

## Investigation of the effect of trimethylamine-N-oxide on the proinflammatory cytokine genes expression in U937-derived macrophages

Abdi M., PhD<sup>1</sup>, Vahabzadeh Z., PhD<sup>2</sup>, Ghanivash A., Medical Student<sup>3</sup>, Farhadi L., PhD Candidate<sup>4</sup>, Hakhamaneshi MS., PhD<sup>5</sup>, Andalibi P., Pharmacologist<sup>6</sup>

1. Assistant Professor, Clinical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

2. Assistant Professor, Liver & Digestive Research Center, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran. (Corresponding Author), Tel:+98-087-33625742, zakariav@Yahoo.com

3. Medical student, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

4. PhD candidate, Molecular Medicine and Genetics Department, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

5. Associate Professor, Clinical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

6. Instructor, Clinical Biochemistry Department, Faculty of Medicine, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran.

### ABSTRACT

**Background and Aim:** Atherosclerosis is known as a multifactorial inflammatory disease. Trimethylamine N-oxide (TMAO) as a risk factor, has a potential to trigger or enhance the immune inflammatory reactions in atherosclerosis. Yet, The exact mechanism by which TMAO induces inflammation during atherosclerosis is not well understood. The present study was designed to evaluate the expression of IL-1 , IL-6, and TNF- mRNA in response to treatment of macrophages with different concentrations of TMAO.

**Material and Methods:** In this experimental *in-vitro* study, U937-derived macrophages were treated with different concentrations of TMAO (37.5, 75,150 and 300 µM) for 24 h. A group of cells were also treated with tunicamycin as positive control for stress. RT-qPCR was used to evaluate the expression of IL-1 , IL-6, and TNF- mRNA levels. One-Way ANOVA and Post-hoc Dunnett test were used to compare the mean value of every group with that of control group.

**Results:** Although TMAO increased expression of IL-1 , IL-6, and TNF- mRNA, only 300 µM of TMAO significantly increased expression of IL-1 mRNA compared to the control cells (P<0.001). Tunicamycin increased expression of IL-6 significantly.

**Conclusion:** The results of this study showed that among the above mentioned cytokines, IL-1 as a proinflammatory cytokine had a greater role in inflammatory reactions, induced by TMAO as a risk factor for atherosclerosis.

**Keywords:** Cytokine, Atherosclerosis, Trimethylamine-N-Oxide, Tunicamycin, Macrophage.

**Received:** Nov 21, 2017    **Accepted:** May 15, 2018

## بررسی اثر تری متیل آمین -N- اکساید در بیان ژن سیتوکاین های پیش التهابی در

### ماکروفاژهای مشتق شده از رده سلولی U937

محمد عبدی<sup>۱</sup>، ذکریا وهاب زاده<sup>۲</sup>، امین غنی وش<sup>۳</sup>، لیلا فرهادی<sup>۴</sup>، محمد سعید هخامنشی<sup>۵</sup>، پدram عندلیبی<sup>۶</sup>

۱. استادیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۲. استادیار، مرکز تحقیقات گوارش و کبد، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران. (مؤلف مسئول)، تلفن: ۰۸۷-۳۳۶۲۵۷۴۲، zakariav@Yahoo.com

۳. دانشجوی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۴. دانشجوی دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۵. دانشیار، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

۶. مربی، گروه بیوشیمی بالینی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** امروزه آترواسکلروز به عنوان یک بیماری التهابی مالتی فاکتوریال شناخته می شود. ترکیب تری متیل آمین -N- اکساید (TMAO) به عنوان یک ریسک فاکتور آترواسکلروز، توانایی آغاز کردن و یا تشدید واکنش های التهابی در طی فرآیند ترواسکلروز را دارد. مکانیسم دقیقی که از طریق آن TMAO التهاب را در آترواسکلروز تشدید می کند هنوز به خوبی شناخته نشده است. مطالعه حاضر در جهت ارزیابی بیان اینترلوکین -۱ بتا (IL-1)، اینترلوکین ۶ (IL-6) و فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-) در سطح mRNA در پاسخ به تیمار ماکروفاژها با غلظت های مختلف TMAO طراحی شده است.

**روش بررسی:** در این مطالعه تجربی به صورت *in-vitro*، رده سلولی منوسیت U937 را به ماکروفاژ انسانی تمایز داده و سپس به مدت ۲۴ ساعت با غلظت های ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار TMAO تیمار کردیم. گروهی از سلولها نیز با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر تونیکامایسین به عنوان شاهد مثبت استرس تیمار شدند. میزان بیان IL-1، IL-6 و TNF- در سطح mRNA با استفاده از روش RT-qPCR ارزیابی شد. آزمون One-Way ANOVA و تست تعقیبی متناسب برای ارزیابی تفاوت میانگین هر گروه با گروه کنترل استفاده گردید.

