

Lek. wet. Klaudia Maksymiuk

Wpływ trimetyloaminy na funkcje układu krążenia i nerek.

**Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki medyczne**

Promotor: prof. dr hab. n. med. Marcin Ufnal

Zakład Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej Warszawskiego Uniwersytetu
Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2024

Słowa kluczowe

trimetyloamina (TMA), tlenek trimetyloaminy (TMAO), cholina, karnityna, choroby sercowo-naczyniowe, przewlekła niewydolność nerek, nadciśnienie, zespół sercowo-nerkowy, monooksygenazy flawinowe (FMOs), metabolity bakteryjne

Keywords

trimethylamine (TMA), trimethylamine oxide (TMAO), choline, carnitine, cardiovascular disease (CVD), chronic kidney disease, hypertension, cardiorenal syndrome (CRS), flavin-containing monooxygenases (FMOs), bacterial metabolites

Nazwa i numer projektu badawczego

Badania wchodzące w skład rozprawy doktorskiej zostały zrealizowane w ramach projektu: Opus 19 2020/37/B/ NZ5/00366, pt. „(TNT-CVD) Trimetyloamina jako toksyna w chorobach układu krążenia” oraz Opus 16 UMO-2018/31/B/NZ5/00038, pt. „Rola piezolitów i osmolitów w układzie krążenia w zdrowiu i chorobie” z Narodowego Centrum Nauki. Kierownikiem projektów jest prof. dr n. med. Marcin Ufnal.

Dedukacje

*Składam serdeczne podziękowania
Panu Profesorowi Marcinowi Ufnalowi,
którego wiedza, profesjonalizm i zaangażowanie były dla mnie
nieocenionym wsparciem na każdym etapie tworzenia niniejszej pracy.*

*Dziękuję moim współpracownikom
z Zakładu Fizjologii i Patofizjologii Eksperymentalnej
za przyjazną atmosferę, życzliwość
oraz pomoc w przeprowadzeniu badań doświadczalnych.*

Szczególne podziękowania kieruję do Izy, Kingi, Marty,

Marka, Mateusza, Piotrka i Tomka.

*Praca ta powstała dzięki Waszemu wsparciu i zaangażowaniu,
za co jestem Wam bardzo wdzięczna.*

Podziękowania kieruję także do Pani Krysi, która zawsze pomagała dobrą radą.

*Dziękuję również mojemu Mężowi
za wsparcie, zrozumienie i cierpliwość,
a także mojej córce Karolinie,
która zawsze była dla mnie największą motywacją.*

Dziękuję!

Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską

1. **Maksymiuk K.**, Szudzik M., Samborowska E., Chabowski D., Konop M., Ufnal M. Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases. *PLoS One*, 2024; 19(1): e0297474. DOI: 10.1371/journal.pone.0297474. **IF 3,7, Punkty MNiSW wg listy z 2024r: 100.**
2. **Maksymiuk K.M.**, Szudzik M., Gawryś-Kopczyńska M., Onyszkiewicz M., Samborowska E., Mogilnicka I., Ufnal M. Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats. *Journal of Translational Medicine*, 2022; Oct 15;20(1):470. DOI: 10.1186/12967-022-03687-y. **IF 7,4, Punkty MNiSW wg listy z 2024r: 100.**

Wszystkie prace zostały opublikowane i są zamieszczone w rozprawie doktorskiej w wersji oryginalnej (format PDF).

SPIS TREŚCI

Słowa kluczowe	2
Nazwa i numer projektu badawczego	3
Dedykacje	4
Wykaz publikacji stanowiących pracę doktorską	5
Wykaz stosowanych skrótów	7
Streszczenie w języku polskim.....	8
Streszczenie w języku angielskim	10
Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl	12
Założenia i cel pracy	19
PUBLIKACJA nr 1	21
PUBLIKACJA nr 2	43
Podsumowanie i wnioski.....	58
Opinie Komisji Etycznej	61
Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji	68

Wykaz stosowanych skrótów

CVD – choroby sercowo-naczyniowe

FMOs – monooksygenazy flawinowe

KIM-1 - cząsteczka-1 uszkodzenia nerek

TMA - trimetyloamina

TMAO – tlenek trimetyloaminy

Streszczenie w języku polskim

Wpływ trimetyloaminy na funkcje układu krążenia i nerek.

W ostatnich latach duże zainteresowanie wzbudza wpływ związków wytwarzanych przez mikrobiotę jelitową na zdrowie człowieka. Wiele badań dotyczy tlenku trimetyloaminy (TMAO), który powstaje w wyniku utleniania trimetyloaminy (TMA) przez flawinowe monooksygenazy (FMOs) w wątrobie. Mikrobiota jelitowa wytwarza TMA ze źródeł pokarmowych takich jak: cholina i karnityna. Ponadto TMA i TMAO znajdują się w rybach i owocach morza. Wydalanie TMA i TMAO odbywa się głównie wraz z moczem.

Szereg badań klinicznych wykazało pozytywną korelację między podwyższonym poziomem TMAO we krwi i moczu, a ryzykiem sercowo-naczyniowym. Jednak mechanizmy leżące u podstaw tej zależności są mało poznane. Chociaż większość badań wskazuje na szkodliwy wpływ TMAO na zdrowie człowieka, istnieją również badania sugerujące korzystne działanie TMAO.

Pomimo dużego zainteresowania rolą TMAO, rola TMA (prekursora TMAO) w patogenezie chorób sercowo-naczyniowych i nerek nie została szerzej zbadana.

Celem mojej pracy doktorskiej było ustalenie fizjologicznych stężeń TMA, TMAO i ich prekursorów w tkankach zwierząt laboratoryjnych, które są najczęściej przedmiotem badań przedklinicznych w zakresie chorób układu krążenia i nerek (mysz domowa, szczur wędrowny, kawia domowa). Praca miała na celu również poszerzenie wiedzy dotyczącej FMOs i metabolizmu TMA/TMAO (Publikacja nr 1). Kolejnym etapem było zbadanie wpływu TMA na funkcje nerek i układu sercowo-naczyniowego (Publikacja nr 2).

Niniejsze badania są pierwszymi, które porównują stężenia TMA i TMAO w tkankach zwierząt laboratoryjnych, ponieważ poprzednie badania koncentrowały się wyłącznie na oznaczeniu stężeń we krwi lub moczu. Badania wykazały znaczące różnice w stężeniach karnityny, choliny, TMA i TMAO we krwi, moczu oraz sercu, płucach, wątrobie i nerkach pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt. Warto podkreślić, że pomimo istotnych różnic międzygatunkowych w stężeniach tkankowych, stężenia samego TMAO we krwi były podobne pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt i zbliżone do stężeń obserwowanych u ludzi. Najwyższe stężenie TMAO zaobserwowano w rdzeniu nerkowym szczurów, a najniższe w wątrobie myszy. Z kolei najwyższe stężenia TMA stwierdzono w rdzeniu nerkowym myszy,

a najniższe w płucach szczurów. Badania wykazały także wyraźne różnice międzygatunkowe w ekspresji FMOs w sercu, płucach, wątrobie i nerkach.

Kolejnym celem pracy było zbadanie wpływu przewlekłego podawania TMA z wodą pitną na funkcje nerek i układu sercowo-naczyniowego u szczurów. Szczury otrzymujące TMA miały wyższe ciśnienie skurczowe, podwyższony poziom glukozy, białka oraz markera cewkowego uszkodzenia nerek-1 (KIM-1) w moczu. Ponadto, zaobserwowano wyższy stosunek białka do kreatyniny w moczu oraz zmiany histologiczne w nerkach, wskazujące na przewlekłą progresywną nefropatię. Otrzymane wyniki badań dowodzą, że przewlekła ekspozycja na TMA negatywnie wpływa na nerki i układ sercowo-naczyniowy.

Ponadto, szczury pojone TMA wykazywały 7-30 krotny wzrost stężenia TMAO w tkankach, podczas gdy poziomy TMA wzrosły tylko nieznacznie. Obserwowano także istotny wzrost wydalania TMA i TMAO, co wskazuje na efektywną konwersję TMA do TMAO.

Niniejsza praca doktorska wnosi nową wiedzę dotyczącą stężeń TMA, TMAO i ich prekursorów, jak również aktywności FMO u najczęściej badanych zwierząt laboratoryjnych. Badania umożliwiają lepsze zrozumienie metabolizmu TMA i TMAO oraz ich roli w chorobach sercowo-naczyniowych i nerek. Wyniki tej pracy dostarczają ważnych danych dla wyboru odpowiedniego modelu zwierzęcego do badań przedklinicznych. Ponadto, praca wykazała negatywny wpływ przewlekłego podawania TMA na funkcje układu sercowo-naczyniowego i nerek u szczurów, co sugeruje konieczność dalszego poszerzenia badań nad rolą TMA w patologii układu krążenia i nerek.

The impact of trimethylamine on the function of the cardiovascular system and kidneys

In recent years, an increasing number of studies have focused on the impact of gut microbiota on human health. A particular area of interest is Trimethylamine oxide (TMAO), a metabolite produced through the oxidation of trimethylamine (TMA) by flavin-containing monooxygenases (FMOs) in the liver. Gut microbiota generate TMA from dietary sources such as choline and carnitine. Additionally, TMA and TMAO are present in fish and seafood, which are dietary sources of these compounds. Excretion of TMA and TMAO predominantly occurs through urine.

The bulk of research concentrates on the role of TMAO. Investigations have consistently shown a positive correlation between elevated levels of TMAO in blood and urine and the onset of cardiovascular and kidney diseases. However, the underlying mechanisms remain partially understood. While most studies indicate a detrimental effect of TMAO on human health, there are some that propose beneficial impacts.

Conversely, the role of TMA in the pathogenesis of cardiovascular and kidney diseases has received limited attention, and studies on the role of TMA in cardiovascular and renal diseases are scarce.

This doctoral thesis aimed to establish the physiological concentrations of TMA, TMAO, and their precursors in various laboratory animals (house mouse, brown rat, guinea pig). The thesis further sought to enhance understanding of FMOs and TMA/TMAO metabolism (Publication No. 1) and to investigate the impact of TMA on kidney and cardiovascular system functions (Publication No. 2).

This research is the first to compare concentrations of TMA and TMAO in tissues of laboratory animals, as previous studies focused solely on blood or urine. Our findings reveal significant differences in the concentrations of carnitine, choline, TMA, and TMAO in blood, urine, and various tissues (heart, lungs, liver, kidneys) among these species. Notably, TMAO blood concentrations were consistent across species and aligned with human and animal studies. The highest TMAO concentration was observed in the rat's renal medulla, and the lowest in the mouse liver. Conversely, TMA concentrations were highest in the mouse's renal medulla and lowest in the rat's lungs. We also evaluated the activity of FMO1, FMO3, and FMO5 in the

heart, lungs, liver, and kidneys, observing notable species-specific differences in FMO expression.

The effects of chronic TMA administration via drinking water on rat kidney and cardiovascular system functions were also examined. Rats receiving TMA exhibited increased systolic blood pressure, elevated levels of glucose, protein, Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1) in urine, and a higher protein/creatinine ratio in urine, alongside histological kidney changes indicative of chronic progressive nephropathy. This suggests that chronic TMA exposure adversely affects kidney and cardiovascular health.

Furthermore, TMA-treated rats showed a 7-30 fold increase in tissue TMAO concentration, while TMA levels rose minimally. These rats also demonstrated a daily increase in TMA and TMAO excretion and reduced renal FMO1 and FMO3 expression, indicating efficient TMA-to-TMAO conversion.

This thesis contributes new insights into the concentrations of TMA, TMAO, and their precursors in commonly used laboratory animals, as well as the activity of FMOs. These findings enhance our understanding of TMA and TMAO metabolism and their roles in cardiovascular and kidney diseases. Additionally, our research may aid in selecting appropriate animal models for future studies. Importantly, this thesis provides data on the negative impact of chronic TMA administration on cardiovascular and kidney functions.

Wstęp uzasadniający połączenie wskazanych publikacji w jeden cykl

Rosnąca liczba badań wskazuje na ważną rolę mikrobioty jelitowej dla prawidłowego funkcjonowania organizmu. Liczbę mikroorganizmów w jelicie grubym szacuje się na 10^{11} - 10^{12} w ml jego zawartości, są to głównie bakterie (1). Bakterie produkują różne związki, które mogą istotnie oddziaływać na organizm człowieka. Jednym z takich związków jest trimetyloamina (TMA).

Substratami do produkcji TMA przez bakterie jelitowe są składniki pokarmowe - cholina i karnityna, które nie zostaną wchłonięte w jelicie cienkim i zostaną przepasażowane do jelita grubego (2-4). W wątrobie TMA utleniana jest przez FMOs do TMAO. Wyróżnianych jest 5 izoform FMO u ludzi i zwierząt. Za utlenianie TMA do TMAO w wątrobie u większości ssaków odpowiada głównie izoforma FMO3 (5). Ekspresja FMOs była również wykazywana w nerkach i płucach, zarówno u ludzi, jak i u zwierząt (6-9).

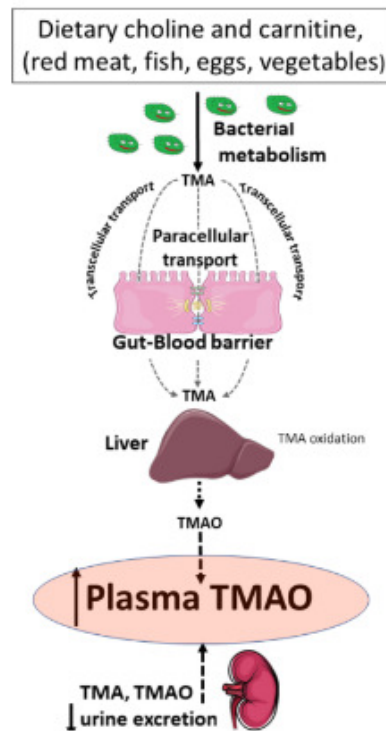
Innymi źródłami TMA i TMAO w organizmie człowieka są ryby i owoce morza (10-12). U zwierząt morskich wykazano istotną rolę TMAO jako piezolitu i osmolitu, czyli związku chroniącego białka przed wysokim ciśnieniem hydrostatycznym oraz wysoką osmolarnością (13-15). TMAO pełni rolę osmolitu także w rdzeniu nerek ssaków, gdzie osmolarność jest 4-5 krotnie większa niż osmolarność osocza (16).

Potencjalnie możliwe są również jeszcze inne źródła TMA w organizmie człowieka, ponieważ TMA stosowana jest do produkcji np.: tworzyw sztucznych, środków dezynfekujących, środków wabiących owady, słodzików, aromatów owoców morza, witaminy B4. TMA jest także składnikiem zanieczyszczenia powietrza (17). Główną drogą eliminacji TMA i TMAO z organizmu jest mocz (18, 19).

Zatem na stężenia TMA i TMAO we krwi i tkankach wpływ mają: dieta, skład i aktywność mikrobioty jelitowej, poziom absorpcji TMA przez barierę jelito – krew, aktywność FMOs i poziom utlenienia TMA do TMAO oraz ilość TMA i TMAO wydalana wraz z moczem (Ryc. 1) (20).

W ostatnich latach wykazano pozytywną korelację pomiędzy wzrostem stężenia TMAO we krwi i moczu, a ryzykiem wystąpienia incydentów sercowo-naczyniowych i niewydolnością nerek (21-23). Choroby serca mogą powodować niewydolność nerek i na odwrót, chore nerki mogą przyczyniać się do rozwoju chorób sercowo-naczyniowych (24). Wielu badaczy uważa, że TMAO odgrywa kluczową rolę w patogenezie tych chorób (25-29). Badania wykazały, że pacjenci m. in. z przewlekłą niewydolnością nerek mają podwyższone stężenie TMAO we krwi i moczu (18, 23, 30, 31). TMAO może powodować włóknienie nerek (23, 29).

Dowodzono również istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy stężeniem TMAO we krwi a rozwojem miażdżycy, niewydolnością serca oraz nadciśnieniem (2, 22, 32, 33). Dotychczas brak jest jednak danych z badań interwencyjnych u ludzi, a wyniki badań przedklinicznych nie są jednoznaczne. Niektóre badania nie potwierdzają opisanych powyżej korelacji (34, 35), a część badań wskazuje, że TMAO może wywierać korzystny wpływ na układ krążenia (36-38).



Ryc. 1. „Czynniki wpływające na stężenie TMA i TMAO w osoczu.”

A. Drapała, M. Szudzik, D. Chabowski, I. Mogilnicka, K. Jaworska, K. Kraszewska, E. Samborowska, M. Ufnal. *Heart Failure Disturbs Gut-Blood Barrier and Increases Plasma Trimethylamine, a Toxic Bacterial Metabolite*. *Int J Mol Sci*. 2020 Aug 26;21(17):6161 (zmodyfikowano).

Przyczyną niezgodności w wynikach badań mogą być różnice w metodyce takie jak: prowadzenie badań z użyciem różnych dawek oraz różnych modeli zwierzęcych. Najczęściej wykorzystywanymi do badań przedklinicznych gatunkami są: szczur wędrowny oraz mysz domowa. Wiadomo, że gatunki te różnią się aktywnością FMOs, u samców myszy ekspresja genu FMO3 zostaje wyłączona w wieku 5-6 tygodni (9, 39). Od tego momentu jedynie FMO1 odpowiada za utlenianie około 10% TMA (40), przez co samce myszy charakteryzują się wysokim stężeniem TMA we krwi oraz moczu. Z tego powodu często w badaniach dotyczących

TMA i TMAO stosuje się samice myszy. Jednak ze względu na cykl menstruacyjny i zmiany hormonalne przeprowadzanie badań przedklinicznych wyłącznie na samicach jest skomplikowane. Wykazano bowiem, że miesiączka może być czynnikiem wpływającym na występowanie przejściowej trimetyloaminurii u kobiet (41, 42).

Wydaje się, że szczur wędrowny jest bardziej odpowiednim gatunkiem do przeprowadzenia badań przedklinicznych dotyczących roli TMA i TMAO. Szczury wykazują bowiem ekspresję zarówno FMO1, jak i FMO3 w wątrobie. Za utlenianie TMA do TMAO odpowiada u tego gatunku głównie FMO3, podobnie jak u ludzi (9). Wykorzystanie różnych gatunków zwierząt może utrudniać interpretację wyników i zmniejszać ich wartość translacyjną. Dobór odpowiedniego modelu zwierzęcia jest kluczowy przy projektowaniu badań przedklinicznych (43-45). Dotychczas nie porównano stężeń TMA, TMAO i ich prekursorów we krwi i moczu u obu gatunków, a oznaczenie stężeń tych substancji w tkankach zwierzęcych wykonywano w pojedynczych badaniach (46).

Kawia domowa jest także wykorzystywana w badaniach przedklinicznych. Gatunek ten charakteryzuje się zbliżonym do człowieka profilem lipoprotein, metabolizmem cholesterolu oraz czynnością elektryczną serca (47-49), stąd może być preferowanym modelem do badań układu sercowo-naczyniowego. Jednak do tej pory nie oznaczano stężeń TMA i TMAO w materiale biologicznym, a także nie przeprowadzono badań na temat wpływu TMA i TMAO na układ sercowo-naczyniowy u tego gatunku.

W ostatnich latach, zespół prof. Ufnala zaproponował, że to TMA, a nie TMAO może wywierać negatywny wpływ na układ krążenia (50, 51).

Wpływ TMA na rozwój chorób układu krążenia i nerek dotychczas nie był przedmiotem intensywnych badań. Wcześniejsze badania wykazały toksyczne działanie TMA w przypadku narażenia na długotrwałą ekspozycję lub jej wysoką dawkę w wyniku podania doustnego lub przez inhalację. Do obserwowanych objawów należały nudności, wymioty, biegunka, trudności w oddychaniu oraz podrażnienie błon śluzowych nosa i jamy ustnej (52-55). Przeprowadzono również wiele badań na temat trimetylaminurii (*fish odor syndrome*), która związana jest z akumulacją TMA w organizmie człowieka w wyniku braku aktywności FMO3 w wątrobie (56, 57). Chorzy na trimetyloaminurię charakteryzują się nieprzyjemnym zapachem, przypominającym zapach zepsutych ryb, który spowodowany jest zwiększonym wydalaniem TMA w moczu, oddechu oraz pocie (58). Głównymi objawami towarzyszącymi jest cuchnący oddech oraz zaburzenia psychiczne takie jak depresja (58, 59).

W medycznych bazach danych dostępnych jest jednak niewiele informacji na temat wpływu TMA na rozwój chorób sercowo-naczyniowych i nerek. Dowiedziono, że pacjenci z krańcową niewydolnością nerek charakteryzują się wzrostem stężenia TMA w osoczu, a także wzrostem ilości TMA w wydychanym powietrzu (60, 61). W badaniu przeprowadzonym u dzieci z niewydolnością nerek wykazano również odwrotną korelację pomiędzy stężeniem TMA w osoczu, a eGFR (30). W badaniach, których jestem współautorem dowiedliśmy, że ostre podanie TMA, a nie TMAO, powoduje wzrost ciśnienia tętniczego krwi u szczurów (50). Do tej pory nie było przeprowadzone badanie na temat wpływu przewlekłego podawania TMA na układ sercowo-naczyniowy i nerki.

Przedstawiona rozprawa doktorska pt. „Wpływ trimetyloaminy na funkcje układu krążenia i nerek.” stanowi monotematyczny cykl 2 prac oryginalnych, opublikowanych w czasopismach anglojęzycznych o zasięgu międzynarodowym. Doktorant jest pierwszym autorem we wszystkich pracach. Łączna wartość wskaźnika cytowań (Impact Factor) czasopism, w których prace zostały opublikowane wynosi 11,1, natomiast suma punktów wg listy MNiSW z 2024 roku to 200.

Bibliografia:

1. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature*. 2007;449(7164):804-10.
2. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(5):576-85.
3. Zeisel SH, Wishnok JS, Blusztajn JK. Formation of methylamines from ingested choline and lecithin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1983;225(2):320-4.
4. Zhu Y, Jameson E, Crosatti M, Schafer H, Rajakumar K, Bugg TD, et al. Carnitine metabolism to trimethylamine by an unusual Rieske-type oxygenase from human microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(11):4268-73.
5. Lang DH, Yeung CK, Peter RM, Ibarra C, Gasser R, Itagaki K, et al. Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3. *Biochem Pharmacol*. 1998;56(8):1005-12.
6. Cashman JR, Zhang J. Human flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:65-100.
7. Lattard V, Lachuer J, Buronfosse T, Garnier F, Benoit E. Physiological factors affecting the expression of FMO1 and FMO3 in the rat liver and kidney. *Biochem Pharmacol*. 2002;63(8):1453-64.
8. Janmohamed A, Hernandez D, Phillips IR, Shephard EA. Cell-, tissue-, sex- and developmental stage-specific expression of mouse flavin-containing monooxygenases (Fmos). *Biochem Pharmacol*. 2004;68(1):73-83.
9. Lattard V, Buronfosse T, Lachuer J, Longin-Sauvageon C, Moulin C, Benoit E. Cloning, sequencing, tissue distribution, and heterologous expression of rat flavin-containing monooxygenase 3. *Arch Biochem Biophys*. 2001;391(1):30-40.
10. Zhang AQ, Mitchell SC, Smith RL. Dietary precursors of trimethylamine in man: a pilot study. *Food Chem Toxicol*. 1999;37(5):515-20.

11. Cheung W, Keski-Rahkonen P, Assi N, Ferrari P, Freisling H, Rinaldi S, et al. A metabolomic study of biomarkers of meat and fish intake. *Am J Clin Nutr.* 2017;105(3):600-8.
12. Costabile G, Vetrani C, Bozzetto L, Giacco R, Bresciani L, Del Rio D, et al. Plasma TMAO increase after healthy diets: results from 2 randomized controlled trials with dietary fish, polyphenols, and whole-grain cereals. *Am J Clin Nutr.* 2021;114(4):1342-50.
13. 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. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* 2004;50(4):371-6.
14. Yancey PH, Clark ME, Hand SC, Bowlus RD, Somero GN. Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science.* 1982;217(4566):1214-22.
15. Yancey PH, Somero GN. Counteraction of urea destabilization of protein structure by methylamine osmoregulatory compounds of elasmobranch fishes. *Biochem J.* 1979;183(2):317-23.
16. Sackett DL. Natural osmolyte trimethylamine N-oxide stimulates tubulin polymerization and reverses urea inhibition. *Am J Physiol.* 1997;273(2 Pt 2):R669-76.
17. Pospischil E JG, Nielsen GD, Papameletiou D, Klein CL. SCOEL/REC/179 Trimethylamine. *Publ Sci Comm Occup Expo Lim Eur Union.* 2017.
18. Bell JD, Lee JA, Lee HA, Sadler PJ, Wilkie DR, Woodham RH. Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1096(2):101-7.
19. Mitchell SC, Zhang AQ, Noblet JM, Gillespie S, Jones N, Smith RL. Metabolic disposition of [14C]-trimethylamine N-oxide in rat: variation with dose and route of administration. *Xenobiotica.* 1997;27(11):1187-97.
20. Drapala A, Szudzik M, Chabowski D, Mogilnicka I, Jaworska K, Kraszewska K, et al. Heart Failure Disturbs Gut-Blood Barrier and Increases Plasma Trimethylamine, a Toxic Bacterial Metabolite. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17).
21. 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. *J Am Heart Assoc.* 2017;6(7).
22. Ge X, Zheng L, Zhuang R, Yu P, Xu Z, Liu G, et al. The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Hypertension Risk: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Adv Nutr.* 2020;11(1):66-76.
23. Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatista-Boyle B, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ Res.* 2015;116(3):448-55.
24. Ronco C, House AA, Haapio M. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. *Intensive Care Med.* 2008;34(5):957-62.
25. Zhang Y, Wang Y, Ke B, Du J. TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure. *Transl Res.* 2021;228:109-25.
26. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, et al. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell.* 2016;165(1):111-24.
27. Liu M, Han Q, Yang J. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) increased aquaporin-2 expression in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens.* 2019;41(4):312-22.
28. Zhang X, Li Y, Yang P, Liu X, Lu L, Chen Y, et al. Trimethylamine-N-Oxide Promotes Vascular Calcification Through Activation of NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3) Inflammasome and NF-kappaB (Nuclear Factor kappaB) Signals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2020;40(3):751-65.
29. Fang Q, Zheng B, Liu N, Liu J, Liu W, Huang X, et al. Trimethylamine N-Oxide Exacerbates Renal Inflammation and Fibrosis in Rats With Diabetic Kidney Disease. *Front Physiol.* 2021;12:682482.
30. Hsu CN, Chang-Chien GP, Lin S, Hou CY, Lu PC, Tain YL. Association of Trimethylamine, Trimethylamine N-oxide, and Dimethylamine with Cardiovascular Risk in Children with Chronic Kidney Disease. *J Clin Med.* 2020;9(2).

31. Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A, Larson MG, Elmariah S, McCabe E, et al. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J Am Soc Nephrol.* 2013;24(8):1330-8.
32. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature.* 2011;472(7341):57-63.
33. Jiang S, Shui Y, Cui Y, Tang C, Wang X, Qiu X, et al. Gut microbiota dependent trimethylamine N-oxide aggravates angiotensin II-induced hypertension. *Redox Biol.* 2021;46:102115.
34. Aldana-Hernandez P, Leonard KA, Zhao YY, Curtis JM, Field CJ, Jacobs RL. Dietary Choline or Trimethylamine N-oxide Supplementation Does Not Influence Atherosclerosis Development in Ldlr-/- and Apoe-/- Male Mice. *J Nutr.* 2020;150(2):249-55.
35. Andraos S, Jones B, Lange K, Clifford SA, Thorstensen EB, Kerr JA, et al. Trimethylamine N-oxide (TMAO) Is not Associated with Cardiometabolic Phenotypes and Inflammatory Markers in Children and Adults. *Curr Dev Nutr.* 2021;5(1):nzaa179.
36. Gawrys-Kopczynska M, Konop M, Maksymiuk K, Kraszewska K, Derzsi L, Sozanski K, et al. TMAO, a seafood-derived molecule, produces diuresis and reduces mortality in heart failure rats. *Elife.* 2020;9.
37. Huc T, Drapala A, Gawrys M, Konop M, Bielinska K, Zaorska E, et al. Chronic, low-dose TMAO treatment reduces diastolic dysfunction and heart fibrosis in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018;315(6):H1805-H20.
38. Videja M, Vilskersts R, Korzh S, Cirule H, Sevostjanovs E, Dambrova M, et al. Microbiota-Derived Metabolite Trimethylamine N-Oxide Protects Mitochondrial Energy Metabolism and Cardiac Functionality in a Rat Model of Right Ventricle Heart Failure. *Front Cell Dev Biol.* 2020;8:622741.
39. Cherrington NJ, Cao Y, Cherrington JW, Rose RL, Hodgson E. Physiological factors affecting protein expression of flavin-containing monooxygenases 1, 3 and 5. *Xenobiotica.* 1998;28(7):673-82.
40. Veeravalli S, Karu K, Scott F, Fennema D, Phillips IR, Shephard EA. Effect of Flavin-Containing Monooxygenase Genotype, Mouse Strain, and Gender on Trimethylamine N-oxide Production, Plasma Cholesterol Concentration, and an Index of Atherosclerosis. *Drug Metab Dispos.* 2018;46(1):20-5.
41. Shimizu M, Cashman JR, Yamazaki H. Transient trimethylaminuria related to menstruation. *BMC Med Genet.* 2007;8:2.
42. Zhang AQ, Mitchell SC, Smith RL. Exacerbation of symptoms of fish-odour syndrome during menstruation. *Lancet.* 1996;348(9043):1740-1.
43. Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK. Requirements and selection of an animal model. *Isr J Med Sci.* 1987;23(6):551-5.
44. Fliegner D, Gerdes C, Meding J, Stasch JP. Translational In Vivo Models for Cardiovascular Diseases. *Handb Exp Pharmacol.* 2016;232:223-34.
45. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:497841.
46. daCosta KA, Vrbanac JJ, Zeisel SH. The measurement of dimethylamine, trimethylamine, and trimethylamine N-oxide using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1990;187(2):234-9.
47. Fernandez ML, Volek JS. Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond).* 2006;3:17.
48. Dasagrandhi D, R ASK, Muthuswamy A, Lennox AM, Jayavelu T, Devanathan V, et al. Ischemia/reperfusion injury in male guinea pigs: An efficient model to investigate myocardial damage in cardiovascular complications. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:469-79.
49. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1998;39(1):60-76.
50. Jaworska K, Bielinska K, Gawrys-Kopczynska M, Ufnal M. TMA (trimethylamine), but not its oxide TMAO (trimethylamine-oxide), exerts haemodynamic effects: implications for interpretation of cardiovascular actions of gut microbiome. *Cardiovasc Res.* 2019;115(14):1948-9.

51. Ufnal M. Trimethylamine, a Toxic Precursor of Trimethylamine Oxide, Lost in Medical Databases. *J Nutr.* 2020;150(2):419.
52. Calvert GD. Trimethylaminuria and inherited Noonan's syndrome. *Lancet.* 1973;1(7798):320-1.
53. Henschler D. Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründungen von MAK-Werten. Deutsche Forschungsgemeinschaft, VCH Verlag Weinheim. 1983.
54. Lewin L. Gifte und Vergiftungen. Georg Stilke-Verlag Berlin. 1929;47.
55. Kinney LA, Burgess BA, Chen HC, Kennedy GL. Inhalation Toxicology of Trimethylamine. *Inhalation Toxicology.* 1990. 241-51.
56. Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA, Phillips IR. Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nat Genet.* 1997;17(4):491-4.
57. Treacy EP, Akerman BR, Chow LM, Youil R, Bibeau C, Lin J, et al. Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Hum Mol Genet.* 1998;7(5):839-45.
58. Cashman JR, Camp K, Fakharzadeh SS, Fennessey PV, Hines RN, Mamer OA, et al. Biochemical and clinical aspects of the human flavin-containing monooxygenase form 3 (FMO3) related to trimethylaminuria. *Curr Drug Metab.* 2003;4(2):151-70.
59. Ayesh R, Mitchell SC, Zhang A, Smith RL. The fish odour syndrome: biochemical, familial, and clinical aspects. *BMJ.* 1993;307(6905):655-7.
60. Simenhoff ML, Burke JF, Saukkonen JJ, Ordinario AT, Doty R. Biochemical profile or uremic breath. *N Engl J Med.* 1977;297(3):132-5.
61. 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. *Nephrol Dial Transplant.* 2006;21(5):1300-4.

Założenia i cel pracy

Założenia i hipoteza badawcza

Celem pracy doktorskiej było określenie fizjologicznych stężeń TMA, TMAO i ich prekursorów u zwierząt laboratoryjnych, poszerzenie wiedzy na temat FMOs i metabolizmu TMA/TMAO oraz zbadanie wpływu TMA na funkcje układu sercowo-naczyniowego i nerek. Hipoteza badawcza zakładała, że trimetyloamina ma negatywny wpływ na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego oraz nerek.

Główne i szczegółowe cele pracy:

1. Określenie fizjologicznych stężeń TMA, TMAO i ich prekursorów u zwierząt laboratoryjnych.
 - a. Porównanie stężeń cholicy, karnityny, TMA i TMAO we krwi, moczu oraz homogenacie z kału i tkanek (serce, płuca, wątroba, nerki) u trzech powszechnie stosowanych gatunków zwierząt laboratoryjnych: mysz domowa, szczur wędrowny oraz kawia domowa.
 - b. Porównanie ekspresji i poziomu białek FMO1, FMO3 i FMO5 w tkankach (serce, płuca, wątroba, nerki) u trzech powszechnie stosowanych gatunków zwierząt laboratoryjnych: mysz domowa, szczur wędrowny oraz kawia domowa.
2. Zbadanie wpływu trimetyloaminy na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego oraz nerek.
 - a. Zbadanie wpływu przewlekłego, doustnego podawania TMA na bilans TMA/TMAO oraz stężenia karnityny, cholicy, TMA i TMAO we krwi, moczu oraz homogenacie z kału i tkanek (serce, płuca, wątroba, nerki) u szczurów.
 - b. Zbadanie wpływu przewlekłego, doustnego podawania TMA na ekspresję FMO1, FMO3 i FMO5 w tkankach (płuca, wątroba, nerki) u szczurów.
 - c. Zbadanie wpływu przewlekłego, doustnego podawania TMA na funkcje układu sercowo-naczyniowego u szczurów, poprzez zbadanie zmian ciśnienia tętniczego krwi, parametrów echokardiograficznych oraz zmian histopatologicznych serca.

- d. Zbadanie wpływu przewlekłego, doustnego podawania TMA na funkcje nerek u szczurów, poprzez zbadanie zmian parametrów biochemicznych krwi i moczu, stężenia białka KIM-1 we krwi i moczu oraz zmian histopatologicznych nerek.

PUBLIKACJA nr 1

Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases.

Klaudia Maksymiuk

Mateusz Szudzik

Emilia Samborowska

Dawid Chabowski

Marek Konop

Marcin Ufnal

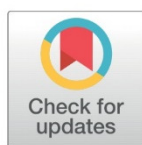
RESEARCH ARTICLE

Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases

Klaudia M. Maksymiuk^{1*}, Mateusz Szudzik¹, Emilia Samborowska², Dawid Chabowski¹, Marek Konop¹, Marcin Ufnal¹

1 Laboratory of the Centre for Preclinical Research, Department of Experimental Physiology and Pathophysiology, Medical University of Warsaw, Warsaw, Poland, **2** Mass spectrometry Laboratory, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

* kbielinska@wum.edu.pl



OPEN ACCESS

Citation: Maksymiuk KM, Szudzik M, Samborowska E, Chabowski D, Konop M, Ufnal M (2024) Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases. *PLoS ONE* 19(1): e0297474. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474>

Editor: Rajeev Singh, Satyawati College, University of Delhi, INDIA

Received: October 22, 2023

Accepted: January 6, 2024

Published: January 24, 2024

Copyright: © 2024 Maksymiuk et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All raw data and original images from Western blotting are available in the [Supporting Information](#) files.

Funding: This work was supported by the National Science Centre, Poland, grant no: 2020/37/B/NZ5/00366. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Introduction

Increased plasma trimethylamine oxide (TMAO) is observed in cardiovascular and metabolic diseases, originating from the gut microbiota product, trimethylamine (TMA), via flavin-containing monooxygenases (FMOs)-dependent oxidation. Numerous studies have investigated the association between plasma TMAO and various pathologies, yet limited knowledge exists regarding tissue concentrations of TMAO, TMAO precursors, and interspecies variability.

Methods

Chromatography coupled with mass spectrometry was employed to evaluate tissue concentrations of TMAO and its precursors in adult male mice, rats, and guinea pigs. FMO mRNA and protein levels were assessed through PCR and Western blot, respectively.

Results

Plasma TMAO levels were similar among the studied species. However, significant differences in tissue concentrations of TMAO were observed between mice, rats, and guinea pigs. The rat renal medulla exhibited the highest TMAO concentration, while the lowest was found in the mouse liver. Mice demonstrated significantly higher plasma TMA concentrations compared to rats and guinea pigs, with the highest TMA concentration found in the mouse renal medulla and the lowest in the rat lungs. FMO5 exhibited the highest expression in mouse liver, while FMO3 was highly expressed in rats. Guinea pigs displayed low expression of FMOs in this tissue.

Conclusion

Despite similar plasma TMAO levels, mice, rats, and guinea pigs exhibited significant differences in tissue concentrations of TMA, TMAO, and FMO expression. These interspecies

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

variations should be considered in the design and interpretation of experimental studies. Furthermore, these findings may suggest a diverse importance of the TMAO pathway in the physiology of the evaluated species.

1 Introduction

Trimethylamine (TMA) is a gut microbiota metabolite. A plethora of studies show that trimethylamine oxide (TMAO), a product of the liver oxidation of TMA, is a biomarker in cardiovascular [1–3], metabolic [4–6] and renal diseases [7]. TMA is produced by gut microbiota from dietary choline and carnitine [8–13]. Another direct source of TMA and TMAO for humans is seafood [14, 15]. TMA crosses the gut-blood barrier and, in the liver, is rapidly oxidized to TMAO by flavin-containing monooxygenase (FMOs). Extensive research has been conducted to elucidate FMOs biochemical properties, substrate specificities, and functional roles. Among them, FMO5 stands out as it exhibits no activity towards trimethylamine [16–23].

In humans, FMO3 in the liver plays a key role in the oxidation of TMA [24]. However, other isoforms of FMO can be found in various organs, such as the kidneys, lungs, heart, and small intestine, in both humans and animals [25–28]. Deficiency in FMO3 activity within the human liver leads to a condition commonly known as "fish odor syndrome" or trimethylaminuria, characterized by symptoms such as fishy body odor [29–32].

The variations in FMO3 activity between mice and rats have been previously reported. Rats exhibit expression of both FMO1 and FMO3 in the liver [27]. In this species, FMO3 is responsible for the oxidation of TMA to TMAO, similar to humans. Conversely, the FMO3 gene expression is suppressed in the liver of male mice, resulting in elevated levels of TMA in their blood and urine [28, 33]. In both male and female mice, FMO1 is postulated to oxidize approximately 10% of TMA [34].

Studies indicate that TMAO could potentially have detrimental effects on various physiological processes and play a direct role in the progression of cardiovascular, renal, and metabolic diseases [2, 5, 35–38]. However, conflicting data from other studies challenge the assertion regarding the negative impact of TMAO [39–41], with some evidence suggesting a positive effect [42–44].

These discrepancies may arise from variations in the doses of TMA/TMAO tested or differences in the physiological levels or metabolism of TMA/TMAO among different species [35–39, 42–50]. These factors can lead to differences in TMA/TMAO exposure, potentially influencing the observed effects on health outcomes. Finally, some suggest that TMA but not TMAO exerts a negative effect on the organism [47, 51–55]. Therefore, the expression and activity of FMO3 which oxidizes TMA to TMAO may play a vital role in the biological effects of exogenous TMA and/or TMAO in interventional experimental settings.

Proper selection of animal models is crucial for ensuring translatability of findings to humans, as species-related factors significantly influence data interpretation [56–58].

The interspecies differences in tissue concentrations of TMAO and its precursors in laboratory animals, particularly in rats, mice, and guinea pigs, have not been well-established. This study aimed to determine the tissue concentration of TMAO and its precursors in these commonly used experimental species. Furthermore, the expression of flavin-containing monooxygenases (FMOs) in different tissues was examined to gain insights into TMA/TMAO metabolism in these animals.

2 Materials and methods

2.1 Animals

The study was performed on 15-17-week-old male *Sprague-Dawley rats*, 10-12-week-old male *BALB/c mice*, and 7-8-month *American guinea pigs*. The age of the animals in our study was selected to reflect their varied lifespans and developmental rates. Rats and mice were obtained from the Central Laboratory for Experimental Animals, Medical University of Warsaw, Poland. Guinea pigs were obtained from Laboratory Animal Breeding of Ilkowice, Poland. The animal study was conducted in the Laboratory of the Centre for Preclinical Research Laboratory, Medical University of Warsaw. The study was performed according to Directive 2010/63 EU on the protection of animals used for scientific purposes and 1st Local Ethics Committee permission no 555/2018 and 464/2017.

The animals were quarantined for 2 weeks after they were brought to the laboratory. The animals were housed in groups of 2–4 in propylene cages, 12 hrs light / 12 hrs dark cycle, temperature 22–23°C, and humidity 45–55%. During this period, the animals were fed a standard laboratory diet for mice, rats (Labofed B standard, Kcynia, Poland) and guinea pigs (Versele-Laga Cavia Complete).

After this period, the animals were anesthetized with urethane (1.5 g/kg BW) during light cycle of the day. Fresh urine samples produced during spontaneous voids before anesthetized were collected. Blood was collected from the heart, and the animals were euthanized by cervical vertebrae dislocation in the case of rats and mice or decapitation in the case of guinea pigs. Feces from the colon were collected and prepared as previously described [59]. The tissue samples: liver, heart, lung, renal cortex, and renal medulla were collected and frozen at -80 degrees Celsius.

2.2 Plasma, urine, stools, and tissue TMA and TMAO measurements

The TMA, TMAO, choline and carnitine concentrations in plasma, urine and stools and tissue homogenates were examined using the liquid chromatography-mass spectrometry technique. All urine samples were diluted 10 times using water. Mouse urine samples were further diluted 1000 times or 10 000 times to quantify TMA concentration. Liver, lungs, heart, and kidney (separately the cortex and the medulla) samples were weighed and placed in 10% ethanol (90 µL per 10 mg tissue). Homogenized using the Precellys Cryolys Evolution tissue homogenizer (Bertin Instruments) and stored at -80°C until analysis.

Analyte concentrations were evaluated using Waters Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (Waters, Milford, Massachusetts, USA) coupled with Waters TQ-S triple-quadrupole mass spectrometer (Waters, Manchester, UK). Tissue preparation and the exact determination of metabolites in tissue homogenates have been previously described [52]. The metabolite concentrations in tissues were measured in dry tissue mass.

2.3 Real-time PCR

Total RNA was extracted from the lungs, liver, heart, renal cortex and renal medulla using Trizol™ reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The RNA concentration and purity (Ratios 260/280 and 260/230) were determined by photometric measurement (NanoPhotometer® N60, Implen, Munich, Germany). The cDNA was produced with an iscript® (Bio-Rad, Hercules, USA) kit according to the manufacturer's protocol. A Bio-Rad real-time system with iTaq® Universal SYBR Green Supermix (Bio-rad, Hercules, CA, USA) was used to perform real-time PCR using gene-specific primer pairs shown in [S1 Table](#). Primers were designed using the in-silico tool, BLAST. Before the PCR reaction, all primers were analyzed

using Gradient PCR to determine the optimum annealing temperature. PCR products were analyzed with a melting curve and agarose gel electrophoresis. The results were calculated by the Delta-Delta Ct method. mRNA Expression levels were normalized relative to the Gapdh-reference gene, selected from four different housekeeping genes using NormFinder software (version 0.953, MOMA, Aarhus, Denmark).

2.4 Western blotting

Protein concentration was determined using the Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, USA). Western blotting was performed in liver, lungs, renal cortex, and renal medulla samples. Protein concentration was determined using the Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, USA). All samples were resolved using SDS-PAGE gel by electrophoresis. Next proteins were transferred into the PVDF membrane (Bio-Rad, Hercules, USA). The membranes were incubated with skimmed milk for one hour at room temperature, then with different primary antibodies overnight at 4°C, followed by a 1-hour incubation with secondary antibodies labeled with AP. The dilutions of the primary and secondary antibodies are shown in [S2 Table](#). Finally, Quantitative analysis of proteins was performed by ChemiDoc MP Imaging System and Quantity One software (Bio-rad, Hercules, USA).

2.5 Statistics

The Shapiro–Wilk test was used to test the normality of the distribution. Differences in the concentrations of choline, carnitine, TMA, and TMAO in the plasma and urine within one species were evaluated by Mann-Whitney U Test. Differences in the concentrations of choline, carnitine, TMA, and TMAO in the tissue homogenates and FMOs expression in the tissues within one species were evaluated by Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc Dunn's test. Differences in the concentrations of choline, carnitine, TMA and TMAO in the plasma, urine and tissue homogenates between the three species were evaluated by Kruskal-Wallis test, followed by post-hoc Dunn's test. Statistical analysis was conducted using STATISTICA 13.3 (Stat Soft, Krakow, Poland). Outliers were defined (results above $Q3 + 1.5 \times IQR$ and below $Q1 - 1.5 \times IQR$) and removed from the statistical analysis. A value of two-sided $p < 0.05$ was considered significant.

3 Results

3.1 Part 1—comparison within one species

Plasma and urine concentrations of TMAO and its precursors are presented in [Table 1](#).

3.1.1 Mice. The median of TMA and TMAO urine concentrations was 9500-fold and 500-fold higher, respectively, than the plasma concentrations of these substances. The renal cortex and medulla exhibited the highest concentrations of choline and TMA in mouse tissue, respectively. Conversely, the heart and lungs had the lowest concentrations of choline and TMA, respectively. In contrast, the heart had the highest carnitine concentration, while the renal cortex had the lowest concentration. TMAO concentrations in all examined tissues of mice were generally low, with a median below 30 nM/g. The liver had the lowest TMAO concentration, with a median below 3 nM/g ([Table 2](#)).

Among the examined tissues, mouse liver displayed the highest expression of the FMO5 gene. Additionally, mice exhibited FMO3 gene expression in all the examined tissues, albeit at lower levels compared to FMO5 gene expression ([Fig 1](#)).

3.1.2 Rats. The choline concentration in urine was found to be 20-fold higher than in plasma, while the TMAO concentration in urine was 67-fold higher than in plasma. Plasma

Table 1. Species-specific comparison of TMAO, TMA and other metabolites concentrations in plasma and urine.

Parameter [$\mu\text{M/L}$]	Plasma	Urine
Mice		
Choline	42.68 (36.54; 48.78)	372.18 (185.54; 464.65)
Carnitine	22.76 (20.65; 26.43)	47.79 (43.38; 146.93)
TMA	1.90 (0.60; 2.35)	17922.01 (345.30; 36429.84)
TMAO	3.68 (3.36; 4.26)	1788.76 (993.74; 3315.89)
Rats		
Choline	27.01 (23.39; 40.23)	550.92 (301.78; 778.48)
Carnitine	40.60 (38.37; 43.33)	36.64 (32.26; 49.21)
TMA	<LOQ	3.40 (1.94; 6.19)
TMAO	9.10 (7.41; 9.82)	614.51 (471.73; 798.42)
Guinea pigs		
Choline	51.22 (32.06; 67.60)	69.11 (54.19; 97.32)
Carnitine	22.55 (20.03; 32.49)	1.98 (1.29; 2.31)
TMA	0.04 (0.01; 0.07)	33.16 (19.24; 59.62)
TMAO	3.24 (2.73; 9.19)	619.81 (364.75; 1066.12)

Abbreviations: LOQ, Limit of quantification; TMA, trimethylamine; TMAO, trimethylamine oxide. LOQ for TMA in plasma = 0.017 $\mu\text{M/L}$. All data are expressed as the median.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.t001>

TMA levels were below the limit of quantification, indicating very low levels of TMA in the blood (Table 1). The renal cortex and medulla exhibited the highest concentrations of choline, TMA, and TMAO, while the heart and lungs had the lowest concentrations of these substances. In contrast, the heart had the highest carnitine concentration, whereas the renal cortex and medulla had the lowest concentrations (Table 2).

Among the FMO genes, FMO1, FMO3, and FMO5 showed the highest expression levels in the livers of rats. Notably, the FMO3 gene exhibited the highest expression among all the FMO genes. Minimal expression of FMO1 and FMO3 was observed in the renal cortex and medulla of rats (Fig 1).

3.1.3 Guinea pigs. In guinea pigs, the plasma carnitine concentration was found to be 11-fold higher than in urine. Conversely, the median concentrations of TMA and TMAO were significantly higher in urine compared to plasma, with increases of over 800-fold and almost 200-fold, respectively (Table 1). The renal medulla exhibited the highest choline concentration, while the heart had the lowest concentration. The heart had the highest carnitine concentration, whereas the liver had the lowest concentration. Guinea pigs displayed low concentrations of TMA and TMAO in all examined tissues, with median concentrations below 20 nM/g. The liver had the highest TMA concentration, while the renal medulla had the highest TMAO concentration. The heart had the lowest concentrations of both TMA and TMAO (Table 2).

Guinea pigs exhibited low expression of the FMO genes in the examined tissues, with no significant difference observed between the tissues. FMO3 showed the highest expression among the FMO genes (Fig 1).

3.2 Part 2 –Interspecies comparison

3.2.1 TMA and TMAO concentrations in plasma and tissues. Rats exhibited a higher plasma concentration of creatinine compared to mice and guinea pigs (Table 3). Mice displayed significantly higher plasma TMA concentration than guinea pigs, while also showing a significantly lower TMAO/TMA ratio in plasma. Plasma TMA levels in rats were below the

Table 2. Species-specific comparison of TMAO and its precursors in the tissue homogenate.

Parameter [nM/g]	Liver	Heart	Lungs	Renal Cortex	Renal medulla	Kruskal-Wallis test
Mice						
Choline	3287.15 (2134.77; 4490.67)	409.01 (378.99; 488.68)	1185.42 (1121.19; 1250.79)	5936.21 (5516.04; 6513.84)###	11558.12 (10385.53; 13407.00)###; &&&	P < 0.001
Carnitine	153.86 (129.59; 179.43)	454.72 (429.28; 499.83)*	402.70 (381.97; 416.83)	106.79 (86.63; 129.68)###; &&	121.26 (100.00; 136.62)###; &	P < 0.001
TMA	35.32 (20.13; 47.56)	7.05 (5.79; 9.40)	2.76 (2.30; 2.96)*	48.31 (41.01; 74.24)&&&	70.80 (48.53; 96.49)##, &&&	P < 0.001
TMAO	2.04 (1.69; 5.23)	9.95 (7.86; 48.03)	21.86 (20.61; 33.20)**	20.56 (12.92; 114.54)**	28.75 (11.95; 113.58)**	P = 0.001
Rats						
Choline	1818.51 (1417.03; 1893.36)	247.19 (228.96; 262.21)*	867.00 (829.75; 957.90)	2295.91 (1329.02; 2836.27)##	4344.08 (3478.40; 5055.77)###; &&&	P < 0.001
Carnitine	154.24 (132.83; 169.44)	650.07 (638.39; 677.23)	305.01 (291.00; 321.09)	96.46 (91.01; 101.30)###, &&	94.96 (91.31; 99.15)###, &&	P < 0.001
TMA	10.09 (7.97; 12.57)	0.84 (0.75; 1.17)	0.71 (0.60; 0.85)	54.53 (39.55; 86.94)###; &&&	49.56 (44.03; 55.95)##, &&&	P < 0.001
TMAO	26.75 (16.33; 33.03)	3.95 (3.60; 4.28)*	6.66 (5.40; 10.29)	37.90 (21.85; 48.29)##	62.52 (46.84; 118.01)###; &&	P < 0.001
Guinea pigs						
Choline	2286.92 (1584.16; 3893.22)	385.60 (259.56; 544.80)	1453.19 (1352.48; 1547.02)	5713.83 (5434.18; 6143.23)###	9505.60 (8140.01; 10647.24)*; ###; &&	P < 0.001
Carnitine	98.79 (91.10; 116.78)	690.72 (639.38; 817.09)***	266.78 (215.78; 285.33)**	149.94 (124.75; 178.84)#	120.96 (104.00; 141.78)###	P < 0.001
TMA	14.02 (4.45; 32.45)	0.99 (0.20; 1.89)**	3.81 (1.57; 4.27)	7.04 (6.94; 8.59)#	12.49 (9.14; 14.06)###; &	P < 0.001
TMAO	9.81 (7.64; 13.98)	3.01 (1.75; 5.64)	6.50 (3.79; 10.96)	16.82 (12.30; 23.46)##	18.15 (11.56; 30.91)##	P < 0.001

Abbreviations: TMA, trimethylamine; TMAO, trimethylamine oxide. All data are expressed as the median, Q1, Q3; Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test.

