

## Streszczenie

**Wstęp** N-Tlenek trimetyloaminy (TMAO) powstaje w ludzkim organizmie na drodze enzymatycznego utlenienia metabolitu mikrobioty jelitowej – trimetyloaminy oraz jest wchłaniany bezpośrednio z pokarmu. TMAO może mieć wpływ na przebieg i rokowanie u pacjentów z chorobami układu krążenia. Stopień wchłaniania TMAO i jego prekursora wiąże się z przepuszczalnością bariery jelitowej, która może się zwiększyć w chorobach układu krążenia. Biomarkerem przepuszczalności bariery jelitowej jest cytrulina - aminokwas syntetyzowany przez enterocyty.

**Cel pracy:** Ocena przydatności klinicznej stężenia TMAO jako niezależnego czynnika rokowniczego u polskich pacjentów obciążonych chorobami układu krążenia w obserwacji długoterminowej, ocena przydatności klinicznej stężenia cytruliny jako niezależnego czynnika rokowniczego u tych pacjentów oraz ocena wzajemnego powiązania stężenia TMAO i uszkodzenia bariery jelitowej ocenionego stężeniem cytruliny.

## Material i metody

W pierwszej pracy wchodzącej w skład rozprawy dokonano przeglądu literatury dotyczącej metabolizmu TMAO oraz wyników dotychczasowych badań nad wpływem tej cząsteczki na przebieg i rokowanie u pacjentów z chorobami układu krążenia.

Material kliniczny: Retrospektywnie oceniono stężenie TMAO oraz cytruliny w surowicy 1036 kolejnych pacjentów (mediana wieku 62, mężczyźni 61%) hospitalizowanych w Oddziale Kardiologicznym Uniwersyteckiego Szpitala Klinicznego we Wrocławiu w latach 2013-2015. Oceniono wpływ stężenia TMAO i cytruliny na śmiertelność długoterminową (obserwacja 5-letnia) oraz zbadano korelacje stężenia TMAO oraz cytruliny z parametrami antropometrycznymi i biochemicznymi. Analizę wykonano dla całej badanej populacji oraz dla podgrup pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym (ACS) n=177, stabilnym zespołem wieńcowym (SCS) n=441, przewlekłą niewydolnością serca (HF) n=292 oraz migotaniem przedsionków (AF) n=277. Stężenie cytruliny skorelowano ze stężeniem TMAO w surowicy

**Wyniki:** Na podstawie przeglądu literatury wykazano, że TMAO jest użytecznym markerem ryzyka sercowo naczyniowego.

W obserwacji 5-letniej stwierdzono 171 zgonów. W analizie jednoczynnikowej wyższe stężenie TMAO w całej grupie badanej było istotnym predykatorem śmiertelności 5-letniej (HR 1,01 przy 95% CI 1,006-1,018 i  $p < 0,0001$ ) jednak zależność ta traciła istotność

statystyczną w analizie wieloczynnikowej. Dodatkowo stwierdzając istotny wzrost ryzyka zgonu u pacjentów w górnym kwartylu stężeń TMAO. Analiza ROC pozwoliła wyznaczyć punkt odcięcia stężenia TMAO wynoszący 5,94  $\mu\text{M}$  powyżej którego z 48% czułością i 80% specyficznoscią ryzyko zgonu było istotnie wyższe w porównaniu z pozostałą grupą. W grupie pacjentów z przewlekłym zespołem wieńcowym, przewlekłą niewydolnością serca i migotaniem przedsionków wykazano istotne różnice stężenia TMAO pomiędzy pacjentami zmarłymi, a przeżywającymi obserwację 5-letnią.

Nie stwierdzono istotnej różnicy stężenia cytruliny pomiędzy grupą pacjentów zmarłych oraz przeżywających 5-letni okres obserwacji. Nie wykazano także statystycznie istotnego wpływu stężenia cytruliny na śmiertelność pacjentów w obserwacji 5-letniej HR 0.99 (95% CI 0.97-1.00  $p=0,49$ ). Jedynie w podgrupie pacjentów z ostrym zespołem wieńcowym obserwowano istotnie niższe stężenie cytruliny w grupie pacjentów, którzy zmarli w trakcie obserwacji 5-letniej w porównaniu z pacjentami, którzy przeżyli: 20,9  $\mu\text{M}$  (15,2-25,8) vs 24,0  $\mu\text{M}$  (18,5-30,1)  $p=0,025$ . Nie wykazano istotnych statystycznie korelacji stężenia cytruliny z danymi biochemicznymi, antropometrycznymi ani wielochorobowością w badanej grupie. Nie wykazano istotnej korelacji pomiędzy stężeniami TMAO i cytruliny (korelacja tau Kendala = 0,027).