**یافته ها:** اگرچه در مجموع TMAO بیان همه ژن های IL-1، IL-6 و TNF- را افزایش داد ولی فقط غلظت ۳۰۰ میکرومولار TMAO توانست میزان بیان IL-1 را در سطح mRNA در مقایسه با گروه کنترل به صورت معنی دار ( $P < 0.001$ ) افزایش دهد. تونیکامایسین میزان بیان IL-6 را بطور معنی داری افزایش داد.

**نتیجه گیری:** یافته های این مطالعه شواهدی را فراهم کرد که نشان می دهد سیتوکاین پیش التهابی IL-1 در بین سایرین نقش بیشتری در القاء واکنش های التهابی ناشی از TMAO به عنوان یک ریسک فاکتور آترواسکلروز دارد.

**واژه های کلیدی:** سیتوکاین، آترواسکلروز، تری متیل آمین -N- اکسید، تونیکامایسین، ماکروفاژ

وصول مقاله: ۹۶/۸/۳۰ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۲/۲۵ پذیرش: ۹۷/۲/۲۵

## مقدمه

در مطالعات متعددی نشان داده شده است که فرآیندهای التهابی نقش مهمی در شروع روند آتروژنز، پارگی پلاک‌ها آترواسکلروزی و تشدید علائم آن دارد (۱-۳). از طرفی دیگر، آترواسکلروز به عنوان یک بیماری چند فاکتوری با ریسک فاکتورهای متعددی نظیر بالا بودن میزان کلسترول، استرس اکسیداتیو و سایر استرس‌های بیوشیمیایی شناخته شده است (۱). بنابراین بسیار مهم است که اثر ریسک فاکتورهای آترواسکلروز بر مسیرهای التهابی فعال در طی آترواسکلروز مشخص شود. در مطالعات قبلی به وضوح نشان داده شده است که افزایش مقادیر سایتوکاین‌های پیش التهابی با ریسک بیماری قلبی عروقی همراه هستند (۲).

سایتوکاین‌های پیش التهابی ترکیباتی هستند که در پاسخ به فعالسازی مسیرهای التهابی از میزبان آزاد می‌شوند. این مولکولها در واکنشهای التهابی نقش واسطه‌ای دارند. در این میان خانواده اینترلوکین ۱ (IL-1) که توسط سلول‌های دیواره عروق بیان می‌شوند، نقش مرکزی در شبکه سایتوکاینی و نیز در ایجاد و تشدید آترواسکلروز دارند (۳). اینترلوکین ۶ (IL-6) سایتوکاین پیش التهابی دیگری است که از آن به عنوان یک مارکر اصلی در تشخیص زودرس آترواسکلروز استفاده می‌شود. این اینترلوکین با اثرات اتوکراین و پاراکراین باعث فعالسازی مونوسیت‌ها و در نتیجه واکنش‌های فاز حاد کبدی شده و هر دوی این دو اتفاق در تشدید آترواسکلروز نقش دارند (۴). فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-) نیز به عنوان یک سایتوکاین پیش التهابی دیگر ارزش پیش‌بینی کننده در بیماری‌های قلبی عروقی، ایجاد آترواسکلروز و عوارض بعدی آن دارد (۴).

در طی چند سال اخیر فلور میکروبی روده (میکروبیوم) به عنوان یکی دیگر از فاکتورهای تعیین‌کننده آترواسکلروز معرفی شده است، بدین ترتیب که باکتریهای فلور طبیعی روده با متابولیزه کردن کولین موجود در منابع غذایی، ترکیبی به نام تری متیل آمین (Trimethylamine) را می‌سازند که پس از ورود به خون و برداشت توسط کبد،

بوسیله آنزیم کبدی فلاوین مونواکسیژناز به یک متابولیت پروآتروژنیک به نام تری متیل آمین-N-اکساید (Trimethylamine-N-oxide, TMAO) تبدیل می‌شود (۵). مطالعات قبلی نشان داده است که TMAO باعث ایجاد التهاب و تشدید تشکیل سلولهای کف آلود ماکروفاژی (Foam Cells) می‌شود. علاوه بر این در مطالعات متعدد دیگری TMAO به عنوان یک ریسک فاکتور مستقل برای ناهنجاری‌های آندوتلیال آترواسکلروز و بیماری‌های قلبی عروقی معرفی شده است (۵-۸). با توجه به اینکه براساس مطالعات قبلی، TMAO بطور قطع یک ریسک فاکتور آترواسکلروز است (۵) و نیز با توجه به اینکه هنوز مکانیسم و نحوه‌ی عملکرد TMAO در ایجاد التهاب در طی آترواسکلروز در ماکروفاژها به خوبی شناخته نشده است و براساس بررسی کتابخانه‌ای نگارندگان، تاکنون مطالعه‌ای یافت نشده است که مستقیماً تاثیر TMAO را بر میزان بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی در ماکروفاژها نشان دهد، لذا مطالعه تاثیر مستقیم TMAO بر میزان بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی در ماکروفاژها ارزشمند و روشن‌کننده خواهد بود. بنابراین در این مطالعه ما بیان سایتوکاین‌های پیش التهابی اینترلوکین-۱ بتا (IL-1 $\beta$ )، اینترلوکین ۶ (IL-6) و فاکتور نکروز توموری آلفا (TNF-) را در سطح mRNA در پاسخ به تیمار ماکروفاژها با غلظتهای مختلف TMAO بررسی کردیم.