*P < 0.05 vs. liver

**P < 0.01 vs. liver

#P < 0.05 vs. heart

##P < 0.01 vs. heart

###P < 0.001 vs. heart

&P < 0.05 vs. lungs

&&P < 0.01 vs. lungs

&&&P < 0.001 vs. lungs.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.t002>

limit of quantification. All study groups demonstrated a similar median plasma concentration of TMAO (Fig 2).

In terms of TMA concentration in the liver, mice exhibited higher levels compared to rats and guinea pigs, with a 3.5-fold and 2.5-fold difference, respectively. However, the TMAO concentration in the liver of mice was 13-fold lower than that of rats. The TMAO/TMA ratio in the liver was almost 30-fold higher in rats compared to mice (Fig 3). Mice displayed higher TMA concentration in the heart compared to rats and guinea pigs, with an 8-fold and 7-fold difference, respectively. The TMAO concentration in the heart was 3-fold higher in mice compared to rats and guinea pigs. Additionally, the TMAO/TMA ratio in the heart was significantly higher in rats compared to mice (Fig 3). Rats exhibited lower TMA concentration in the lungs compared to mice and guinea pigs, with a 4-fold and 5-fold difference, respectively. The median TMAO concentration in the lungs was 3-fold higher in mice compared to rats and guinea pigs. Furthermore, guinea pigs had a 5-fold lower TMAO/TMA ratio in the lungs compared to mice and rats (Fig 3). In the renal cortex, guinea pigs displayed lower TMA

Tissue FMOs

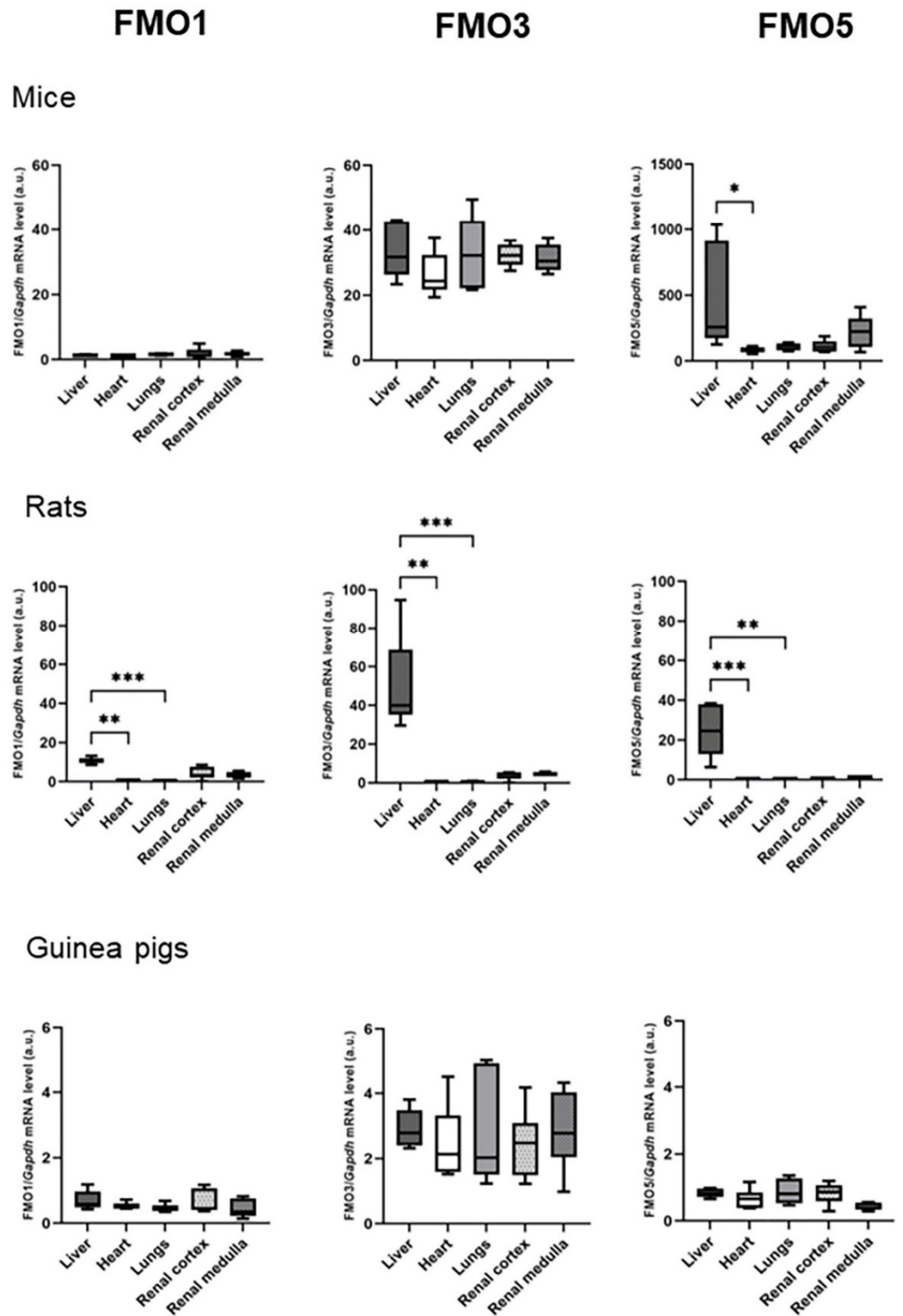


Fig 1. Tissue FMOs. RT-qPCR analysis of FMO1, FMO3 and FMO5 transcript levels in mice, rats and guinea pigs tissues: liver, heart, lungs, renal cortex, renal medulla. Abbreviation: FMO, Flavin-containing monooxygenase. All data are expressed as the median, Q1, Q3, MIN, MAX (n = 5 or 6; use arbitrary units); Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.g001>

concentration compared to mice and rats, with a 7-fold and 8-fold difference, respectively. The TMAO/TMA ratio in the renal cortex was higher in guinea pigs compared to mice and rats, with a 7-fold and 4-fold difference, respectively. There were no significant differences observed between the study groups in terms of TMAO concentration in the renal cortex (Fig 4). The median TMA concentration in the renal medulla was lower in guinea pigs compared to mice and rats, with a 6-fold and 4-fold difference, respectively. The TMAO concentration in the renal medulla was 3-fold higher in rats compared to guinea pigs. No significant differences were found between the groups in terms of the TMAO/TMA ratio in the renal medulla (Fig 4).

3.2.2 Protein quantification of FMO3 and FMO5. The levels of FMO3 protein in the liver (Fig 5), renal cortex, and renal medulla (Fig 6) were significantly higher in rats and guinea pigs compared to mice. Furthermore, rats exhibited a significantly higher level of FMO3 protein in the liver and a significantly lower level in the renal cortex compared to guinea pigs. On the other hand, the level of FMO5 protein in the liver (Fig 5) was highest in mice. Rats also showed a high level of FMO5 protein in the liver.

3.2.3 Choline and carnitine concentrations in plasma and tissues. Among the examined tissues, rats exhibited the lowest choline concentrations compared to mice or guinea pigs. Mice had the lowest concentration of carnitine in the heart and the highest concentration in the lungs. Rats displayed the lowest carnitine concentration in the renal medulla. Guinea pigs had the lowest concentration of carnitine in the liver and the highest concentration in the renal cortex (Table 4).

Table 3. Species-specific comparison of TMAO, TMA, and other metabolites plasma and urine concentrations.

Parameter [$\mu\text{M/L}$]	Mice	Rats	Guinea pigs	Kruskal- Wallis test
Plasma				
Choline	42.68 (36.54; 48.78)	27.01 (23.39; 40.23)	51.22 (32.06; 67.60)	P = 0.09
Carnitine	22.76 (20.65; 26.43)	40.60 (38.37; 43.34)*	22.55 (20.03; 32.49)#	P = 0.007
Urine				
Choline	372.18 (185.54; 464.65)	550.92 (301.78; 778.49)	69.11 (54.19; 97.32)*, ###	P < 0.001
Carnitine	47.79 (43.38; 146.93)	36.64 (32.26; 49.21)	1.98 (1.29; 2.31)***, #	P < 0.001
TMA	17922.01 (345.30; 36429.84)	3.40 (1.94; 6.19)***	33.16 (19.24; 59.62)	P < 0.001
TMAO	1788.76 (993.74; 3315.89)	614.51 (471.73; 798.42)*	619.81 (364.75; 1066.12)*	P = 0.009
TMAO/TMA ratio	0.10 (0.09; 3.60)	225.51 (58.47; 282.12)***	13.34 (10.58; 26.75)	P < 0.001
Stools				
Choline	72.71 (60.99; 130.64)	19.90 (15.86; 55.94)*	60.84 (34.14; 127.10)	P = 0.02
Carnitine	0.85 (0.52; 1.40)	0.28 (0.17; 1.19)	0.57 (0.38; 0.64)	P = 0.18
TMA	51.16 (32.06; 59.87)	14.41 (9.18; 16.87)*	5.96 (1.75; 10.50)**	P = 0.001
TMAO	<LOQ	<LOQ	<LOQ	-

All data are expressed as the median, Q1, Q3; Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test.

*P < 0.05 vs. mice

**P < 0.01 vs. mice

***P < 0.001 vs. mice

#P < 0.05 vs. rats

###P < 0.001 vs. rats.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.t003>

Three species comparison

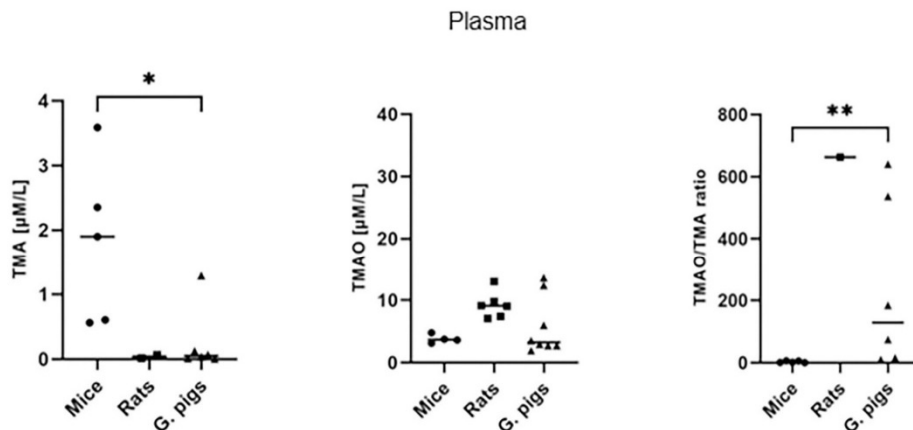


Fig 2. Three species comparison—Plasma. Comparison of the concentrations of TMA, TMAO and the TMAO/TMA ratio in the plasma. Abbreviations: TMA, Trimethylamine; TMAO, Trimethylamine oxide. LOQ for TMA in plasma = 0.017 µM/L. All data are expressed as the individual values and median; Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.g002>

4 Discussion

The key finding of our study is the significant variation in tissue concentration of TMA and TMAO among mice, rats, and guinea pigs, despite comparable plasma levels of TMAO. Additionally, we observed pronounced differences in the concentrations of methylamines across different organs and tissues. Specifically, the kidneys displayed the highest concentrations, while the lungs and hearts exhibited the lowest concentrations of these compounds.

TMAO originates mostly from TMA, a gut microbiota product of dietary choline and carnitine [8–13]. TMA crosses the gut-blood barrier and is oxidized to TMAO by hepatic FMO3 [24]. The expression of the gene encoding FMO3, is switched off in the liver of male mice at the age of 5–6 weeks [28, 33]. In male mice, hepatic FMO1 is responsible for approximately 10% of TMA oxidation to TMAO. These factors contribute to the higher concentration of TMA in mice plasma compared to other species [34].

Increasing evidence suggests that plasma TMAO is a marker of cardiovascular, renal, and metabolic diseases [1–7, 60]. Furthermore, findings from multiple studies suggest a potential involvement of TMAO and TMA in the development of the aforementioned diseases. However, it is crucial to acknowledge the current lack of clinical interventional studies in humans. The existing experimental interventional studies, conducted in diverse animal species and under varying experimental conditions, have produced conflicting results and interpretations [39–44].

The present study aimed to address the current gap in knowledge regarding inter-species differences in tissue concentrations of TMAO, TMA, and their precursors in laboratory animals. Here, we provide comprehensive data on the levels of carnitine, choline, TMA, and TMAO in different tissues and body fluids harvested from the three commonly used species of laboratory animals. Importantly, this study represents the first attempt to evaluate and compare the concentrations of these metabolites across various tissues and body fluids in these three species, which are most commonly utilized in the generation of animal models for disease in pre-clinical studies.

Three species comparison

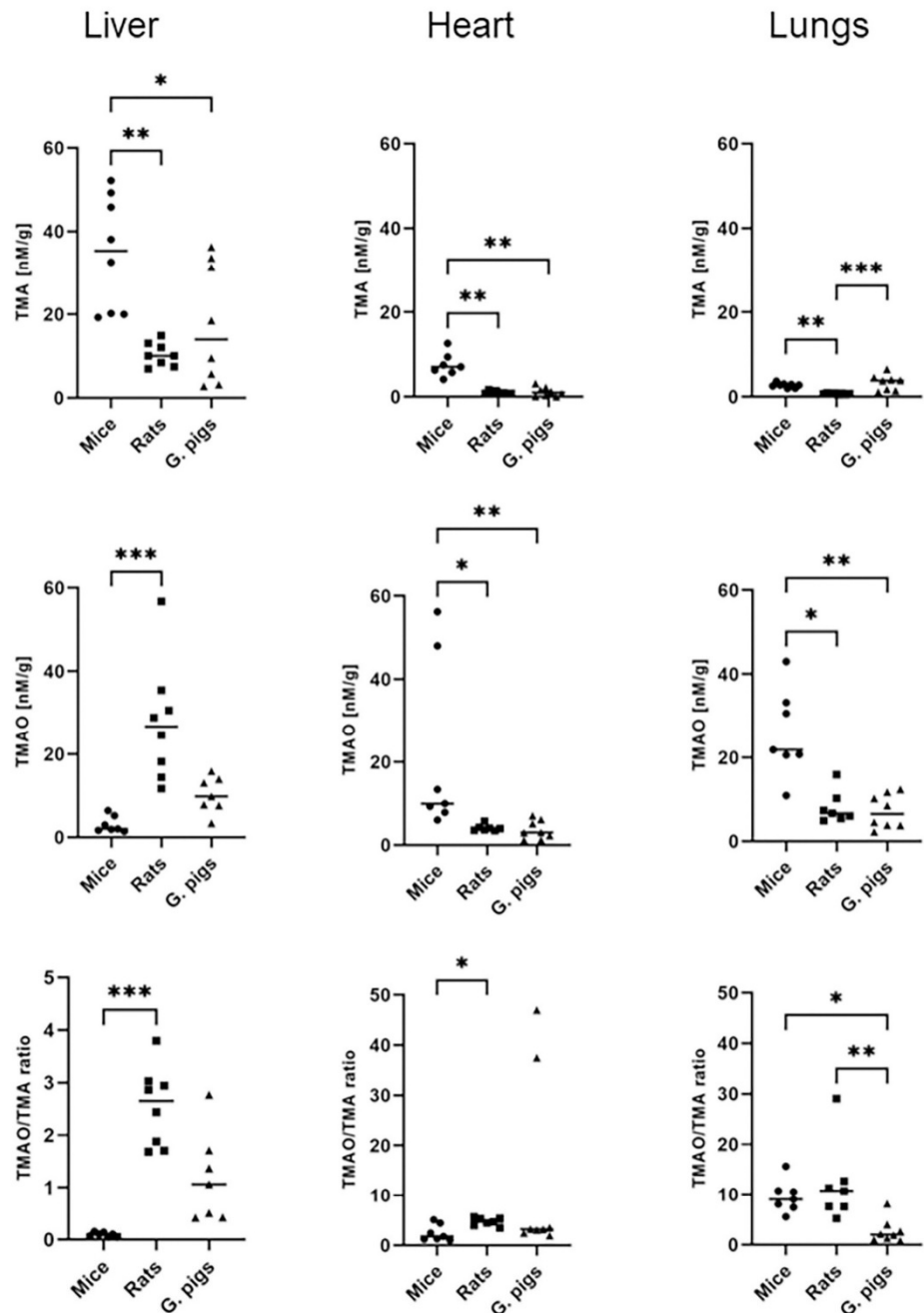


Fig 3. Three species comparison—Tissues. Comparison of the concentrations of TMA, TMAO and the TMAO/TMA ratios in the liver, heart and lungs. Abbreviations: TMA, Trimethylamine; TMAO, Trimethylamine oxide. All data are expressed as the individual values and median; Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.g003>

Three species comparison

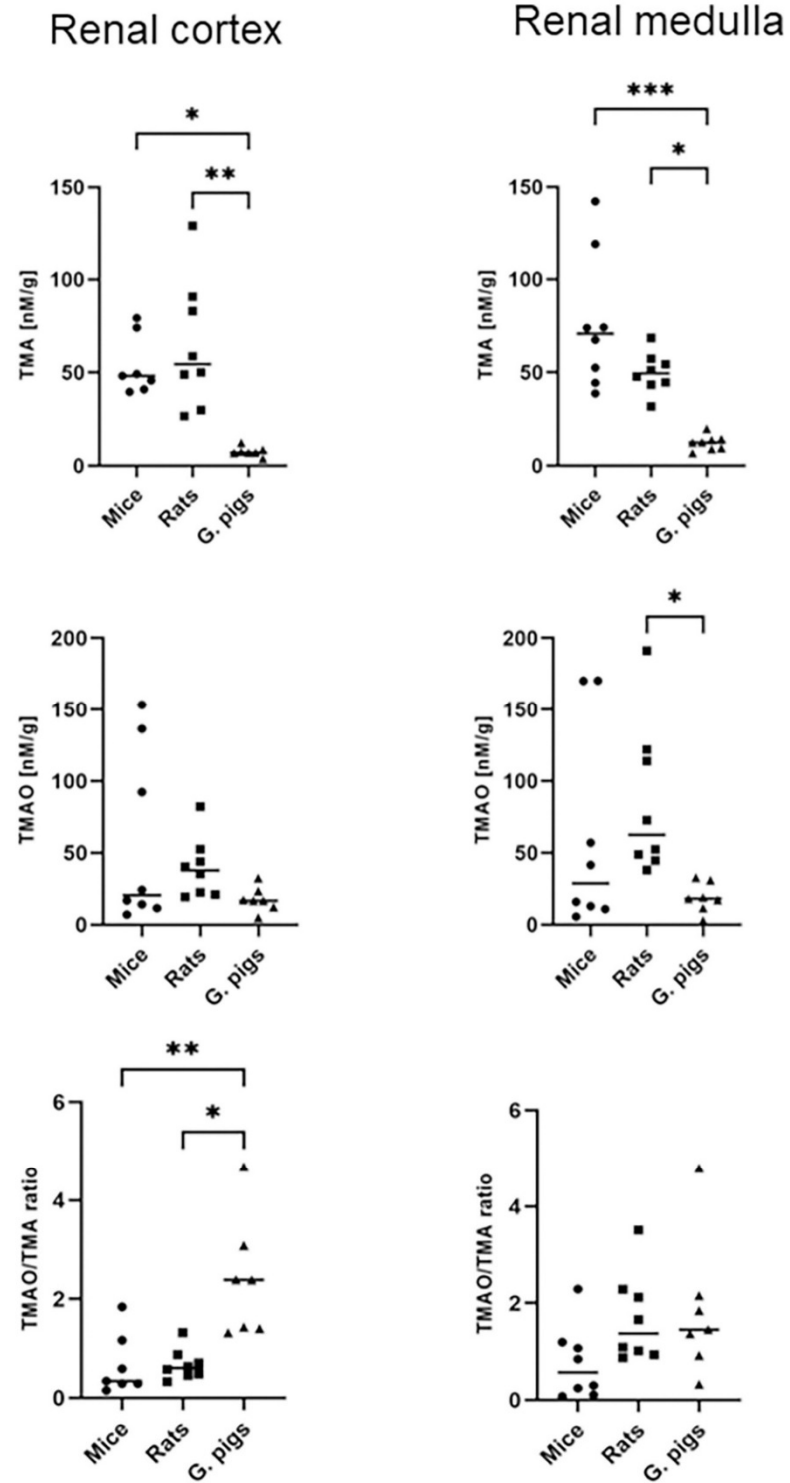


Fig 4. Three species comparison—Tissues, continuation. Comparison of the concentrations of TMA, TMAO and the TMAO/TMA ratios in the renal cortex and renal medulla. Abbreviations: TMA, Trimethylamine; TMAO, Trimethylamine oxide. All data are expressed as the individual values and median; Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.g004>

Choline and carnitine in mammals are obtained from the diet and, to a lesser extent, through endogenous synthesis [61, 62]. Intestinal bacteria metabolize dietary choline and carnitine that are not absorbed in the small intestine, leading to the formation of TMA. In the current study, rats exhibited significantly lower choline concentrations in tissues compared to the other two species. However, plasma choline levels were similar among the three species. Notably, choline concentration in urine was consistently higher than in plasma in all tested species. Additionally, the kidneys showed the highest choline concentration, suggesting that the kidneys play a primary role in choline excretion [63]. In all three species, the heart exhibited the highest concentration of carnitine, potentially highlighting its primary role in transporting

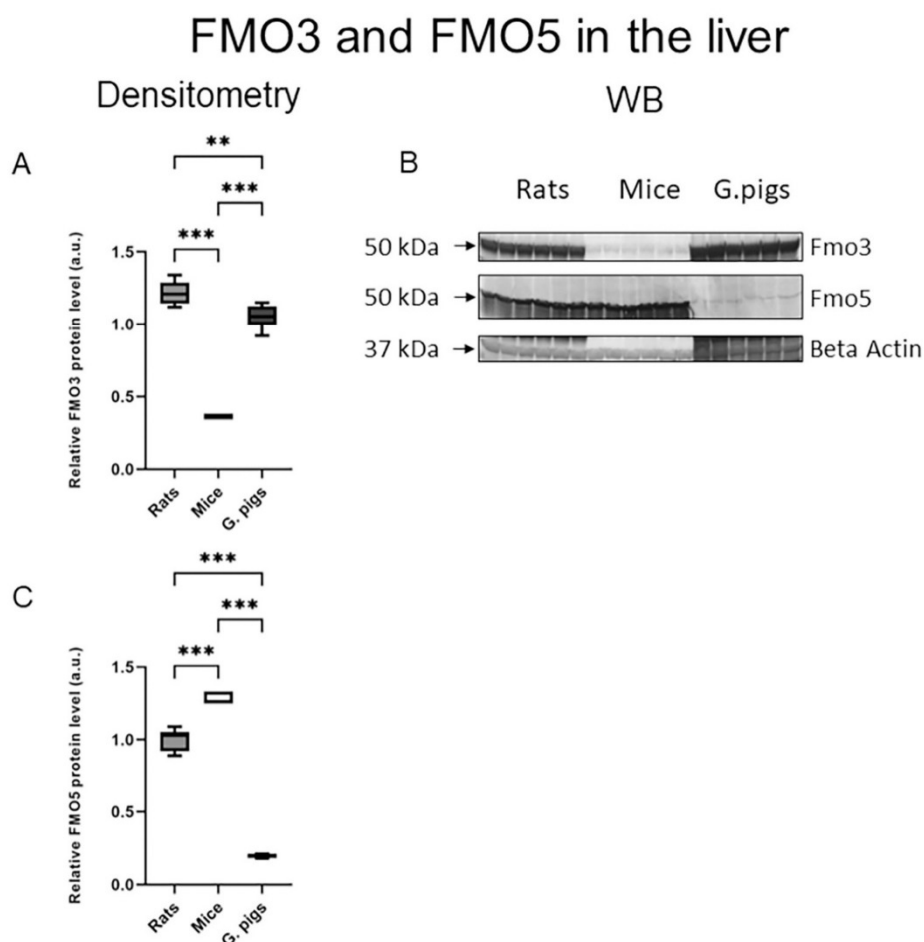


Fig 5. FMO3 and FMO5 in the liver. Western blot analysis of FMO3 (A) and FMO5 (C) protein levels from total protein extract prepared from the liver in rats, mice and guinea pigs. (B) A representative immunoblot. Immunolabeled FMO3 and beta actin loading control bands were quantified using a Molecular Imager. Relative levels of the test proteins are plotted in arbitrary units. Abbreviations: FMO, Flavin-containing monooxygenase. All data are expressed as the median, mean, Q1, Q3, MIN, MAX (n = 4–6); ANOVA followed by post-hoc Tuckey test. ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.g005>

