 ± 5	69 ± 5	68 ± 6	61 ± 3	.108	.530	.158
LDL (mg·dL ⁻¹)	140 ± 11	131 ± 11	130 ± 11	115 ± 13	.021	.394	.553
TG (mg·dL ⁻¹)	116 ± 10	105 ± 16	117 ± 22	98 ± 16	.033	.705	.999
NEFA (μmol·L ⁻¹)	521 ± 72	558 ± 94	532 ± 95	749 ±128	.074	.730	.088
glicerol (μmol·L ⁻¹)	101 ± 13	90 ± 14	86 ± 18	89 ± 18	.643	.692	.441

TCh: cholesterol całkowity; HDL: cholesterol HDL; LDL: cholesterol LDL; TG: trójglicerydy; NEFA: nieestryfikowane kwasy tłuszczowe

Inne markery

Inne określone metabolity w surowicy krwi, mocznik, kreatynina, Alt, glukoza, insulina i obliczony model homeostatycznej oceny insulinooporności (ang. Homeostasis Model Assessment of Insulin Resistance; HOMA-IR) mieściły się w normach zakresu fizjologicznego i suplementacja nie miała na nie wpływu. Zaobserwowano jedynie znaczący spadek stężenia kreatyniny w obu grupach po 24 tygodniach suplementacji.

Tabela 7. Stężenie wybranych metabolitów w surowicy w grupach L-karnityny i placebo przed i po 24 tygodniach suplementacji.

	<i>L-karnityna</i>		<i>placebo</i>		<i>ANNOVA</i>		
	<i>przed</i>	<i>po</i>	<i>przed</i>	<i>po</i>	<i>czas</i>	<i>grupa</i>	<i>czas/grupa</i>
mocznik ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)	31.6 $\pm$ 2.3	29.8 $\pm$ 3.1	32.3 $\pm$ 3.2	33.1 $\pm$ 3.1	.703	.511	.525
kreatynina ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)	0.81 $\pm$ 0.04	0.77 $\pm$ 0.03	0.82 $\pm$ 0.05	0.76 $\pm$ 0.05	.014	.987	.789
glukoza ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)	96 $\pm$ 4	96 $\pm$ 2	98 $\pm$ 4	98 $\pm$ 2	.949	.613	.979
insulina ($\text{IU}\cdot\text{dL}^{-1}$)	12.1 $\pm$ 2.5	12.7 $\pm$ 2.8	8.3 $\pm$ 1.9	8.4 $\pm$ 1.7	.595	.335	.923
HOMA-IR	3.0 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 0.7	2.0 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.5	.604	.419	.920
Alt ($\text{IU}\cdot\text{dL}^{-1}$)	17.1 $\pm$ 2.0	15.9 $\pm$ 1.8	17.8 $\pm$ 3.2	19,5 $\pm$ 3.4	.959	.617	.440

HOMA-IR: homeostaza modelowa ocena insulinooporności

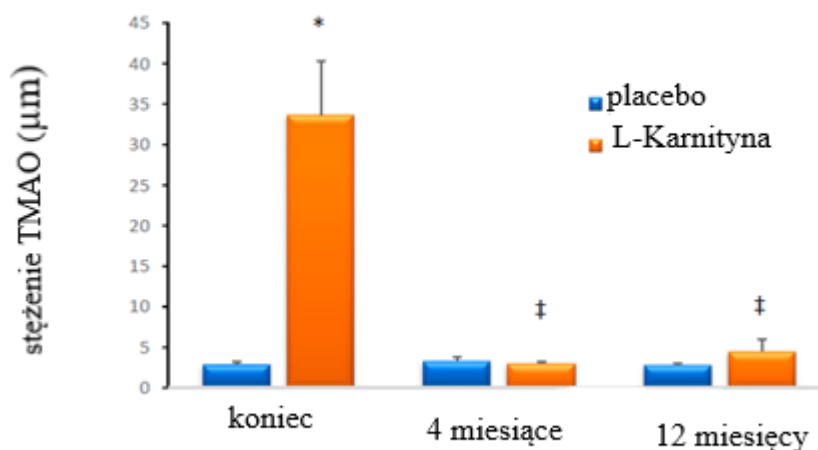
Tabela 8. Markery stresu oksydacyjnego w grupach L-karnityna i placebo: przed rozpoczęciem, oraz po 12 i 24 tygodniach suplementacji.

	<i>L-karnityna</i>			<i>placebo</i>		
	<i>0 tydz.</i>	<i>12 tydz.</i>	<i>24 tydz.</i>	<i>0 tydz.</i>	<i>12 tydz.</i>	<i>24 tydz.</i>
PC (nmol·mg protein ⁻¹)	0.84 ± 0.04	0.82 ± 0.05	0.77 ± 0.05	0.77 ± 0.05	0.80 ± 0.04	0.84 ± 0.10
ox-LDL (μg·L ⁻¹)	45 ± 14	60 ± 19	40 ± 4	40 ± 4	73 ± 17	44 ± 7
MPO (μg·L ⁻¹)	60.09 ± 5.0	59.8 ± 6.7	53.9 ± 6.1	53.9 ± 3.9	48.1 ± 5.7	48.0 ± 4.8
UA (μmol·L ⁻¹)	283 ± 15	307 ± 21	312 ± 24	289 ± 22	292 ± 31	306 ± 24
Hcy (μmol·L ⁻¹)	11.8 ± 1.0	13.4 ± 1.8	13.1 ± 1.4	11.5 ± 1.1	11.9 ± 0.9	12.9 ± 1.4

PC – grupy karbonylowe białka, ox-LDL – utlenowana lipoproteina niskiej gęstości, MPO – mieloperoksydaza, UA – kwas moczowy, Hcy – homocysteina.

4.2. Badanie 1B

Pod koniec protokołu suplementacji stężenie TMAO w osoczu osiągnęło $33,6 \pm 6,7 \mu\text{M}$ w grupie suplementowanej L-karnityną, podczas gdy w grupie placebo było to $2,9 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (ryc.17). Cztery miesiące po zaprzestaniu suplementacji TMAO w osoczu zmniejszyło się do porównywalnego w grupie placebo i pozostało niezmienione przez następne osiem miesięcy (ryc. 17).



Ryc. 17. Stężenia TMAO w osoczu w grupach placebo i L-karnityny. * $p < 0,001$ w porównaniu z grupą placebo w tym samym czasie, ‡ $p < 0,001$ w porównaniu do wyników uzyskanych po zakończeniu suplementacji w tej samej grupie.

W tym samym czasie u krążące wskaźniki profilu lipidowego nie ulegały zmianie zarówno w czasie suplementacji jak i po jej zakończeniu (Tab. 9).

Tabela 9. Metabolity profilu lipidowego w surowicy w grupach L-karnityny i placebo po 24 tygodniach suplementacji (koniec) oraz 4 i 12 miesięcy po zaprzestaniu suplementacji L-karnityną i placebo.

	<i>L-karnityna</i>			<i>placebo</i>		
	<i>koniec</i>	<i>4 m-ce</i>	<i>12 m-cy</i>	<i>koniec</i>	<i>4 m-ce</i>	<i>12 m-cy</i>
TCh (mg·dL ⁻¹)	217 ± 12	213 ± 16	211 ± 13	199 ± 15	211 ± 10	202 ± 11
HDL (mg·dL ⁻¹)	67 ± 5	72 ± 6	70 ± 5	61 ± 4	72 ± 7	67 ± 5
LDL (mg·dL ⁻¹)	127 ± 10	119 ± 14	115 ± 12	117 ± 13	120 ± 10	117 ± 7
TG (mg·dL ⁻¹)	114 ± 18	116 ± 14	130 ± 22	103 ± 18	98 ± 12	89 ± 14

Podobnie liczba leukocytów pozostała niezmienną i nie różniła się między grupami (Tabela 10).

Tabela 10. Liczba krążących białych krwinek w grupach L-karnityny i placebo po 24 tygodniach suplementacji (koniec) oraz 4 i 12 miesięcy po zaprzestaniu suplementacji.

	<i>L-karnityna</i>			<i>placebo</i>		
	<i>koniec</i>	<i>4 m-ce</i>	<i>12 m-cy</i>	<i>koniec</i>	<i>4 m-ce</i>	<i>12 m-cy</i>
Leuko (10 ⁹ ·L ⁻¹)	5.7 ± 0.5	6.1 ± 0.6	6.6 ± 0.8	5.4 ± 0.4	5.7 ± 0.5	5.5 ± 0.4
Neutro (10 ⁹ ·L ⁻¹)	3.0 ± 0.3	3.4 ± 0.5	3.7 ± 0.5	3.0 ± 0.2	3.0 ± 0.4	2.7 ± 0.2
Limfo(10 ⁹ ·L ⁻¹)	2.0 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2	2.1 ± 0.2	2.1 ± 0.2
NLR	1.0 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1,8 ± 0,2	1.7 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.4 ± 0.01
Mono (10 ⁹ ·L ⁻¹)	0.51 ± 0.04	0.51 ± 0.03	0.54 ± 0.05	0.45 ± 0.06	0.46 ± 0.06	0.45 ± 0.04
PLT (10 ⁹ ·L ⁻¹)	279 ± 16	272 ± 12	291 ± 13	249 ± 19	248 ± 18	253 ± 23

Leuko: leukocyty, Neutro: neutrofile, Lympho: limfocyty, NLR: neutrofile-limfocyty, Mono: monocyty, PLT: płytki krwi.

Nie stwierdzono różnic w zwyczajach żywieniowych dotyczących spożycia ryb i owoców morza (tabela 11).

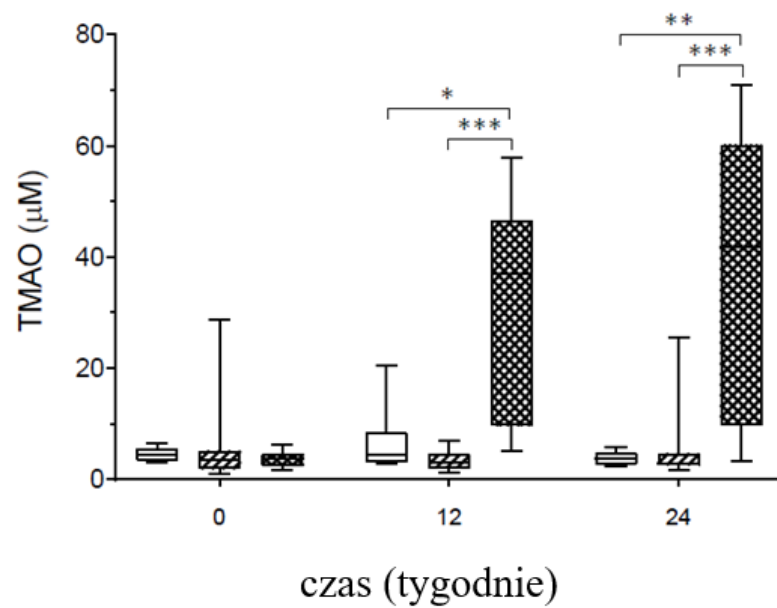
Tabela 11. Częstotliwość spożycia ryb.

	<i>L-karnityna</i>		<i>placebo</i>	
	<i>średnia</i>	<i>częstotliwość</i>	<i>średnia</i>	<i>częstotliwość</i>
dorsz	F1	F0-F3	F1	F0-F3
łosoś	F1	F0-F2	F2	F0-F3
makrela	F1	F0-F2	F1	F0-F2
śledź	F1	F0-F3	F1	F0-F3
pstrąg	F0	F0-F1	F1	F0-F3
tuńczyk	F0	F0-F1	F0	F0-F2
flądra	F0	F0-F1	F0	F0-F1
morszczuk	F0	F0-F1	F0	F0-F1
węgorz	F0	F0-F1	F0	F0-F1
mintaj	F0	F0-F1	F0	F0-F1

F0: nigdy / okazjonalnie, F1: 1-2 razy w miesiącu, F2: raz w tygodniu, F3: 2-5 razy w tygodniu.

4.3 Badanie 2

Trening oporowy nie wpłynął na zmiany stężenia TMAO w osoczu w okresie 24 tygodni – nie zaobserwowano różnic statystycznie istotnych w czasie zarówno w grupie kontrolnej jak i suplementowanej Leucyna. Natomiast suplementacja L-Karnityna spowodowała dziesięciokrotny wzrost stężenia TMAO w osoczu (ryc. 18).



Ryc. 18. Mediana z zakresem międzykwartylowym stężeń TMAO w osoczu w grupie kontrolnej (biała) z suplementacją L-leucyną (przekątna) oraz z suplementacją L-leucyną + L-karnityną (kreskowanie). *, ** i *** oznaczają wartości p odpowiednio 0,05, 0,01 i 0,001.

Tabela 12. Liczba krążących białych krwinek i markery stanu zapalnego przed i po 24 tygodniach treningu oporowego w grupie kontrolnej i suplementowanych (średnia $\pm$ SE).

