

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní obor: Imunologie



Bc. Janet Ježková

Střevní mikrobiom a autoimunitní mechanismy u pacientů s narkolepsií 1. typu

Gut microbiome and autoimmune mechanisms in patients with type 1 narcolepsy

Diplomová práce

Vedoucí práce:

RNDr. Radka Roubalová, Ph.D.

Praha, 2022

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 8. 2022

Bc. Janet Ježková

.....

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Radce Roubalové, Ph.D. za ochotu, cenné rady, vstřícný přístup a trpělivost během psaní diplomové práce. Děkuji také všem členům Laboratoře buněčné a molekulární imunologie za vytvoření přátelského pracovního prostředí a zejména RNDr. Petře Procházkové, Ph.D. za rady a pomoc s experimentální prací. Velké díky patří rovněž mým blízkým za morální podporu během studia.

Abstrakt

Narkolepsie 1. typu (NT1) je chronické neurologické onemocnění charakterizované přítomností kataplexie a nadměrné denní spavosti. NT1 vzniká pravděpodobně autoimunitní destrukcí orexinergních neuronů v hypotalamu. Tyto neurony jsou jedinými známými producenty neuropeptidů orexinu A a B, které se podílejí na regulaci spánku a bdění. NT1 často doprovází komorbiditu, jakými jsou obezita, diabetes 2. typu, hormonální poruchy, deprese a úzkosti. Střevní mikrobiota produkcí různých metabolitů ovlivňuje kvalitu spánku a uvažuje se o jejím podílu na patogenezi NT1 či na rozvoji přidružených komorbidit. V naší studii bylo pomocí sekvenování nové generace analyzováno složení střevní mikrobioty 41 pacientů trpících NT1 a 32 zdravých kontrol. Diverzita střevní mikrobioty pacientů se významně nelišila od zdravých kontrol. U pacientů byla odhalena pozitivní korelace mezi zastoupením bakteriální čeledi *Coriobacteriaceae*, BMI a délkou onemocnění. Dále existuje negativní korelace mezi množstvím čeledi *Coriobacteriaceae* a hladinou cholesterolu, což naznačuje vliv těchto bakterií na metabolismus lipidů. U pacientů bylo oproti zdravým kontrolám dále zjištěno vyšší zastoupení čeledi *Leuconostocaceae* a *Clostridiaceae*¹, přičemž množství bakterií čeledi *Clostridiaceae* klesá s rostoucí délkou onemocnění. Bakteriální čeleď *Clostridiaceae* se produkcí butyrátu podílí na zlepšování kvality spánku. Střevní mikrobiota představuje významný zdroj antigenů, které mohou strukturně mimikovat neuropeptidy a neurohormony hostitelského organismu. Protilátky vznikající proti těmto mikrobiálním antigenům mohou s těmito látkami zkříženě reagovat a ovlivňovat tak jejich funkci. Hladiny takových autoprotilátek jsou asociované s vyšší prevalencí psychických a metabolických poruch. U skupiny pacientů a zdravých kontrol byly stanoveny autoprotilátky proti neuropeptidům, které by se mohly potenciálně podílet na patogenezi NT1. U pacientů byly oproti zdravým kontrolám nalezeny významně snížené hladiny IgG autoprotilátek proti alfa melanocyty stimulujícímu hormonu (α -MSH) a IgA proti orexinu A. U pacientů nebyly detekovány zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů ani markerů poškození střevní a hematoencefalické bariéry. Výsledky této studie poukazují na možné propojení střevní mikrobioty, fyziologie spánku a imunitního systému.