## روش بررسی

کشت و تیمار سلول:

این مطالعه تجربی به صورت *in-vitro* و با کشت سلولی انجام شد. برای این منظور ابتدا رده سلولی منوسیت U937 را در محیط کشت RPMI 1640 حاوی ۱۰٪ FBS، ۱٪ آنتی بیوتیک از مخلوط پنی سیلین-استرپتومایسین و ۴ میلی مولار ال-گلوتامین (L-Glutamine)، در انکوباتور ۵٪ CO<sub>2</sub> با دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، در فلاسکهای ۲۵ سانتی متر مربع کشت دادیم. سپس سلولها را با غلظت

برای استخراج RNA از کیت استخراج RNX-Plus و طبق دستورالعمل همراه آن اقدام شد. برای ارزیابی مقدار RNA استخراج شده از هر نمونه جذب آن به ترتیب در طول موج ۲۶۰ نانومتر و برای ارزیابی خلوص آن نسبت های جذب ۲۶۰/۲۸۰ نانومتر و ۲۶۰/۲۳۰ نانومتر، به کمک پیکودراب (Synergy HTX, BioTEK, USA) خواند شد. برای سنتز cDNA با کیت تاکارا (TaKaRa RR037A, v0610)، مقدار یکسانی از RNA ی هر نمونه در گروه ها و تیمارهای مختلف برای رفع آلودگی احتمالی DNA ژنومی با DNase I تیمار شد. در ادامه برای سنتز cDNA، طبق دستورالعمل کیت مقدار ۵۰۰ نانوگرم RNA الگو به هر تیوب اضافه شد. واکنش سنتز cDNA با انکوباسیون و فراهم کردن چرخه های دمایی مطابق دستورالعمل کیت، در دستگاه ترمال سایکلر انجام شد. در مرحله آخر به منظور ارزیابی بیان ژن در سطح mRNA، روی محصولات cDNA ی هر نمونه آزمایشهای RT-qPCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر ژن، کیت شرکت تاکارا (SYBR Green Rotor-) و دستگاه (PCR Kit, TKARA Japan GeneTM 6000 Real-Time PCR System Corbett, Germany) در لوله های مخصوص انجام گرفت. داده های مربوط به واکنش RT-qPCR پس از صدور و ذخیره با فرمت مناسب (LinReg Export Format)، برای یکسان سازی کارایی واکنش PCR و محاسبات مربوط به میزان الگوی اولیه (mRNA) ژنهای مورد نظر در نرم افزار (version 2013.x) نتایج این نرم افزار برای mRNA هر ژن نمونه تیمار شده پس از تقسیم کردن بر میزان mRNA ژن GAPDH همان نمونه، نسبت به گروه کنترل، بصورت نسبی (Relative) محاسبه و بصورت  $Mean \pm SEM$  برای چهار تکرار هر تیمار گزارش شد.

۲۰ نانومولار PMA (phorbol-12-myristate-13-acetate) به مدت ۴۸ ساعت به ماکروفاژ تمایز دادیم. در مرحله بعد ماکروفاژها را با غلظتهای ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰ و ۳۰۰ میکرومولار TMAO به مدت ۲۴ ساعت تیمار کردیم. گروهی از سلولها به مدت ۱۸ ساعت با غلظت ۲ میکروگرم بر میلی لیتر تونیکامایسین به عنوان شاهد مثبت استرس تیمار شدند. گروهی از ماکروفاژها هم به عنوان گروه کنترل معمولی تحت هیچ گونه تیماری قرار نگرفتند (۹).