	<i>trenująca</i>		<i>kontrola</i>		<i>L-leucyna</i>		<i>L-leucyna + L-karnityna</i>	
	<i>przed</i>		<i>po</i>		<i>przed</i>		<i>przed</i>	<i>po</i>
WBC ($10^9/L$)	5.85 $\pm$ 0.46		6.15 $\pm$ 0.049		5.85 $\pm$ 0.42		6.34 $\pm$ 0.45	6.09 $\pm$ 0.47
Neutr ($10^9/L$)	3.08 $\pm$ 0.31		3.17 $\pm$ 0.35		3.05 $\pm$ 0.29		3.47 $\pm$ 0.32	3.29 $\pm$ 0.34
Lym ($10^9/L$)	2.00 $\pm$ 0.18		2.21 $\pm$ 0.23		2.07 $\pm$ 0.17		2.04 $\pm$ 0.21	2.13 $\pm$ 0.22
NLR	1.62 $\pm$ 0.15		1.54 $\pm$ 0.29		1.52 $\pm$ 0.14		1.96 $\pm$ 0.27	1.80 $\pm$ 0.28
Mono ($10^9/L$)	0.49 $\pm$ 0.04		0.55 $\pm$ 0.05		0.46 $\pm$ 0.04		0.53 $\pm$ 0.04	0.47 $\pm$ 0.04
CRP (mg/L)	1.67 $\pm$ 0.59		2.40 $\pm$ 0.93		2.17 $\pm$ 0.54		1.54 $\pm$ 0.85	2.74 $\pm$ 0.93
IL-6 (pg/ml)	1.76 $\pm$ 0.26		1.77 $\pm$ 0.35		1.52 $\pm$ 0.24		1.73 $\pm$ 0.32	1.97 $\pm$ 0.35
TNF- α (pg/mL)	0.98 $\pm$ 0.08		1.00 $\pm$ 0.09		1.19 $\pm$ 0.08		1.16 $\pm$ 0.09	1.11 $\pm$ 0.09

WBC: białe krwinki, Leuko: leukocyty, Neutro: neutrofile, Lympho: limfocyty, NLR: Neutrofile-limfocyty, Mono: monocyty, CRP: białko C-reaktywne, IL-6: interleukina 6, TNF- α : czynnik martwicy α .

Wzrost TMAO w osoczu, wynikający z suplementacji L-karnityną, nie wpływał na zmiany stężenia ADMA, SDMA oraz aminokwasów biorący udział w metabolizmie L-argininy. Ponadto, brak korelacji między TMAO a ADMA ($r_s = 0,014$, $p = 0,220$), TMAO i SDMA ($r_s = 0,009$, $p = 0,338$).

Tabela 13. Metabolity lipidów w surowicy przed i po 24 tygodniach interwencji (średnia $\pm$ SEM).

	trenująca kontrola		L-leucyna		L-leucyna + L-Karnityna	
	przed	po	przed	po	przed	po
TCh (mg/dL)	221 $\pm$ 12	220 $\pm$ 12	201 $\pm$ 11	208 $\pm$ 11	207 $\pm$ 12	227 $\pm$ 11
HDL (mg/dL)	75.5 $\pm$ 6.4	71.2 $\pm$ 5.9	65.4 $\pm$ 5.9	72.1 $\pm$ 5.5	69.1 $\pm$ 6.1	69.8 $\pm$ 5.7
LDL (mg/dL)	123 $\pm$ 10	125 $\pm$ 9	112 $\pm$ 10	113 $\pm$ 8	120 $\pm$ 10	137 $\pm$ 8
TG (mg/dL)	114 $\pm$ 14	120 $\pm$ 11	120 $\pm$ 13	112 $\pm$ 10	94 $\pm$ 14	104 $\pm$ 11
TCh/HDL	3.11 $\pm$ 0.23	3.22 $\pm$ 0.20	3.22 $\pm$ 0.21	2.00 $\pm$ 0.19	3.07 $\pm$ 0.22	3.37 $\pm$ 0.20
TG/HDL	1.79 $\pm$ 0.33	1.87 $\pm$ 0.28	2.06 $\pm$ 0.31	1.75 $\pm$ 0.25	1.43 $\pm$ 0.32	1.67 $\pm$ 0.26

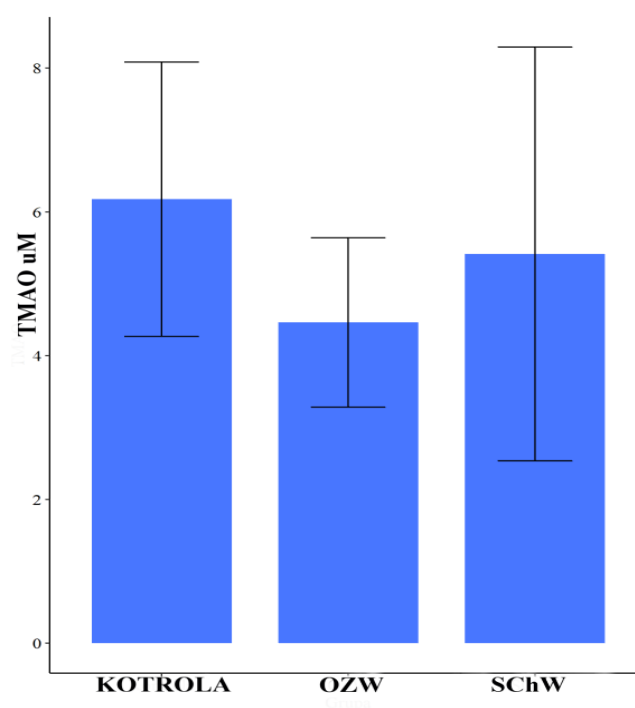
TCh: cholesterol całkowity, HDL: wysokiej gęstości lipoproteina, LDL: niskiej gęstości lipoproteina, TG: trójglicerydy.

Tabela 14. Spożycie energii i składników odżywczych w diecie (średnia $\pm$ SEM).

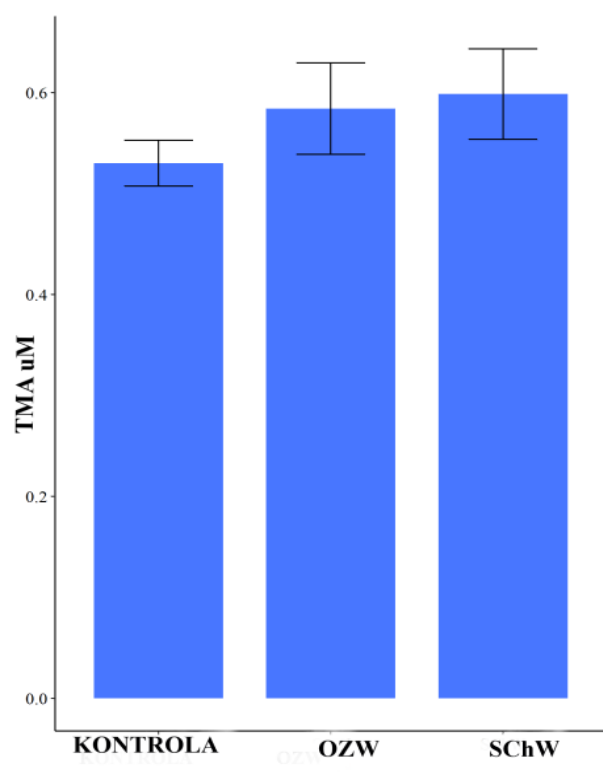
<i>dieta</i>	<i>trenująca kontrola</i>	<i>L-leucyna</i>	<i>L-leucyna+L-karnityna</i>
zużycie energii (Mj/d)	6.5 $\pm$ 0.7	6.6 $\pm$ 0.3	7.0 $\pm$ 0.6
spożycie białka (%)	18 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1
spożycie tłuszczu (%)	36 $\pm$ 2	34 $\pm$ 3	36 $\pm$ 2
spożycie węglowodanów (%)	46 $\pm$ 2	48 $\pm$ 3	46 $\pm$ 2

4.4 Badanie 3

Porównano stężenia TMAO, TMA, TMAO/TMA w trzech podgrupach OZW, SChW, Kontrola.

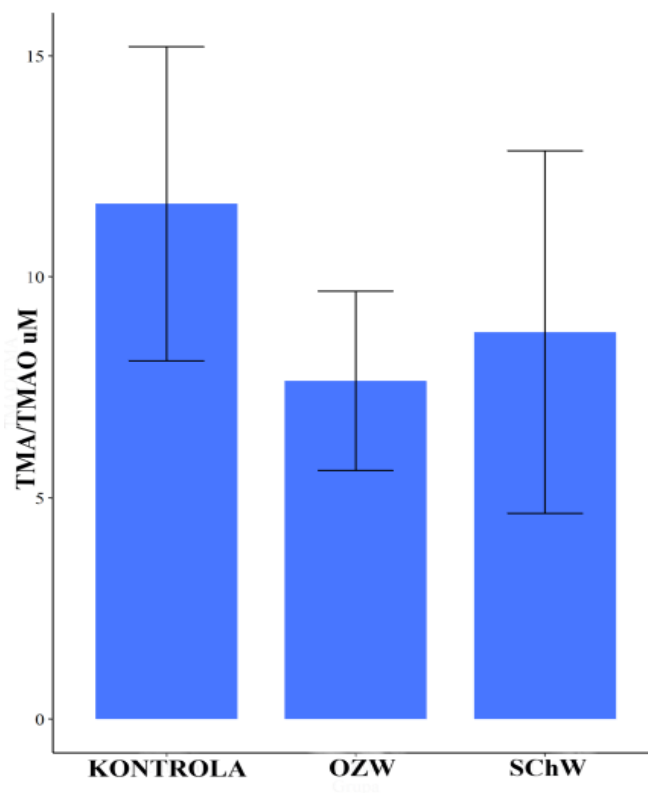


Rys. 19. TMAO w zależności od grupy badanej; średnia arytmetyczna oraz 95% przedziały ufności.



Ryc. 20. TMA w zależności od grupy badanej; średnia arytmetyczna oraz 95% przedziały ufności.

Poziom TMA wzrastał wraz z ryzykiem zaawansowania CVD, najwyższy poziom zaobserwowano w grupie pacjentów z stabilną chorobą wieńcową.



Ryc. 21. TMAO/TMA w zależności od grupy badanej; średnia arytmetyczna oraz 95% przedziały ufności.

Tabela 15. Wyniki analizy jednozmiennowej, testem efektów między obiektowych oraz analiza post-hoc testem HSD Tukeya.

„a, b”: średnie arytmetyczne różniące się od siebie istotnie statystycznie posiadają te same indeksy literowe w obrębie jednej zmiennej; test post-hoc Tukeya HSD; $p < 0,05$.

	<i>grupa</i>	<i>M</i>	<i>SD</i>	<i>F</i>	<i>p</i>	<i>częstko we η^2</i>	<i>R² skory gowane</i>	<i>moc obserwowana</i>
TMAO (μM)	kontrola	6.18	5.55					
	OZW	4.46	2.72	0.69	0.506	0.02	-0.01	0.162
	SChW	5.41	6.97					
TMA (μM)	kontrola	0,53a	0.07					
	OZW	0.58	0.1	4.72	0.12	0.11	0.08	0.775
	SChW	0.60a	0.11					
TMAO/TM A (μM)	kontrola	11.65	10.34					
	OZW	7.65	4.69	1.56	0.216	0.04	0.01	0.322
	SChW	8.75	9.93					
eGFR (ml/min)	kontrola	78.44	16.78					
	OZW	76.57	38.76	0.16	0.852	0	-0.02	0.074
	SChW	74.35	27.51					
AIP	kontrola	0.12	0.24					
	OZW	0.19	0.25	0.95	0.39	0.02	0	0.21
	SChW	0.22	0.38					
WBC ($10^3/\mu\text{l}$)	kontrola	5.91a	1.29					
	OZW	9.32a	2.86	22.06	<0.001	0.36	0.34	1
	SChW	7.40a	1.55					
TCh ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)	kontrola	181.6 ab	53.68					
	OZW	212.3 a	48.93	7.06	0.001	0.15	0.13	0.921
	SChW	225.76 b	32.05					
TG ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)	kontrola	116.57	54.26					
	OZW	116.3	53.36	1.2	0.307	0.03	0.01	0.255
	SChW	97.68	42.4					
HDL ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)	kontrola	58.83	18.23					
	OZW	68.91	20.61	2.59	0.081	0.06	0.04	0.503
	SChW	66.12	13.02					
LDL ($\text{mg}\cdot\text{dL}^{-1}$)	kontrola	99.11 a	49.07					
	OZW	120.09	43.91	6.82	0.002	0.15	0.12	0.911
	SChW	140.08 a	29.43					

M: mediana, SD: odchylenie standardowe, η^2 : ETA kwadrat – miara siły efektu.

W celu porównania grup kontrolna, OZW i SChW dla 10 zmiennych zależnych (parametry krwi, nerkowe, wzrost, wiek) wykonano analizę wariancji MANOVA. Jako współczynnik mocy efektu użyto η^2 .

Ogólny model wielozmiennowy okazał się być istotny statystycznie, $F(30, 132) = 2,78$; $p < 0,001$; $\eta^2 = 0,39$; test λ Wilksa. Oznacza to, że można było spodziewać się istotnych różnic statystycznych również w przypadku porównań jednozmiennowych. W celu odnalezienia zmiennych dla których wyniki badanych grup różniły się istotnie statystycznie przeprowadzono dalsze analizy.