### **Wnioski:**

1. W analizie jednoczynnikowej stężenie TMAO jest czynnikiem rokowniczym zgonu w obserwacji 5-letniej pacjentów obciążonych chorobami układu krążenia. W analizie wieloczynnikowej zależność ta traci istotność statystyczną.
2. Uszkodzenie bariery jelitowej, mierzone stężeniem cytruliny w surowicy nie jest czynnikiem ryzyka zgonu w obserwacji 5-letniej pacjentów obciążonych chorobami układu krążenia.
3. Nie występuje korelacja pomiędzy stężeniem TMAO oraz cytruliny w surowicy.

## **Streszczenie w języku angielskim**

**Introduction** Trimethylamine N-oxide (TMAO) is formed in the human body by enzymatic oxidation of the gut microbiota metabolite- trimethylamine and is absorbed directly from food. TMAO may affect the clinical course and prognosis of patients with cardiovascular disease. The degree of absorption of TMAO and its precursor is related to intestinal barrier permeability, which may be increased in cardiovascular disease. A biomarker of intestinal barrier permeability is citrulline, an amino acid synthesised by enterocytes.

**Objectives:** To assess the clinical usefulness of TMAO levels as an independent prognostic factor in Polish patients with cardiovascular disease in long-term follow-up. Moreover, to evaluate the clinical usefulness of citrulline levels as an independent prognostic factor in these patients, and to assess the interrelationship between TMAO levels and intestinal barrier damage assessed by citrulline levels.

### **Material and methods**

The first paper included the literature review on TMAO metabolism and the results of previous studies on the influence of this molecule on the course and prognosis of patients with cardiovascular diseases.

**Clinical material:** TMAO and citrulline concentrations were retrospectively assessed in serum of 1036 consecutive patients (median age 62, men 61%), hospitalised in the Cardiology Department of Jan Mikulicz-Radecki University Teaching Hospital, Wrocław, between 2013 and 2015. The effect of TMAO and citrulline concentrations on long-term mortality (5-year follow-up) was assessed. Correlations of TMAO and citrulline concentrations with anthropometric and biochemical parameters were investigated. The analysis was performed for the whole study population and for subgroups of patients with acute coronary syndrome (ACS) n=177, stable coronary syndrome (SCS) n=441, chronic heart failure (HF) n=292 and atrial fibrillation (AF) n=277. Citrulline concentration was correlated with serum TMAO concentration.

### **Results:**

Based on the literature review, TMAO was shown to be a useful marker of cardiovascular risk. There were 171 deaths at 5-year follow-up. In univariate analysis, higher TMAO levels in the entire study group were a significant predictor of 5-year mortality (HR 1.01 with 95% CI 1.006-1.018 and  $p < 0.0001$ ); however, this relationship lost statistical significance in multivariate

analysis. In addition, we found a significant increase in the risk of death in patients in the upper quartile of TMAO concentrations. ROC analysis determined a TMAO concentration cut-off point of 5.94  $\mu\text{M}$  with 48% sensitivity and 80% specificity, above which, the risk of death was significantly higher compared with the rest of the group. In the group of patients with chronic coronary syndrome, chronic heart failure and atrial fibrillation, significant differences in TMAO concentration were found between patients who died and 5-year survivors.

No significant difference in citrulline concentration was found between the group of patients who died and those surviving a 5-year follow-up. There was also no statistically significant effect of citrulline concentration on patient mortality at 5-year follow-up HR 0.99 (95% CI 0.97-1.00  $p=0.49$ ). Only in the subgroup of patients with acute coronary syndrome were significantly lower citrulline concentrations observed in patients who died during the 5-year follow-up compared to patients who survived: 20.9  $\mu\text{M}$  (15.2-25.8) vs 24.0  $\mu\text{M}$  (18.5-30.1)  $p=0.025$ . There was no statistically significant correlation of citrulline concentration with biochemical, anthropometric or multimorbidity data in the study group. There was no significant correlation between TMAO and citrulline concentrations (Kendal's tau correlation = 0.027).

### **Conclusions:**

1. In univariate analysis, TMAO concentration is a prognostic factor for death in the 5-year follow-up of patients with cardiovascular disease. In multivariate analysis, this relationship loses statistical significance.
2. Intestinal barrier damage, as measured by serum citrulline concentration, is not a risk factor for death in the 5-year follow-up of patients with cardiovascular disease.
3. There is no correlation between TMAO and serum citrulline concentrations.