FMO3 in the lungs, renal cortex and medulla

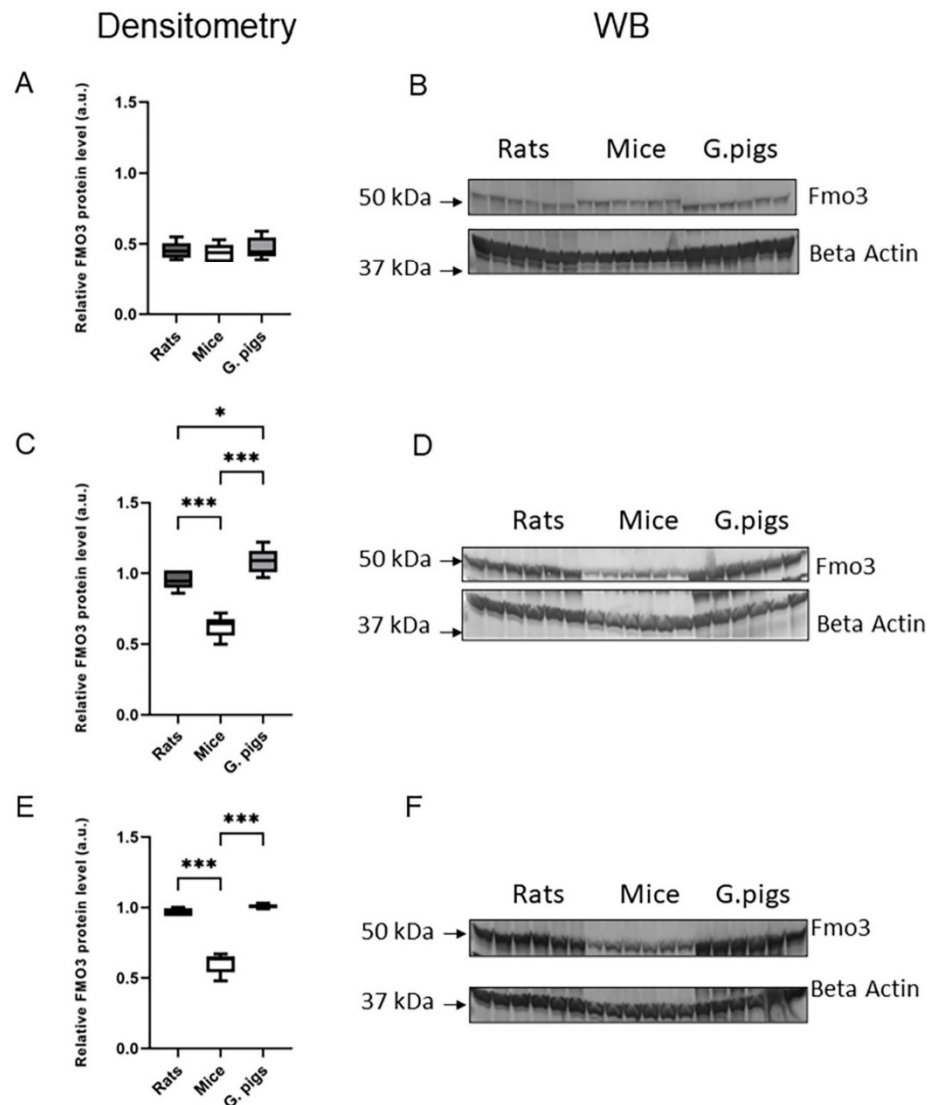


Fig 6. FMO3 in the lungs, renal cortex and medulla. Western blot analysis of FMO3 protein level from total protein extract prepared and a representative immunoblot from the (A, B) lungs (C, D) renal cortex and (E, F) renal medulla in rats, mice and guinea pigs. Immunolabeled FMO3 and beta actin loading control bands were quantified using a Molecular Imager. Relative levels of the test proteins are plotted in arbitrary units. Abbreviations: FMO, Flavin-containing monooxygenase. All data are expressed as the median, mean, Q1, Q3, MIN, MAX (n = 5–6); ANOVA followed by post-hoc Tuckey test. *P < 0.05; ***P < 0.001.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.g006>

long-chain fatty acids to the mitochondrial matrix. This process is essential for beta-oxidation and the subsequent production of energy from fatty acids [64]. Interestingly, we found that guinea pigs had a tenfold higher concentration of carnitine in plasma compared to urine. This finding suggests that carnitine is a highly conserved compound in guinea pigs, with a significant portion being retained rather than excreted in the urine.

Table 4. Species-specific comparison of choline and carnitine concentrations in various tissues.

Parameter [$\mu\text{M}/\text{kg}$]	Mice	Rats	Guinea pigs	Kruskal-Wallis test
Liver				
Choline	3287.15 (2134.77; 4490.67)	1818.51 (1417.03; 1893.36)*	2286.92 (1584.16; 3893.22)	P = 0.02
Carnitine	153.86 (129.59; 179.43)	154.24 (132.83; 169.44)	98.79 (91.10; 116.78)**,#	p = 0.002
Heart				
Choline	409.01 (378.99; 488.68)	247.19 (228.96; 262.21)*	385.60 (259.56; 544.80)	P = 0.01
Carnitine	454.72 (429.28; 499.83)	650.07 (638.39; 677.23)*	690.72 (639.38; 817.09)**	P = 0.002
Lungs				
Choline	1185.42 (1121.19; 1250.79)	867.00 (829.75; 957.90)	1453.19 (1352.48; 1547.02)###	P < 0.001
Carnitine	402.70 (381.97; 416.83)	305.01 (291.00; 321.09)*	266.78 (215.78; 285.33)***	P < 0.001
Renal cortex				
Choline	5936.21 (5516.04; 6513.84)	2295.91 (1329.02; 2836.27)**	5713.83 (5434.18; 6143.23)##	P < 0.001
Carnitine	106.79 (86.63; 129.68)	96.46 (91.01; 101.30)	149.94 (124.75; 178.84)*,##	P = 0.003
Renal medulla				
Choline	11558.12 (10385.53; 13407.00)	4344.08 (3478.40; 5055.77)***	9505.60 (8140.01; 10647.24)#	P < 0.001
Carnitine	121.26 (100.00; 136.62)	94.96 (91.31; 99.15)*	120.96 (104.00; 141.78)	P = 0.02

All data are expressed as the median, Q1, Q3; Kruskal-Wallis test followed by post-hoc Dunn's test.

*P < 0.05 vs. mice

**P < 0.01 vs. mice

***P < 0.001 vs. mice

#P < 0.05 vs. rats

##P < 0.01 vs. rats

###P < 0.001 vs. rats.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0297474.t004>

4.1 TMA and TMAO concentration

Tissue and plasma levels of TMA and TMAO are influenced by the absorption of TMA, its subsequent oxidation to TMAO, and the excretion of both amines. In the present study, mice consistently exhibited the highest TMA levels in their tissues. Moreover, mice demonstrated the highest concentration of TMA in their stool. Based on these findings, we speculate that the elevated microbial production of TMA in the gut could be an additional factor contributing to the high plasma concentrations of this compound in mice. To further elucidate the role of gut microbiota in TMA production, examining TMA concentrations in the blood from the portal vein across these species would be informative.

The highest concentrations of TMA among the examined tissues were consistently observed in the renal cortex and medulla, supporting the notion that these organs serve as major routes for the excretion of TMA and TMAO [65–67].

In our study, the plasma concentration of TMAO in mice, rats, and guinea pigs ranged between 5 and 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ (Table 1), which is in line with previously reported levels in healthy individuals and animals [2, 3, 35, 36, 38, 42, 68–73]. Notably, the plasma concentration of TMAO was comparable across all three species, despite significant differences in tissue concentrations of TMA and TMAO. Variations in the rates of TMA to TMAO oxidation, tissue clearance, and urine excretion of these compounds may contribute to this phenomenon. The urinary excretion of TMA and TMAO plays a crucial role in maintaining low plasma levels of these metabolites. Numerous studies have consistently demonstrated that impaired kidney function is associated with elevated plasma levels of TMA and TMAO [7, 65, 70, 74]. Therefore, given the significant differences in tissue concentrations of TMA and TMAO among the three species, but similar plasma levels of these methylamines, it appears that plasma TMAO

level could potentially serve as a biomarker for kidney function, akin to plasma creatinine or cystatin [75–78]. On the other hand, tissue concentrations of TMA and TMAO may provide more valuable insights into their potential biological roles and functions within the body, stressing also interspecies differences.

4.2 FMO expression and TMA/TMAO oxidation

In humans, it is widely recognized that FMO3 in the liver plays a significant role in the oxidation of TMA to TMAO [24]. Our study shows that rats have the highest level of FMO3 protein and the highest TMAO/TMA ratio in the liver, compared to mice and guinea pigs. Moreover, rats exhibited FMO5 gene expression and a high level of FMO5 protein in the liver. Notably, we also detected FMO1 and FMO3 gene expression in the renal cortex and renal medulla of rats, along with the highest TMAO/TMA ratio in the renal medulla. These findings suggest that TMA is metabolized to TMAO in the kidneys of rats as well. Other studies have reported FMO1 expression in the kidneys of both humans and rats [79, 80]. The TMAO/TMA ratio in urine was highest in rats. However, both rats and guinea pigs exhibited ratios above 1, confirming effective TMA metabolism to TMAO in these species.

Guinea pigs exhibited lower levels of FMO3 protein and a lower TMAO/TMA ratio in the liver compared to rats. Additionally, they had the lowest level of FMO5 protein in the liver among all the species studied. However, guinea pigs demonstrated the highest level of FMO3 protein in the renal cortex and renal medulla compared to the other two species. Moreover, the TMAO/TMA ratios were above 1 in both the renal cortex and renal medulla of guinea pigs. These findings suggest that kidney oxidation likely plays an important role in the metabolism of TMA to TMAO in guinea pigs.

We investigated the expression of FMO1, FMO3, and FMO5 in five different tissues. Among the studied species, mice exhibited the highest expression of FMO5 in the liver. Conversely, mice demonstrated low expression levels of FMO1 and FMO3 in the liver as well as other tissues. Furthermore, mice had the lowest level of FMO3 protein and the highest level of FMO5 protein in the liver compared to the other species examined. These findings support the notion that in the liver of male mice, FMO3 is not actively involved in TMA metabolism [28, 33]. Janmohamed et al. showed that the most expressed FMO in the mice liver is FMO5, which is consistent with our results [28]. Further studies investigating the role of FMO5 in male mice are warranted to gain a deeper understanding of its function in TMA metabolism. Additionally, it is noteworthy that in our study in most tissues of mice, the TMAO/TMA ratio was below 1. This observation suggests that TMA metabolism is relatively low in the overall mouse body.

Several studies suggest that the guinea pig may be the preferred model for preclinical cardiovascular research due to its lipoprotein profile, cholesterol metabolism, and heart electrophysiology, which closely resemble those of humans [81–84]. To date, experimental studies investigating the role of TMAO in cardiovascular disease in guinea pigs are lacking. This study establishes the plasma and tissue concentration of TMAO and its precursors in guinea pigs for the first time, paving the way for further research on evaluating the impact of TMAO in cardiovascular and other diseases using the guinea pig model.

The limitation of our study lies in the absence of calculations for the total 24-hour turnover of TMAO and its precursors. Such calculations would necessitate precise measurements of 24-hour intake and excretion in stools, urine, and exhaled air. A more comprehensive understanding of TMAO metabolism would involve evaluating the metabolism of TMAO precursors in the intestinal tract, the efficacy of the gut-blood barrier, and metabolism within the liver, kidney, and other tissues.

In this study, we analyzed the concentrations of TMAO and its precursors across various tissues in rats, mice, and guinea pigs. While plasma TMAO levels were similar, we noted marked differences in tissue concentrations of TMA, TMAO, and FMOs expression among the three species. This underscores the interspecies variations in the TMAO pathway, suggesting possible differences in the biological responses to either activation or inhibition of this pathway through experimental procedures. Recognizing the critical role of species selection in pre-clinical study design for effective translational research [56, 57], our findings provide valuable insights to guide the choice of animal species in upcoming studies.

5 Conclusion

In conclusion, our research provides new data on the distinct concentrations of TMA precursors, TMA, and TMAO in plasma, urine, and tissues across mice, rats, and guinea pigs. Uniquely, we found that despite similar plasma TMAO levels, tissue concentrations of TMA and TMAO significantly varied across these species, indicating crucial interspecies differences. This variation in tissue methylamine concentrations suggests potential disparities in the physiological importance and roles of these compounds, as well as possible differences in biological responses to exogenous TMA and TMAO. Such understanding could have notable implications for future research directions, especially in studies focusing on the role of TMA and TMAO in cardiovascular, renal, and metabolic diseases. Future preclinical studies should take into account interspecies differences, particularly in the context of FMOs expression and TMA and TMAO levels. This approach would help ensure that the research outcomes are more representative and reflective of the biological diversity and would enable a more comprehensive understanding of the precise functions of TMA and TMAO in disease pathogenesis.

Supporting information

S1 Table. List of oligonucleotide primers used for RT-qPCR.
(DOCX)

S2 Table. List of antibodies used for western blot analyses.
(DOCX)

S3 Table. Raw data.
(PDF)

S1 Fig. Western blotting—original images.
(PDF)

Author Contributions

Conceptualization: Marcin Ufnal.

Data curation: Klaudia M. Maksymiuk.

Formal analysis: Klaudia M. Maksymiuk, Marcin Ufnal.

Funding acquisition: Marcin Ufnal.

Investigation: Klaudia M. Maksymiuk, Mateusz Szudzik, Emilia Samborowska, Dawid Chabowski, Marek Konop.

Methodology: Klaudia M. Maksymiuk, Mateusz Szudzik, Emilia Samborowska, Marcin Ufnal.

Project administration: Klaudia M. Maksymiuk.

Resources: Klaudia M. Maksymiuk, Mateusz Szudzik, Emilia Samborowska, Marek Konop.

Supervision: Marcin Ufnal.

Validation: Klaudia M. Maksymiuk, Marcin Ufnal.

Visualization: Klaudia M. Maksymiuk.

Writing – original draft: Klaudia M. Maksymiuk.

Writing – review & editing: Dawid Chabowski, Marcin Ufnal.

References

1. Zhang Y, Wang Y, Ke B, Du J. TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure. *Transl Res.* 2021; 228:109–25. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2020.08.007> PMID: 32841736
2. 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. *J Am Heart Assoc.* 2017; 6(7). <https://doi.org/10.1161/JAHA.116.004947> PMID: 28663251
3. Ge X, Zheng L, Zhuang R, Yu P, Xu Z, Liu G, et al. The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Hypertension Risk: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. *Adv Nutr.* 2020; 11(1):66–76. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz064> PMID: 31269204
4. Dehghan P, Farhangi MA, Nikniaz L, Nikniaz Z, Asghari-Jafarabadi M. Gut microbiota-derived metabolite trimethylamine N-oxide (TMAO) potentially increases the risk of obesity in adults: An exploratory systematic review and dose-response meta-analysis. *Obes Rev.* 2020; 21(5):e12993. <https://doi.org/10.1111/obr.12993> PMID: 32017391
5. Shan Z, Sun T, Huang H, Chen S, Chen L, Luo C, et al. Association between microbiota-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide and type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2017; 106(3):888–94. <https://doi.org/10.3945/ajcn.117.157107> PMID: 28724646
6. Zhuang R, Ge X, Han L, Yu P, Gong X, Meng Q, et al. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine N-oxide and the risk of diabetes: A systematic review and dose-response meta-analysis. *Obes Rev.* 2019; 20(6):883–94. <https://doi.org/10.1111/obr.12843> PMID: 30868721
7. Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatista-Boyle B, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ Res.* 2015; 116(3):448–55. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.305360> PMID: 25599331
8. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med.* 2013; 19(5):576–85. <https://doi.org/10.1038/nm.3145> PMID: 23563705
9. Zeisel SH, Wishnok JS, Blusztajn JK. Formation of methylamines from ingested choline and lecithin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1983; 225(2):320–4. PMID: 6842395
10. Miller CA, Corbin KD, da Costa KA, Zhang S, Zhao X, Galanko JA, et al. Effect of egg ingestion on trimethylamine-N-oxide production in humans: a randomized, controlled, dose-response study. *Am J Clin Nutr.* 2014; 100(3):778–86. <https://doi.org/10.3945/ajcn.114.087692> PMID: 24944063
11. Zeisel SH, DaCosta KA, Fox JG. Endogenous formation of dimethylamine. *Biochem J.* 1985; 232(2):403–8. <https://doi.org/10.1042/bj2320403> PMID: 4091797
12. Koeth RA, Lam-Galvez BR, Kirsop J, Wang Z, Levison BS, Gu X, et al. L-Carnitine in omnivorous diets induces an atherogenic gut microbial pathway in humans. *J Clin Invest.* 2019; 129(1):373–87. <https://doi.org/10.1172/JCI94601> PMID: 30530985
13. Zhang AQ, Mitchell SC, Smith RL. Dietary precursors of trimethylamine in man: a pilot study. *Food Chem Toxicol.* 1999; 37(5):515–20. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(99\)00028-9](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(99)00028-9) PMID: 10456680
14. Cheung W, Keski-Rahkonen P, Assi N, Ferrari P, Freisling H, Rinaldi S, et al. A metabolomic study of biomarkers of meat and fish intake. *Am J Clin Nutr.* 2017; 105(3):600–8. <https://doi.org/10.3945/ajcn.116.146639> PMID: 28122782
15. Costabile G, Vetrani C, Bozzetto L, Giacco R, Bresciani L, Del Rio D, et al. Plasma TMAO increase after healthy diets: results from 2 randomized controlled trials with dietary fish, polyphenols, and whole-grain cereals. *Am J Clin Nutr.* 2021; 114(4):1342–50. <https://doi.org/10.1093/ajcn/nqab188> PMID: 34091663

16. Cheropkina H, Catucci G, Marucco A, Fenoglio I, Gilardi G, Sadeghi SJ. Human flavin-containing monooxygenase 1 and its long-sought hydroperoxyflavin intermediate. *Biochem Pharmacol*. 2021; 193:114763. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114763> PMID: 34509493
17. Fiorentini F, Geier M, Binda C, Winkler M, Faber K, Hall M, et al. Biocatalytic Characterization of Human FMO5: Unearthing Baeyer-Villiger Reactions in Humans. *ACS Chem Biol*. 2016; 11(4):1039–48. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.5b01016> PMID: 26771671
18. Fiorentini F, Romero E, Fraaije MW, Faber K, Hall M, Mattevi A. Baeyer-Villiger Monooxygenase FMO5 as Entry Point in Drug Metabolism. *ACS Chem Biol*. 2017; 12(9):2379–87. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00470> PMID: 28783300
19. Catucci G, Aramini D, Sadeghi SJ, Gilardi G. Ligand stabilization and effect on unfolding by polymorphism in human flavin-containing monooxygenase 3. *Int J Biol Macromol*. 2020; 162:1484–93. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.08.032> PMID: 32781122
20. Matsumoto K, Hasegawa T, Ohara K, Kamei T, Koyanagi J, Akimoto M. Role of human flavin-containing monooxygenase (FMO) 5 in the metabolism of nabumetone: Baeyer-Villiger oxidation in the activation of the intermediate metabolite, 3-hydroxy nabumetone, to the active metabolite, 6-methoxy-2-naphthylacetic acid in vitro. *Xenobiotica*. 2021; 51(2):155–66.
21. Gao C, Catucci G, Castrignano S, Gilardi G, Sadeghi SJ. Inactivation mechanism of N61S mutant of human FMO3 towards trimethylamine. *Sci Rep*. 2017; 7(1):14668. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15224-9> PMID: 29116146
22. Phillips IR, Shephard EA. Flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3): genetic variants and their consequences for drug metabolism and disease. *Xenobiotica*. 2020; 50(1):19–33. <https://doi.org/10.1080/00498254.2019.1643515> PMID: 31317802
23. Zhang J, Cerny MA, Lawson M, Mosadeghi R, Cashman JR. Functional activity of the mouse flavin-containing monooxygenase forms 1, 3, and 5. *J Biochem Mol Toxicol*. 2007; 21(4):206–15. <https://doi.org/10.1002/jbt.20176> PMID: 17721934
24. Lang DH, Yeung CK, Peter RM, Ibarra C, Gasser R, Itagaki K, et al. Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3. *Biochem Pharmacol*. 1998; 56(8):1005–12. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(98\)00218-4](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(98)00218-4) PMID: 9776311
25. Cashman JR, Zhang J. Human flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006; 46:65–100. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141043> PMID: 16402899
26. Lattard V, Buronfosse T, Lachuer J, Longin-Sauvageon C, Moulin C, Benoit E. Cloning, sequencing, tissue distribution, and heterologous expression of rat flavin-containing monooxygenase 3. *Arch Biochem Biophys*. 2001; 391(1):30–40. <https://doi.org/10.1006/abbi.2001.2317> PMID: 11414682
27. Lattard V, Lachuer J, Buronfosse T, Garnier F, Benoit E. Physiological factors affecting the expression of FMO1 and FMO3 in the rat liver and kidney. *Biochem Pharmacol*. 2002; 63(8):1453–64. [https://doi.org/10.1016/s0006-2952\(02\)00886-9](https://doi.org/10.1016/s0006-2952(02)00886-9) PMID: 11996886
28. Janmohamed A, Hernandez D, Phillips IR, Shephard EA. Cell-, tissue-, sex- and developmental stage-specific expression of mouse flavin-containing monooxygenases (Fmos). *Biochem Pharmacol*. 2004; 68(1):73–83. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.02.036> PMID: 15183119
29. Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA, Phillips IR. Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nat Genet*. 1997; 17(4):491–4. <https://doi.org/10.1038/ng1297-491> PMID: 9398858
30. Humbert JA, Hammond KB, Hathaway WE. Trimethylaminuria: the fish-odour syndrome. *Lancet*. 1970; 2(7676):770–1. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(70\)90241-2](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(70)90241-2) PMID: 4195988
31. Akerman BR, Lemass H, Chow LM, Lambert DM, Greenberg C, Bibeau C, et al. Trimethylaminuria is caused by mutations of the FMO3 gene in a North American cohort. *Mol Genet Metab*. 1999; 68(1):24–31. <https://doi.org/10.1006/mgme.1999.2885> PMID: 10479479
32. Shimizu M, Koibuchi N, Mizugaki A, Hishinuma E, Saito S, Hiratsuka M, et al. Genetic variants of flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) in Japanese subjects identified by phenotyping for trimethylaminuria and found in a database of genome resources. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2021; 38:100387. <https://doi.org/10.1016/j.dmpk.2021.100387> PMID: 33831674
33. Cherrington NJ, Cao Y, Cherrington JW, Rose RL, Hodgson E. Physiological factors affecting protein expression of flavin-containing monooxygenases 1, 3 and 5. *Xenobiotica*. 1998; 28(7):673–82. <https://doi.org/10.1080/004982598239254> PMID: 9711811
34. Veeravalli S, Karu K, Scott F, Fennema D, Phillips IR, Shephard EA. Effect of Flavin-Containing Monooxygenase Genotype, Mouse Strain, and Gender on Trimethylamine N-oxide Production, Plasma Cholesterol Concentration, and an Index of Atherosclerosis. *Drug Metab Dispos*. 2018; 46(1):20–5. <https://doi.org/10.1124/dmd.117.077636> PMID: 29070510

35. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, et al. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. *Cell*. 2016; 165(1):111–24. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.011> PMID: 26972052
36. Liu M, Han Q, Yang J. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) increased aquaporin-2 expression in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Hypertens*. 2019; 41(4):312–22. <https://doi.org/10.1080/10641963.2018.1481420> PMID: 29985655
37. Zhang X, Li Y, Yang P, Liu X, Lu L, Chen Y, et al. Trimethylamine-N-Oxide Promotes Vascular Calcification Through Activation of NLRP3 (Nucleotide-Binding Domain, Leucine-Rich-Containing Family, Pyrin Domain-Containing-3) Inflammasome and NF-kappaB (Nuclear Factor kappaB) Signals. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2020; 40(3):751–65.
38. Fang Q, Zheng B, Liu N, Liu J, Liu W, Huang X, et al. Trimethylamine N-Oxide Exacerbates Renal Inflammation and Fibrosis in Rats With Diabetic Kidney Disease. *Front Physiol*. 2021; 12:682482. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.682482> PMID: 34220546
39. Aldana-Hernandez P, Leonard KA, Zhao YY, Curtis JM, Field CJ, Jacobs RL. Dietary Choline or Trimethylamine N-oxide Supplementation Does Not Influence Atherosclerosis Development in Ldlr^{-/-} and Apoe^{-/-} Male Mice. *J Nutr*. 2020; 150(2):249–55. <https://doi.org/10.1093/jn/nxz214> PMID: 31529091
40. Andraos S, Jones B, Lange K, Clifford SA, Thorstensen EB, Kerr JA, et al. Trimethylamine N-oxide (TMAO) Is not Associated with Cardiometabolic Phenotypes and Inflammatory Markers in Children and Adults. *Curr Dev Nutr*. 2021; 5(1):nzaa179. <https://doi.org/10.1093/cdn/nzaa179> PMID: 33501405
41. Bordoni L, Samulak JJ, Sawicka AK, Pelikant-Malecka I, Radulska A, Lewicki L, et al. Trimethylamine N-oxide and the reverse cholesterol transport in cardiovascular disease: a cross-sectional study. *Sci Rep*. 2020; 10(1):18675. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75633-1> PMID: 33122777
42. Gawrys-Kopczynska M, Konop M, Maksymiuk K, Kraszewska K, Derzsi L, Sozanski K, et al. TMAO, a seafood-derived molecule, produces diuresis and reduces mortality in heart failure rats. *Elife*. 2020; 9. <https://doi.org/10.7554/eLife.57028> PMID: 32510330
43. Videja M, Vilskersts R, Korzh S, Cirule H, Sevostjanovs E, Dambrova M, et al. Microbiota-Derived Metabolite Trimethylamine N-Oxide Protects Mitochondrial Energy Metabolism and Cardiac Functionality in a Rat Model of Right Ventricle Heart Failure. *Front Cell Dev Biol*. 2020; 8:622741. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.622741> PMID: 33520996
44. Huc T, Drapala A, Gawrys M, Konop M, Bielinska K, Zaorska E, et al. Chronic, low-dose TMAO treatment reduces diastolic dysfunction and heart fibrosis in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018; 315(6):H1805–H20. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00536.2018> PMID: 30265149
45. Jiang S, Shui Y, Cui Y, Tang C, Wang X, Qiu X, et al. Gut microbiota dependent trimethylamine N-oxide aggravates angiotensin II-induced hypertension. *Redox Biol*. 2021; 46:102115. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102115> PMID: 34474396
46. Bai C, Biwersi J, Verkman AS, Matthay MA. A mouse model to test the in vivo efficacy of chemical chaperones. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1998; 40(1):39–45. [https://doi.org/10.1016/s1056-8719\(98\)00034-3](https://doi.org/10.1016/s1056-8719(98)00034-3) PMID: 9920533
47. Jaworska K, Bielinska K, Gawrys-Kopczynska M, Ufnal M. TMA (trimethylamine), but not its oxide TMAO (trimethylamine-oxide), exerts haemodynamic effects: implications for interpretation of cardiovascular actions of gut microbiome. *Cardiovasc Res*. 2019; 115(14):1948–9. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvz231> PMID: 31504256
48. Geng J, Yang C, Wang B, Zhang X, Hu T, Gu Y, et al. Trimethylamine N-oxide promotes atherosclerosis via CD36-dependent MAPK/JNK pathway. *Biomed Pharmacother*. 2018; 97:941–7. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.016> PMID: 29136772
49. Brunt VE, Casso AG, Gioscia-Ryan RA, Sapinsley ZJ, Ziembra BP, Clayton ZS, et al. Gut Microbiome-Derived Metabolite Trimethylamine N-Oxide Induces Aortic Stiffening and Increases Systolic Blood Pressure With Aging in Mice and Humans. *Hypertension*. 2021; 78(2):499–511. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.120.16895> PMID: 33966451
50. Ding L, Chang M, Guo Y, Zhang L, Xue C, Yanagita T, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherosclerosis is associated with bile acid metabolism. *Lipids Health Dis*. 2018; 17(1):286. <https://doi.org/10.1186/s12944-018-0939-6> PMID: 30567573
51. Jaworska K, Hering D, Mosieniak G, Bielak-Zmijewska A, Pilz M, Konwerski M, et al. TMA, A Forgotten Uremic Toxin, but Not TMAO, Is Involved in Cardiovascular Pathology. *Toxins (Basel)*. 2019; 11(9). <https://doi.org/10.3390/toxins11090490> PMID: 31454905
52. Maksymiuk KM, Szudzik M, Gawrys-Kopczynska M, Onyszkiewicz M, Samborowska E, Mogilnicka I, et al. Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats. *J Transl Med*. 2022; 20(1):470. <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03687-y> PMID: 36243862