W przypadku porównań jednowymiarowych różnice okazały się być istotne dla zmiennych WBC, cholesterol i LDL. Dla WBC najwyższymi wynikami charakteryzowała się grupa OZW, nieco mniejszymi SChW, a najmniejszymi grupa kontrolna. Zarówno współczynnik η^2 jak i R^2 wskazują, że różnice te są duże. Dla zmiennej cholesterol najwyższymi wynikami odznaczała się grupa SchW, podczas gdy najniższymi grupa kontrolna. Istotne okazały się porównania kontrolna vs SChW oraz kontrolna vs OZW. Współczynnik η^2 wskazuje również na obecność dużych różnic. Podobnie jak w zmiennej cholesterol kształtują się wyniki LDL. Jednak dla zmiennej LDL jedynym istotnym statystycznie porównaniem jest kontrolna vs SChW. Współczynnik η^2 wskazuje na dużą moc efektu.

5. Dyskusja

Główne wyniki tej pracy wskazują, że stężenie TMAO w osoczu krwi ludzkiej może ulegać modyfikacji pod wpływem suplementacji karnityną. Istotnych zmian w stężeniu TMAO nie stwierdzono po 24 tygodniach treningu oporowego. Nie zaobserwowano także różnic pomiędzy stężeniem TMAO w osoczu krwi kobiet z ChSN a grupą kobiet zdrowych. Należy także podkreślić, że pomimo istotnego podwyższenia stężenia TMAO w osoczu wynikającego z suplementacji karnityną, nie odnotowano zmian w profilu lipidowym oraz wybranych wskaźników stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego badanych. Co istotne, u osób z prawidłową funkcją nerek stężenie TMAO w osoczu wraca do wartości sprzed okresu suplementacji.

Badania nad TMAO zostały zapoczątkowane już pod koniec XIX wieku (Dunstan i Goulging, 1894). W ubiegłym stuleciu TMAO był postrzegany głównie jako stabilizator białek w warunkach stresu środowiskowego, przede wszystkim w warunkach wysokiego ciśnienia hydrostatycznego (Yancey i wsp. 2002). W 2011 r. Wang i wsp. zasugerowali, że TMAO przyczynia się do rozwoju miażdżycy, a przez to ChSN. Ponieważ diety bogate w czerwone mięso są silnie związane z chorobami serca, karnityna została wskazana jako główny składnik odpowiedzialny za rozwój miażdżycy, a jako łącznik uznano metabolizm karnityny do TMAO (Koeth i wsp. 2013).

Od tego czasu kilkakrotnie wykazano, że zastosowanie suplementacji L- karnityną podwyższa poziom TMAO w osoczu (Fukami i wsp. 2015, Miller i wsp. 2016, Vallance i wsp. 2018). U pacjentów z wrodzonymi chorobami metabolicznymi, którzy wymagają suplementacji L-karnityną, średnie stężenie TMAO w osoczu wynosiło 120 μM , co było wartością ~ 45 -krotnie wyższą w porównaniu do osób zdrowych nie suplementowanych (Miller i wsp. 2016). Vallance i wsp. 2018 podali, że suplementacja L-karnityną (1000 mg dziennie przez ponad 1 rok) u pacjentów z zaburzeniami mitochondrialnymi wywoływała ~ 12 -krotny wzrost stężenia TMAO (mediana 3.54 μM w porównaniu do 43.26 μM po suplementacji). W naszym badaniu u zdrowych kobiet odnotowano 10-krotny wzrost TMAO w osoczu po 12 tygodniach suplementacji, który pozostawał podwyższony przez kolejne 12 tygodni; niezależnie

od tego czy zastosowano 1.5 g L-winianu L-karnityny dziennie (Samulak i wsp. 2019a), czy 1.0 g L-winianu L-karnityny dziennie (badanie 2). Co ciekawe po 6 miesiącach suplementacja L-karnityną w ilości 0.9 g dziennie u pacjentów dializowanych, oprócz zwiększonego poziomu TMAO zaobserwowano obniżenie stężenia wskaźników uszkodzenia naczyń krwionośnych oraz stresu oksydacyjnego (Fukami i wsp. 2015).

Istotną rolę w występowaniu i progresji miażdżycy tętnic i ChNS odgrywa stan zapalny. CRP jest wskaźnikiem o określonym związku z incydentami sercowo-naczyniowymi. Z kolei podwyższone poziomy IL-6, TNF- α i SELP są uważane za markery immunologicznej aktywacji leukocytów i makrofagów, natomiast SELP jest markerem aktywacji płytek krwi. Mediatory stanu zapalnego przenoszone przez krew powodują uszkodzenie śródbłonna naczyniowego. Cząsteczki adhezyjne, takie jak VCAM-1 i ICAM-1, są wykorzystywane jako markery dysfunkcji śródbłonna. Wykazano także, że TMAO sprzyja rozwijaniu stanu zapalnego w komórkach (Sun i wsp. 2016, Chou i wsp. 2019, Ke i wsp. 2018). Konsekwentnie u chorych ze stabilną dławicą obserwowano bezpośrednią korelację między TMAO a CRP (Chou i wsp. 2019). Analiza przekrojowa populacji niemieckiej wykazała dodatni związek między TMAO w osoczu a TNF- α , ale nie stwierdzono istotnego związku między TMAO a CRP lub IL-6. (Rohrmann i wsp. 2016). W naszym badaniu 10-krotny wzrost TMAO w osoczu, wywołany suplementacją L-karnityną, nie wpływał na markery zapalne tj. ICAM, VCAM, L-selektynę, P-selektynę, białko C-reaktywne, czynnik martwicy nowotworu i interleukina-6 (Samulak i wsp. 2019a). Ponadto stosunek liczby neutrofili do limfocytów (NLR), który jest wskaźnikiem ogólnoustrojowego stanu zapalnego, związanego z subkliniczną miażdżycą tętnic (Shang i wsp. 2014), w trakcie i po suplementacji utrzymywał się na poziomie 1,8 (Olek i wsp. 2019), porównywalnym do grupy kontrolnej z badania (Demirkol i wsp. 2014).

Stan zapalny w połączeniu ze stresem oksydacyjnym odgrywa ważną rolę nie tylko w procesie powstawania, ale także powiększania blaszek miażdżycowych, prowadząc do ich destabilizacji (Malle i wsp. 2006, Abdo i wsp. 2017, Teng i wsp. 2017). Ostatnie badania wykazały, że do rozwoju miażdżycy przyczynia się MPO (Vita i wsp. 2004), uwalniane przez aktywowane leukocyty (Baldus i wsp. 2003). Produkowane przez MPO silne pro-oksydanty (na przykład HOCl), utleniają lipoproteiny o niskiej gęstości, w efekcie czego powstają ox-LDL, które indukują dysfunkcję śródbłonna

(Meuwese i wsp. 2007). Prospektywne badanie kohortowe w regionie Sirente, obejmujące 363 osoby w wieku >80 lat, wykazało zwiększone ryzyko śmiertelności u następnie do wodoronadtlenku moczanu (Meotti i wsp. 2011), co sugeruje, że UA może wpływać na progresję dysfunkcji śródbłonka (Silva i wsp. 2018). Rzeczywiście, ryzyko śmiertelności znacznie wzrasta w UA poziomu w surowicy > 7,5 mg / dl [$\sim 450 \mu\text{M}$] (Ndrepepa i wsp. 2012). W badaniach epidemicznych zbadano również związek między CVD i Hcy we krwi (Fortin i Genest, 1995, Nygard i wsp. 1995, Geisel i wsp. 2003). Hcy osłabia funkcja śródbłonka poprzez produkcję nadtlenu wodoru (Starkebaum i Harlan. 1986) i anionu ponadtlenkowego (Lang i wsp. 2000) i może zwiększać utlenianie LDL (Pfanzagl i wsp. 2003). Niemniej jednak, żaden z tych markerów nie zmienił się w okresie suplementacji, pomimo zmian w poziomie TMAO i pozostały w normalnych zakresach. L-karnityna działa ochronnie na wywołany oksydacją spadek tioli drobnocząsteczkowych i peroksydację lipidów w osoczu (Kolodziejczyk i wsp. 2011), a suplementacja L-karnityną obniża poziom oksydacji LDL u chorych na cukrzycę (Malaguarnera i wsp. 2009). Jednak suplementacja L-karnityną nie wpłynęła na stężenie ox-LDL ani PC w naszym badaniu. Może to wynikać z braku stresu oksydacyjnego, ponieważ obserwowane przez nas wartości ox-LDL (Koubaa i wsp. 2010, Basati i wsp. 2011) i PC (Cakatay i wsp. 2008) były porównywalne do stwierdzonych wcześniej u zdrowych ochotników w podobnym wieku.

Badania *in vitro* wykazały, że TMAO, poprzez zwiększone wytwarzanie RFT, hamuje śródbłonkową syntezę NO, a tym samym produkcję NO (Sun i wsp. 2016, Ke i wsp. 2018), przez co pośrednio również może wpływać na rozwój miażdżycy. Jako pośredni biochemiczny marker produkcji NO zaproponowano stosunek L-arginina / ADMA (Bode-Boger i wsp. 2007). Jednak w naszych badaniach żadnej różnicy w stosunku L-arginina / ADMA między pacjentami z podwyższonym TMAO w osoczu. Warto zauważyć, że osoby biorące udział w badaniu nie miały cukrzycy ani nadciśnienia tętniczego z TCh i TG w prawidłowych zakresach, a stężenie ADMA w osoczu oraz L-arginina / ADMA były porównywalne z wartościami prawidłowymi osób zdrowych (Lunenburg i wsp. 2011)

Mechanizmy patofizjologiczne łączą ChSN ze stanem zapalnym, nasiloną generacją RFT i akumulacją lipidów. Wczesne zmiany miażdżycowe charakteryzują

się gromadzeniem komórek piankowatych pochodzących głównie z cholesterolu nagromadzonego w makrofagach (Tang i wsp. 2015). Dlatego metabolizm cholesterolu odgrywa istotną rolę w rozwoju miażdżycy (Tang i wsp. 2013), a wysokie stężenia LDL w surowicy odgrywają główną rolę w powstawaniu i progresji miażdżycy. Natomiast HDL hamuje gromadzenie się LDL w naczyniach, ogranicza stany zapalne i uszkodzenia śródbłónka (Badimon i Vilahur, 2012). Metaanaliza badań z udziałem pacjentów poddawanych dializie sugeruje, że suplementacja L-karnityną może pozytywnie wpływać na poziom LDL w surowicy, chociaż nie wiązała się z istotną zmianą poziomu TCh, HDL i TG w surowicy (Huang i wsp. 2013). Podobnie profil lipidowy poprawia się po suplementacji L-karnityną u kobiet z chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego (Malek Mahdavi i wsp. 2015). W naszym badaniu po 24 tygodniach suplementacji zaobserwowano znaczące zmniejszenie stężenia TCh, LDL i TG w surowicy, ale nie można tego przypisać L-karnitynie. Jedynym prawdopodobnym wytłumaczeniem tej zmiany mogą być sezonowe wahania stężenia lipidów w surowicy w populacji osób starszych (Woodhouse i wsp. 1993), zważywszy, że protokół badania rozpoczął się zimą, a kończył latem.

Czynniki związane ze stylem życia, jak na przykład dieta, wpływają na produkcję TMAO (Zhu i wsp. 2020). Poprzednie badania wykazały, że osoby spożywające wszystkie pokarmy wykazują zdolność do wytwarzania TMAO z diety, osiągając wyższe poziomy TMAO w osoczu niż wegetarianie po spożyciu L-karnityny (Koeth i wsp. 2013). Ponadto, zastosowanie interwencji dietetycznej u zdrowych dorosłych osób, powoduje wzrost stężenia TMAO zarówno we krwi, jak i w moczu po 4 tygodniach diety bogatej w czerwone mięso. Stężenie TMAO w osoczu krwi było średnio trzykrotnie wyższe niż po zastosowaniu w tym samym czasie diety bezmięsnej i diety bogatej w białe mięso (Wang i wsp. 2018). Aczkolwiek, nawykowe spożywanie czerwonego, przetworzonego lub białego mięsa nie miało wpływu na TMAO w osoczu u dorosłych Niemców (Rohrmann i wsp. 2016). Co więcej, nie wykazano rozbieżności w stężeniu TMAO w osoczu w odniesieniu do restrykcyjnego przestrzegania diety wegetariańskiej (Obeid i wsp. 2017) oraz w bezpośrednim porównaniu wegetarian i osób spożywających wszystkie produkty (Lin i wsp. 2019). Ponadto stwierdzono, że wysokie spożycie mięsa w ramach diety paleolitycznej nie zwiększa tworzenia TMAO w 4-tygodniowym randomizowanym badaniu z grupą kontrolną (Genoni i wsp. 2019).