Klíčová slova: Narkolepsie 1. typu, střevní mikrobiom, osa mikrobiom-střevo-mozek, autoprotilátky, molekulární mimikry, propustnost střeva, hematoencefalická bariéra

Abstract

Narcolepsy Type 1 (NT1) is a chronic neurological disease characterized by the presence of cataplexy and excessive daytime sleepiness. NT1 probably arises from autoimmune destruction of orexinergic neurons in the hypothalamus. These neurons are the only known producers of the neuropeptides orexin A and B, which are involved in the regulation of sleep and wakefulness. NT1 is often accompanied by comorbidities such as obesity, type 2 diabetes, hormonal disorders, depression, and anxiety. Gut microbiota affects the quality of sleep by the production of various metabolites. It is considered that it may be involved in the pathogenesis of NT1 or in the development of related comorbidities. In our study, we analyzed the gut microbiota composition of 41 NT1 patients and 32 healthy controls using next-generation sequencing. The diversity of patients' gut microbiota did not differ significantly from healthy controls. In patients, we revealed a positive correlation between the abundance of the bacterial family *Coriobacteriaceae*, BMI, and the disease duration. Besides, we observed a negative correlation between the *Coriobacteriaceae* family and cholesterol levels, suggesting that these bacteria are involved in host lipid metabolism. Compared to healthy controls, a higher abundance of bacteria from the families *Leuconostocaceae* and *Clostridiaceae1* was detected in patients. In addition, the abundance of the *Clostridiaceae* family decreased with the increasing disease duration. The bacterial family *Clostridiaceae* is known to produce butyrate and its production improves the quality of sleep. Gut microbiota represents an important source of antigens that can structurally mimic neuropeptides and neurohormones of the host organism. Antibodies produced against these microbial antigens can cross-react with these neuroactive compounds and affect their function. Levels of such autoantibodies are associated with a higher prevalence of psychological and metabolic disorders. In a group of patients and healthy controls, we detected autoantibodies against neuropeptides that could potentially be involved in the pathogenesis of NT1. We found lower levels of IgG autoantibodies against alpha melanocyte-stimulating hormone (α -MSH) and IgA against orexin A in patients compared to healthy controls. We did not detect increased levels of pro-inflammatory cytokines or markers of gut or blood-brain barrier damage in patients. The results of this study show a possible connection between gut microbiota, sleep physiology, and the immune system.

Keywords: Type 1 narcolepsy, gut microbiome, microbiome-gut-brain axis, autoantibodies, molecular mimicry, gut permeability, blood-brain barrier

Obsah

1 Úvod	1
2 Přehled literatury	2
2.1 Regulace spánku a bdění	2
2.2 Narkolepsie 1. typu	2
2.2.1 Klinické projevy NT1	3
2.2.2 Epidemiologie a genetický podklad NT1	5
2.2.3 Environmentální faktory ovlivňující rozvoj NT1	5
2.2.4 Etiologie NT1	6
2.2.5 Diagnóza NT1	9
2.2.6 Terapie NT1	9
2.2.7 Narkolepsie u zvířat	9
2.3 Střevní mikrobiom	10
2.4 Osa mikrobiom-střevo-mozek	11
2.4.1 Mikrobiom a spánek	12
2.4.2 Mikrobiom a regulace chuti k jídlu	13
3 Cíl práce	15
4 Metodika	16
4.1 Získ a zpracování vzorků	16
4.1.1 Odběr, zpracování a uskladnění vzorků krve	16
4.1.2 Odběr, izolace DNA a uskladnění vzorků stolice	16
4.2 Polymerázová řetězová reakce a DNA elektroforéza	16
4.3 Kvantitativní PCR	17
4.4 Kontrola primerů	18
4.5 Sekvenování nové generace	19
4.6 Bioinformatická analýza střevního mikrobiomu	19
4.7 Detekce autoprotilátek proti vybraným peptidům	20
4.8 Detekce intaktnosti biologických bariér	21
4.9 Detekce cytokinů	22
4.10 Statistické zpracování výsledků	22
5 Výsledky	24
5.1 Porovnání skupiny pacientů a kontrol	24
5.2 Sekvence střevního mikrobiomu	25
5.3 Kvantifikace bakterií pomocí qPCR	34

5.4 Detekce hladin sérových protilátek	35
5.5 Koncentrace sérových cytokinů	37
5.6 Koncentrace sérového I-FABP a S100B	38
6 Diskuze	40
7 Závěr	49
8 Seznam použité literatury	50