#### آزمون MTT:

میزان بقای (viability) ماکروفاژها بعد از تیمارهای مختلف با استفاده از آزمون MTT ارزیابی شد (۱۰). در این روش ابتدا از یک سوسپانسیون سلولی یکنواخت در ۳ تکرار، ۱۰۰ میکرولیتر برداشت و به چاهکهای پلیت ۹۶ خانه منتقل شد. در مرحله بعد پلیت کشت یافته، تا زمان دو برابر شدن و اتصال سلولها به بستر، در شرایط مساعد رشد (انکوباتور ۵% CO<sub>2</sub> و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد) انکوبه شد. بعد از گذشت این زمان ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت آزمایش (Treatment Medium) تازه متناسب با غلظتهای تیمارهای مورد آزمایش، به هر چاهک اضافه شد و سپس تا ۲۴ ساعت در انکوباتور با شرایط مساعد قرار داده شد. برای چاهکهای گروه کنترل، به جای محیط کشت آزمایش، ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت کامل اضافه شد. بعد از گذشت این زمان ۲۰ میکرولیتر از محلول ۵ میلی گرم بر میلی لیتر MTT به هر چاهک اضافه و به مدت ۳-۴ ساعت برای تشکیل رسوب در انکوباتور قرار داده شد. در مرحله بعد، محتویات چاهکها تخلیه و ۱۰۰ میکرولیتر حلال فورمازون به هر چاهک اضافه گردید و برای حل شدن کامل رسوب (به مدت ۳-۴ ساعت) در دمای اتاق و به دور از نور (در تاریکی) نگهداری شد. در نهایت میزان جذب آن در طول موج ۵۷۰ نانومتر خوانده شد.

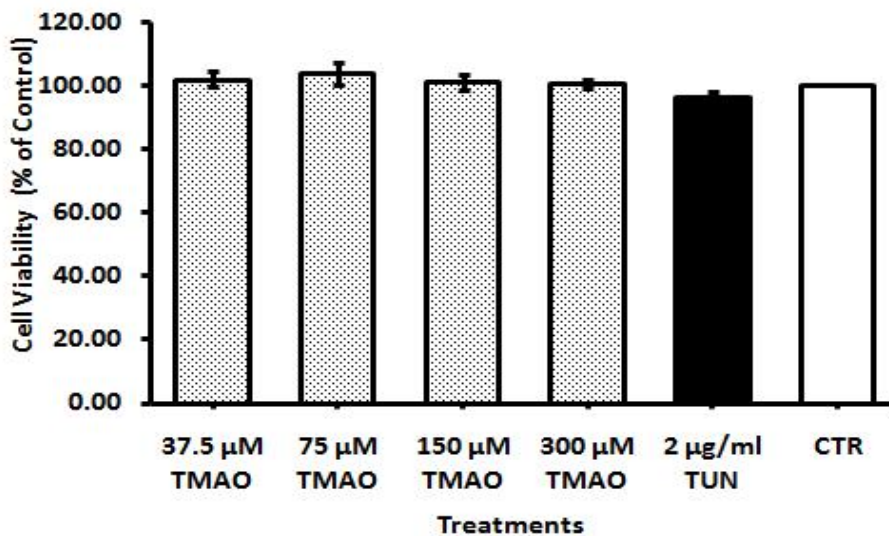
#### روش RT-qPCR:

روش آماری:

برای بررسی‌های آماری، از نسخه ۲۰ نرم‌افزار SPSS و  $P < 0.05$  به عنوان سطح معنی داری استفاده شد. از آزمون One-Way ANOVA و متعاقباً Post-hoc Dunnett test برای مقایسه و ارزیابی تفاوت میانگین هر گروه با گروه کنترل استفاده گردید.

## یافته‌ها

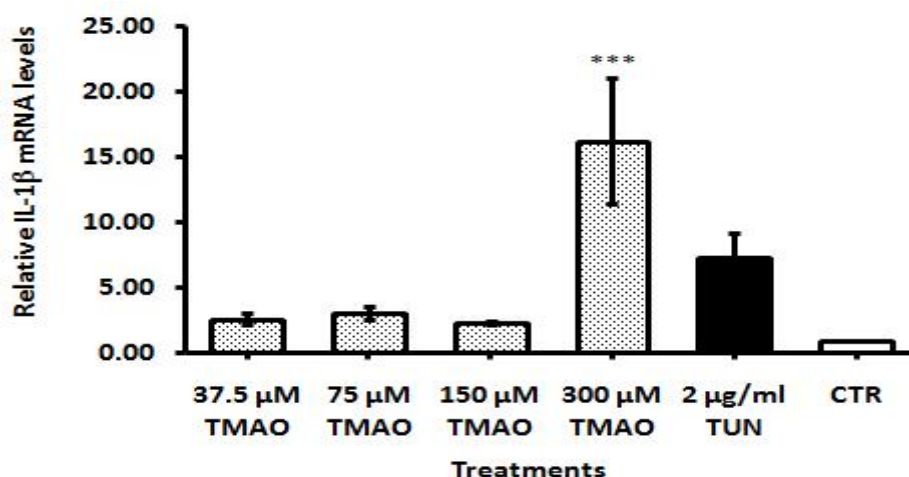
نتایج مربوط به آزمون MTT در نمودار ۱، نشان داده شده است. میزان بقای ماکروفاژها، برای همه تیمارها (TMAO و تونیکامایسین)، در همه غلظت‌ها بالای ۹۶ درصد بود و هیچگونه مرگ و میر سلولی وابسته به تیمار در سلولها مشاهده نشد.