53. Kinney LA BB, Chen HC, Kennedy GL. Inhalation Toxicology of Trimethylamine. *Inhalation Toxicology*. 1990; 2(1):41–51.
54. Guest I, Varma DR. Selective growth inhibition of the male progeny of mice treated with trimethylamine during pregnancy. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993; 71(2):185–7. <https://doi.org/10.1139/y93-026> PMID: [8319141](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8319141/)
55. Jaworska K, Konop M, Hutsch T, Perlejewski K, Radkowski M, Grochowska M, et al. Trimethylamine But Not Trimethylamine Oxide Increases With Age in Rat Plasma and Affects Smooth Muscle Cells Viability. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020; 75(7):1276–83. <https://doi.org/10.1093/gerona/glaz181> PMID: [31411319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31411319/)
56. Davidson MK, Lindsey JR, Davis JK. Requirements and selection of an animal model. *Isr J Med Sci*. 1987; 23(6):551–5. PMID: [3312096](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3312096/)
57. Fliegner D, Gerdes C, Meding J, Stasch JP. Translational In Vivo Models for Cardiovascular Diseases. *Handb Exp Pharmacol*. 2016; 232:223–34. https://doi.org/10.1007/164_2015_31 PMID: [26552402](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26552402/)
58. Zaragoza C, Gomez-Guerrero C, Martin-Ventura JL, Blanco-Colio L, Lavin B, Mallavia B, et al. Animal models of cardiovascular diseases. *J Biomed Biotechnol*. 2011; 2011:497841. <https://doi.org/10.1155/2011/497841> PMID: [21403831](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21403831/)
59. Bielinska K, Radkowski M, Grochowska M, Perlejewski K, Huc T, Jaworska K, et al. High salt intake increases plasma trimethylamine N-oxide (TMAO) concentration and produces gut dysbiosis in rats. *Nutrition*. 2018; 54:33–9. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2018.03.004> PMID: [29705499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29705499/)
60. Dumas ME, Rothwell AR, Hoyles L, Aranas T, Chilloux J, Calderari S, et al. Microbial-Host Co-metabolites Are Prodromal Markers Predicting Phenotypic Heterogeneity in Behavior, Obesity, and Impaired Glucose Tolerance. *Cell Rep*. 2017; 20(1):136–48. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.039> PMID: [28683308](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28683308/)
61. Vance DE, Ridgway ND. The methylation of phosphatidylethanolamine. *Prog Lipid Res*. 1988; 27(1):61–79. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(88\)90005-7](https://doi.org/10.1016/0163-7827(88)90005-7) PMID: [3057511](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3057511/)
62. Pekala J, Patkowska-Sokola B, Bodkowski R, Jamroz D, Nowakowski P, Lochynski S, et al. L-carnitine—metabolic functions and meaning in humans life. *Curr Drug Metab*. 2011; 12(7):667–78. <https://doi.org/10.2174/138920011796504536> PMID: [21561431](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21561431/)
63. Zeisel SH. Dietary choline: biochemistry, physiology, and pharmacology. *Annu Rev Nutr*. 1981; 1:95–121. <https://doi.org/10.1146/annurev.nu.01.070181.000523> PMID: [6764726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6764726/)
64. Adeva-Andany MM, Calvo-Castro I, Fernandez-Fernandez C, Donapetry-Garcia C, Pedre-Pineiro AM. Significance of l-carnitine for human health. *IUBMB Life*. 2017; 69(8):578–94. <https://doi.org/10.1002/iub.1646> PMID: [28653367](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28653367/)
65. Bell JD, Lee JA, Lee HA, Sadler PJ, Wilkie DR, Woodham RH. Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1096(2):101–7. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(91\)90046-c](https://doi.org/10.1016/0925-4439(91)90046-c) PMID: [2001424](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2001424/)
66. Mitchell SC, Zhang AQ, Noblet JM, Gillespie S, Jones N, Smith RL. Metabolic disposition of [14C]-trimethylamine N-oxide in rat: variation with dose and route of administration. *Xenobiotica*. 1997; 27(11):1187–97. <https://doi.org/10.1080/004982597239949> PMID: [9413922](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9413922/)
67. Bain MA, Fornasini G, Evans AM. Trimethylamine: metabolic, pharmacokinetic and safety aspects. *Curr Drug Metab*. 2005; 6(3):227–40. <https://doi.org/10.2174/1389200054021807> PMID: [15975041](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15975041/)
68. Zhang W, Miikeda A, Zuckerman J, Jia X, Charugundla S, Zhou Z, et al. Inhibition of microbiota-dependent TMAO production attenuates chronic kidney disease in mice. *Sci Rep*. 2021; 11(1):518. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-80063-0> PMID: [33436815](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33436815/)
69. Hsu CN, Yang HW, Hou CY, Chang-Chien GP, Lin S, Tain YL. Melatonin Prevents Chronic Kidney Disease-Induced Hypertension in Young Rat Treated with Adenine: Implications of Gut Microbiota-Derived Metabolites. *Antioxidants (Basel)*. 2021; 10(8). <https://doi.org/10.3390/antiox10081211> PMID: [34439458](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34439458/)
70. Hsu CN, Chang-Chien GP, Lin S, Hou CY, Lu PC, Tain YL. Association of Trimethylamine, Trimethylamine N-oxide, and Dimethylamine with Cardiovascular Risk in Children with Chronic Kidney Disease. *J Clin Med*. 2020; 9(2). <https://doi.org/10.3390/jcm9020336> PMID: [31991725](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31991725/)
71. Wu WK, Chen CC, Liu PY, Panyod S, Liao BY, Chen PC, et al. Identification of TMAO-producer phenotype and host-diet-gut dysbiosis by carnitine challenge test in human and germ-free mice. *Gut*. 2019; 68(8):1439–49. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317155> PMID: [30377191](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30377191/)
72. Kruger R, Merz B, Rist MJ, Ferrario PG, Bub A, Kulling SE, et al. Associations of current diet with plasma and urine TMAO in the KarMeN study: direct and indirect contributions. *Mol Nutr Food Res*. 2017; 61(11). <https://doi.org/10.1002/mnfr.201700363> PMID: [28755411](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28755411/)

73. Wu Q, Zhao Y, Zhang X, Yang X. A faster and simpler UPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of trimethylamine N-oxide, trimethylamine and dimethylamine in different types of biological samples. *Food Funct.* 2019; 10(10):6484–91. <https://doi.org/10.1039/c9fo00954j> PMID: 31532423
74. 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. *Nephrol Dial Transplant.* 2006; 21(5):1300–4. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfk056> PMID: 16401621
75. Dharnidharka VR, Kwon C, Stevens G. Serum cystatin C is superior to serum creatinine as a marker of kidney function: a meta-analysis. *Am J Kidney Dis.* 2002; 40(2):221–6. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2002.34487> PMID: 12148093
76. Fliser D, Ritz E. Serum cystatin C concentration as a marker of renal dysfunction in the elderly. *Am J Kidney Dis.* 2001; 37(1):79–83. <https://doi.org/10.1053/ajkd.2001.20628> PMID: 11136171
77. Levey AS, Perrone RD, Madias NE. Serum creatinine and renal function. *Annu Rev Med.* 1988; 39:465–90. <https://doi.org/10.1146/annurev.me.39.020188.002341> PMID: 3285786
78. Kashani K, Rosner MH, Ostermann M. Creatinine: From physiology to clinical application. *Eur J Intern Med.* 2020; 72:9–14. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2019.10.025> PMID: 31708357
79. Novick RM, Mitzey AM, Brownfield MS, Elfarra AA. Differential localization of flavin-containing monooxygenase (FMO) isoforms 1, 3, and 4 in rat liver and kidney and evidence for expression of FMO4 in mouse, rat, and human liver and kidney microsomes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009; 329(3):1148–55. <https://doi.org/10.1124/jpet.109.152058> PMID: 19307449
80. Dolphin CT, Cullingford TE, Shephard EA, Smith RL, Phillips IR. Differential developmental and tissue-specific regulation of expression of the genes encoding three members of the flavin-containing monooxygenase family of man, FMO1, FMO3 and FMO4. *Eur J Biochem.* 1996; 235(3):683–9. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1996.00683.x> PMID: 8654418
81. Dasagrandhi D, ASK R, Muthuswamy A, Lennox AM, Jayavelu T, Devanathan V, et al. Ischemia/reperfusion injury in male guinea pigs: An efficient model to investigate myocardial damage in cardiovascular complications. *Biomed Pharmacother.* 2018; 99:469–79. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.087> PMID: 29665648
82. Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 1998; 39(1):60–76. [https://doi.org/10.1016/s0008-6363\(98\)00110-2](https://doi.org/10.1016/s0008-6363(98)00110-2) PMID: 9764190
83. Fernandez ML, Volek JS. Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond).* 2006; 3:17. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-3-17> PMID: 16566831
84. Rajput SK, Singh JN, Sharma SS. Evaluation of terfenadine and ketoconazole-induced QT prolongation in conscious telemetered guinea pigs. *Pharmacol Rep.* 2010; 62(4):683–8. [https://doi.org/10.1016/s1734-1140\(10\)70325-x](https://doi.org/10.1016/s1734-1140(10)70325-x) PMID: 20885008

PUBLIKACJA nr 2

Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats.

Klaudia Maksymiuk

Mateusz Szudzik

Marta Gawryś-Kopczyńska

Maksymilian Onyszkiewicz

Emilia Samborowska

Izabella Mogilnicka

Marcin Ufnal

RESEARCH

Open Access



Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats

Klaudia M. Maksymiuk¹, Mateusz Szudzik¹, Marta Gawryś-Kopczyńska¹, Maksymilian Onyszkiewicz¹, Emilia Samborowska², Izabella Mogilnicka¹ and Marcin Ufnal^{1*} 

Abstract

Background: Trimethylamine oxide (TMAO) is a biomarker in cardiovascular and renal diseases. TMAO originates from the oxidation of trimethylamine (TMA), a product of gut microbiota and manufacturing industries-derived pollutant, by flavin monooxygenases (FMOs). The effect of chronic exposure to TMA on cardiovascular and renal systems is undetermined.

Methods: Metabolic, hemodynamic, echocardiographic, biochemical and histopathological evaluations were performed in 12-week-old male SPRD rats receiving water (controls) or TMA (200 or 500 μ M/day) in water for 18 weeks. TMA and TMAO levels, the expression of FMOs and renin-angiotensin system (RAS) genes were evaluated in various tissues.

Results: In comparison to controls, rats receiving high dose of TMA had significantly increased arterial systolic blood pressure (126.3 ± 11.4 vs 151.2 ± 19.9 mmHg; $P = 0.01$), urine protein to creatinine ratio (1.6 (1.5; 2.8) vs 3.4 (3.3; 4.2); $P = 0.01$), urine KIM-1 levels (2338.3 ± 732.0 vs 3519.0 ± 953.0 pg/mL; $P = 0.01$), and hypertrophy of the tunica media of arteries and arterioles (36.61 ± 0.15 vs 45.05 ± 2.90 μ m, $P = 0.001$ and 18.44 ± 0.62 vs 23.79 ± 2.60 μ m, $P = 0.006$; respectively). Mild degeneration of renal bodies with glomerulosclerosis was also observed. There was no significant difference between the three groups in body weight, water-electrolyte balance, echocardiographic parameters and RAS expression. TMA groups had marginally increased 24 h TMA urine excretion, whereas serum levels and 24 h TMAO urine excretion were increased up to 24-fold, and significantly increased TMAO levels in the liver, kidneys and heart. TMA groups had lower FMOs expression in the kidneys.

Conclusions: Chronic exposure to TMA increases blood pressure and increases markers of kidney damage, including proteinuria and KIM-1. TMA is rapidly oxidized to TMAO in rats, which may limit the toxic effects of TMA on other organs.

Keywords: Trimethylamine, Trimethylamine oxide, Chronic kidney disease, Hypertension, Proteinuria, Kidney damage

*Correspondence: mufnal@wum.edu.pl

¹ Department of Experimental Physiology and Pathophysiology, Laboratory of the Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland

Full list of author information is available at the end of the article

Background

The reciprocal interaction between the cardiovascular and renal systems is well established [1]. Furthermore, heart failure often coexists with renal failure, which is defined as a cardiorenal syndrome (CRS). There are



© The Author(s) 2022. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

several types of CRS, which are categorized by their primary cause (heart or kidney dysfunction) and duration (chronic or acute). Other comorbidities may also be involved in the development of CRS including diabetes mellitus or sepsis [2].

Recently, the association between CRS and gut microbiota has been intensively investigated [3–6]. For instance, it has been postulated that trimethylamine oxide (TMAO), one of the gut microbiota-derived metabolites, may be involved in the pathogenesis of cardiovascular and kidney diseases. Several studies have shown that patients with chronic kidney disease (CKD) have elevated plasma and/or urine TMAO concentration [7–10]. Besides, patients with end-stage renal failure show increased plasma TMAO levels, which decreases after hemodialysis [11]. Tang et al. found that TMAO contributes to progressive kidney dysfunction and renal fibrosis [10]. Finally, a positive correlation between high plasma TMAO and atherosclerosis [12–14], heart failure [15, 16] and hypertension [17, 18] was reported, and a causal relation between TMAO and cardiovascular disease (CVD) has been proposed. However, other studies suggest beneficial effect of TMAO in CVD [19–21]. Therefore, currently TMAO is considered a biomarker in CVD and renal diseases, but the causative role of TMAO in CVD is open to debate and may depend on TMAO concentration and animal species.

Interestingly, our previous studies found that trimethylamine (TMA), but not TMAO, exerts toxic effects on the cardiovascular system. Specifically, TMA increased blood pressure in anesthetized rats during the intravenous administration and exerted cytotoxic effects in *in vitro* studies [22–24].

Plasma TMAO originates from TMA, a gut bacteria product of choline and carnitine [25]. Other origins of TMA in the human body are also possible. First, TMA is manufactured on the order of thousands of tons worldwide. It is used in the production of plastics, disinfectants, insect attractants, intense sweeteners, seafood flavor, vitamin B4 and many other compounds. Second, TMA is an air pollutant [26]. TMA oxidation occurs mainly in the liver by the action of flavin monooxygenase 3 (FMO3) [27]. Both TMA and TMAO are removed from the body by the kidneys [25], although TMA was also detected in exhaled air in patients with end-stage renal disease [28]. The impact of TMA on human health is poorly determined; however, some studies suggested toxic effects of TMA [28–31].

To the best of our knowledge, the effect of chronic TMA administration on renal and cardiovascular systems has not been evaluated thus far. Therefore, the present study aimed to assess the impact of chronic TMA exposure on cardiovascular and renal systems in rats.

Methods

Animal

The study was performed according to Directive 1020/63 EU on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the II Local Ethical Committee in Warsaw (permission: WAW/2/098/2019). The study was performed on 12-week-old male Sprague–Dawley rats (SPRD). Rats were obtained from the Central Laboratory for Experimental Animals, Medical University of Warsaw, Poland.

Rats were housed in groups of 2–4 animals in polypropylene cages, fed a laboratory diet (Labofed B standard, Kcynia, Poland), 12 h light / 12 h dark cycle, temperature 22–23 °C and humidity 45–55%.

The animals were divided into 3 groups of 9 rats. The first group had access to tap water (control group), the second group to a TMA solution (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) at a concentration of 4.85 mmol/L (TMA—low dose group—“L group”) and the third group to a TMA solution at a concentration of 14.24 mmol/L (TMA—high dose group—“H group”). Based on pilot experiments, the low dose of TMA was selected as a dose that did not increase urine TMA excretion (suggesting complete TMA oxidation to TMAO). The high dose of TMA was selected as a dose that increased TMA urine excretion and plasma concentration. The water or TMA solutions were available to animals *ad libitum*. The study ran for 18 weeks. Blinding of laboratory technicians were not possible due to characteristic smell of TMA in drinking water and body fluids [32].

Metabolic, echocardiography and hemodynamic measurements

After 18 weeks, the animals were placed in metabolic cages for 48 h. The weight of water consumed, food consumed, feces excreted, urine excreted, and body weight were measured after 24 h and 48 h. 24 h urine collection was performed to measure water-electrolyte, TMA and TMAO balance and concentrations of choline, carnitine, TMA and TMAO. Fresh urine samples produced during spontaneous voids were collected to measure urine protein/creatinine and KIM-1 levels. The next day, an ECHO was performed (Samsung HM70: an ultrasound system equipped with a linear probe 5–13 MHz). After the ECHO study, the animals were anesthetized with urethane (1.5 g/kg BW). The femoral artery was cannulated for arterial blood pressure measurements with Biopac MP 150 (Biopac Systems, USA). After completing the measurements, blood was drawn from the heart to measure concentrations of serum choline, carnitine, TMA and TMAO, serum KIM-1 and other serum biochemical analysis. The rats were euthanized by cervical vertebrae dislocation. Colon feces were collected and prepared as

previously described [33]. The heart, lung, kidney (separately cortex and medulla) and liver were collected and frozen at -80°C . The harvested fragments of the liver, kidneys and heart were fixed in a buffered solution of 10% formalin. The TMA, TMAO, choline and carnitine concentrations in stool, serum and urine were examined. Serum sodium, potassium, creatinine, urea and urine creatinine, protein and glucose were analyzed using a Cobas 6000 analyzer (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA).

Stools, plasma, urine and tissue choline, carnitine, TMA and TMAO measurements

Tissue samples were weighed, placed in 10% ethanol (90 μL per 10 mg tissue) and homogenized using the Precellys Cryolys Evolution tissue homogenizer (Bertin Instruments). After homogenization, samples were stored at -80°C until analysis.

Samples were prepared using the derivatization technique. The derivatization reaction of TMA was based on a modified Johnson's protocol. The reader is referred to the Additional file 1: Methods for a detailed description of the protocol. Metabolite concentrations in serum, urine, stool extract and tissue homogenate were evaluated using Waters Acquity Ultra Performance Liquid Chromatograph coupled with Waters TQ-S triple-quadrupole mass spectrometer. The mass spectrometer was operated in multiple-reaction monitoring (MRM)-positive electrospray ionization (ESI+) mode for all analytes. Analyte concentrations (choline, carnitine, TMA and TMAO) were calculated using a calibration curve prepared by spiking water with working stock solutions. Biological samples (serum, urine, stool extract and tissue homogenate) were compared against the calibration curve. The concentrations of analytes (choline, carnitine, TMA and TMAO) in tissue were measured in dry tissue mass. For a detailed description of the method, see Additional file 1: Methods.

Histopathology

The preserved tissues (kidney, liver and heart) were macroscopically examined and then dehydrated in graded ethanol and xylene baths. The dehydrated sections (measuring 3–4 μm) were then embedded in paraffin wax and stained with hematoxylin and eosin (H-E). The liver, heart and kidney tissue structures were examined using an Axiolab A5 light microscope with AxioCam 208 color and ZEN 3.0 software (Zeiss, Jena, Germany). Microscopic evaluation was performed at $10\times$ and $40\times$ magnification. Morphometric measurements of 5 arcuate arteries and 5 arterioles were performed for each individual. Four measurements were made at the $\times 40$ lens

magnification using the ZEN 3.0 software (Zeiss, Jena, Germany) for each type of vessel.

ELISA test

Serum and urine KIM-1 (cat. No ab223858) levels were evaluated using EIAab Kits (Wuhan EIAab Science Co. Ltd., Wuhan, Hubei, China). Both protocols were performed according to the standard protocol by ELISA Kit Operating Instruction. The absorbance intensity was measured at 450 nm with a Multiskan microplate reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All experiments were performed in duplicate.

RNA isolation and RT-qPCR

Total cellular RNA was extracted from the lungs, liver, renal cortex and renal medulla (approximately 15 mg of wet tissue) using a Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to Chomczyński and Sacchi [34]. The procedure was performed as previously described [35]. Specific primers were purchased from Bio-rad (Additional file 2: Table S1). The PCR products were subjected to a melting curve analysis to confirm amplification specificity. Bio-Rad CFX Maestro Software (Hercules, CA, USA) was used for data analysis. Transcript levels were normalized relative to the *Gapdh* reference gene (selected from four different housekeeping genes using NormFinder software: version 0.953, MOMA, Aarhus, Denmark) for each tissue separately.

Statistic

The Shapiro–Wilk test was used to test the normality of the distribution. Differences between the three groups for metabolic, hemodynamic, and ECHO parameters and serum and urine KIM-1 concentrations, morphometric measurements of arcuate arteries and arterioles were evaluated by one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test. Differences between the groups for urine protein, creatinine and glucose concentrations, metabolites concentrations (choline, carnitine, TMA, TMAO), TMA/TMAO balance, RT-qPCR analysis of FMO1, FMO3, FMO5, REN, AGT, AGTr1a, AGTr1b, AGT2 were evaluated by Kruskal–Wallis test followed by post-hoc Dunn's test. A value of two-sided $p < 0.05$ was considered significant. Statistical analysis was conducted using STATISTICA 13.3 (Stat Soft, Krakow, Poland).

Results

Metabolic parameters

After the treatment, there were no significant differences between the groups in body weight, food intake and urine output. Rats on TMA tended to drink more water and excrete more feces (Table 1).

Table 1 Metabolic parameters

Parameter	Control group	L group	H group	One-way ANOVA
Body weight [g]	431.52 (± 20.08)	429.77 (± 25.56)	440.93 (± 21.22)	<i>P</i> = 0.53
Water [g/24 h]	31.94 (± 6.01)	36.28 (± 5.07)	35.47 (± 5.04)	<i>P</i> = 0.21
Food [g/24 h]	19.28 (± 1.85)	20.23 (± 1.79)	20.33 (± 2.70)	<i>P</i> = 0.53
Feces [g/24 h]	7.74 (± 2.33)	10.08 (± 2.38)	9.48 (± 1.66)	<i>P</i> = 0.08
Urine [g/24 h]	19.17 (± 5.64)	19.32 (± 3.53)	18.83 (± 3.75)	<i>P</i> = 0.97

All data are expressed as the mean ± SD. ANOVA followed by post hoc Tuckey-test
L group TMA low-dose group; *H group* TMA high-dose group.

Hemodynamic and ECHO parameters

Rats on TMA showed higher blood pressure (Table 2). Specifically, the H group had significantly higher systolic blood pressure and demonstrated a trend towards higher diastolic blood pressure.

There were no significant differences between the groups in echocardiographic parameters (Additional file 3: Table S2).

TMA and TMAO concentrations in stool, serum and urine

The median TMA stool concentration was significantly higher in the H group than in the control or L group. The median TMA and TMAO serum concentrations were significantly higher in the H group than in the control group, eightfold and sixfold, respectively. TMA and TMAO serum concentrations were also higher in the L group than in the control group. The median TMA and TMAO urine concentrations were significantly higher in the H group than in controls, 17-fold and 24-fold, respectively. The median TMAO urine concentration was higher in the L group than in the control group [11-fold], but TMA urine concentration was similar to the control group (Table 3).

There were no significant differences between groups in choline and carnitine concentrations. TMAO concentration in stool was below the lower limit of quantification.

TMA/TMAO balance

L and H groups consumed TMA in water at an average dose of 200 and 500 µM/day, respectively. The amount of TMA excreted per day was significantly higher in the H

group than in the control or L group, 17-fold and 20-fold, respectively. The amount of TMAO excreted per day was significantly higher in H and L groups than in the control group (Fig. 1), 24-fold and 11-fold, respectively.

TMA and TMAO concentrations in the tissue

In most of the evaluated tissues, TMAO concentrations were several-fold higher in TMA groups than in controls. In contrast, TMA levels were only moderately higher in TMA groups and there were no significant differences in choline and carnitine levels. (Table 4).

Urine biochemical analysis

Rats from the H group showed significantly higher protein concentration in urine, protein/ creatinine ratio and glucose concentration in urine than the control group (Fig. 2). Urine KIM-1 levels were significantly higher in the H group compared to the control group.