Seznam použitých zkratek

α -MSH	Alfa melanocyty stimulující hormon
<i>A. muciniphila</i>	<i>Akkermansia muciniphila</i>
ASO	Anti-Streptolysin O
BMI	Body mass index, index tělesné hmotnosti
CNS	Centrální nervová soustava
EDS	Excessive daytime sleepiness, nadměrná denní spavost
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HCRTR2	Gen pro hypokretinový receptor 2
HEB	Hematoencefalická bariéra
HLA	Human leukocyte antigens, systém lidských leukocytárních antigenů
HPA	Osa hypothalamus-hypofýza-nadledviny
I-FABP	Intestinal fatty acid-binding protein, střevní protein vázající mastné kyseliny
IFN- γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
MCH	Melanin koncentrující hormon
<i>M. smithii</i>	<i>Methanobrevibacter smithii</i>
MSLT	Multiple sleep latency test, test mnohočetné latence usnutí
NEI	Neuropeptid kyselina glutamová-isoleucin
NPY	Neuropeptid Y
NREM	Non-rapid eye movement, klidný pohyb očí

NT1	Narkolepsie 1. typu
NT2	Narkolepsie 2. typu
OTU	Operational taxonomic unit, operační taxonomická jednotka
OX1R	Orexinový receptor 1
OX2R	Orexinový receptor 2
PCR	Polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce
PYY	Peptid YY
qPCR	Kvantitativní PCR
RBD	REM sleep behavior disorder, poruchy chování v REM spánku
REM	Rapid eye movement, rychlé pohyby očí
S100B	Protein B vázající vápník z rodiny S100 proteinů
SCFA	Short-chain fatty acids, mastné kyseliny s krátkým řetězcem
TNF- α	Tumor nekrotizující faktor alfa

1 Úvod

Narkolepsie 1. typu je chronické neurologické onemocnění charakteristické poruchou regulace spánku a bdění. Jedná se o heterogenní onemocnění, při kterém mají pacienti často přidružené metabolické, endokrinní a psychiatrické poruchy. U pacientů s NT1 je vysoká prevalence nadváhy a obezity. Etiologie narkolepsie 1. typu není zcela objasněna, ale velmi pravděpodobně se jedná o autoimunitní onemocnění, při jehož patogenezi hrají roli infekční choroby a potenciálně i složení střevního mikrobiomu.

Střevní mikrobiom skrze osu mikrobiom-střevo-mozek ovlivňuje délku a kvalitu spánku, chuť k jídlu a metabolismus, dále endokrinní a imunitní systém a propustnost střevní a hematoencefalické bariéry. Dysbióza střevního mikrobiomu je mimo jiné asociovaná s metabolickým syndromem, obezitou, diabetem 1. typu a také s neurodegenerativními a psychiatrickými nemocemi. Objasněním etiologie a patogeneze narkolepsie by mohlo vést k formulaci nových terapeutických přístupů vedoucích ke zmírnění symptomů narkolepsie a zkvalitnění života pacientů.

Diplomová práce se zabývá výzkumem složení střevního mikrobiomu a autoimunitních mechanismů u pacientů s narkolepsií 1. typu. Zejména se zaměřuje na odhalení role střevního mikrobiomu v patogenezi narkolepsie a na popsání specifického bakteriálního složení ve střevě těchto pacientů. Práce popisuje teoretické souvislosti mezi střevním mikrobiomem u skupiny pacientů s NT1, vývojem onemocnění a tíží symptomů. Dále také popisuje hladiny autoprotilátek v séru, sérový cytokinový profil a propustnost střevní a hematoencefalické bariéry u pacientů a porovnává tyto hodnoty se skupinou zdravých kontrol.