Ponieważ TMAO występuje w tkankach zwierząt morskich (Gillett i wsp. 1997), a jego stężenie wzrasta proporcjonalnie do głębokości środowiska naturalnego (Yancey i wsp. 2004), Spożycie ryb i owoców morza bezpośrednio zwiększa poziom TMAO w organizmie człowieka (Zhang i wsp. 1999), spożycie ryb w diecie powoduje wzrost stężenia TMAO we krwi krążącej (Zhang i wsp. 1999). W ciągu 2 godzin po spożyciu ryb stężenie TMAO w osoczu osiąga $\sim 150 \mu\text{M}$ (Cho i wsp. 2017). Jednocześnie dowiedziono, że większe spożycie ryb w diecie zmniejsza ryzyko chorób sercowo-naczyniowych (Tong i wsp. 2019). Dlatego niektórzy autorzy wskazując ten paradoks, poddają w wątpliwość aterogenne działanie TMAO (Landfald i wsp. 2017).

W badanych przez nas grupach zwyczaje żywieniowe nie różniły się pomiędzy grupami, ze szczególnym uwzględnieniem spożycia ryb (Samulak i wsp. 2019b), co pozwala stwierdzić, że to suplementacja karnityną jest odpowiedzialna za zmiany stężenia TMAO w osoczu badanych.

Pomimo różnic międzyosobniczych oraz zmienności wewnątrzosobniczej w krążącym TMAO (Romano i wsp. 2015, Kühn i wsp. 2017), na podstawie metaanalizy 7 badań wykazano zależność między wzrostem stężenia TMAO o $10 \mu\text{M}$ i podwyższeniem ryzyka zgonu z jakiegokolwiek przyczyny o 7.6%. Skojarzenie TMAO i śmiertelność utrzymywała się we wszystkich badanych i we wszystkich badanych populacjach metaanalizy (Schiattarella i wsp. 2017). Jako że w wyniku suplementacji L-karnityną zwiększa się stężenie krążącego TMAO (Fukami i wsp. 2015, Miller i wsp. 2016, Vallance i wsp. 2018, Samulak i wsp. 2019a), należałoby zaobserwować negatywny wpływ suplementacji L-karnityną w dotychczasowych badaniach. Jednak L-karnityna jest stosowana w leczeniu pacjentów z chorobami układu krążenia od dziesięcioleci i nie wykazano dotychczas żadnego pogorszenia stanu zdrowia pacjentów w wyniku stosowania tego związku (patrz prace przeglądowe Shang i wsp. 2014, Song i wsp. 2017, Wang i wsp. 2018). Nawet jeśli pozytywny wpływ L-karnityny został ostatnio zanegowany, ze względu na brak korzystnego działania w zakresie niewydolności serca, niestabilnej dławicy piersiowej, ponownego zawału mięśnia sercowego, czy zmniejszenia śmiertelności, (Shang i wsp. 2014), nadal nie wykazano, że może być związkiem szkodliwym chociaż pacjentom po ostrym zawałe mięśnia sercowego podawano nawet 6 g / dzień przez 1 rok) (Iliceto i wsp. 1995). Co więcej, genetyczne ograniczenie wychwyty karnityny prowadzi do osłabienia pracy i niewydolności serca (Grube i wsp. 2011). Ponadto wiele badań

wskazuje ochronną rolę LC przed dysfunkcją śródbłonka i agregacją płytek (Mohammadi i wsp. 2016) lub kardiomiopatią (Wang i wsp. 2018).

Regularna aktywność fizyczna jest znanym czynnikiem ochronnym przed chorobami takimi jak choroby układu krążenia (WHO 2010, Lee i wsp. 2012). Ćwiczenia uważane są za silny bodziec do poprawy funkcji śródbłonka (Di Francescomarino i wsp. 2009), ze szczególnym uwzględnieniem ćwiczeń aerobowych (Seals i wsp. 2019). Trening oporowy jest określany jako mniej skuteczny (Casey i wsp. 2007); w związku z tym różne markery funkcji śródbłonka nie ulegają zmianie nawet po przedłużonym programie treningowym (Casey i wsp. 2007, Olson i wsp. 2006, Da Boit i wsp. 2017). Pomimo to, niewiele jest prac opisujących zależność pomiędzy stężeniem TMAO a aktywnością fizyczną. W 2019 Erickson i wsp. opublikowali wyniki badań podejmujących temat wpływu 12-tygodniowego programu treningowego w połączeniu z interwencją dietetyczną u osób otyłych BMI 35.9 ± 5.3 kg/m² w wieku 66.1 ± 4.4 lat. Badani, 5 dni w tygodniu, wykonywali wysiłek ciągły przez 50–60 minut na bieżni lub ergometrze rowerowym (z intensywnością 60–65% HR max. na początku procesu i stopniowo zwiększaną w trakcie sesji, tak że do 4 tygodnia uczestnicy uzyskiwali intensywność na poziomie 80–85% HR max.). Ponadto grupa została podzielona na dwie podgrupy: spożywające dietę hipokaloryczną i eukaloryczną. Wykazano, że średnia procentowa zmiana w TMAO była istotnie różna pomiędzy grupami, ulegała obniżeniu w grupie poddanej treningowi w połączeniu z restrykcją kaloryczną. Niemniej jednak, w bezwzględnych wartościach zmian nie odnotowano. Autorzy zaobserwowali również korelację pomiędzy TMAO a wyjściową wartością VO₂max ($r = 0.67$, $p = 0.004$) (Erickson i wsp. 2019). Taka zależność nie została potwierdzona kolejnych badaniach (Stelle i wsp. 2021). Nie zaobserwowano różnic w stężeniu TMAO na czczo u mężczyzn wytrenowanych wytrzymałościowo (VO₂max. 56.7 ± 8.2 mlO₂/kg/min) w porównaniu do mężczyzn prowadzących siedzący tryb życia (VO₂max. 39.9 ± 6.0 mlO₂/kg/min). Co więcej, 10-dniowa dieta wysokotłuszczowa nie wpływała na stężenie TMAO w tych grupach (Steele i wsp. 2021). Podobnie w naszych badaniach 24-tygodniowa interwencja treningowa nie wpłynęła na stężenie TMAO na czczo. Należy również zauważyć, że dieta osób biorące udział w naszych badaniach nie różniła się pomiędzy grupami. Jedyne czynniki modyfikujące stężenie TMAO w naszych badaniach, to wzbogacenie diety L-karnityną.

CVD jest ściśle powiązany z chorobą nerek (Gansevoort i wsp. 2013). Nawet niewielkie upośledzenie czynności nerek zostało uznane za czynnik ryzyka sercowo-naczyniowego (Taguchi i wsp. 2019). Ponieważ TMAO jest wydalone głównie poprzez filtrację nerkową. (Rebouche, 1991, Rebouche i Chenard, 1991), wyższy poziom TMAO w osoczu u ludzi zasugerowano jako marker uszkodzenia nerek (Hauet i wsp. 2000). Warto zwrócić uwagę, iż choroby układu krążenia oraz choroby nerek są ze sobą ściśle powiązane (Gansevoort i wsp. 2013), a pogorszona czynność nerek jest silnie związana z chorobowością i śmiertelnością pacjentów z niewydolnością serca (Damman i wsp. 2017). Ponadto u pacjentów z przewlekłą chorobą nerek stwierdzono podwyższone stężenie TMAO w osoczu (Bain i wsp. 2006) i zasugerowano, że może ono być markerem niedokrwiennego uszkodzenia nerek (Hauet i wsp. 2000). Współczynniki filtracji kłębuszkowej osób suplementowanych L-karnityną w tym badaniu mieściły się w normie (Samulak i wsp. 2019a), a cztery miesiące po zaprzestaniu suplementacji, stężenie TMAO powróciło do wartości porównywalnych z obserwowanymi przed rozpoczęciem suplementacji (Samulak i wsp. 2019b).

Wiele prac wykazuje związek pomiędzy podwyższonym stężeniem TMAO a zwiększonym ryzykiem poważnych incydentów sercowo-naczyniowych (Tang i wsp. 2013, 2015, Suzuki i wsp. 2016, Gruppen i wsp. 2017). W naszych badaniach nie zaobserwowano różnic w stężeniu TMAO pomiędzy kontrolą OZW i SChW. Podobne wyniki zostały przedstawione przez Yin i wsp. 2015 oraz Meyer i wsp. 2016. Brak wzrostu poziomu TMAO wykazano u pacjentów z bezobjawową miażdżycą i udarem mózgu (Yin i wsp. 2015). Ponadto nie zaobserwowano, związku pomiędzy stopniem zaawansowania miażdżycy, a mikrobiomem jelitowym oraz poziomem TMAO we krwi (Yin i wsp. 2015). Nie zaobserwowano także zależności pomiędzy TMAO a stopniem zwapnienia naczyń oraz grubości kompleksu intima-media w ciągu 10 lat (Meyer i wsp. 2016). Możliwe, że TMAO może mieć znaczenie etiologiczne w późniejszych etapach procesu chorobowego, w podgrupach wysokiego ryzyka lub wśród osób starszych. Włączenie do analizy pacjentów i pacjentki z chorobami współistniejącymi nie zmieniło znacząco wyników analizy – nie zaobserwowano różnic w stężeniu TMAO pomiędzy grupami (Bordoni i wsp. 2020b). Ponadto, podział na grupy na podstawie wielonaczyniowej choroby wieńcowej (ilości zwężonych

naczyń wieńcowych potwierdzonych w badaniu koronarograficznym), również nie wykazał istotnych różnic w stężeniu TMAO w zależności od ilości zwężonych naczyń wieńcowych potwierdzonych w badaniu koronarograficznym (Bordoni i wsp. 2021). Pomimo braku różnic w TMAO, w naszych badaniach zaobserwowano wyższy poziom TMA u kobiet z CVD niż u kobiet zdrowych. Może to być związane z różnicami między płciami w układzie redoks i odpowiedzi metabolicznej (Kander i wsp. 2016). W warunkach fizjologicznych kobiety wydają się być mniej podatne na stres oksydacyjny niż mężczyźni, co może mieć różny wpływ na rozwój CVD, różnice między płciami w odpowiedzi na stres oksydacyjny mogą wpływać na ryzyko rozwoju miażdżycy (Kander i wsp. 2016).

Rola prekursorów żywieniowych TMAO w ryzyku CVD jest mieszana, przy czym wykazano, że czerwone mięso zwiększa ryzyko CVD, podczas gdy ryby są uważane za kardioprotekcyjne (Lloyd-Jones i wsp. 2010). Ponadto najnowsze dane sugerują, że doustna suplementacja prekursorem TMAO, L-karnityną, może przyczyniać się do obniżenia poziomu lipoprotein w osoczu (Serban i wsp. 2016), pomimo działania na stężenie krążącego TMA czy TMAO.

Pomimo dużego postępu w zakresie strategii zapobiegania, farmakoterapii i interwencyjnego leczenia chorób sercowo-naczyniowych, a zdarzenia sercowo-naczyniowe nadal stanowią główną przyczynę zgonów we współczesnym świecie (Wang i wsp. 2011). Nasze wyniki potwierdzają potrzebę dalszych badań w celu określenia roli TMAO w warunkach fizjologicznych i patologicznych.

Wnioski

Wyniki tych badań wykazują, że:

1. Suplementacja karnityną w sposób istotny, ale nie permanentny podwyższa stężenie TMAO w osoczu; przy czym zmiany te nie mają wpływu na profil lipidowy oraz wybrane wskaźniki stanu zapalnego i stresu oksydacyjnego badanych.
2. 24-tygodniowy trening oporowy nie jest czynnikiem wpływającym na modyfikację stężenia TMAO w osoczu.
3. Choroba sercowo-naczyniowa nie powoduje zmian stężenia TMAO w osoczu krwi, niemniej jednak zaobserwowano różnice w stężeniu TMA pomiędzy grupami.

Karnityna i TMAO mają przeciwstawne właściwości. Karnityna cechuje się działaniem przeciwzapalnym i antyoksydacyjnym. Z kolei TMAO posiada właściwości prozapalne i prooksydacyjne. Co ciekawe suplementacja karnityną podwyższa stężenie krążącego TMAO. Pomimo faktu, że suplementacja karnityną wykazuje pozytywne właściwości (Shang i wsp. 2014, Song i wsp. 2017, Wang i wsp. 2018), badacze zasugerowali niekorzystne działanie TMAO na organizm człowieka (Tang i wsp. 2013, 2015, Suzuki i wsp. 2016, Gruppen i wsp. 2017). Co ciekawe, powszechnie znane są korzystne właściwości regularnego wysiłku fizycznego (WHO 2010, 2020, Lee i wsp. 2012, Taesuwan i wsp. 2017, Schuch i wsp. 2016, Das i wsp. 2012) nasze badania wykazały, że 24-tygodniowy proces treningowy nie wpłynął na stężenie TMAO w osoczu. Niemniej jednak, zaobserwowano różnice w stężeniu TMA pomiędzy osobami z chorobą sercowo-naczyniową a zdrowymi. Dlatego konieczne są dalsze badania w celu określenia potencjalnych korzyści lub szkodliwego działania metabolitów mikrobiomu jelitowego.