نمودار ۱: درصد بقای ماکروفاژها. با استفاده از نتایج تست MTT به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد سه بار آزمایش مجزا، محاسبه شد. TMAO: تری متیل آمین-N-اکساید. TUN: تونیکامایسین. CTR: کنترل.  $P < 0.05$  به عنوان معنی دار آماری در نظر گرفته شده است.

بیان IL-1 در مقایسه با گروه کنترل نشان ندادند ( $P > 0.05$ ). فقط غلظت ۳۰۰ میکرومولار TMAO به طور معنی داری میزان بیان IL-1 را در مقایسه با گروه کنترل افزایش داد ( $P < 0.001$ ).

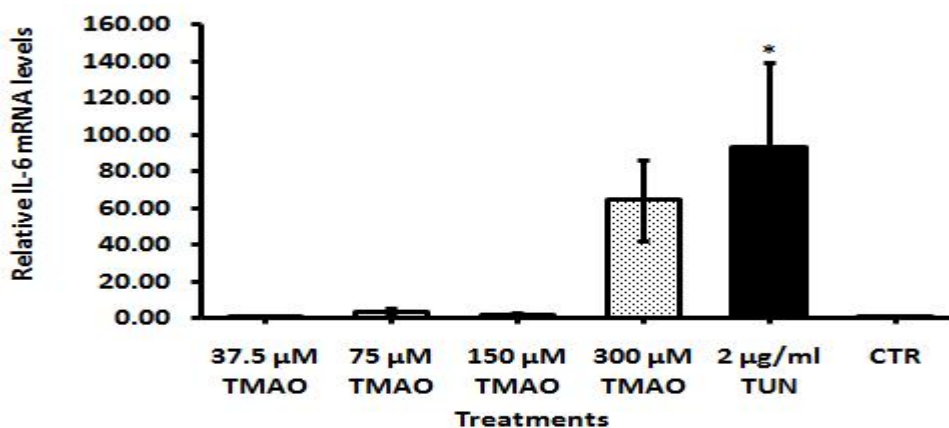
نمودار ۲، میزان تغییرات نسبی mRNA ژن IL-1 را پس از ۲۴ ساعت تیمار ماکروفاژها با غلظت‌های مختلفی از TMAO و تونیکامایسین به مدت ۱۸ ساعت نشان می‌دهد. سلولهای تیمار شده با تونیکامایسین هیچ‌گونه افزایش معنی داری را در میزان



نمودار ۲: تغییرات نسبی mRNA ژن IL-1. نتایج بصورت میانگین ± خطای استاندارد چهار آزمایش مجزا گزارش شده اند. TMAO: تری متیل آمین-N-اکساید. TUN: تونیکامایسین. CTR: کنترل.  $P < 0.05$  به عنوان معنی دار آماری در نظر گرفته شده است. در مقایسه با گروه کنترل:  $P < 0.001$ . \*\*\*

تفاوت معنی داری در میزان بیان IL-6 در مقایسه با گروه کنترل دیده نشد ( $P > 0.05$ ). ولی تونیکامایسین توانست به طور معنی داری میزان بیان IL-6 در را افزایش دهد ( $P = 0.028$ ).

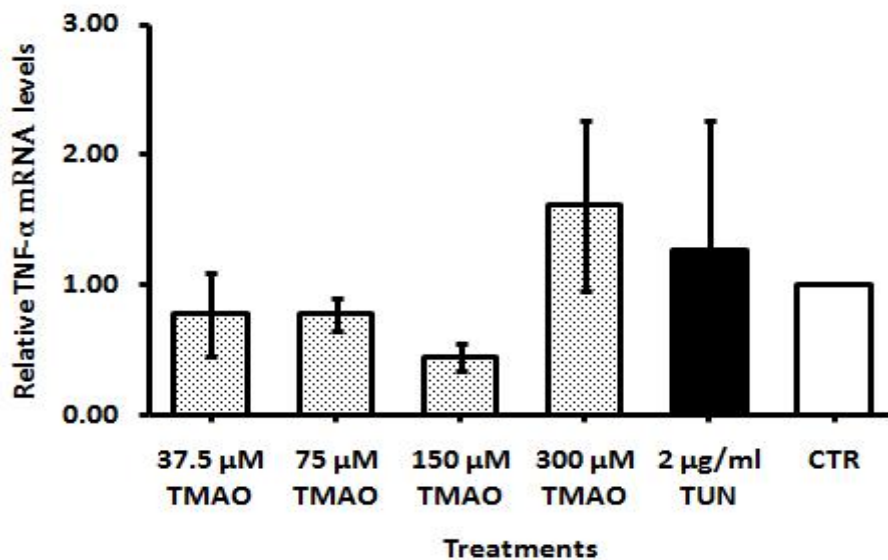
نمودار ۳، میزان تغییرات نسبی mRNA ژن IL-6 را پس از ۲۴ ساعت تیمار ماکروفازها با غلظتهای مختلفی از TMAO و تونیکامایسین به مدت ۱۸ ساعت نشان می دهد. در سلولهای تیمار شده با TMAO هیچ گونه