Serum biochemical analysis

There was a trend for a higher serum potassium concentration in the TMA groups than in the control group (Additional file 4: Table S3). There were no significant differences between groups in the serum urea, serum creatinine, serum sodium concentrations, creatinine clearance and KIM-1 protein in serum.

FMOs genes expression

The FMO3 gene expression in the renal cortex and renal medulla was significantly lower in the L group than in the control group. The L group had significantly

Table 2 Hemodynamic parameters

Parameter	Control group	L group	H group	One-way ANOVA
SBP [mmHg]	126.3 (± 11.4)	141.3 (± 17.9)	151.2 (± 19.9)*	<i>P</i> = 0.02
DBP [mmHg]	70.8 (± 14.0)	64.2 (± 13.5)	81.78 (± 14.1)	<i>P</i> = 0.06
Heart rate [bpm]	314 (± 86)	330 (± 58)	373 (± 13)	<i>P</i> = 0.16
SVR [mmHg·min·mL ⁻¹]	1.51 (± 0.95)	0.73 (± 0.19)	3.67 (± 5.16)	<i>P</i> = 0.14

All data are expressed as the mean ± SD; ANOVA followed by post hoc Tuckey-test; **P* < 0.05 vs control group

SBP systolic blood pressure, DBP diastolic blood pressure, SVR Systemic Vascular Resistance, *L group* TMA low-dose group, *H group* TMA high-dose group

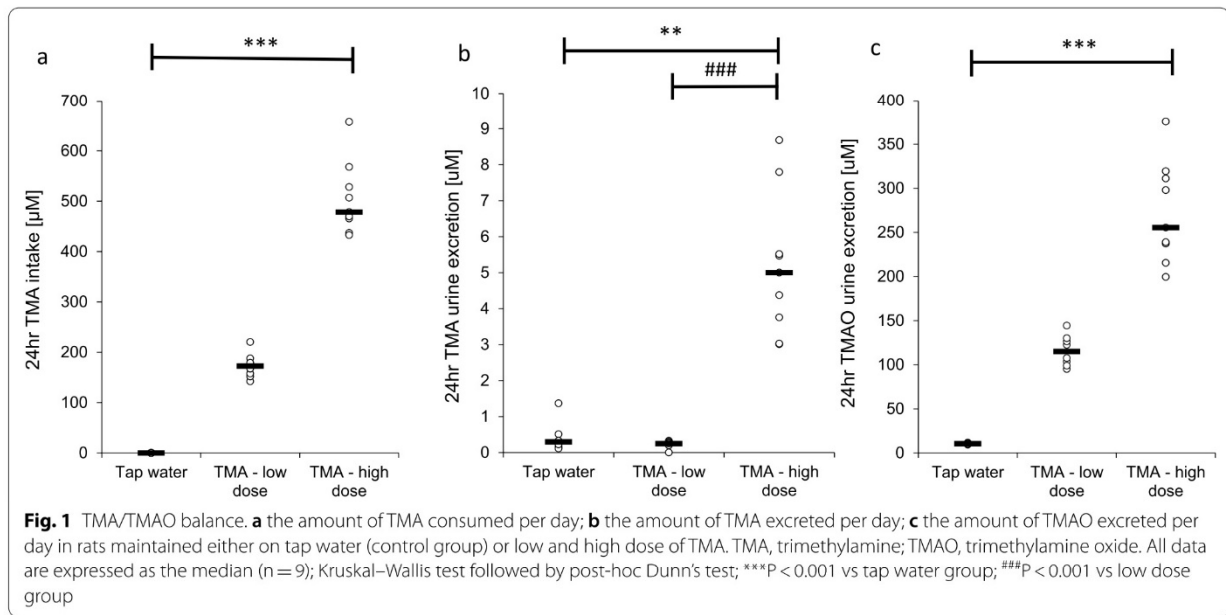
Table 3 TMAO, TMA and their precursors concentrations in stool, serum and urine

Parameter [µM/l]	Control group	L group	H group	Kruskal–Wallis test
Stool				
TMA	19.70 (13.86; 30.38)	30.14 (21.27; 41.67)	54.62 (47.88; 79.21)**	<i>P</i> = 0.003
Choline	77.55 (67.81; 92.10)	61.87 (57.19; 84.98)	81.52 (77.15; 88.23)	<i>P</i> = 0.41
Carnitine	8.91 (7.43; 11.49)	6.07 (3.97; 8.03)	6.52 (5.87; 7.62)	<i>P</i> = 0.26
Serum				
TMAO	8.96 (6.46; 11.85)	26.25 (25.30; 31.67)*	49.50 (45.84; 84.76)***	<i>P</i> < 0.001
TMA	0.04 (0.03; 0.04)	0.14 (0.09; 0.17)*	0.32 (0.27; 0.64)***	<i>P</i> < 0.001
Choline	75.92 (60.91; 104.79)	117.31 (93.88; 135.97)	95.77 (78.62; 110.24)	<i>P</i> = 0.13
Carnitine	66.77 (60.34; 70.64)	74.90 (64.88; 80.64)	66.47 (57.60; 73.78)	<i>P</i> = 0.29
Urine				
TMAO	584.98 (448.50; 686.60)	6 143.59 (5 569.76; 6 449.26)*	14 049.76 (13 902.77; 15 586.82)***; #	<i>P</i> < 0.001
TMA	15.18 (9.75; 20.99)	15.10 (12.94; 16.37)	257.37 (207.48; 324.83)***; ###	<i>P</i> < 0.001
Choline	94.41 (69.78; 151.54)	135.07 (118.75; 160.19)	137.25 (129.10; 154.52)	<i>P</i> = 0.27
Carnitine	169.45 (142.06; 232.12)	153.41 (141.67; 171.76)	134.18 (123.83; 165.68)	<i>P</i> = 0.23

All data are expressed as the median (Q1; Q3); Kruskal–Wallis test followed by post-hoc Dunn’s test

TMA trimethylamine, TMAO trimethylamine oxide, L group TMA low-dose group, H group TMA high-dose group

P* < 0.05 vs control group; **P* < 0.001 vs control group; #*P* < 0.05 vs low dose group; ###*P* < 0.001 vs low dose group



lower FMO1 gene expression in the renal medulla than the control group. Additionally, the H group had significantly lower FMO3 gene expression in the renal cortex than the control group. There were no significant differences between groups in the FMO5 gene expression in evaluated tissues (Fig. 3).

Renin-angiotensin system gene expression

The AGT gene expression in the renal medulla was significantly lower in the L group than in the control group. The AGTr1b gene expression in the renal cortex was increased in the L group compared to the control group. There were no significant differences between groups in

Table 4 The TMAO, TMA and other metabolites concentrations in the tissue

Parameter [$\mu\text{M}/\text{kg}$]	Control group	L group	H group	Kruskal–Wallis test
Lungs				
TMAO	9.27 (5.19; 11.07)	52.04 (48.16; 57.69)*	218.25 (191.74; 282.54)***	$P < 0.001$
TMA	6.52 (5.14; 8.93)	6.71 (5.85; 8.63)	9.76 (7.26; 11.28)	$P = 0.18$
Choline	1 870.59 (1 784.86; 2 062.80)	2 038.94 (1 985.86; 2 159.95)	1 969.03 (1 877.74; 2 120.19)	$P = 0.42$
Carnitine	307.11 (277.93; 309.62)	279.62 (272.50; 342.72)	309.68 (293.66; 334.90)	$P = 0.23$
Liver				
TMAO	5.40 (4.24; 9.57)	19.82 (13.79; 23.19)	35.85 (29.32; 41.87)***	$P = 0.001$
TMA	47.80 (38.09; 47.25)	63.12 (53.61; 73.26)*	80.39 (62.98; 92.61)***	$P < 0.001$
Choline	1 112.92 (921.26; 1 462.16)	1 124.02 (814.50; 1 241.82)	1 265.63 (1 014.44; 2 007.82)	$P = 0.11$
Carnitine	470.73 (452.88; 481.55)	514.03 (477.57; 589.24)	568.35 (498.70; 589.18)	$P = 0.34$
Renal cortex				
TMAO	14.48 (13.13; 21.87)	27.76 (26.04; 36.82)	189.74 (82.22; 204.48)***	$P < 0.001$
TMA	158.48 (149.59; 163.61)	240.14 (229.81; 262.72)*	487.66 (389.55; 593.86)***	$P < 0.001$
Choline	1 441.73 (1 159.19; 1 538.25)	1 512.66 (1 462.91; 1 687.80)	1 346.40 (1 025.19; 1 521.07)	$P = 0.56$
Carnitine	314.85 (291.49; 362.62)	344.41 (226.85; 364.37)	358.71 (306.06; 434.33)	$P = 0.78$
Renal medulla				
TMAO	18.53 (14.43; 27.82)	42.74 (34.16; 43.01)	192.02 (73.95; 213.70)***, #	$P < 0.001$
TMA	193.08 (186.32; 218.50)	286.22 (267.48; 294.91)	449.83 (348.32; 524.00)***	$P < 0.001$
Choline	2 408.67 (1 737.76; 2 570.56)	1 198.82 (399.11; 1 493.18)	1 751.37 (1 308.89; 2 353.36)	$P = 0.06$
Carnitine	341.55 (314.27; 355.18)	297.82 (288.73; 310.64)	306.90 (299.75; 355.56)	$P = 0.10$
Heart				
TMAO	3.22 (2.45; 5.77)	35.59 (34.37; 48.97)*	96.30 (90.30; 112.43)***	$P < 0.001$
TMA	0.70 (0.58; 0.85)	4.02 (3.67; 4.36)*	11.32 (10.42; 13.17)***, #	$P < 0.001$
Choline	129.98 (124.15; 156.68)	145.91 (134.83; 150.98)	140.36 (135.37; 152.92)	$P = 0.45$
Carnitine	759.22 (727.41; 796.04)	795.12 (698.43; 838.37)	883.12 (814.61; 916.01)	$P = 0.06$

TMA, trimethylamine; TMAO, trimethylamine oxide; L group – TMA low-dose group; H group – TMA high-dose group. All data are expressed as the median (Q1; Q3); Kruskal–Wallis test followed by post-hoc Dunn's test. * $P < 0.05$ vs control group; *** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ vs low dose group

the REN, AGTr1a, and AGTr2 gene expression (Additional file 5: Fig. S1).

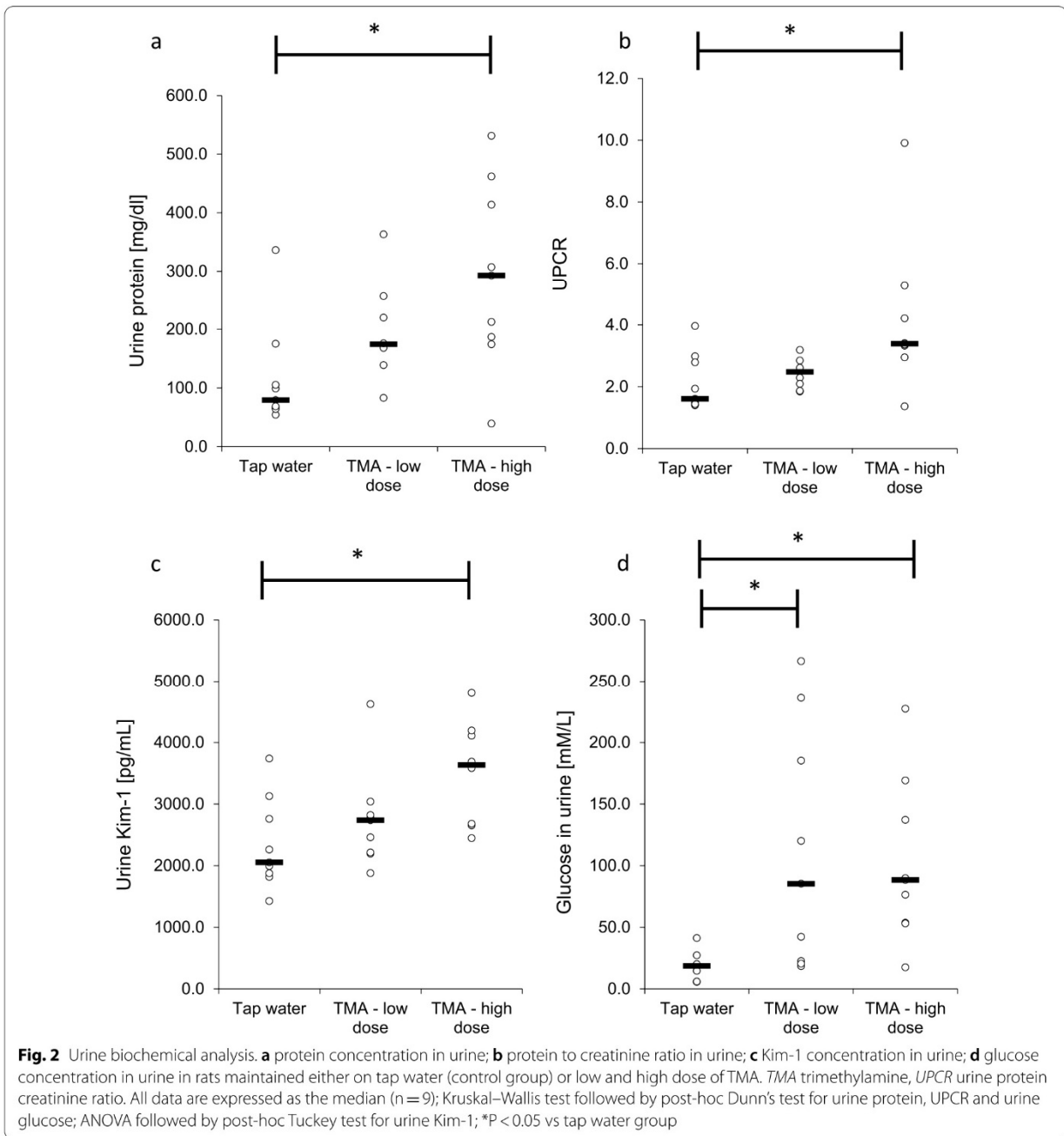
Histopathological evaluation

The control group showed no pathological changes in the liver or heart tissue. Nevertheless, in the kidneys of control animals, we observed some lymphohistiocytic infiltrates in the stroma, Bowman's capsule hyperplasia and thickening of the basal membranes of the tubules and vessels of the glomerulus.

In the kidneys of the L and H groups, the severity of the abovementioned changes was greater. Specifically, in the L and H groups, the pronounced thickening of the membranes of the substate tubules and glomerular vessels, mild degeneration of renal bodies with glomerulosclerosis, the hypertrophy of the tunica media of arteries and arterioles with vacuolization and degeneration of smooth myocytes were present. The H group showed significantly thicker accurate arteries and arterioles ($45.05 \pm 2.90 \mu\text{m}$ and $23.79 \pm 2.60 \mu\text{m}$;

respectively) than the control group ($36.61 \pm 0.15 \mu\text{m}$, $P = 0.001$ and $18.44 \pm 0.62 \mu\text{m}$, $P = 0.006$; respectively) and the L group ($40.47 \pm 1.77 \mu\text{m}$, $P = 0.02$ and $20.16 \pm 0.99 \mu\text{m}$, $P = 0.02$; respectively; Additional file 6: Fig. S2). Moreover, mild to moderate chronic progressive nephropathy (CPN) can be described in rats from L and H groups. These changes are more pronounced in the H group (Fig. 4).

No pathological changes were found in the liver of the L group. Rats from the H group showed slight to moderate hepatocyte edema and cytoplasmic vacuolization, indicative of hydropic degeneration with features of acid degeneration. Moreover, there is marginalization of chromatin in the hepatocytes' nuclei as well as prominent large 1–3 nucleoli. In the control and L groups, no significant lesions in the heart were found. In the H group in the myocardium, a focal wave course of cardiomyocytes, reduced visibility of cytoplasm striation and slight vacuolation of the cytoplasm were observed (Fig. 5).



Discussion

The novel finding of our study is that chronic administration of TMA causes proteinuria, elevated urine KIM-1 and glucose levels, histological characteristics of chronic progressive nephropathy and increased blood pressure in rats. These results suggest a deleterious effect of TMA on the kidneys and cardiovascular system.

Recently, the effects of TMAO on the cardiovascular and renal systems have been researched extensively [36, 37]. Some studies suggest that TMAO may contribute to the development of cardiorenal syndrome [3, 4]. On the other hand, it has been well established that TMAO is one of the osmolytes protecting proteins from high osmotic pressure [38, 39]. For instance, TMAO and other osmolytes such as betaine, sorbitol and

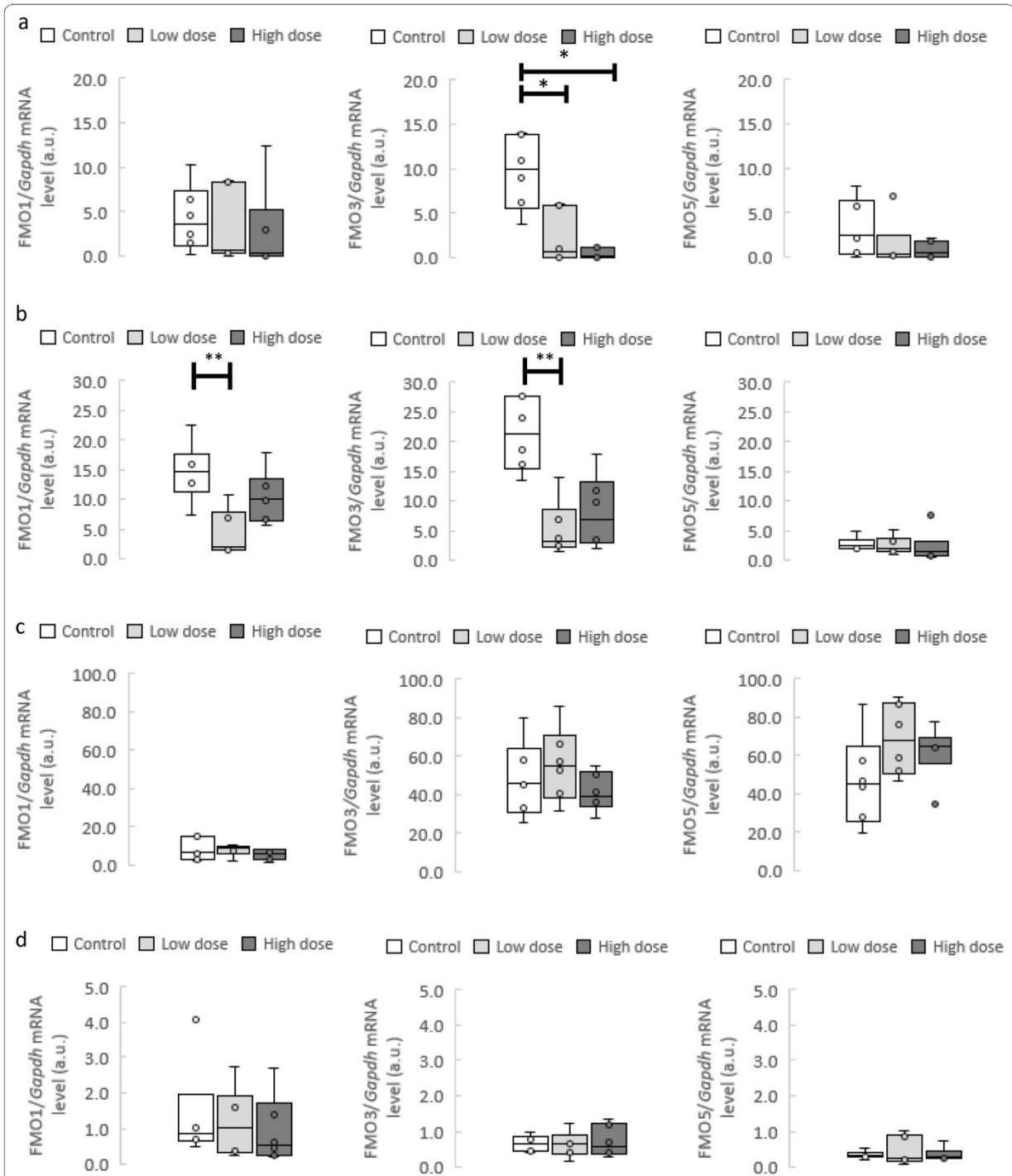
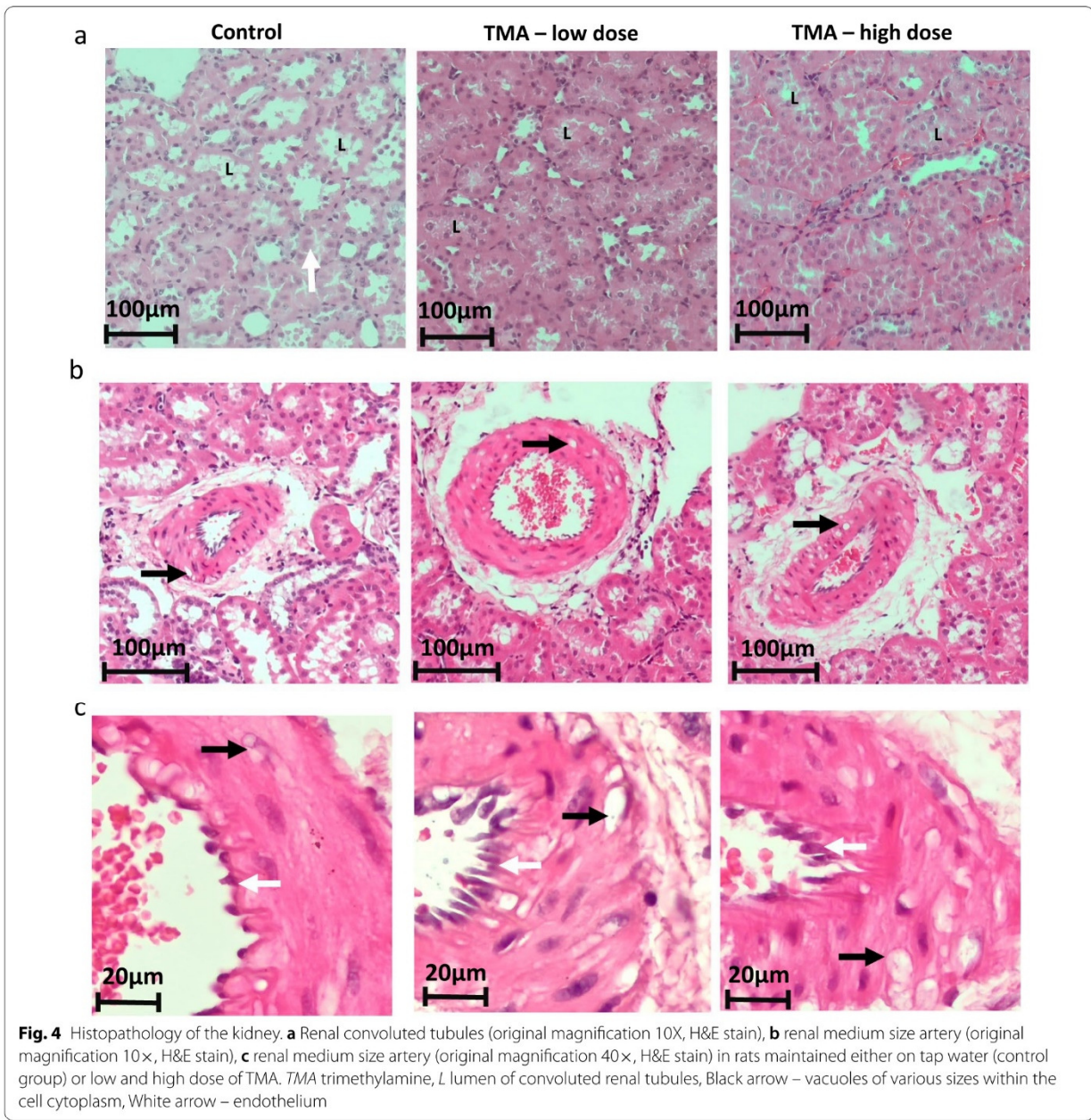


Fig. 3 FMOs genes expression. FMOs in the kidney, liver and lungs. RT-qPCR analysis of FMO1, FMO3 and FMO5 transcript levels in the **a** renal cortex, **b** renal medulla, **c** liver and **d** lungs in rats maintained either on tap water (control group) or low and high dose of TMA. TMA trimethylamine; FMO Flavin-containing monooxygenase. All data are expressed as the median, Q1, Q3, MIN, MAX (n=6; use arbitrary units); Kruskal–Wallis test followed by post-hoc Dunn’s test. *P < 0.05 vs tap water group; **P < 0.01 vs tap water group



glycerophosphorylcholine play a protective role in the renal medulla in which osmolality exceeds plasma osmolality by up to 4–5-folds [40–42].