6. Piśmiennictwo

Abdo A, Rayner B, Van Reyk D, Hawkins C, Low-density lipoprotein modified by myeloperoxidase oxidants induces endothelial dysfunction, *Redox Biology* 2017, vol. 13, pp. 623–632

Badimon L, Vilahur G, LDL-cholesterol versus HDL-cholesterol in the atherosclerotic plaque: inflammatory resolution versus thrombotic chaos. *Annals of New York Academy Sciences* 2012; 1254:18-32

Bain MA, Faull R, Fornasini G, Milne RW, Evans AM, Accumulation of Trimethylamine and Trimethylamine-N-Oxide in End-Stage Renal Disease Patients Undergoing Haemodialysis, *Nephrology Dialysis Transplantation* 2006;21(5):1300-4

Baldus S, Heeschen C, Meinertz T, Zeiher AM, Eiserich JP, Münzel T, Simoons ML, Hamm ChW, Myeloperoxidase serum levels predict risk in patients with acute coronary syndromes, *Circulation* 2003, vol. 108, no. 12, pp. 1440–1445

Baltazar-Martins G, Brito de Souza D, Aguilar-Navarro M, Munoz-Guerra J, Del Mar Plata M, Del Coso J, Prevalence and patterns of dietary supplement use in elite Spanish athletes, *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2019;16(1):30

Barrea L, Annunziata G, Muscogiuri G, Laudisio D, Di Somma C, Maisto M, Tenore GC, Colao A, Savastano S, Trimethylamine N-oxide, Mediterranean diet, and nutrition in healthy, normal-weight adults: also, a matter of sex? *Observational Study Nutrition*, 2019;62:7-17

Basati G, Pourfarzam M, Movahedian A, Samsamshariat SZ, Sarrafzadegan N, Reduced plasma adiponectin levels relative to oxidized low density lipoprotein and nitric oxide in coronary artery disease patients, *Clinics* 2011, vol. 66, no. 7, pp. 1129–1135

Bell KE, Snijders T, Zulyniak M, Kumbhare D, Parise G, Chabowski A, Phillips SM, A whey protein-based multi-ingredient nutritional supplement stimulates gains in lean body mass and strength in healthy older men: A randomized controlled trial *Randomized Controlled Trial Public Library of Science One*, 2017;12(7):e0181387

Berliner JA, Heinecke JW, The role of oxidized lipoproteins in atherogenesis, *Free Radical Biology & Medicine* 1996, vol. 20, no. 5, pp. 707–727

Blann AD, Nadar SK, Lip GY, The adhesion molecule P-selectin and cardiovascular disease, *European Heart Journal*, 2003;24(24):2166-79

Bode-Boger SM, Scalera F, Ignarro LJ. The L-arginine paradox: Importance of the Larginine/asymmetrical dimethylarginine ratio, *Pharmacology & Therapeutics* 2007,114:295-306

Bordoni L, Fedeli D, Piangerelli M, Pelikant-Malecka I, Radulska A, Samulak JJ, Sawicka AK, Lewicki L, Kalinowski L, Olek RA, Gabbianelli R., Gender-Related Differences in Trimethylamine and Oxidative Blood Biomarkers in Cardiovascular Disease Patients, *Biomedicines*, 2020a;8(8):238

Bordoni L, Samulak JJ, Sawicka AK, Pelikant-Malecka I, Radulska A, Lewicki L, Kalinowski L, Gabbianelli R, Olek RA, Trimethylamine N-oxide and the reverse cholesterol transport in cardiovascular disease: a cross-sectional study, *Scientific Reports*, 2020b;10(1):18675

Bordoni L, Petracci I, Pelikant-Malecka I, Radulska A, Piangerelli M, Samulak JJ, Lewicki L, Kalinowski L, Gabbianelli R, Olek RA. Mitochondrial DNA copy number and trimethylamine levels in the blood: new insights on cardiovascular disease biomarkers, *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*, 2021 e21694

Brennan ML, Penn MS, Van Lente F, Nambi V, Shishehbor MH, Ronnier DO, Aviles R, Goormastic M, Pepoy ML, McErlean ES, Topol EJ, Nissen SE, Hazen SL, Prognostic value of myeloperoxidase in patients with chest pain, *The New England Journal of Medicine*, 2003; 349: 1595–1604

Cakatay U, Kayali R, Uzun H, Relation of plasma protein oxidation parameters and paraoxonase activity in the ageing population, *Clinical and Experimental Medicine*, 2008 vol. 8, no. 1, pp. 51–57

Casey DP, Pierce GL, Howe KS, Mering MC, Braith RW, Effect of resistance training on arterial wave reflection and brachial artery reactivity in normotensive postmenopausal women, *European Journal of Applied Physiology*, 2007;100:403-8

Chhibber-Goel J, Singhal V, Parakh N, Bhargava B, Sharma A, The Metabolite Trimethylamine-N-Oxide is an Emergent Biomarker of Human Health, *Current Medical Chemistry*, 2017;24(36):3942-3953

Cho CE, Taesuwan S, Malysheva OV, Bender E, Tulchinsky NF, Yan J, Sutter JL, Caudill MA, Trimethylamine-N-oxide (TMAO) response to animal source foods varies among healthy young men and is influenced by their gut microbiota

composition: A randomized controlled trial, *Molecular Nutrition and Food Research*, 2017;61(1)

Chou RH, Chen CY, Chen IC, Huang HL, Lu YW, Kuo CS, Chang CC, Huang PH, Chen JW, Lin SJ, Trimethylamine N Oxide, Circulating Endothelial Progenitor Cells, and Endothelial Function in Patients with Stable Angina, *Scientific Reports*, 2019;9:4249

Coutinho-Wolino KS, de F Cardozo L, de Oliveira Leal V, Mafra D, Stockler-Pinto MB, Can diet modulate trimethylamine N-oxide (TMAO) production? What do we know so far? *European Journal of Nutrition*, 2021;60(7):3567-3584

Da Boit M, Sibson R, Sivasubramaniam S, Meakin JR, Greig CA, Aspden RM, Thies F, Jeromson S, Hamilton DL, Speakman JR, Hambly C, Mangoni AA, Preston T, Gray SR, Sex differences in the effect of fish-oil supplementation on the adaptive response to resistance exercise training in older people: a randomized controlled trial, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2017;105:151-8

Dambrova M, Latkovskis G, Kuka J, Strele I, Konrade I, Grinberga S, Hartmane D, Pugovics O, Erglis A, Liepinsh E, Diabetes is Associated with Higher Trimethylamine N-oxide Plasma Levels, *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 2016;124(4):251-6

Damman K, Valente MA, Voors AA, O'Connor CM, van Veldhuisen DJ, Hillege HL, Renal Impairment, Worsening Renal Function, and Outcome in Patients with Heart Failure: An Updated Meta-Analysis, *European Heart Journal*, 2017, 35, 455–469

Daniels TF, Killinger KM, Michal JJ, Wright RW Jr, Jiang Z, Lipoproteins, cholesterol homeostasis and cardiac health, *International Journal of Biological Science*, 2009;5(5):474-88

Das P, Horton R, Rethinking our approach to physical activity, *Lancet*, 2012;380(9838):189–90

Demirkol S, Balta S, Unlu M, Arslan Z, Cakar M, Kucuk U, Celik T, Arslan E, Turker T, Iyisoy A, Yokusoglu M, Neutrophils/Lymphocytes Ratio in Patients with Cardiac Syndrome X and Its Association with Carotid Intima-Media Thickness, *Clinical and Applied Thrombosis / Hemostasis*, 2014, 20, 250–255

Di Francescomarino S, Sciartilli A, Di Valerio V, Di Baldassarre A, Gallina S, The effect of physical exercise on endothelial function, *Sports Medicine*, 2009;39:797-812

DiNicolantonio JJ, Lavie CJ, Fares H, Menezes AR, O'Keefe JH, L-carnitine in the secondary prevention of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis, Mayo Clinic Proceedings, 2013;88(6):544-51

Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA, Phillips IR, Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome, Nature Genetics, 1997;17(4):491-4

Dunstan WR, Goulding E, The action of methylic iodide on hydroxylamine, Journal of the Chemical Society, Proceedings (1894) 66: 138

Ekelund U, Brown WJ, Steene-Johannessen J, Fagerland MW, Owen N, Powell KE, Bauman AE, Lee IM, Do the associations of sedentary behaviour with cardiovascular disease mortality and cancer mortality differ by physical activity level? A systematic review and harmonised metaanalysis of data from 850 060 participants, British Journal of Sports Medicine, 2019;53:886–94

Erickson ML, Steven K, Zeneng M, Wang J, Brown M, Hazen SL, Kirwan JP, Effects of Lifestyle Intervention on Plasma Trimethylamine N-Oxide in Obese Adults, Nutrients, 2019, 11(1):179

Falony G, Joossens M, Vieira-Silva S, Wang J, Darzi Y, Faust K, Kurilshikov A, Bonder MJ, Valles-Colomer M, Vandeputte D, Tito RY, Chaffron S, Rymenans L, Verspecht C, De Sutter L, Lima-Mendez, D'hoë K, Jonckheere K, Homola D, Garcia R, Tigchelaar EF, Eeckhaut L, Fu J, Henckaerts L, Zhernakova A, Wijmenga C, Raes J, Population-level analysis of gut microbiome variation, Science, 2016 Apr 29;352(6285):560-4

Ferrari R, Merli E, Cicchitelli G, Mele D, Fucili A, Ceconi C, Therapeutic effects of L-carnitine and propionyl L-carnitine on cardiovascular diseases: a review, Annals of the New York Academy of Sciences, 2004 vol. 1033, pp. 79–91

Fortin LJ, Genest J Jr., Measurement of homocysteine in the prediction of arteriosclerosis, Clinical Biochemistry, 1995 vol. 28, no. 2, pp. 155–162

Förstermann U, Xia N, Li H, Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis, Circulation Research 2017;120(4):713-735

Fukami K, Yamagishi S, Sakai K, Kaida Y, Yokoro M, Ueda S, Wada Y, Takeuchi M, Shimizu M, Yamazaki H, Okuda S, Oral L-carnitine supplementation increases trimethylamine-N-oxide but reduces markers of vascular injury in hemodialysis patients, Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2015 Mar;65(3):289-95

Ganguly P, Boserman P, van der Vegt NFA, Shea JE, Trimethylamine N-oxide Counteracts Urea Denaturation by Inhibiting Protein-Urea Preferential Interaction, *Journal of the American Chemical Society*, 2018, 140(1), 483-492

Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, Jafar TH, Heerspink HJ, Mann JF, Matsushita K, Wen CP, Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Risk: Epidemiology, Mechanisms, and Prevention, *The Lancet*, 2013, 382, 339–352

Geisel J, Hennen B, Hübner U, Knapp JP, Herrmann W, The impact of hyperhomocysteinemia as a cardiovascular risk factor in the prediction of coronary heart disease, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2003 vol. 41, no. 11, pp. 1513–1517

Genoni A, Lo J, Lyons-Wall P, Boyce MC, Christophersen CT, Bird A, et al, A Paleolithic diet lowers resistant starch intake but does not affect serum trimethylamine-N oxide concentrations in healthy women, *British Journal of Nutrition*, 2019;121:322-9

Gillett MB, Suko JR, Santoso FO, Yancey PH, Elevated levels of trimethylamine oxide in muscles of deep-sea gadiform teleosts: A high-pressure adaptation? *Journal of Experimental Zoology*, 1997, 279:386–391

Giovannini S, Onder G, Leeuwenburgh Ch, Carter Ch, Marzetti E, Russo A, Capoluongo E, Pahor M, Bernabei R, Landi F, Myeloperoxidase levels and mortality in frail community-living elderly individuals, *The Journal of Gerontology, Series A Biological Sciences and Medical Science*, 2010;65(4):369-76

Grinberga S, Dambrova M, Latkovskis G, Strele I, Konrade I, Hartmane D, Sevostjanovs E, Liepinsh E, Pugovics O, Determination of trimethylamine-N-oxide in combination with L-carnitine and gamma-butyrobetaine in human plasma by UPLC/MS/MS, *Biomedical Chromatography* 2015;29:1670-1674

Grube M, Ameling S, Noutsias M, Köck K, Triebe I, Bonitz K, Meissner K, Jedlitschky G, Herda LR, Reinthaler M, Rohde M, Hoffmann W, Kühl U, Schultheiss HP, Völker U, Felix SB, Klingel K, Kandolf R, Kroemer H, Selective regulation of cardiac organic cation transporter novel type 2 (OCTN2) in dilated cardiomyopathy, *American Journal of Clinical Pathology*, 2011, 178, 2547–2559

Gruppen EG, Garcia, E, Connelly MA, Jeyarajah EJ, Otvos JD, Bakker SJL, Dullaart RPF, Tmao Is Associated with Mortality: Impact of Modestly Impaired Renal Function, *Scientific Reports*, 2017, 7, 13781

Hauet T, Baumert H, Gibelin H, Godart C, Carretier M, Eugene M, Citrate, Acetate and Renal Medullary Osmolyte Excretion in Urine as Predictor of Renal Changes after Cold Ischaemia and Transplantation, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2000, 38, 1093–1098