نمودار ۳: تغییرات نسبی mRNA ژن IL-6. نتایج بصورت میانگین ± خطای استاندارد چهار آزمایش مجزا گزارش شده اند. TMAO: تری متیل آمین-N-اکساید. TUN: تونیکامایسین. CTR: کنترل.  $P < 0.05$  به عنوان معنی دار آماری در نظر گرفته شده است. در مقایسه با گروه کنترل:  $P < 0.05$ . \*

TMAO و یا تونیکامایسین هیچ گونه تفاوت معنی داری در میزان بیان TNF- در مقایسه با گروه کنترل دیده نشد ( $P > 0.05$ ).

نمودار ۴، میزان تغییرات نسبی mRNA ژن TNF- را پس از ۲۴ ساعت تیمار ماکروفاژها با غلظتهای مختلفی از TMAO و تونیکامایسین به مدت ۱۸ ساعت نشان می دهد. در سلولهای تیمار شده با



نمودار ۴: تغییرات نسبی mRNA ژن TNF- نتایج بصورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد چهار آزمایش مجزا گزارش شده اند. TMAO: تری متیل آمین-N-اکساید. TUN: تونیکامایسین. CTR: کنترل.  $P < 0.05$  به عنوان معنی دار آماری در نظر گرفته شده است.

## بحث

مطالعه حاضر احتمالاً تنها مطالعه ای است که برای اولین بار تاثیر مستقیم TMAO را بر بیان IL-1, IL-6 و TNF- در ماکروفاژ انسانی در *In-Vitro* مطالعه و ارزیابی می کند. در این مطالعه (غلظت بالای) TMAO از بین پارامترهای مذکور فقط توانست بیان IL-1 را به طور معنی داری افزایش دهد. در تایید این یافته می توان به مطالعاتی اشاره کرد که توانمندی خاصی برای TMAO در القای تشکیل ماکروفاژ کف آلود و فعال شدن مسیرهای التهابی پیشنهاد می کنند. به عنوان مثال مطالعات قبلی نشان داده اند که TMAO می تواند مسیر پروتئین کیناز C/فاکتور هسته ای NF- $\kappa$ B را فعال کند و احتمالاً از این طریق می تواند باعث

افزایش بیان سایتوکاین های پیش التهابی و تنظیم مولکولهای اتصالی به دیواره عروق (Vascular Cell Adhesion Molecule 1, VCAM-1) شود (۱۲). فعال سازی انفلاموزوم (NLRP3) به عنوان مکانیسم دیگری برای اثر TMAO در القای بیان سایتوکاین های پیش التهابی و التهاب در دیواره عروق معرفی می شود (۱۲). اگرچه، جهت مقایسه، تاکنون مطالعه ای یافت نشده است که مستقیماً تاثیر TMAO را بر بیان IL-1 در ماکروفاژها نشان دهد، لکن مطالعات فوق الذکر به اتفاق با این یافته ما همخوانی دارند و تاییدی بر آن می باشند. TMAO از مسیر دیگری نیز می تواند بطور غیرمستقیم و بواسطه

از تغییرات آشکار و معنی داری آن دو پارامتر در مطالعه حاضر جلوگیری کرده است.

مطالعات قبلی نشان داده اند که القای بیان سایتوکاینهای پیش التهابی نظیر پارامترهایی که در این مطالعه بررسی شدند، در اثر ریسک فاکتورهای آترواسکلروز، بطور حتم در ایجاد و پیشرفت آترواسکلروز به عنوان یک بیماری التهابی نقش دارند (۱۳). تری متیل آمین-N-اکساید (Trimethylamine-N-oxide) قبلاً به عنوان اسمولیتی شناخته می شد که در پلاسمای بیماران مزمن کلیوی افزایش می یابد (۱۷). در سالهای اخیر مطالعات نشان داده اند که این متابولیت پلاسمایی به عنوان یک ریسک فاکتور آترواسکلروز (۲۰-۱۸)، در مهار انتقال معکوس کلسترول، در اختلال متابولیسم اسیدهای صفرای، تسریع تشکیل ماکروفاژ کف آلود و ایجاد مقاومت نسبت به انسولین اثر دارد (۲۳-۲۱ و ۱۷ و ۱۵). افزون بر این موارد، افزایش سطح پلاسمایی TMAO با بیماری کبد چرب غیرالکلی (۲۴)، آترایمر (۲۵) و سرطانهای دستگاه گوارش (۳۰ و ۲۶) نیز مرتبط شناخته شده است. در تمامی موارد فوق الذکر فرآیندهای التهابی و افزایش بیان سایتوکاینهای پیش التهابی به نحوی دیده می شود. در این میان، همانطور که پیشتر هم در مقدمه ذکر شد، IL-1 نقش مرکزی در شبکه سایتوکاینی و نیز در ایجاد و تشدید آترواسکلروز القاء شده در اثر ریسک فاکتورهایی نظیر TMAO دارد (۴). لذا از این حیث می توان مجدداً عنوان کرد که یافته های مطالعه حاضر با سایر مطالعات قبلی هم خوانی دارد. البته مطالعه حاضر نمی تواند تاثیر احتمالی TMAO در کاهش یا سرکوب بیان سایتوکاینهای ضد التهابی (نظیر