2 Přehled literatury

2.1 Regulace spánku a bdění

Spánek je okamžitě reverzibilní funkční stav organismu, při kterém dochází ke snížené reaktivitě na vnější podněty, k poklesu pohybové aktivity a ke změně kognitivních činností (1). Spánek se dělí na NREM a REM fáze, které se odlišují rozdílnou aktivitou mozkové kůry a regulací svalového napětí při spánku. Během NREM spánku dochází ke snížení metabolických procesů mozku a ke snížení svalového tonu, zatímco při REM spánku jsou aktivita mozkové kůry a metabolické procesy mozku srovnatelné se stavem bdělosti. Kosterní svaly jsou v REM spánku zcela atonické s výjimkou bránice, svalů středouší, okohybných svalů a některých svalů hrtanu. NREM spánek v dospělosti tvoří 75-80 % nočního spánku (1). Spánek i bdělost jsou závislé na cirkadiánním rytmu a tendenci organismu spát, která se zvyšuje s délkou trvání předchozí bdělosti. Cirkadiánní rytmus je zajištěn díky tzv. hodinovým genům. Hlavní mozkové centrum, kde se tento biorytmus generuje, je párové jádro nucleus suprachiasmaticus, které se nachází v předním hypotalamu. Tato mozková oblast je aktivní ve dne a je ovlivňována tzv. synchronizátory, mezi které patří například denní světlo a melatonin (1; 2). Regulaci spánku a bdění zajišťují neurony, které přímo či nepřímo aktivují mozkovou kůru a tím buď navozují či udržují bdění, nebo mozkovou kůru tlumí, čímž navozují spánek (1).

Orexinergní (neboli hypokretinergní) neurony se nachází v laterální části hypotalamu a prochází do dalších částí mozku a míchy (2; 3). Orexinergní neurony jsou esenciální pro udržování organismu v bdělosti, přičemž jsou maximálně aktivní při pohybové aktivitě a bdění a neaktivní ve všech fázích spánku (3). Orexinergní neurony jsou aktivovány všemi druhy budivých systémů (noradrenergní, dopaminergní, serotoninergní, histaminergní, acetylcholinergní atd.) a zároveň mohou tyto budivé systémy podporovat v kontinuální aktivitě a tím udržovat stav bdění (1). Orexinergní neurony také inervují části mozku, ve kterých se nachází centrum odměn, chuti a metabolismu (4).

2.2 Narkolepsie 1. typu

Narkolepsie je chronické neurologické onemocnění, které je charakteristické porušenou regulací spánku a bdění. Narkolepsie patří do skupiny onemocnění označovaných jako centrální hypersomnie (1). Narkolepsii rozlišujeme na narkolepsii 1. typu (NT1), dříve označovanou jako narkolepsie s kataplexií, a narkolepsii 2. typu (NT2), dříve označovanou jako narkolepsie bez kataplexie. Typickým projevem narkolepsie obou typů je nadměrná denní spavost (5; 6). NT1 je způsobená selektivní destrukcí orexinergních neuronů v hypotalamu, které jsou jedinými známými producenty neuropeptidů orexinu A (neboli hypokretinu 1) a orexinu B (neboli hypokretinu 2). Orexin A i B ovlivňují navázáním na orexinové receptory 1 (OX1R) a 2 (OX2R) aktivitu různých typů neuronů. Destrukce orexinergních neuronů způsobuje snížení hladin orexinu v likvoru, což vede k narušení regulace

spánku a bdění (7; 8). Kromě orexinergních neuronů nejsou u pacientů s NT1 poškozeny žádné jiné neurony a celkové zastoupení jednotlivých typů neuronů je srovnatelné se zdravými kontrolami. Výjimku tvoří histaminergní neurony, které jsou u pacientů s NT1 ve větší míře (9). Histaminergní neurony jsou stejně jako orexinergní neurony budivé, takže jejich navýšení může u narkoleptických pacientů působit jako kompenzace chybějícího budivého systému (10). Příčina destrukce orexinergních neuronů ještě nebyla zcela odhalena, ale pravděpodobně se jedná o autoimunitní proces (viz. Kapitola 2.2.4).