Heianza Y, Ma W, Manson JE, Rexrode KM, Qi L, Gut Microbiota Metabolites and Risk of Major Adverse Cardiovascular Disease Events and Death: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies, *Journal of American Heart Association*, 2017 Jun 29;6(7):e004947

Huang H, Song L, Zhang H, Zhang H, Zhang J, Zhao W, Influence of L-carnitine supplementation on serum lipid profile in hemodialysis patients: a systematic review and meta- analysis, *Kidney and Blood Pressure Research*, 2013;38:31-41

Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E, Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study, *Circulation*, 1997;96(12):4219-25

Iliceto S, Scrutinio D, Bruzzi P, D'Ambrosio G, Boni L, Di Biase M, Biasco G, Hugenholtz PG, Rizzon P, Effects of L-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the L-Carnitine Ecocardiografia Digitalizzata Infarto Miocardico (CEDIM) Trial, *Journal of the American College of Cardiology*, 1995, 26: 380-387

Kander MC, Cui Y, Liu Z, Gender difference in oxidative stress: A new look at the mechanisms for cardiovascular diseases, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2016, 21, 1024–1032

Kasielski, M, Eusebio MO, Pietruczuk M, Nowak D, The Relationship between Peripheral Blood Mononuclear Cells Telomere Length and Diet—Unexpected Effect of Red Meat, *Journal of Nutrition*, 2016, 15, 68

Kaysen GA, Johansen KL, Chertow GM, Dalrymple LS, Kornak J, Grimes B, Dwyer T, Chassy AW, Fiehn O, Associations of Trimethylamine N-Oxide with Nutritional and Inflammatory Biomarkers and Cardiovascular Outcomes in Patients. New to Dialysis, *Journal of Renal Nutrition*, 2015;25(4):351-6

Ke Y, Li D, Zhao M, Liu C, Liu J, Zeng A, Shi X, Cheng S, Pan B, Zheng L, Hong H, Gut flora-dependent metabolite Trimethylamine-N-oxide accelerates endothelial cell senescence and vascular aging through oxidative stress. *Free Radical Biology and Medicine*, 2018;116:88-100

Keadle SK, Conroy DE, Buman MP, Dunstan DW, Matthews CE, Targeting reductions in sitting time to increase physical activity and improve health, *Medical & Science in Sports & Exercise*, 2017;49:1572–82

KellerJ, Couturier A, Haferkamp M, Most E, Eder K, Supplementation of carnitine leads to an activation of the IGF-1/PI3K/Akt signaling pathway and down regulates the E 3 ligase MuRF1 in skeletal muscle of rats, *Nutrition & Metabolism (London)*, 2013;10(1)

Kita T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Murayama T, Sano H, Moriwaki H, Kataoka H, Nishi E, Horiuchi H, Arai H, Yokode M, Role of oxidized LDL in atherosclerosis, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001 vol. 947, no. 1, pp. 199–206

Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, Britt EB, Fu X, Wu Y, Li L, Smith JD, DiDonato JA, Chen J, Li H, Wu GD, Lewis JD, Warriar M, Brown JM, Krauss RM, Tang WH, Bushman FD, Lusis AJ, Hazen SL, Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis, *Nature Medicine*, 2013;19(5):576-585

Kolodziejczyk J, Saluk-Juszczak J, Wachowicz B, L-Carnitine protects plasma components against oxidative alterations, *Nutrition*, 2011;27(6):693-9

Koubaa N, Nakbi A, Hammami S, Mehri S, Attia N, Farhat MB, Hammami M, Association of the C677T MTHFR polymorphism with homocysteine, ox-LDL levels, and thiolactonase activities in the severity of coronary syndrome, *Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis*, 2010 vol. 16, no. 5, pp. 515–521

Kumemoto R, Yusa K, Shibayama T, Hatori K, Trimethylamine N-oxide suppresses the activity of the actomyosin motor, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012;1820:1597-1604

Kühn T, Rohrmann S, Sookthai D, Johnson T, Katzke V, Kaaks R, von Eckardstein A, Müller D, Intra-individual variation of plasma trimethylamine-N-oxide (TMAO), betaine and choline over 1 year, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2017;55(2):261-268

Landfald B, Valeur J, Berstad A, Raa J, Microbial trimethylamine-N-oxide as a disease marker: something fishy? *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2017;28:1327309

Lang D, Kredan MB, Moat SJ, Hussain SA, Powell CA, Bellamy MF, Powers HJ, Lewis MJ, Homocysteine-induced inhibition of endothelium-dependent relaxation in rabbit aorta: role for superoxide anions, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000 vol. 20, no. 2, pp. 422–427

Lau D, Baldus S, Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease, *Pharmacology & Therapeutics*, 2006; 111:16–26

Lee BJ, Lin JS, Lin YC, Lin PT, Effects of L-carnitine supplementation on oxidative stress and antioxidant enzymes activities in patients with coronary artery disease: a randomized, placebo-controlled trial, *Journal of Nutrition*, 2014;13:79

Lee IM, Shiroma EJ, Lobelo F, Puska P, Blair SN, Katzmarzyk PT, Lancet Physical Activity Series Working Group, Effect of physical inactivity on major non-communicable diseases worldwide: an analysis of burden of disease and life expectancy, *The Lancet*, 2012;380(9838):219–29

Lin TJ, Tang SC, Liao PY, Dongoran RA, Yang JH, Liu CH, A comparison of L-carnitine and several cardiovascular-related biomarkers between healthy vegetarians and omnivores, *Nutrition*, 2019;66:29-37

Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, Ballard C, Banerjee S, Brayne C, Burns A, Cohen_mansfield J, Cooper C, Costafrea SG, Dias A, Fox N, Gitlin LN, Howard R, Kales HC, Kivimäki M, Larson EB, Ogunniyi A, Orgeta V, Ritchie K, Rockwood K, Sampson EL, Samus Q, Schneider LS, Selbæk G, Teri L, Mukadam N, Dementia prevention, intervention, and care, *The Lancet*, 2017;390(10113):2673–734

Lloyd-Jones DM, Hong Y, Labarthe D, Mozaffarian D, Appel LJ, Van Horn L, Greenlund K, Daniels S, Nichol G, Tomaselli GF, Arnett DK, Fonarow GC, Ho PM, Lauer MS, Masoudi FA, Robertson RM, Roger V, Schwamm LH, Sorlie P, Yancy CW, Rosamond WD, American Heart Association Strategic Planning Task F and Statistics C . Defining and setting national goals for cardiovascular health promotion and disease reduction: the American Heart Association's strategic Impact Goal through 2020 and beyond, *Circulation*, 2010;121:586–613

Luneburg N, Xanthakis V, Schwedhelm E, Sullivan LM, Maas R, Anderssohn M, Riederer U, Glazer NL, Vasan RS, Böger H, Reference intervals for plasma L-arginine and the L-arginine: asymmetric dimethylarginine ratio in the Framingham Offspring Cohort, *Journal of Nutrition*, 2011;141:2186-90

Malaguarnera M, Vacante M, Avitabile T, Malaguarnera M, Cammalleri L, Motta M, L-carnitine supplementation reduces oxidized LDL cholesterol in patients with diabetes, *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2009 vol. 89, no. 1, pp. 71–76

Malek Mahdavi A, Mahdavi R, Kolahi S, Zemestani M, Vatankhah AM, L-Carnitine supplementation improved clinical status without changing oxidative stress and lipid profile in women with knee osteoarthritis, *Nutrition Research*, 2015;35:707-715

Malle E, Marsche G, Arnhold J, Davies MJ, Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2006 vol. 1761, no. 4, pp. 392–415

Manor O, Zubair N, Conomos MP, Xu X, Rohwer JE, Krafft CE, Lovejoy JC, Magis AT, A Multi-omic Association Study of Trimethylamine N-Oxide, *Cell Reports*, 2018;24(4):935-946

Martínez-González MA, Gea A, Ruiz-Canela M, The Mediterranean Diet and Cardiovascular Health, *Circulation Research*, 2019;124(5):779-798

Meijuan Xu, Bhatt DK, Yeung CK, Claw CG, Chaudhry AS, Gaedigk A, Pearce RE, Broeckel U, Gaedigk R, Nickerson DA, Schuetz E, Rettie AE, Leeder JS, Thummel KE, Prasad B, Genetic and Nongenetic Factors Associated with Protein Abundance of Flavin-Containing Monooxygenase 3 in Human Liver, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2017;363(2):265-274

Meotti FC, Jameson GNL, Turner R, Harwood DT, Stockwell S, Rees MD, Thomas SR Kettle AJ, Urate as a physiological substrate for myeloperoxidase: implications for hyperuricemia and inflammation, *The Journal of Biological Chemistry*, 2011 vol. 286, no. 15, pp. 12901–12911

Messenger J, Clark S, Massick S, Bechtel M, A review of trimethylaminuria: (fish odor syndrome), *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology*, 2013;6(11):45-8

Meuwese MC, Stroes ESG, Hazen SL, van Miert JN, Kuivenhoven JA, Schaub RG, Wareham NJ, John RL, Kastelein JP, Khaw KT, Boekholdt SM, Serum myeloperoxidase levels are associated with the future risk of coronary artery disease in apparently healthy individuals: the EPIC-Norfolk prospective population study, *Journal of the American College of Cardiology*, 2007 vol. 50, no. 2, pp. 159–165

Meyer KA, Benton TZ, Bennett BJ, Jacobs DR Jr., Lloyd-Jones DM, Gross MD, Carr JJ, Gordon-Larsen P, Zeisel SH, Microbiota-Dependent Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Coronary Artery Calcium in the Coronary Artery Risk Development in

Young Adults Study (CARDIA), Journal of the American Heart Association, 2016;5(10):e003970

Miller MJ, Bostwick BL, Kennedy AD, Donti T, Sun Q, Sutton VR, Elsea SH, Chronic Oral L-Carnitine Supplementation Drives Marked Plasma TMAO Elevations in Patients with Organic Acidemias Despite Dietary Meat Restrictions, Journal of Inherited Metabolic Disease Reports, 2016;30:39-44

Missailidis C, Hällqvist J, Qureshi AR, Barany P, Heimbürger O, Lindholm B, Stenvinkel P, Bergman P, Serum Trimethylamine-N-Oxide Is Strongly Related to Renal Function and Predicts Outcome in Chronic Kidney Disease, Public Library of Science One, 2016;11(1):e0141738

Mohammadi M, Hajhossein Talasaz A, Alidoosti M, Preventive effect of l-carnitine and its derivatives on endothelial dysfunction and platelet aggregation, Clinical Nutrition ESPEN, 2016;15:1-10

Mueller DM, Allenspach M, Othman A, Saely CH, Muendlein A, Vonbank A, Drexel H, von Eckardstein A, Plasma levels of trimethylamine-N-oxide are confounded by impaired kidney function and poor metabolic control, Atherosclerosis, 2015;243(2):638-44

Ndrepepa G, Braun S, Haase H U, Schulz S, Ranftl S, Hadamitzky M, Mehilli J, Schömig A, Kastrati A, Prognostic value of uric acid in patients with acute coronary syndromes, The American Journal of Cardiology, 2012 vol. 109, no. 9, pp. 1260– 1265

Nordlie FG, Environmental influences on regulation of blood plasma/serum components in teleost fishes: a review, Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2009, 19(4), 481-564

Nygård O, Vollset SE, Refsum H, Tverdal SA, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvåle G, Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile: The Hordaland homocysteine study, Journal of the American Medical Association, 1995 vol. 274, no. 19, pp. 1526–1533

Obeid R, Awwad HM, Keller M, Geisel J, Trimethylamine-N-oxide and its biological variations in vegetarian, European Journal of Nutrition, 2017;56:2599-609

Olek RA, Samulak JJ, Sawicka AK, Hartmane D, Grinberga S, Pugovics O, Lysiak-Szydlowska W, Increased Trimethylamine N-Oxide Is Not Associated with Oxidative Stress Markers in Healthy Aged Women, Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019;2019:6247169