In our study, chronic administration of TMA caused proteinuria, glucosuria and elevated KIM-1 levels in urine (Fig. 2). Proteinuria is a well-known marker of kidney damage [43, 44], and is associated with CVD [45, 46]. KIM-1 is a transmembrane tubular protein, which is up-regulated and present in urine after the renal tubular

injury, both in rats and humans [47, 48]. This protein is also a marker for drug-induced kidney toxicity [49]. Glucosuria is a common finding in diabetes mellitus and diabetic kidney disease but it may also be present in non-diabetic advanced CKD [50]. In contrast to humans, in rats glucose is observed also in healthy animals [51–53]. Notably, in this study the urine glucose concentration was significantly higher in the TMA groups than in the control group, which further points to tubular damage in rats

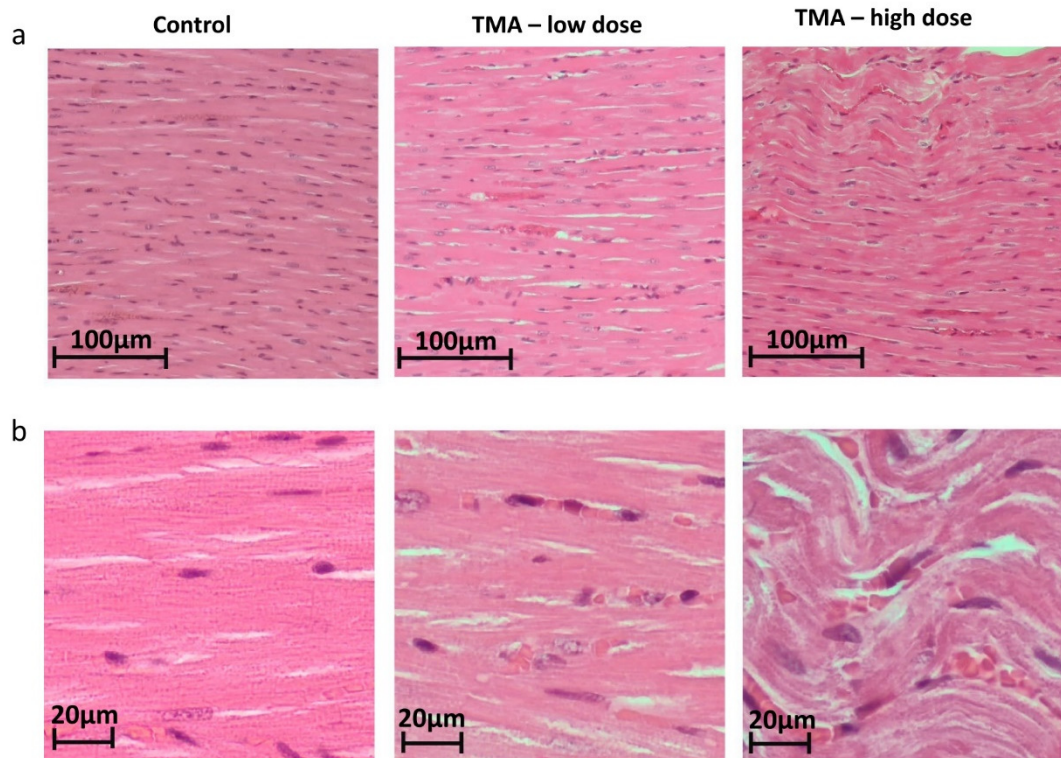


Fig. 5 Histopathology of the heart. **a** Myocardium of left ventricle (original magnification 10x, H&E stain), **b** myocardium of left ventricle (original magnification 40X, H&E stain) in rats maintained either on tap water (control group) or low and high dose of TMA. TMA trimethylamine

exposed to TMA in drinking water. The chronic administration of TMA also caused histopathological changes, including thickening of the basement membranes and increased infiltration of mononuclear cells without signs of concomitant inflammation, which may reflect CPN (Fig. 4). CPN is a spontaneous disease with unknown etiology. The observed changes in the renal parenchyma in rats receiving TMA may result from either the activation or aggravation of the ongoing CPN due to a direct effect of TMA on the kidneys or may be secondary to TMA-induced hemodynamic disturbances [54–56].

The association between CKD and hypertension is widely studied and hypertension may be a cause and a consequence of kidney disease [57–59]. Herein we observed that rats administered TMA showed increased arterial blood pressure (Table 2). Specifically, a significant increase in systolic blood pressure was accompanied by a more moderate increase in diastolic blood pressure. Systemic vascular resistance calculated from cardiac output and mean arterial blood pressure tended to be higher in rats exposed to the higher dose of TMA, which suggest that in this group the increase in BP was in part mediated by vasoconstriction. In general, these findings align with

our previous studies, showing hypertensive response after the acute administration of TMA [22]. In this study, we did not find indications of fluid retention or water-electrolyte disturbances. However, rats on TMA tended to drink more water and show elevated serum potassium levels. Renal regulation of water-electrolyte balance and blood pressure is exerted mainly through the renin-angiotensin system. However, we did not find any consistent changes in the RAS gene expression in the kidneys that could explain the effect of TMA on blood pressure and water-electrolyte balance (Additional file 5: Fig. S1). Finally, we did not find any significant changes in echocardiographic parameters (Additional file 3: Table S2). Specifically, TMA and control groups did not differ in the atria and ventricle size, stroke volume or ejection fraction. Therefore, it seems that the magnitude or/and duration of hemodynamic changes were insufficient to produce noticeable remodeling of the heart.

There are some clinical data linking high TMA levels to renal system pathologies. Hsu et al. showed that children with end-stage renal failure had higher plasma concentration of TMA than patients with stage 1 chronic kidney disease. They also demonstrated that plasma TMA

levels were inversely correlated with high BP and eGFR [8]. Research also shows that patients with end-stage renal disease have increased plasma TMA concentration [11] and TMA levels in exhaled air [28], but these levels decrease after dialysis. There is also evidence that patients with trimethylaminuria due to FMO3 deficiency show higher blood pressure [60].

However, the effects of TMA on the renal and cardiovascular systems have not been studied so far in interventional studies. To the best of our knowledge, our study is the first showing the negative effect of TMA on the kidneys; a finding which suggests a causative relationship between TMA accumulation due to kidney failure and cardiorenal complications of CKD. It may be speculated that TMA is one of the mediators in the vicious cycle of the cardiorenal syndrome.

Although there are multiple studies evaluating TMAO and TMA concentrations in fish and other marine animals' muscle and liver tissues [39, 61–64], studies showing TMAO and TMA concentration in tissue of mammals are scant or lacking. Present work broadens the knowledge of TMA and TMAO tissue distribution in mammals. In the current study, control animals showed the highest TMA and TMAO concentrations in the renal cortex (158.5 $\mu\text{M}/\text{kg}$ and 14.5 $\mu\text{M}/\text{kg}$, respectively) and renal medulla (193.1 $\mu\text{M}/\text{kg}$ and 18.5 $\mu\text{M}/\text{kg}$, respectively, Table 4). The lowest TMA and TMAO concentrations were found in the heart (0.7 $\mu\text{M}/\text{kg}$ and 3.22 $\mu\text{M}/\text{kg}$, respectively). The liver contained higher levels of TMA (42.8 $\mu\text{M}/\text{kg}$) than TMAO (5.4 $\mu\text{M}/\text{kg}$). TMA concentration (6.5 $\mu\text{M}/\text{kg}$) in the lungs was lower than TMAO concentration (9.3 $\mu\text{M}/\text{kg}$).

Three decades ago, Da Costa et al. assessed TMA and TMAO concentrations in the rat's liver and kidney [65] but using different methods. They measured concentrations in tissue wet mass, not in tissue dry mass as in our study, making the comparison of Da Costas and our results difficult. TMA concentration was higher in the liver (437 nM/g) and kidney in the Da Costa study (531 nM/g) than in our study. TMAO concentration in the liver was over 100-fold higher (633 nM/g) than in our study, while TMAO concentration in the kidneys was not provided by Da Costa et al. It needs to be stressed that, in contrast to relatively simple and reproducible measurements of TMAO levels across numerous studies [4, 8, 10, 14, 16, 18–21, 66], the measurements of TMA are much more difficult. There are discrepancies in reported absolute TMA levels across the few available studies [11, 23, 24, 33, 35, 65, 67–69].

It needs to be noted, that the determination of small volatile amines such as TMA or ammonium is very challenging [67]. In this study, we used the method based on the derivatization technique which gives

different TMA plasma results than the methods used before [21, 33]. We suspect that the method without derivatization gives higher plasma levels of TMA due to the presence of analytes containing TMA in their structure which coelute with trimethylamine and break down at the ion source yielding falsely TMA results. After several years of experience with TMA and TMAO determination in various tissues, we believe that the derivatization method is more appropriate because it allows reducing the volatility of trimethylamine and transforms trimethylamine into more stable and more compatible to liquid chromatography derivative before injection. For a detailed description of the method, see Additional file 1: Methods.

After crossing the gut-blood barrier, TMA is metabolized in the liver to TMAO by FMOs, mainly FMO3 [27, 70]. Five isoforms of FMOs are expressed in humans and animals. FMO3 shows the highest expression in the human liver whereas the human kidneys show the highest expression of FMO1 [27]. Rats also show FMO1 and FMO3 expression in the liver and kidneys [71–73]. Novick et al. observed higher FMO1 and FMO3 expression in the kidneys than in the liver. FMO1 expression was highest in the proximal and distal tubules, whereas FMO3 expression was highest in the distal tubules, collecting tubules and glomeruli [73].

To the best of our knowledge, our study is the first to evaluate the expression of FMO1, FMO3 and FMO5 after chronic TMA administration (Fig. 3). Our study shows that chronic TMA administration reduces FMO3 expression in the renal cortex and FMO1 and FMO3 expression in the renal medulla. Due to the accumulation of products, the negative feedback mechanism is often found in the regulation of enzyme, hormone and receptor activity in human and animal organisms [74–78]. Therefore, we speculate that rapid oxidation of TMA to TMAO caused downregulation of FMO1 and FMO3 expression in the kidney. Future research on TMA to TMAO oxidation in the kidneys is needed.

Finally, our study, suggests that TMA is rapidly oxidized to TMAO, which may limit the toxic effect of TMA on other organs. Namely, serum TMA concentrations in all groups were at least 100 times lower than TMAO concentrations. Furthermore, administration of TMA resulted in small increases in TMA tissue levels but 7–30-fold increases in TMAO levels (depending on the type of tissue, for comparison of the control group and the H group). Moreover, 24-h urine excretion of TMAO was 11 and 24 times higher in TMA-treated rats (the L group and the H group, respectively). In contrast, TMA 24-h urine excretion increased 17 times only for the H group (in the L group, we did not notice any changes).

Conclusion

In conclusion, chronic TMA administration at high doses increases blood pressure and causes deleterious effects on the kidneys, including proteinuria, increased urine KIM-1 and glucose levels in rats. TMA is rapidly oxidized to TMAO, which may limit the toxic effect of the molecule. Furthermore, TMA lowers the expression of FMO1 and FMO3 in the kidneys. More research on TMA, in particular in pathological states characterized by impaired TMA to TMAO oxidation, is needed to understand the role of TMA and TMAO in the pathological process of cardiorenal syndrome.

Abbreviations

AGT: Angiotensinogen; AGTR: Angiotensinogen receptor; AO: Aortic root diameter; CKD: Chronic kidney disease; CO: Cardiac output; CPN: Chronic progressive nephropathy; CRS: Cardiorenal syndrome; DBP: Diastolic blood pressure; EF: Ejection fraction; FMO: Flavin-containing monooxygenase; FS: Fractional shortening; IVSD: Interventricular septum thickness at diastole; IVSS: Interventricular septum thickness at systole; KIM-1: Kidney injury molecule 1; LA: Left atrium diameter; LVDD: Left ventricular diastolic diameter; LVDS: Left ventricular systolic diameter; LVEDV: Left ventricular end-diastolic volume; LVESV: Left ventricular end-systolic volume; PWD: Posterior wall thickness at diastole; PWS: Posterior wall thickness at systole; RAS: Renin angiotensin system; REN: Renin; SBP: Systolic blood pressure; SPRD: Sprague–Dawley rats; SV: Stroke volume; SVR: Systemic vascular resistance; TMA: Trimethylamine; TMAO: Trimethylamine oxide; UPCR: Urine protein creatinine ratio.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12967-022-03687-y>.

Additional file 1. Methods

Additional file 2: Table S1. List of oligonucleotide primers used for RT-qPCR

Additional file 3: Table S2. Echocardiographic parameters. IVSD, interventricular septum thickness at diastole; LVDD, left ventricular diastolic diameter; PWD, posterior wall thickness at diastole; IVSS, interventricular septum thickness at systole; LVDS, left ventricular systolic diameter; PWS, posterior wall thickness at systole; EF, ejection fraction; FS, fractional shortening; LVEDV, left ventricular end-diastolic volume; LVESV, left ventricular end-systolic volume; AO, aortic root diameter; LA, left atrium diameter; CO, cardiac output; L group – TMA low-dose group; H group – TMA high-dose group. All data are expressed as the mean \pm SD; ANOVA followed by post hoc Tukey-test

Additional file 4: Table S3. Serum biochemical analysis. L group – TMA low-dose group; H group – TMA high-dose group. All data are expressed as the mean \pm SD

Additional file 5: Fig. S1. Renin – angiotensin system. The genes of the renin-angiotensin system. RT-qPCR analysis of REN, AGT, AGTr1a, AGTr1b, AGTr2 transcript levels in the (A) renal cortex, (B) renal medulla, (C) liver in rats maintained either on tap water (control group) or low and high dose of TMA. Abbreviations: TMA, trimethylamine; REN, renin; AGT, angiotensinogen; AGTr1a, angiotensin II receptor, type 1a; AGTr1b, angiotensin II receptor, type 1b; AGTr2, angiotensin II receptor, type 2. All data are expressed as the median, Q1, Q3, MIN, MAX (n = 6; use arbitrary units); Kruskal–Wallis test followed by post-hoc Dunn's test. **P < 0.01 vs control group

Additional file 6: Fig. S2. Morphometry. Morphometric measurement of renal (a) arteries and (b) arterioles in rats maintained either on tap water (control group) or low and high dose of TMA. Abbreviations: TMA,

trimethylamine. Morphometric measurements of five arcuate arteries and five arterioles were performed for each individual. Four measurements were made for each vessel. All measurements are expressed as single points (n = 3–5); ANOVA followed by post-hoc Tukey test; *P < 0.05

Acknowledgements

The authors would like to thank Tomasz Hutsch and Agnieszka Barc, veterinary pathologists, for consultations on histopathological analysis.

Author contributions

KM, MG–K, MO and IM conducted the animal research; MSz conducted ELISA Test, RNA Isolation and RT-qPCR; ES measured stools, plasma, urine, tissue TMA and other metabolites concentrations; KM collected the data, performed statistics analyses, drafted the manuscript; MU designed the study, supervised the analysis, reviewed the results, drafted and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported by the National Science Centre, Poland, grant no: 2020/37/B/NZ5/00366.

Availability of data and materials

The part of the raw data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files. The raw data presented in tables are available from the corresponding author upon reasonable request.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was performed according to Directive 1020/63 EU on the protection of animals used for scientific purposes and approved by the II Local Ethical Committee in Warsaw (permission: WAW2/098/2019).

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors have nothing to disclose.

Author details

¹Department of Experimental Physiology and Pathophysiology, Laboratory of the Centre for Preclinical Research, Medical University of Warsaw, 02-091 Warsaw, Poland. ²Spectrometry Laboratory, Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland.

Received: 10 August 2022 Accepted: 1 October 2022

Published online: 15 October 2022

References

1. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N, et al. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant*. 2005;20(6):1048–56.
2. Ronco C, House AA, Haapio M. Cardiorenal syndrome: refining the definition of a complex symbiosis gone wrong. *Intensive Care Med*. 2008;34(5):957–62.
3. Nanto-Hara F, Kanemitsu Y, Fukuda S, Kikuchi K, Asaji K, Saigusa D, et al. The guanylate cyclase C agonist linacotide ameliorates the gut-cardiorenal axis in an adenine-induced mouse model of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2020;35(2):250–64.
4. Zou D, Li Y, Sun G. Attenuation of circulating trimethylamine N-oxide prevents the progression of cardiac and renal dysfunction in a rat model of chronic cardiorenal syndrome. *Front Pharmacol*. 2021;12: 751380.
5. Lekawanvijit S. Role of gut-derived protein-bound uremic toxins in cardiorenal syndrome and potential treatment modalities. *Circ J*. 2015;79(10):2088–97.

6. Verbrugge FH, Dupont M, Steels P, Grieten L, Malbrain M, Tang WH, et al. Abdominal contributions to cardiorenal dysfunction in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol*. 2013;62(6):485–95.
7. Bell JD, Lee JA, Lee HA, Sadler PJ, Wilkie DR, Woodham RH. Nuclear magnetic resonance studies of blood plasma and urine from subjects with chronic renal failure: identification of trimethylamine-N-oxide. *Biochim Biophys Acta*. 1991;1096(2):101–7.
8. Hsu CN, Chang-Chien GP, Lin S, Hou CY, Lu PC, Tain YL. Association of Trimethylamine, Trimethylamine N-oxide, and Dimethylamine with Cardiovascular Risk in Children with Chronic Kidney Disease. *J Clin Med*. 2020;9(2):336.
9. Rhee EP, Clish CB, Ghorbani A, Larson MG, Elmehrik S, McCabe E, et al. A combined epidemiologic and metabolomic approach improves CKD prediction. *J Am Soc Nephrol*. 2013;24(8):1330–8.
10. Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatista-Boyle B, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ Res*. 2015;116(3):448–55.
11. 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. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(5):1300–4.
12. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013;19(5):576–85.
13. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature*. 2011;472(7341):57–63.
14. Wang Z, Tang WH, Buffa JA, Fu X, Britt EB, Koeth RA, et al. Prognostic value of choline and betaine depends on intestinal microbiota-generated metabolite trimethylamine-N-oxide. *Eur Heart J*. 2014;35(14):904–10.
15. Mamic P, Chaikijurajai T, Tang WHW. Gut microbiome—a potential mediator of pathogenesis in heart failure and its comorbidities: State-of-the-art review. *J Mol Cell Cardiol*. 2021;152:105–17.
16. Zhang W, Miikeda A, Zuckerman J, Jia X, Charugundla S, Zhou Z, et al. Inhibition of microbiota-dependent TMAO production attenuates chronic kidney disease in mice. *Sci Rep*. 2021;11(1):518.
17. Ge X, Zheng L, Zhuang R, Yu P, Xu Z, Liu G, et al. The gut microbial metabolite trimethylamine N-oxide and hypertension risk: a systematic review and dose-response meta-analysis. *Adv Nutr*. 2020;11(1):66–76.
18. Jiang S, Shui Y, Cui Y, Tang C, Wang X, Qiu X, et al. Gut microbiota dependent trimethylamine N-oxide aggravates angiotensin II-induced hypertension. *Redox Biol*. 2021;46: 102115.
19. Aldana-Hernandez P, Leonard KA, Zhao YY, Curtis JM, Field CJ, Jacobs RL. Dietary choline or trimethylamine N-oxide supplementation does not influence atherosclerosis development in Ldlr^{-/-} and Apoe^{-/-} male mice. *J Nutr*. 2020;150(2):249–55.
20. Gawrys-Kopczynska M, Konop M, Maksymiuk K, Kraszewska K, Derzis L, Sozanski K, et al. TMAO, a seafood-derived molecule, produces diuresis and reduces mortality in heart failure rats. *Elife*. 2020. <https://doi.org/10.7554/eLife.57028>.
21. Huc T, Drapala A, Gawrys M, Konop M, Bielinska K, Zaorska E, et al. Chronic, low-dose TMAO treatment reduces diastolic dysfunction and heart fibrosis in hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2018;315(6):H1805–20.
22. Jaworska K, Bielinska K, Gawrys-Kopczynska M, Ufnal M. TMA (trimethylamine), but not its oxide TMAO (trimethylamine-oxide), exerts haemodynamic effects: implications for interpretation of cardiovascular actions of gut microbiome. *Cardiovasc Res*. 2019;115(14):1948–9.
23. Jaworska K, Hering D, Mosieniak G, Bielak-Zmijewska A, Pilz M, Konwerski M, et al. TMA, a forgotten uremic toxin, but not TMAO, is involved in cardiovascular pathology. *Toxins (Basel)*. 2019;11(9):490.
24. Jaworska K, Konop M, Huttsch T, Perlejewski K, Radkowski M, Grochowska M, et al. Trimethylamine but not trimethylamine oxide increases with age in rat plasma and affects smooth muscle cells viability. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*. 2020;75(7):1276–83.
25. Ufnal M, Zadlo A, Ostaszewski R. TMAO: a small molecule of great expectations. *Nutrition*. 2015;31(11–12):1317–23.
26. Pospisil E JG, Nielsen GD, Papameletiou D, Klein CL. SCOEL/REC/179 Trimethylamine. *Publ Sci Comm Occup Expo Lim Eur Union*. 2017.
27. Cashman JR, Zhang J. Human flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2006;46:65–100.
28. Simenhoff ML, Burke JF, Saukkonen JJ, Ordinario AT, Doty R. Biochemical profile of uremic breath. *N Engl J Med*. 1977;297(3):132–5.
29. Fluhr JW, Kelterer D, Fuchs S, Kaatz M, Grieshaber R, Kleesz P, et al. Additive impairment of the barrier function and irritation by biogenic amines and sodium lauryl sulphate: a controlled in vivo tandem irritation study. *Skin Pharmacol Physiol*. 2005;18(2):88–97.
30. Guest I, Varma DR. Developmental toxicity of methylamines in mice. *J Toxicol Environ Health*. 1991;32(3):319–30.
31. Friemann W, Overhoff W, Wolter JR. Eye diseases in the fishing industry. *Arch Gewerbepathol Gewerbehyg*. 1959;17(1):1–56.
32. Rehman HU. Fish odor syndrome. *Postgrad Med J*. 1999;75(886):451–2.
33. Bielinska K, Radkowski M, Grochowska M, Perlejewski K, Huc T, Jaworska K, et al. High salt intake increases plasma trimethylamine N-oxide (TMAO) concentration and produces gut dysbiosis in rats. *Nutrition*. 2018;54:33–9.
34. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156–9.
35. Drapala A, Szudzik M, Chabowski D, Mogilnicka I, Jaworska K, Kraszewska K, et al. Heart failure disturbs gut-blood barrier and increases plasma trimethylamine, a toxic bacterial metabolite. *Int J Mol Sci*. 2020;21(17):6161.
36. Gatarek P, Kaluzna-Czaplinska J. Trimethylamine N-oxide (TMAO) in human health. *EXCLI J*. 2021;20:301–19.
37. Zeisel SH, Warrier M. Trimethylamine N-Oxide, the microbiome, and heart and kidney disease. *Annu Rev Nutr*. 2017;37:157–81.
38. Wang A, Bolen DW. A naturally occurring protective system in urea-rich cells: mechanism of osmolyte protection of proteins against urea denaturation. *Biochemistry*. 1997;36(30):9101–8.
39. 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. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2004;50(4):371–6.
40. Moriyama T, Garcia-Perez A, Burg MB. Factors affecting the ratio of different organic osmolytes in renal medullary cells. *Am J Physiol*. 1990;259(5 Pt 2):F847–58.
41. Nakanishi T, Uyama O, Nakahama H, Takamitsu Y, Sugita M. Determinants of relative amounts of medullary organic osmolytes: effects of NaCl and urea differ. *Am J Physiol*. 1993;264(3 Pt 2):F472–9.
42. Sackett DL. Natural osmolyte trimethylamine N-oxide stimulates tubulin polymerization and reverses urea inhibition. *Am J Physiol*. 1997;273(2 Pt 2):R669–76.
43. Garg AX, Kiberd BA, Clark WF, Haynes RB, Clase CM. Albuminuria and renal insufficiency prevalence guides population screening: results from the NHANES III. *Kidney Int*. 2002;61(6):2165–75.
44. Cravedi P, Remuzzi G. Pathophysiology of proteinuria and its value as an outcome measure in chronic kidney disease. *Br J Clin Pharmacol*. 2013;76(4):516–23.
45. Agrawal V, Marinescu V, Agarwal M, McCullough PA. Cardiovascular implications of proteinuria: an indicator of chronic kidney disease. *Nat Rev Cardiol*. 2009;6(4):301–11.
46. Segura J, Campo C, Ruilope LM. Effect of proteinuria and glomerular filtration rate on cardiovascular risk in essential hypertension. *Kidney Int Suppl*. 2004;92:S45–9.
47. Huo W, Zhang K, Nie Z, Li Q, Jin F. Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel kidney-specific injury molecule playing potential double-edged functions in kidney injury. *Transplant Rev (Orlando)*. 2010;24(3):143–6.
48. Waanders F, van Timmeren MM, Stegeman CA, Bakker SJ, van Goor H. Kidney injury molecule-1 in renal disease. *J Pathol*. 2010;220(1):7–16.
49. Griffin BR, Gist KM, Faubel S. Current status of novel biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury: a historical perspective. *J Intensive Care Med*. 2020;35(5):415–24.
50. Hung CC, Lin HY, Lee JJ, Lim LM, Chiu YW, Chiang HP, et al. Glycosuria and renal outcomes in patients with nondiabetic advanced chronic kidney disease. *Sci Rep*. 2016;6:39372.
51. Hsieh MC, Wu CH, Chen CL, Chen HC, Chang CC, Shin SJ. High blood glucose and osmolality, but not high urinary glucose and osmolality, affect neuronal nitric oxide synthase expression in diabetic rat kidney. *J Lab Clin Med*. 2003;141(3):200–9.
52. Zhang Y, Thai K, Kepecs DM, Gilbert RE. Sodium-glucose linked cotransporter-2 inhibition does not attenuate disease progression in the rat

- remnant kidney model of chronic kidney disease. *PLoS ONE*. 2016;11(1):e0144640.
53. Chen L, LaRocque LM, Efe O, Wang J, Sands JM, Klein JD. Effect of dapagliflozin treatment on fluid and electrolyte balance in diabetic rats. *Am J Med Sci*. 2016;352(5):517–23.
 54. Berridge BR, Mowat V, Nagai H, Nyska A, Okazaki Y, Clements PJ, et al. Non-proliferative and proliferative lesions of the cardiovascular system of the rat and mouse. *J Toxicol Pathol*. 2016;29(3 Suppl):15–47S.
 55. Hard GC, Johnson KJ, Cohen SM. A comparison of rat chronic progressive nephropathy with human renal disease—implications for human risk assessment. *Crit Rev Toxicol*. 2009;39(4):332–46.
 56. Kawamura K, Okada S, Li B, Suwa M, Yao J, Morioka T, et al. Turbulence of glomerular hemodynamics involved in progressive glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2006;69(10):1792–8.
 57. Barri YM. Hypertension and kidney disease: a deadly connection. *Curr Cardiol Rep*. 2006;8(6):411–7.
 58. Wiederkehr M, Toto R, Fenves AZ, Ram CV. Hypertension and the kidney. *Semin Nephrol*. 2005;25(4):236–45.
 59. Klag MJ, Whelton PK, Randall BL, Neaton JD, Brancati FL, Ford CE, et al. Blood pressure and end-stage renal disease in men. *N Engl J Med*. 1996;334(1):13–8.
 60. Treacy EP, Akerman BR, Chow LM, Youil R, Bibeau C, Lin J, et al. Mutations of the flavin-containing monooxygenase gene (FMO3) cause trimethylaminuria, a defect in detoxication. *Hum Mol Genet*. 1998;7(5):839–45.
 61. Charest RP, Chenoweth M, Dunn A. Metabolism of trimethylamines in kelp bass (*Paralabrax clathratus*) and marine and freshwater pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *J Comp Physiol B*. 1988;158(5):609–19.
 62. Kelly RH, Yancey PH. High contents of trimethylamine oxide correlating with depth in deep-sea teleost fishes, skates, and decapod crustaceans. *Biol Bull*. 1999;196(1):18–25.
 63. Sadok S, M'Hetli M, El Abed A, Uglow RF. Changes in some nitrogenous compounds in the blood and tissues of freshwater pikeperch (*Sander lucioperca*) during salinity acclimation. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2004;138(1):9–15.
 64. Treberg JR, Bystriansky JS, Driedzic WR. Temperature effects on trimethylamine oxide accumulation and the relationship between plasma concentration and tissue levels in smelt (*Osmerus mordax*). *J Exp Zool A Comp Exp Biol*. 2005;303(4):283–93.
 65. daCosta KA, Vrbanac JJ, Zeisel SH. The measurement of dimethylamine, trimethylamine, and trimethylamine N-oxide using capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem*. 1990;187(2):234–9.
 66. Zhou J, Wang D, Li B, Li X, Lai X, Lei S, et al. Relationship between plasma trimethylamine N-oxide levels and renal dysfunction in patients with hypertension. *Kidney Blood Press Res*. 2021;46(4):421–32.
 67. Bain MA, Faull R, Fornasini G, Milne RW, Schumann R, Evans AM. Quantifying trimethylamine and trimethylamine-N-oxide in human plasma: interference from endogenous quaternary ammonium compounds. *Anal Biochem*. 2004;334(2):403–5.
 68. Malinowska AM, Szwengiel A, Chmurzynska A. Dietary, anthropometric, and biochemical factors influencing plasma choline, carnitine, trimethylamine, and trimethylamine-N-oxide concentrations. *Int J Food Sci Nutr*. 2017;68(4):488–95.
 69. Nnane IP, Damani LA. Pharmacokinetics of trimethylamine in rats, including the effects of a synthetic diet. *Xenobiotica*. 2001;31(10):749–55.
 70. Lang DH, Yeung CK, Peter RM, Ibarra C, Gasser R, Itagaki K, et al. Isoform specificity of trimethylamine N-oxygenation by human flavin-containing monooxygenase (FMO) and P450 enzymes: selective catalysis by FMO3. *Biochem Pharmacol*. 1998;56(8):1005–12.
 71. Lattard V, Buronfosse T, Lachuer J, Longin-Sauvageon C, Moulin C, Benoit E. Cloning, sequencing, tissue distribution, and heterologous expression of rat flavin-containing monooxygenase 3. *Arch Biochem Biophys*. 2001;391(1):30–40.
 72. Lattard V, Lachuer J, Buronfosse T, Garnier F, Benoit E. Physiological factors affecting the expression of FMO1 and FMO3 in the rat liver and kidney. *Biochem Pharmacol*. 2002;63(8):1453–64.
 73. Novick RM, Mitzey AM, Brownfield MS, Elfarra AA. Differential localization of flavin-containing monooxygenase (FMO) isoforms 1, 3, and 4 in rat liver and kidney and evidence for expression of FMO4 in mouse, rat, and human liver and kidney microsomes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;329(3):1148–55.