تحریک تولید گونه های فعال اکسیژن (reactive oxygen species, ROS) به افزایش و القای بیان سایتوکاینهای پیش التهابی منجر شود (۱۳). افزون بر آن مطالعات قبلی نویسندگان نشان داده است که TMAO می تواند بیان پروتئینهای شوک حرارتی (heat shock proteins, HSPs) را در ماکروفاژها القاء کند (۹ و ۱۴). افزایش بیان پروتئینهای شوک حرارتی خود می تواند با اثرات اتوکترین و از طریق به اثر گیرنده های شبه تول (Toll like Receptors) به تحریک تولید سایتوکاینهای پیش التهابی منجر شود (۱۵).

در مطالعه ما اگرچه TMAO تغییراتی را در جهت افزایش بیان ژن IL-6 و TNF- در سطح mRNA در ماکروفاژها القاء کرد، لکن این تغییرات برای هیچ یک از دو پارامتر مذکور و در هیچ یک از غلظتهای استفاده شده TMAO از لحاظ آماری معنی دار نبود. در توجیه این یافته ها می توان خاطر نشان کرد که افزایش بیان ژن بواسطه یک تیمار صرفاً در سطح مقدار mRNA اتفاق نمی افتد، بلکه در بعضی از موارد ممکن است در سطح میزان پایداری mRNA، در سطح پروتئین و یا در سطح تغییرات پس از ترجمه پروتئین صورت گیرد و در بعضی موارد هم ممکن است فاکتورهای تنظیم کننده دیگری بر پایداری mRNA ی ژن تاثیر داشته باشند. به عنوان مثال مطالعات قبلی نشان داده اند که mir-365 اثر تنظیمی منفی (کاهنده) بر روی میزان mRNA IL-6 دارد (۱۶). بنابراین احتمالاً در مطالعه ما هم تغییرات دو پارامتر IL-6 و TNF- نه در سطح mRNA، بلکه ممکن است صرفاً در سطح پروتئین دیده شود یا اینکه تحت تاثیر فاکتورهای تنظیم کننده دیگری نیز بوده که

مکانیسمهای فعال سازی غیر طبیعی ماکروفاژها و القای التهاب در فرآیند آترواسکلروز را روشن می سازد.

IL-8 را به عنوان مکانیسم دیگری در فعال کردن یا تشدید التهاب در طی آترواسکلروز رد کند یا نادیده بگیرد.

### تشکر و قدردانی

هزینه های مالی این مطالعه توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان و در قالب پایان نامه دانشجویی تامین شده است. نویسندگان مقاله از همکاری مسئول و پرسنل محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی دانشگاه علوم پزشکی کردستان کمال تشکر و قدر دانی را اعلام می دارند.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که TMAO به عنوان یک ریسک فاکتور آترواسکلروز احتمالاً از طریق تحریک و افزایش بیان سیتوکاینهای التهابی نظیر IL-1 در ماکروفاژها با پاتوژنز آترواسکلروز ارتباط پیدا می کند و یافته های این مطالعه احتمالاً بخشی از