- Olson TP**, Dengel DR, Leon AS, Schmitz KH, Moderate resistance training and vascular health in overweight women, *Medicine & Science in Sports & Exercise*, 2006;38:1558-64
- Pamukcu B**, Lip GY, Devitt A, Griffiths H, Shantsila E, The role of monocytes in atherosclerotic coronary artery disease, *Annals of Medicine*, 2010;42(6):394-403
- Paul S**, Polyglutamine-mediated neurodegeneration: use of chaperones as prevention strategy. *Biochemistry (Moscow)*, 2007;72:359-366
- Patzelt J**, Langer HF, Platelets in angiogenesis, *Current Vascular Pharmacology*, 2012;10(5):570-7
- Pfanzagl B**, Tribl F, Koller E, Möslinger T, Homocysteine strongly enhances metal-catalyzed LDL oxidation in the presence of cystine and cysteine, *Atherosclerosis*, 2003 vol. 168, no. 1, pp. 39–48
- Podrez A**, Abu-Soud HM, Hazen SL, Myeloperoxidase-generated oxidants and atherosclerosis, *Free Radical Biology & Medicine*, 2000 vol. 28, no. 12, pp. 1717–1725
- Randrianarisoa E**, Lehn-Stefan A, Wang X, Hoene M, Peter A, Heinzmann SS, Zhao X, Königsrainer I, Königsrainer A, Balletshofer B, Machann J, Schick F, Fritsche A, Häring HU, Xu G, Lehmann R, Stefan N, Relationship of Serum Trimethylamine N-Oxide (TMAO) Levels with early Atherosclerosis in Humans, *Scientific Reports*, 2016;6:26745
- Rebouche CJ**, Quantitative estimation of absorption and degradation of a carnitine supplement by human adults, *Metabolism*, 1991;40:1305-10
- Rebouche CJ**, Chenard CA, Metabolic fate of dietary carnitine in human adults: identification and quantification of urinary and fecal metabolites, *Journal of Nutrition*, 1991;121:539-46
- Rebouche CJ**, Mack DL, Edmonson PF, L-Carnitine dissimilation in the gastrointestinal tract of the rat, *Biochemistry*, 1984;23(26):6422-6
- Ribas GS**, Vargas CR, Wajner M, L-carnitine supplementation as a potential antioxidant therapy for inherited neurometabolic disorders, *Gene*, 2014;533(2):469-76
- Rohrmann S**, Linseisen J, Allenspach M, von Eckardstein A, Müller D, Plasma Concentrations of Trimethylamine-N-oxide Are Directly Associated with Dairy Food Consumption and Low-Grade Inflammation in a German Adult Population, *Journal of Nutrition*, 2016;146(2):283-9

Romano KA, Vivas EI, Amador-Noguez D, Rey FE, Intestinal microbiota composition modulates choline bioavailability from diet and accumulation of the proatherogenic metabolite trimethylamine-N-oxide, *MBio*, 2015;6(2): e02481

Runge MS, Molnar K, Madamanchi NR, „Old" hearts and arteries: the role of oxidative stress, *Transaction of the American Clinical and Climatological Association*, 2010;121:52-8; discussion 59-60

Sahebkar A, Effect of L-carnitine Supplementation on Circulating C-reactive Protein Levels: A Systematic Review and Meta-Analysis, *Biochemical Medicine*, 2015;34(2):151-159

Samulak JJ, Sawicka AK, Hartmane D, Grinberga S, Pugovics O, Lysiak-Szydlowska W, Olek RA, L-Carnitine Supplementation Increases Trimethylamine-N-Oxide but Not Markers of Atherosclerosis in Healthy Aged Women, *Annals of Nutrition Metabolism*, 2019a, 74, 11–17

Samulak JJ, Sawicka AK, Samborowska E, Olek RA, Plasma Trimethylamine-N-oxide following Cessation of L-carnitine Supplementation in Healthy Aged Women, *Nutrients*, 2019b;11(6):1322

Sawicka AK, Hartmane D, Lipinska P, Wojtowicz E, Lysiak-Szydlowska W, Olek RA, L-Carnitine Supplementation in Older Women. A Pilot Study on Aging Skeletal Muscle Mass and Function, *Nutrients*, 2018;10(2):255

Sawicka AK, Renzi G, Olek RA, The bright and the dark sides of L-carnitine supplementation: a systematic review, *Journal of the International Society of Sports Nutrition*, 2020;17(1):49

Schiattarella GG, Sannino A, Toscano E, Giugliano G, Gargiulo G, Franzone A, Trimarco B, Esposito G, Perrino C, Gut Microbe-Generated Metabolite Trimethylamine-N-Oxide as Cardiovascular Risk Biomarker: A Systematic Review and Dose-Response Meta-Analysis, *European Heart Journal*, 2017, 38, 2948–2956

Schuch FB, Vancampfort D, Richards J, Rosenbaum S, Ward PB, Stubbs B, Exercise as a treatment for depression: A meta-analysis adjusting for publication, *Journal of Psychiatric Research*, 2016;77:42–51

Seals DR, Nagy EE, Moreau KL, Aerobic exercise training and vascular function with ageing in healthy men and women, *The Journal of Physiology*, 2019;597:4901-14

Serban MC, Sahebkar A, Mikhailidis DP, Toth PP, Jones SR, Muntner P, Blaha MJ, Andrica F, Martin SS, Borza C, Lip GY, Ray KK, Rysz J, Hazen SL, Banach M, Impact of L-carnitine on plasma lipoprotein(a) concentrations: A systematic review

and meta-analysis of randomized controlled trials, *Medical Scientific Reports*, 2016;6:19188

Shang R, Sun Z, Li H, Effective dosing of L-carnitine in the secondary prevention of cardiovascular disease: a systematic review and meta-analysis, *BMC Cardiovascular Disorders*, 2014;14:88

Shepshelovich J , Goldstein-Magal L, Globerson A, M Yen P, Rotman-Pikielny P, Hirschberg K, Protein synthesis inhibitors and the chemical chaperone TMAO reverse endoplasmic reticulum perturbation induced by overexpression of the iodide transporter pendrin, *Journal of Cell Science*, 2005;118(Pt 8):1577-86

Silva RP, Carvalho LAC, Patricio ES, Bonifacio JPP, Chaves-Filho AB, Miyamoto s, Meotti FC, Identification of urate hydroperoxide in neutrophils: a novel pro-oxidant generated in inflammatory conditions, *Free Radical Biology & Medicine*, 2018 vol. 126, pp. 177–186

Sinning C, Schnabel R, Peacock WF, Blankenberg S, Up and coming markers: myeloperoxidase, a novel biomarker test for heart failure and acute coronary syndrome application? *Congestive Heart Failure*, 2008; 14: 46–48

Song X, Qu H, Yang Z, Rong J, Cai W, Zhou H, Efficacy and Safety of L-Carnitine Treatment for Chronic Heart Failure: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials, *BioMed Research International*, 2017, 6274854

Starkebaum G, Harlan JM, Endothelial cell injury due to copper-catalyzed hydrogen peroxide generation from homocysteine, *The Journal of Clinical Investigation*, 1986 vol. 77, no. 4, pp. 1370–1376

Steele CN, Baugh ME, Griffin LE, Neilson AP, Davy BM, Hulver MW, Davy KP, Fasting and postprandial trimethylamine N-oxide in sedentary and endurance-trained males following a short-term high-fat diet, *Physiological Reports*, 2021;9(16):e14970

Stocker R, Keaney JF Jr., Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiological Reviews*, 2004;84(4):1381-478

Strain T, Brage S, Sharp SJ, Richards J, Tainio M, Ding D, Benichou J, Kelly P, Use of the prevented fraction for the population to determine deaths averted by existing prevalence of physical activity: a descriptive study, *The Lancet Global Health*, 2020;8(7):e920–e30

Strasser B, Schobersberger W, Evidence of resistance training as a treatment therapy in obesity, *Journal of Obesity & Metabolic Syndrome*, 2011; 2011: 482564

Stubbs JR, House JA, Ocque AJ, Zhang S, Johnson C, Kimber C, Schmidt K, Gupta A, Wetmore JB, Nolin TD, Spertus JA, Yu AS, Serum Trimethylamine-N-Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden, *Journal of the American Society of Nephrology*, 2016;27(1):305-13

Sun X, Jiao X, Ma Y, Liu Y, Zhang L, He Y, Chen Y, 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*, 2016;481(1-2):63-70

Suzuki T, Heaney LM, Bhandari SS, Jones DJ, Ng LL, Trimethylamine N-Oxide and Prognosis in Acute Heart Failure, *Heart*, 2016, 102, 841–848

Szostak B, Laurant P, The forgotten face of regular physical exercise: a 'natural' anti-atherogenic activity, *Clinical Science (London)*, 2011;121(3):91-106

Taesuwan S, Cho CE, Malysheva OV, Bender E, King JH, Yan J, Thalacker-Mercer AE, Caudill MA, The metabolic fate of isotopically labeled trimethylamine-N-oxide (TMAO) in humans, *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2017;45:77-82

Taguchi K, Elias BC, Brooks CR, Ueda S, Fukami K, Uremic Toxin-Targeting as a Therapeutic Strategy for Preventing Cardiorenal Syndrome, *Circulation Journal*, 2019;84:2-8

Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, Wu Y, Hazen SL, Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk, *New England Journal of Medicine*, 2013;368(17):1575-84

Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatsuma-Boyle B, Li XS, Levison BS, Hazen SL, Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease, *Circulation Research*, 2015;116(3):448-55

Tang WH, Brennan ML, Philip K, Tong W, Mann S, Van Lente F, Hazen SL, Plasma myeloperoxidase levels in patients with chronic heart failure, *American Journal of Cardiology*, 2006; 98: 796–799

Tang WH, Katz R, Brennan ML, Aviles RJ, Tracy RP, Psaty BM, Hazen SL, Usefulness of myeloperoxidase levels in healthy elderly subjects to predict risk of developing heart failure, *American Journal of Cardiology*, 2009; 103: 1269–1274

Teng N, Maghazal GJ, Talib J, Rashid I, Lau AK, Stocker R, The roles of myeloperoxidase in coronary artery disease and its potential implication in plaque rupture, *Redox Report*, 2017 vol. 22, no. 2, pp. 51–73

Tong TYN, Appleby PN, Bradbury KE, Perez-Cornago A, Travis RC, Clarke R, Key T, Risks of ischaemic heart disease and stroke in meat eaters, fish eaters, and vegetarians over 18 years of follow-up: results from the prospective EPIC-Oxford study, *British Medical Journal*, 2019;366:14897

Torres N, Guevara-Cruz M, Velázquez-Villegas LA, Tovar AR, Nutrition and Atherosclerosis, *Archives of Medical Research*, 2015 Jul;46(5):408-26

Tremblay MS, Aubert S, Barnes JD, Saunders TJ, Carson V, Latimer-Cheung AE, Chastin SFM, Altenburg TM, Chinapaw MJM, Sedentary Behavior Research Network (SBRN) – Terminology consensus project process and outcome, *International Journal of Behavioral Nutrition and Physical Activity*, 2017;14(1):75

Trøseid M, Hov JR, Nestvold TK, Thoresen H, Berge RK, Svardal A, Lappegård KT, Major Increase in Microbiota-Dependent Proatherogenic Metabolite TMAO One Year After Bariatric Surgery, *Metabolic Syndrom and Related Disorders*, 2016;14(4):197-201

Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, Feldstein AE, Britt EB, Fu X, Chung YM, Wu Y, Schauer P, Smith JD, Allayee H, Tang WH, DiDonato JA, Lusis AJ, Hazen SL, Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease, *Nature*, 2011;472(7341):57-63

Wang Z, Levison BS, Hazen JE, Donahue L, Li XM, Hazen SL, Measurement of trimethylamine-N-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Analytical Biochemistry*, 2014;455:35-40

Wang ZY, Liu YY, Liu GH, Lu HB, Mao CY, L-Carnitine and Heart Disease, *Life Science*, 2018, 194, 88–97

Wardenaar FC, Ceelen IJ, Van Dijk JW, Hangelbroek RW, Van Roy L, Van der Pouw B, De Vries JH, Mensink M, Witkamp RF, Nutritional supplement use by Dutch elite and sub-elite athletes: does receiving dietary counseling make a difference?, *International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism*, 2017;27(1):32–42

West AA, Shih Y, Wang W, Oda K, Jaceldo-Siegl K, Sabate J, Haddad E, Rajaram S, Caudill MA, Burns-Whitmore B, Egg n-3 fatty acid composition modulates biomarkers of choline metabolism in free-living lacto-ovo-vegetarian women of reproductive age, *Journal of the Academy Nutrition and Dietetics*, 2014;114:1594-600

Winter BK, Fiskum G, Gallo LL, Effects of L-carnitine on serum triglyceride and cytokine levels in rat models of cachexia and septic shock, *British Journal of Cancer*, 1995;72(5):1173-9.