74. Chiamolera MI, Wondisford FE. Minireview: Thyrotropin-releasing hormone and the thyroid hormone feedback mechanism. *Endocrinology*. 2009;150(3):1091–6.
75. Herichova I, Szantoova K. Renin-angiotensin system: upgrade of recent knowledge and perspectives. *Endocr Regul*. 2013;47(1):39–52.
76. Naftilan AJ, Oparil S. Inhibition of renin release from rat kidney slices by the angiotensins. *Am J Physiol*. 1978;235(1):F62–8.
77. Radovick S, Levine JE, Wolfe A. Estrogenic regulation of the GnRH neuron. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2012;3:52.
78. Schunkert H, Ingelfinger JR, Hirsch AT, Pinto Y, Remme WJ, Jacob H, et al. Feedback regulation of angiotensin converting enzyme activity and mRNA levels by angiotensin II. *Circ Res*. 1993;72(2):312–8.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



Podsumowanie i wnioski

Wyniki pracy pozytywnie zweryfikowały hipotezę badawczą zakładającą, że trimetyloamina ma negatywny wpływ na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego oraz nerek.

Zrealizowano wszystkie zaplanowane cele główne i szczegółowe, tj. określono fizjologiczne stężenia TMA, TMAO i ich prekursorów u myszy domowej, szczura wędrownego oraz kawii domowej, a także porównano ekspresję genów i poziom białek FMOs u tych zwierząt; zbadano wpływ przewlekłego, doustnego podania trimetyloaminy na funkcjonowanie układu sercowo-naczyniowego oraz nerek, a także na ekspresję FMOs u szczurów.

Najważniejsze wyniki badań (Publikacja nr 1) to:

- Myszy charakteryzowały się największymi stężeniami TMA w kale, osoczu, moczu oraz w badanych tkankach.
- Stężenie TMA w osoczu u szczurów było poniżej granicy kwantyfikacji.
- Stężenie TMAO w osoczu u wszystkich 3 gatunków jest podobne i znajduje się w zakresie 5-10 $\mu\text{M/L}$.
- U badanych gatunków największe stężenia oznaczanych metyloamin były w nerkach, a najmniejsze w sercu i płucach, z wyjątkiem stężenia TMAO w mysich tkankach, które najmniejsze było w wątrobie oraz stężenia TMA w tkankach kawii, które największe było w wątrobie.
- Myszy charakteryzują się najwyższym stężeniem TMA w wątrobie oraz najniższym stężeniem TMAO w wątrobie spośród badanych gatunków.
- W wątrobie szczurów wykazano wysoką ekspresję FMO3. Szczury charakteryzują się także największym poziomem białek FMO3 oraz największym stosunkiem TMAO/TMA w wątrobie w porównaniu do myszy i kawii.
- Szczury wykazywały ekspresję FMO5 w wątrobie oraz wysoki poziom białek FMO5 w wątrobie. U szczurów wykazano także ekspresję FMO1 i FMO3 w korze i rdzeniu

nerki oraz największy stosunek TMAO/TMA w rdzeniu nerki spośród badanych gatunków.

- Kawie charakteryzowały się niższym poziomem białek FMO3 i niższym stosunkiem TMAO/TMA w wątrobie niż szczury oraz najniższym poziomem białek FMO5 w wątrobie spośród badanych gatunków. W korze i rdzeniu nerek kawii został wykazany najwyższy poziom białek FMO3 spośród wszystkich gatunków, a stosunek TMAO/TMA był powyżej 1 w korze i rdzeniu nerki u tego gatunku. Ekspresja FMOs u kawii była niska we wszystkich badanych tkankach.
- Myszy charakteryzowały się wysoką ekspresją FMO5 w wątrobie oraz największym poziomem białek FMO5 w wątrobie spośród badanych gatunków.
- Stosunek TMAO/TMA w moczu był największy u szczurów. Zarówno u szczurów, jak i kawii był powyżej 1.

Najważniejsze wyniki badań (Publikacja nr 2) to:

- Szczury otrzymujące TMA miały zwiększone ciśnienie tętnicze krwi, zwłaszcza ciśnienie skurczowe.
- Stężenie glukozy, białka, KIM-1 oraz stosunek białko/ kreatynina w moczu było znacząco większe u szczurów pijących TMA.
- Przewlekłe podawanie TMA powodowało zmiany histologiczne w nerkach, w tym pogrubienie błon podstawnych i wzmożony naciek komórek jednojądrzastych bez cech współistniejącego stanu zapalnego, co może sugerować przewlekłą postępującą nefropatię (CPN).
- Nie wykazano żadnych istotnych zmian w bilansie wodno-energetycznym, parametrach echokardiograficznych oraz ekspresji genów układu renina-angiotensyn u szczurów pijących TMA.
- Stężenie TMA w surowicy było 100-200 krotnie mniejsze niż stężenie TMAO.
- Szczury z grupy kontrolnej wykazywały największe stężenia TMA i TMAO w korze oraz w rdzeniu nerki. Najniższe stężenia TMA i TMAO były w sercu. U szczurów kontrolnych stężenie TMA w wątrobie było większe niż TMAO, a stężenie TMA w płucach było mniejsze niż TMAO.
- Spożywanie TMA powodowało niewielki wzrost stężenia TMA w tkankach, ale 7-30 krotny wzrost stężenia TMAO w tkankach.

- Dobowe wydalanie TMA wzrosło 17 razy u szczurów pijących wysoką dawkę TMA. U szczurów pijących niską dawkę TMA nie zostały zauważone zmiany w dobowym wydalaniu TMA.
- Dobowe wydalanie TMAO było 11 i 24 razy większe u szczurów, którym podawane było TMA.
- Szczury pijące TMA wykazywały niższą ekspresję FMO3 w korze nerek oraz FMO1 i FMO3 w rdzeniu nerek niż szczury pijące wodę.

Najważniejsze wnioski to:

- Tkanki myszy, szczurów i kawii znacząco różnią się stężeniem TMA i TMAO, pomimo podobnych stężeń TMAO w osoczu. Dodatkowo, badane gatunki zwierząt różnią się znacząco w aktywności FMOs w wątrobie oraz nerkach, co sugeruje istotne różnice w metabolizmie i biologicznej roli TMAO pomiędzy badanymi gatunkami zwierząt.
- TMA wykazuje szkodliwy wpływ na nerki i układ sercowo-naczyniowy u szczurów. Toksyczne działanie TMA wydaje się być ograniczane poprzez efektywne utlenianie TMA do TMAO.

Opinie Komisji Etycznej

UCHWAŁA NR 555/2018

z dnia 17 kwietnia 2018 r.

I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt. **Wpływ czynników modyfikujących ryzyko sercowo-naczyniowe u ludzi na barierę jelito-krew i aktywność bakterii jelitowych u szczurów** z dnia **09.04.2018** r. złożonego przez **Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarsko-Dentystyczny ul. Banacha 1B, 02-091 Warszawa** zaplanowanego przez **dr hab. Marcina Ufnala** lokalna komisja etyczna

WYRAŻA ZGODĘ

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § 1, Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: **DOŚWIADCZENIA NA ZWIERZĘTACH (A)**
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: **UMIARKOWANY**
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków:
Szczur, szczep Sprague- Dawley, 12 tygodni, 234 os.
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: **Ufnal Marcin, Huć Tomasz, Kinga Pham, Bielińska Klaudia**
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie¹ **01.05.2018 - 01.05.2023** r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w:
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez
9. Doświadczenie nie zostanie poddane ocenie retrospektywnej

¹ Nie dłużej niż 5 lat

§ 3

Uzasadnienie:

Prawidłowe funkcjonowanie organizmu ssaków zależy w dużym stopniu od bakterii, które znajdują się w jelitach oraz związków przez nie wytwarzanych. Flora bakteryjna jelit człowieka i zwierząt ulega zmianie przy chorobach takich jak otyłość i nadciśnienie. Metabolity bakterii przechodzą przez barierę jelitową, przedostają się do krwi i oddziałują na organizm. Ostatnie badania wykazały u ludzi z chorobami sercowo-naczyniowymi związek między dysbiozą a wzrostem stężenia w krwi jednego z metabolitów bakteryjnych - trimetylo aminy (TMA) i tlenu rimetylo aminy (TMAO).

Wnioskodawca zwraca uwagę na brak danych dotyczących wpływu leków wykorzystywanych w terapii nadciśnienia (enalapril, simwastatyny), wyjałowienia przewodu pokarmowego przez podanie neomycyny czy wpływu czynników zwiększających ryzyko wystąpienia chorób sercowo-naczyniowych (dieta bogata w sód, spożywanie kofeiny, teofiliny) na stężenie TMA i TMAO we krwi. Brak jest również informacji dotyczących wpływu powyższych związków na funkcjonowanie bariery jelito-krew.

Celem projektu jest zbadanie wpływu czynników modyfikujących ryzyko sercowo-naczyniowe u ludzi na barierę jelito-krew i aktywność bakterii jelitowych u szczurów.

Uzyskane wyniki pozwolą na ocenę stopnia w jakim czynniki modyfikujące ryzyko rozwoju chorób sercowo-naczyniowych wpływają na aktywność bakterii jelitowych i funkcjonowanie bariery jelito-krew. Wnioskodawca zakłada, że uzyskane wyniki przyczynią się do rozwoju nowych metod leczenia nadciśnienia tętniczego przez znajomość wpływu znanych substancji na metabolizm i skład mikroflory jelitowej oraz funkcjonowanie bariery jelito-krew.

Kategoria dotkliwości procedur, uzasadnienie ich przeprowadzenia oraz liczebność grup doświadczalnych zostały określone prawidłowo. Większość Członków Komisji nie zgłosiła zastrzeżeń do procedur oraz czynności doświadczalnych opisanych w przedłożonym wniosku i uznała, że realizacja tego projektu badawczego jest dopuszczalna.

Niniejsza uchwała wchodzi w życie z dniem wydania i jest ważna do 01.05.2023 r.

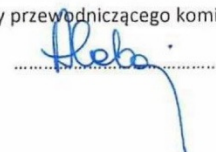
§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1

LOKALNA KOMISJA ETYCZNA
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
przy Wydziale Biologii UW
ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa
tel. 022 5541028, e-mail: ike1waw@biol.uw.edu.pl

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

Podpisy przewodniczącego komisji



Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – t.j.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA NR 464/2017

z dnia 23 stycznia 2018 r.

I Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 pkt. 1 ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266) po rozpatrzeniu wniosku pt. **Ocena wpływu związku przeciwdrgawkowego ADD424042 na czynność elektryczną serca u świnek morskich z dnia 12.01.2018 r.** złożonego przez **Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarsko-Dentystyczny ul. Banacha 1B, 02-091 Warszawa** zaplanowanego przez **dr hab. Marcina Ufnala** lokalna komisja etyczna

WYRAŻA ZGODĘ

Na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: **DOŚWIADCZENIA NA ZWIERZĘTACH (A)**
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: **TERMINALNA**
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków: **Kawia domowa 6 tygodni 30 os.**
4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: **Ufnal Marcin, Huć Tomasz, Konopelski Piotr**
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie¹ **01.02.2018 – 31.12.2018 r.**
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem w:
8. Użyte do procedur zwierzęta dzięki zostaną odłowione przez
9. Doświadczenie nie zostanie poddane ocenie retrospektywnej

¹ Nie dłużej niż 5 lat

§ 3

Uzasadnienie:

Doświadczenie przedstawione we wniosku nr 464/2017 ma na celu zbadanie wpływu związku ADD424042, pochodnej dizopiramidu na czynność elektryczną serca. Związek ADD424042 wykazuje przeciwdrgawkowe działanie w zwierzęcych modelach epilepsji. Złożoność badanych procesów a zatem szereg mechanizmów nerwowych i hormonalnych, które regulują układ krążenia u ssaków powoduje, że nie jest możliwe przeprowadzenie tych badań bez modelu zwierzęcego. W doświadczeniu wykorzystane zostaną świnki morskie. Wykazują one ekspresję hERG (human Ether-à-go-go-Related Gene). Kardiotoxyczność wielu leków związana jest z blokowaniem kanałów potasowych zależnych od hERG dlatego czyni to świnki morskie bardziej odpowiednim modelem do badania parametrów elektrokardiograficznych, w porównaniu ze szczurami, nie wykazującymi ekspresji hERG.

Uzyskane wyniki poszerzą wiedzę z zakresu profilu bezpieczeństwa i możliwych kardiologicznych działań niepożądanych nowego leku przeciwdrgawkowego, będącego pochodną dizopiramidu.

Kategoria dotkliwości procedury, uzasadnienie jej przeprowadzenia oraz liczebność grup doświadczalnych zostały określone prawidłowo. Członkowie Komisji nie zgłosili zastrzeżeń do procedury oraz czynności doświadczalnych opisanych w przedłożonym wniosku i uznali, że realizacja tego projektu badawczego jest dopuszczalna.

Niniejsza uchwała wchodzi w życie z dniem wydania i jest ważna do 31.12.2018 r.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1

I LOKALNA KOMISJA ETYCZNA

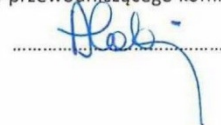
ds. Doświadczeń na Zwierzętach

przy Wydziale Biologii UW

ul. Ilji Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

(Pieczęć lokalnej komisji etycznej) 22 5541026, e-mail: ike1waw@biol.uw.edu.pl

Podpisy przewodniczącego komisji



Otrzymuje Użytkownik

Pouczenie:

Od decyzji komisji można wnieść odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej w terminie 14 od dnia otrzymania uchwały.

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

UCHWAŁA NR WAW2/098/2019

z dnia 28 czerwca 2019 r.

II Lokalnej Komisji Etycznej do spraw doświadczeń na zwierzętach w Warszawie

§ 1

Na podstawie art. 48 ust. 1 pkt. 1¹ ustawy z dnia 15 stycznia 2015r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266), zwanej dalej „ustawą” po rozpatrzeniu wniosku pt.: „TMA, TMAO- metabolity bakteryjne a niewydolność serca” z dnia 05 czerwca 2019 roku, złożonego przez Warszawski Uniwersytet Medyczny, Wydział Lekarsko-Dentystyczny, adres: ul. Banacha 1B, 02-091 Warszawa, zaplanowanego przez Marcina Ufnal²

przy udziale³ -

Lokalna Komisja Etyczna:

WYRAŻA ZGODĘ

na przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach w zakresie wniosku.

§ 2

W wyniku rozpatrzenia wniosku o którym mowa w § , Lokalna Komisja Etyczna ustaliła, że:

1. Wniosek należy przypisać do kategorii: badania podstawowe, sercowo-naczyniowy układ krążenia krwi i limfy.
2. Najwyższy stopień dotkliwości proponowanych procedur to: dotkliwa.
3. Doświadczenia będą przeprowadzane na gatunkach lub grupach gatunków⁴:

Gatunek	Wiek/stadium rozwoju	Liczba
Szczur wędrowny, szczep Sprague-Dawley	12 tygodni	99

4. Doświadczenia będą przeprowadzane przez: Ufnal Marcin, Bielińska Klaudia, Huć Tomasz, Konop Marek, Gawryś Marta.
5. Doświadczenie będzie przeprowadzane w terminie⁵ od 01.07.2019 do 01.07.2024r.
6. Doświadczenie będzie przeprowadzone w ośrodku⁶: nie dotyczy.
7. Doświadczenie będzie przeprowadzone poza ośrodkiem, w: nie dotyczy.
8. Użyte do procedur zwierzęta dzikie zostaną odłowione przez: nie dotyczy.
9. Doświadczenie zostanie/~~nie zostanie~~ poddane ocenie retrospektywnej w terminie do 6 miesięcy od dnia przekazania przez użytkownika dokumentacji, mającej stanowić podstawę dokonania oceny retrospektywnej. Użytkownik jest zobowiązany do przekazania ww. dokumentacji niezwłocznie, tj. w terminie, o którym mowa w art. 52 ust. 2 ustawy.

¹ Niewłaściwy zapis usunąć

² imię i nazwisko osoby, która zaplanowała i jest odpowiedzialna za przeprowadzenie doświadczenia

³ Wypełnić w przypadku dopuszczenia do postępowania organizacji społecznej.

⁴ Podać liczbę, szczep/stado, wiek/stadium rozwoju

⁵ Nie dłużej niż 5 lat

⁶ Podać jeśli jest to inny ośrodek niż użytkownik

§ 3

Uzasadnienie:

Komisja oceniła wniosek zgodnie z kryteriami zawartymi w art. 47.1. ustawy z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. poz. 266). Po zapoznaniu się z problematyką badawczą przedstawioną we wniosku komisja stwierdza, że przedstawiony projekt spełnia zasady dopuszczenia doświadczeń na zwierzętach. Na podstawie art. 107 § 4 ustawy z dnia 14 czerwca 1960 r. – Kodeks postępowania administracyjnego z późniejszymi zmianami (Dz. U. z 2017 poz. 1257) odstąpiono od sporządzania uzasadnienia decyzji, gdyż uwzględnia ona w całości żądanie strony.

§ 4

Integralną część niniejszej uchwały stanowi kopia wniosku, o którym mowa w § 1.

Stowarzyszenie "Dobrostan" z siedzibą w Warszawie
ul. Miodowa 10, 00-611 Warszawa
KRS 0000000000, NIP 525-242-780
(Pieczęć lokalnej komisji etycznej)

PRZEWODNICZĄCA
Lokalnej Komisji Etycznej
ds. Doświadczeń na Zwierzętach
[Podpis]
(Podpis Przewodniczącej komisji)

Pouczenie:

Zgodnie z art. 33 ust. 3 i art. 40 ustawy w zw. z art. 127 § 1 i 2 oraz 129 § 2 ustawy z dnia z dnia 14 czerwca 1960 r. Kodeks postępowania administracyjnego (Dz. U. 2017, poz. 1257 – tj.; dalej KPA) od uchwały Lokalnej Komisji Etycznej strona może wnieść, za jej pośrednictwem, odwołanie do Krajowej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach w terminie 14 od dnia doręczenia uchwały.

Na podstawie art. 127a KPA w trakcie biegu terminu do wniesienia odwołania strona może zrzec się prawa do jego wniesienia, co należy uczynić wobec Lokalnej Komisji Etycznej, która wydała uchwałę. Z dniem doręczenia Lokalnej Komisji Etycznej oświadczenia o zrzeczeniu się prawa do wniesienia odwołania przez ostatnią ze stron postępowania, decyzja staje się ostateczna i prawomocna.

Otrzymuje:

- 1) Użytkownik,
- 2) Organizacja społeczna dopuszczona do udziału w postępowaniu (jeśli dotyczy)
- 3) a/a

Użytkownik kopie przekazuje:

- Osoba planująca doświadczenie
- Zespół ds. dobrostanu

Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji

PUBLIKACJA nr 1

Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases.

Klaudia Maksymiuk

Mateusz Szudzik

Emilia Samborowska

Dawid Chabowski

Marek Konop

Marcin Ufnal

Warszawa, 05.02.2024
(miejsowość, data)

Dr Inż. Mateusz Szudzik

.....

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie oznaczeń real-time PCR i western blotting w materiale biologicznym oraz współudział w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

30.01.2024
(miejsowość, data)

Mgr Emilia Samborowska

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie oznaczeń choliny, karnityny, TMA i TMAO w materiale biologicznym oraz współudział w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

WARSZAWA 5/2/2024
(miejsowość, data)

Dawid Chabowski

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: współudział w przeprowadzeniu doświadczeń na zwierzętach oraz w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....


(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

12.02.2024
(miejsowość, data)

Dr hab. n. med. Marek Konop

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: współudział w przeprowadzeniu doświadczeń na zwierzętach oraz w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

29 STY 2024
.....
(miejsowość, data)

Prof. dr hab. n. med. Marcin Ufnal
.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Mice, rats, and guinea pigs differ in FMOs expression and tissue concentration of TMAO, a gut bacteria-derived biomarker of cardiovascular and metabolic diseases" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu, pomoc w interpretacji wyników.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 60 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

Kierownik Zakładu Fizjologii i
Patofizjologii Eksperymentalnej
.....
Prof. dr hab. n. med. Marcin Ufnal
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Oświadczenia wszystkich współautorów publikacji

PUBLIKACJA nr 2

Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats.

Klaudia Maksymiuk

Mateusz Szudzik

Marta Gawryś-Kopczyńska

Maksymilian Onyszkiewicz

Emilia Samborowska

Izabella Mogilnicka

Marcin Ufnal

Warszawa, 05.02.2024
(miejsowość, data)

Dr Inż. Mateusz Szudzik

.....

(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie oznaczeń real-time PCR i ELISA test w materiale biologicznym oraz współudział w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 55 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)



(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Nasraker, 30.01.2024
(miejsowość, data)

Mgr Marta Gawryś - Koczynska

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: współudział w przeprowadzeniu doświadczeń na zwierzętach oraz w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 55 %,


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Szczecin 25.01.2024

(miejsowość, data)

Dr n. med. Maksymilian Onyszkiewicz

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: współudział w przeprowadzeniu doświadczeń na zwierzętach oraz w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 55 %,


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

30.01.2024
.....
(miejsowość, data)

Mgr Emilia Samborowska

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przeprowadzenie oznaczeń choline, karnityny, TMA i TMAO w materiale biologicznym oraz współudział w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 55 %,


(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)


.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

Belwa 02.02.2024
(miejsowość, data)

Lek. Izabella Mogilnicka

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: współudział w przeprowadzeniu doświadczeń na zwierzętach, wizualizacji danych oraz w przygotowaniu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 55 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

.....
(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników

..2.9..S.T.Y..2024.....
(miejscowość, data)

Prof. dr hab. n. med. Marcin Ufnal

.....
(imię i nazwisko)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. "Trimethylamine, a gut bacteria metabolite and air pollutant, increases blood pressure and markers of kidney damage including proteinuria and KIM-1 in rats" oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu, pomoc w interpretacji wyników.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20 %.

Wkład lek. wet. Klaudii Maksymiuk w powstawanie publikacji określam jako 55 %,

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

obejmował on przeprowadzenie doświadczeń na zwierzętach, analizę, interpretację i wizualizację wyników, współudział w opracowaniu koncepcji i przygotowaniu manuskryptu.

(merytoryczny opis wkładu kandydata do stopnia w powstanie publikacji)*

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej lek. wet. Klaudii Maksymiuk.

(imię i nazwisko kandydata do stopnia)

**Kierownik Zakładu Fizjologii i
Patofizjologii Eksperymentalnej**

.....
prof. dr hab. n. med. Marcin Ufnal

(podpis oświadczającego)

*w szczególności udziału w przygotowaniu koncepcji, metodyki, wykonaniu badań, interpretacji wyników