### Reference

1. Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011; 17: 1410-22.
2. Libby P. Inflammation and Atherosclerosis. *Circulation* 2002; 105: 1135-43.
3. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420: 868-74.
4. Kampoli AM, Tousoulis D, Antoniadis C, Siasos G, Stefanadis C. Biomarkers of premature atherosclerosis. *Trends Mol Med* 2009; 15: 323-32.
5. 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: 57-63.
6. Loscalzo J. Lipid metabolism by gut microbes and atherosclerosis. *Circ Res* 2011; 109:127-9.
7. Sun X, Jiao X, Ma Y, Liu Y, Zhang L, He Y, et al. Trimethylamine N-oxide induces inflammation and endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells via activating ROS-TXNIP-NLRP3 inflammasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 481: 63-70.
8. Warriar M, Shih DM, Burrows AC, Ferguson D, Gromovsky AD, Brown AL, et al. The TMAO-Generating Enzyme Flavin Monooxygenase 3 Is a Central Regulator of Cholesterol Balance. *Cell Reports* 2015; 10: 326-38.
9. Mohammadi A, Gholamhoseyniannajar A, Yaghoobi MM, Jahani Y, Vahabzadeh Z. Expression levels of heat shock protein 60 and glucose-regulated protein 78 in response to trimethylamine-N-oxide treatment in murine macrophage J774A.1 cell line. *Cell Mol Biol* 2015; 61: 94-100.
10. Mohammadi A, Najjar AG, Yaghoobi MM, Jahani Y, Vahabzadeh Z. Trimethylamine-N-Oxide Treatment Induces Changes in the ATP-Binding Cassette Transporter A1 and Scavenger Receptor A1 in Murine Macrophage J774A.1 cells. *Inflammation* 2016; 39: 393-404.
11. Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WM, Karlen Y, Bakker O, van den Hoff MJ, et al. Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: e45.
12. Seldin MM, Meng Y, Qi H, Zhu W, Wang Z, Hazen SL, et al. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappa B. *J Am Heart Assoc* 2016; 22: e002767.

13. Chen ML, Zhu XH, Ran L, Lang HD, Yi L, Mi MT. Trimethylamine-N-oxide induces vascular inflammation by activating the NLRP3 inflammasome through the SIRT3-SOD2-mtROS signaling pathway. *J Am Heart Assoc* 2017 ; 4: e006347.
14. Mohammadi A, Vahabzadeh Z, Jamalzadeh S, Khalili T. Trimethylamine-N-oxide, as a risk factor for atherosclerosis, induces stress in J774A.1 Murine Macrophages. *Adv Med Sci* 2017; 63: 57-63.
15. Xu Q. Role of Heat Shock Proteins in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22: 1547-59.
16. Xu Z, Xiao SB, Xu P, Xie Q, Cao L, Wang D, et al. miR-365, a novel negative regulator of interleukin-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF-kappaB. *J Biol Chem* 2011; 286: 21401-12.
7. Missailidis C, Hallqvist J, Qureshi AR, Barany P, Heimburger O, Lindholm B, et al. Serum trimethylamine-N-oxide is strongly related to renal function and predicts outcome in chronic kidney disease. *PloS One* 2016; 11: e0141738.
18. Ussher JR, Lopaschuk GD, Arduini A. Gut microbiota metabolism of L-carnitine and cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 2013; 231: 456-61.
19. Velasquez MT, Ramezani A, Manal A, Raj DS. Trimethylamine N-oxide: the good, the bad and the unknown. *Toxins* 2016; 8: 326.
20. Bennett BJ, de Aguiar Vallim TQ, Wang Z, Shih DM, Meng Y, Gregory J, et al. Trimethylamine-N-oxide, a metabolite associated with atherosclerosis, exhibits complex genetic and dietary regulation. *Cell Metabol* 2013; 17: 49-60.
21. Al-Obaide MAI, Singh R, Datta P, Rewers-Felkins KA, Salguero MV, Al-Obaidi I, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine-N-oxide and serum biomarkers in patients with T2DM and advanced CKD. *J Clin Med* 2017; 6: E86.
22. Brown JM, Hazen SL. Metaorganismal nutrient metabolism as a basis of cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2014; 25: 48-53.
23. 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: 576-85.
25. Chen YM, Liu Y, Zhou RF, Chen XL, Wang C, Tan XY, et al. Associations of gut-flora-dependent metabolite trimethylamine-N-oxide, betaine and choline with non-alcoholic fatty liver disease in adults. *Sci Rep* 2016; 6: 19076.
26. Xu R, Wang Q. Towards understanding brain-gut-microbiome connections in Alzheimer's disease. *BMC Syst Biol* 2016; 10: 63.
27. Liu X, Liu H, Yuan C, Zhang Y, Wang W, Hu S, et al. Preoperative serum TMAO level is a new prognostic marker for colorectal cancer. *Biomark Med* 2017; 11: 443-7.
28. Oellgaard J, Winther SA, Hansen TS, Rossing P, von Scholten BJ. Trimethylamine N-oxide (TMAO) as a new potential therapeutic target for insulin resistance and cancer. *Curr Pharm Des* 2017; 23: 3699-712.
29. Moloudi R., Nabavizadeh F., Nahrevanian H., Hassanzadeh G. Effect of different doses of GLP-2 (Teduglutide) on acute esophageal lesion due to acid-pepsin perfusion in male rats. *Peptides* 2011; 32: 2086-90.
30. Nabavizadeh F., Moloudi R., Dehpour A.R., Nahrevanian H., Shahvaisi K., Salimi E. The effects of cholestasis and cirrhosis on gastric acid and pepsin secretions in rat: Involvement of nitric oxide. *Iran J Basic Med Sci* 2010;13: 207-21