Winter SE, Lopez CA, Bäumlér AJ, The dynamics of gut-associated microbial communities during inflammation, *EMBO Reports*, 2013;14(4):319-27

Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ, Myeloperoxidase, *Current Opinion in Hematology*, 2000; 7: 53–58

Wong AP, Niedzwiecki A, Rath M, Myocardial energetics and the role of micronutrients in heart failure: a critical review, *American Journal of Cardiovascular Disease*, 2016 vol. 6, no. 3, pp. 81–92

Woodhouse PR, Khaw KT, Plummer M, Seasonal variation of serum lipids in an elderly population *Age Ageing*, 1993;22:273-278

World Health Organization. Global recommendations on physical activity for health. Geneva: World Health Organization; 2010. <https://www.who.int/dietphysicalactivity/global-PA-recs-2010.pdf>

World Health Organization. GUIDELINES ON PHYSICAL ACTIVITY AND SEDENTARY BEHAVIOUR 2020. <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240015128>

Wranne L, Urinary excretion of trimethylamine and trimethylamine oxide following trimethylamine-administration to normals and to patients with liver disease, *Acta Medica Scandinavica*, 1956;153(6):433-41

Vallance HD, Koochin A, Branov J, Rosen-Heath A, Bosdet T, Wang Z, Hazen SL, Horvath G, Marked Elevation in Plasma Trimethylamine-N-Oxide (Tmao) in Patients with Mitochondrial Disorders Treated with Oral L-Carnitine, *Molecular Genetics Metabolism Reports*, 2018, 15, 130–133

Violi F, Loffredo L, Carnevale R, Pignatelli P, Pastori D, Atherothrombosis and Oxidative Stress: Mechanisms and Management in Elderly, *Antioxid Redox Signal*, 2017;27(14):1083-1124

Vita JA, Brennan ML, Gokce N, Mann SA, Goormastic M, Shishehbor H, Penn MS, Keaney JF, Hazen SL, Serum myeloperoxidase levels independently predict endothelial dysfunction in humans, *Circulation*, 2004 vol. 110, no. 9, pp. 1134–1139

Yancey PH, Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses, *Experimental Biology and Medicine*, 2005;208(Pt 15):2819-30

Yancey PH, Blake WR, Conley J, Unusual organic osmolytes in deep-sea animals: adaptations to hydrostatic pressure and other perturbants, *Comperative Biochemistry & Physiology A Molecular & Integrative Physiology*, 2002;133(3):667-76

Yancey PH, Rhea MD, Kemp KM, Bailey DM, Trimethylamine oxide, betaine and other osmolytes in deep-sea animals: Depth trends and effects on enzymes under hydrostatic pressure, *Cellular and Molecular Biology*, 2004, 50(4), 371-376

Yin M, Loyer X, Boulanger CM, Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis, *European Journal of Pharmacology*, 2015;763(Pt A):90-103

Yong F, Pedersen O, Gut microbiota in human metabolic health and disease, *Nature Reviews Microbiology*, 2021;19(1):55-71

Yousuf O, Mohanty BD, Martin SS, Joshi PH, Blaha MJ, Nasir K, Blumenthal RS, Budoff MJ, High-sensitivity C-reactive protein and cardiovascular disease: a resolute belief or an elusive link?, *Journal of the American College of Cardiology*, 2013;62(5):397-408

Yu J, Ye J, Liu X, Han Y, Wang C, Protective effect of L-carnitine against H₂O₂-induced neurotoxicity in neuroblastoma (SH-SY5Y) cells, *Neurological Research*, 2011;33(7):708-16

Zhang AQ, Mitchell, SC, Smith RL, Dietary Precursors of Trimethylamine in Man: A Pilot Study, *Food and Chemical Toxicology*, 1999, 37, 515–520

Zhang C, Yang M, Zhao K, Insight into the effect mechanism of urea-induced protein denaturation by dielectric spectroscopy, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2017, 19(47), 32007-32015

Zhao M, Jiang Q, Wang W, Geng M, Wang M, Han Y, Wang C, The Roles of Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Perfluorooctanoic Acid-Induced Developmental Cardiotoxicity and l-Carnitine Mediated Protection, *International Journal of Molecular Sciences*, 2017;18(6)

Zhu Y, Li Q, Jiang H, Gut microbiota in atherosclerosis: focus on trimethylamine N-oxide, *Acta Pathologica Microbiologica at Immunologica Scandinavica*, 2020; 128: 353–366

Wykaz rycin

Ryc. 1. Schemat budowy. Kolory reprezentują: niebieski – azot (N), czerwony – tlen (O), czarny – węgiel (C), biały – wodór (H).

Ryc. 2. Uproszczony schemat metabolizmu TMA; potencjalne działanie TMAO (Chhibber-Goel i wsp. 2017; zmodyfikowane).

Ryc. 3. Uproszczony schemat przemiany TMA w TMAO przy udziale ROS i RNS (Winter i wsp. 2013; zmodyfikowane).

Ryc. 4. Czynniki przyczyniające się do rozwoju miażdżycy indukowane stresem oksydacyjnym (Runge i wsp. 2010 zmodyfikowany).

Ryc. 5. Schemat badania nr 1 (badanie 1A – 24 tygodnie suplementacji; badanie 1B – 12 miesięczna kontynuacja po zakończeniu suplementacji). Strzykawki wskazują terminy, w których pobierana była krew. Szczegóły procedur opisane są poniżej.

Ryc. 6. Schemat blokowy interwencji i pobierania próbek w badaniu 1.

Ryc. 7. Schemat blokowy interwencji i pobierania próbek w badaniu 2.

Ryc. 8. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „wypychanie ciężaru na suwnicy”.

Ryc. 9. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „wyprost nóg z obciążeniem”.

Ryc. 10. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „przyciąganie drążka wyciągu dolnego w siadzie”.

Ryc. 11. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „ściąganie drążka wyciągu górnego z szerokim uchwytem”.

Ryc. 12. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „wyciskanie sprzed klatki piersiowej siedząc”.

Ryc. 13. Pozycja wyjściowa i pozycja końcowa w ćwiczeniu „wyciskanie nad głowę siedząc”.

Ryc. 14. Schemat blokowy interwencji w badaniu 3.

Ryc. 15. Stężenie TMAO w osoczu grup placebo (o) oraz otrzymujących L karnitynę (♦); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ w porównaniu z placebo w tym samym czasie # $p < 0,005$, ## $p < 0,001$ w porównaniu do czasu 0 w tej samej grupie.

Ryc. 16. Stężenie wolnej karnityny w osoczu placebo (o) oraz suplementowanych L-karnityną (♦); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ w porównaniu z placebo w tym samym czasie; # $p < 0,005$, ## $p < 0,001$ w porównaniu do czasu 0 w tej samej grupie.

Rys. 17. Stężenia TMAO w osoczu w grupach placebo i L-karnityny. * $p < 0,001$ w porównaniu z grupą placebo w tym samym czasie, ‡ $p < 0,001$ w porównaniu do wyników uzyskanych po zakończeniu suplementacji w tej samej grupie.

Ryc. 18. Mediana z zakresem międzykwartylowym stężeń TMAO w osoczu w grupie kontrolnej (biała) z suplementacją L-leucyną (przekątna) oraz z suplementacją L-leucyną + L-karnityną (kreskowanie). *, ** i *** oznaczają wartości p odpowiednio 0,05, 0,01 i 0,001.

Ryc. 19. TMAO w zależności od grupy badanej; średnia arytmetyczna oraz 95% przedziały ufności.

Ryc. 20. TMA w zależności od grupy badanej; średnia arytmetyczna oraz 95% przedziały ufności.

Ryc. 21. TMAO/TMA w zależności od grupy badanej; średnia arytmetyczna oraz 95% przedziały ufności.

Spis tabel

Tabela 1. Stężenie TMAO w osoczu i mięśniach ryb dorszokształtnych w zakresach głębokości występowania różnych gatunków. (Gillett i wsp. 1997).

Tabela 2. Charakterystyka badanych w badaniu 1. (Średnie $\pm$ odchylenie standardowe).

Tabela 3. Charakterystyka badanych w badaniu 2 z podziałem na podgrupy (średnia $\pm$ SEM).

Tabela 4. Charakterystyka badanych w badaniu 3.

Tabela 5. Biomarkery stanu zapalnego w surowicy w grupach L-karnityny i placebo przed i po 24 tygodniach suplementacji.

Tabela 6. Metabolity lipidów w surowicy w grupach L-karnityny i placebo przed i po 24 tygodniach suplementacji.

Tabela 7. Stężenie wybranych metabolitów w surowicy w grupach L-karnityny i placebo przed i po 24 tygodniach suplementacji.

Tabela 8. Markery stresu oksydacyjnego w grupach L-karnityna i placebo: przed rozpoczęciem, oraz po 12 i 24 tygodniach suplementacji.

Tabela 9. Metabolity profilu lipidowego w surowicy w grupach L-karnityny i placebo po 24 tygodniach suplementacji (koniec) oraz 4 i 12 miesięcy po zaprzestaniu suplementacji L-karnityną i placebo.

Tabela 10. Liczba krążących białych krwinek w grupach L-karnityny i placebo po 24 tygodniach suplementacji (koniec) oraz 4 i 12 miesięcy po zaprzestaniu suplementacji.

Tabela 11. Częstotliwość spożycia ryb.

Tabela 12. Liczba krążących białych krwinek i markery stanu zapalnego przed i po 24 tygodniach treningu oporowego w grupie kontrolnej i suplementowanych (średnia $\pm$ SE).

Tabela 13. Metabolity lipidów w surowicy przed i po 24 tygodniach interwencji (średnia $\pm$ SEM).

Tabela 14. Spożycie energii i składników odżywczych w diecie (średnia $\pm$ SEM).

Tabela 15. Wyniki analizy jednozmiennowej, testem efektów między obiektowych oraz analiza post-hoc testem HSD Tukeya.

Wykaz skrótów

μM - mikromole

1RM – jedno maksymalne powtórzenie

ADMA – asymetryczna dimetyloarginina

AIP – wskaźnik aterogenności (wskaźnik miażdżycowy)

ALT – aminotransferaza Alaninowa

Alt – aminotransferaza alaninowa

Ang. - angielska

ANOVA – analiza wariancji

AST – aminotransferaza Asparginianowa

ATP – adenzyno – 5' - trzyfosforan

ATPaza – adenzynotrzyfosfataza fosfohydrolazy ATP

BMI – Body Mass Index – wskaźnik masy ciała

ChNS – choroba niedokrwienna serca

ChSN – choroby sercowo - naczyniowe

CKD – przewlekła niewydolność nerek

CRP- białko C – reaktywne

DBP – ciśnienie rozkurczowe krwi

EDTA – kwas etylenodiaminotetraoctowy

FBG – poziom glukozy na czczo

FMO3 – flawinomonooksygenaza 3

g – gramy

HCY – homocysteina

HDL – lipoproteina wysokiej gęstości

HOMA – IR – model homeostatycznej oceny insulinooporności

HSD Tukeya – test post hoc Tukeya

ICAM-1 – cząsteczka adhezji międzykomórkowej – 1

IGF-1 – insulinopodobny czynnik wzrostu – 1

IL-6 – interleukina-6

K - kontrola

LDL – lipoproteina niskiej gęstości

Leuko – leukocyty

Lympho (lym) – limfocyty
mg – miligramy
MJ - megadżul
Mono – monocyty
MPO – mieloperoksydaza
mRNA – matrycowy kwas rybonukleinowy
n – liczba uczestników
NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoadeninowego
NCN – Narodowe Centrum Nauki
NEFA – nieestryfikowane kwasy tłuszczowe
Neutro (neutr)– neutrofile
NKBBN - Niezależna Komisja Bioetyczna ds. Badań Naukowych
NLR – neutrofile-limfocyty
O - tlen
Ox-LDL – utlenowany LDL
OZW – ostry zespół wieńcowy
P – poziom prawdopodobieństwa
PC – białko karbonylowe
PLT – płytki krwi
RNS – reaktywne formy azotu
ROS – reaktywne formy tlenu
SBP – ciśnienie skurczowe krwi
SChW – stabilna choroba wieńcowa
SD – średnie odchylenie standardowe
SDMA – symetryczna dimetyloarginina
SE – błąd standardowy
SELL – selektyna L
SELP – selektyna P
SEM – błąd standardowy średnia
Tch – cholesterol całkowity
TG - trójglicerydy
TMA - trimetyloamina
TMAO – N Tlenek Trimetyloaminy

TNF- α – czynnik martwicy nowotworów α

UA – kwas moczowy

UPLC / MS/MS – ultrasprawa chromatografia cieczowa

USA – Stany Zjednoczone

VCAM-1 – cząsteczka adhezji komórek naczyniowych – 1

WBC – białe krwinki

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia

Wsp. - współautor

ω -3 – kwas linolenowy

ω -9 – kwas oleinowy

Abstrakt

The purpose of this study was I). determining whether the concentration of trimethylamine N-oxide (TMAO) in the blood plasma is modified during long-term carnitine supplementation and after its discontinuation, and whether it has an impact on selected indicators of inflammation and oxidative stress in healthy people; II). determining whether the 24-week resistance training changes the concentration of TMAO in the plasma, and to what extent the inclusion of carnitine supplementation in the training process will change the concentration of TMAO; III). determining whether the plasma concentration of TMAO in people with cardiovascular disease (CVD) differs from the concentration of this compound in healthy people.

Three separate studies were analyzed in the study. The determinations were made on human blood of women aged 43-91 years who had not been diagnosed with trimethylaminuria.

The main results of this study indicate that the concentration of TMAO in human blood plasma may be modified by carnitine supplementation. No significant changes in the concentration of TMAO were found after 24 weeks of resistance training. There were also no differences between the concentration of TMAO in the blood plasma of women with CVD and the group of healthy women. It should also be emphasized that despite a significant increase in the concentration of TMAO in the plasma resulting from carnitine supplementation, no changes in the lipid profile and selected indicators of inflammation and oxidative stress were observed. Importantly, in people with normal kidney function, the concentration of TMAO in plasma returns to the values before the supplementation period.

Carnitine and TMAO have opposite properties. Carnitine has anti-inflammatory and antioxidant properties. In turn, TMAO has pro-inflammatory and pro-oxidative properties. Interestingly, carnitine supplementation increases the concentration of circulating TMAO. In addition, the beneficial properties of regular exercise are well known, and our research has shown that the 24-week training process did not affect plasma TMAO levels. Nevertheless, differences in the concentration of trimethylamine (TMA) were observed between people with CVD and healthy people. Therefore, more research is needed to determine the potential benefits or harmful effects of metabolites in the gut microbiome.