Orexiny byly objeveny jako regulátory příjmu potravy a až později se zjistila jejich zásadní role v regulaci spánku a bdění. Kromě toho u myši bylo zjištěno, že se podílejí také na regulaci srdečního tepu, termogenezi hnědého tuku, metabolickém obratu a obecně stimulují organismus ke stavu vysoké pozornosti, motivovanosti a připravenosti k fyzické aktivitě (11; 12). Orexinergní neurony produkují také další neurotransmitery jako například glutamát a dynorfin. Není zatím zřejmé, jestli snížení koncentrace těchto látek přímo ovlivňuje vývoj narkolepsie (13). NT2 má velmi heterogenní klinické projevy a v některých případech se postupem času rozvíjí v NT1 (6; 14).

2.2.1 Klinické projevy NT1

Mezi typické projevy NT1 patří kataplexie, nadměrná denní spavost (EDS), rušený nekvalitní noční spánek, parasomnie, halucinace a spánková paralýza. Další velmi časté projevy NT1 představují psychiatrické, emocionální a metabolické poruchy. Méně častými projevy NT1 je noční pocení, poruchy trávení, bolesti hlavy, chronické bolesti zad, poruchy erekce a další. Vzhledem k rozmanitým klinickým projevům se začíná uvažovat o narkolepsii jako o celkové hypotalamické poruše. Jediným specifickým symptomem NT1 je kataplexie, což je stav náhlé ztráty svalového tonu ve stavu bdění. Kataplexie je často u pacienta vyvolaná silnou pozitivní emocí a až u 50 % všech pacientů se projeví při lochtání (6).

Kataplexie může být celková, při níž dochází k pádu pacienta a neschopnosti se hýbat do odeznění ataky, nebo částečná, při níž dochází k ztrátě svalového tonu pouze určitých svalů. Částečná ataka kataplexie obvykle trvá 2-10 sekund, ale v případě, že se stále vyskytuje spouštěč ataky, kataplexie přetrvává. Částečná kataplexie bývá často lokalizovaná na svaly obličeje a může se po pár sekundách rozvinout v celkovou ataku. Celková kataplexie je přítomná přibližně u třetiny pacientů a trvá většinou méně než 2 minuty. Ataka delší než 5 minut je typická spíše pro neléčené pacienty nebo pro pacienty, u kterých přestane fungovat antikataplektická léčba (16). Při kataplektické atace může, zejména u dětí a nově diagnostikovaných pacientů, docházet k záškubům obličejového svalstva, protažení krčního svalstva a opakujícím se záškubům končetin, což může vést k záměně

diagnózy za epilepsii (17). Projevy kataplexie jsou u každého pacienta individuální, stejně jako četnost těchto atak, která se pohybuje od počtu jednotlivých atak několikrát za rok až několikrát za den. Při kataplektické atace zůstává většinou pacient při vědomí a pouze výjimečně pacienti popisují rozmazané vidění a dušení. Kataplexie je, obzvláště při delší atace, sdružená s dalšími projevy NT1 jako například s halucinacemi, spánkovou paralýzou, sněním a typickým chováním jako v REM spánku (19). Kataplexie se většinou začne projevovat po několika měsících od začátku projevů EDS. Někdy se ale začne projevovat až po několika letech, což je nejspíš způsobené tím, že destrukce orexinergních neuronů probíhá v rozmezí delšího časového úseku. Existuje predikce, že se destrukce méně než 50 % orexinergních neuronů projeví nadměrnou denní spavostí a destrukce více jak 80 % těchto neuronů vyúsťuje v projevy kataplexie a rychlého přechodu organismu do REM spánku po usnutí (20).

EDS je charakterizovaná jako chorobné usínání během dne. Mezi nejčastější projevy EDS patří pocit únavy, nedobrovolné usínání neboli spánková ataka, prodloužení nočního spánku, které nevede k odpočinku, opakované usínání během dne a dlouhodobé zhoršené vstávání, které je spojené s podrážděností či zmateností (21). EDS lze klasifikovat podle závažnosti, kde se hodnotí, jestli pacient usíná při monotónní činnosti, anebo také při interaktivní aktivitě. EDS je u 80 % NT1 pacientů doprovázená nedobrovolným usínáním (22). EDS se většinou značně projevovat už v ranních hodinách a v odpoledních hodinách přechází v nekontrolovatelné nutkání spát. Po zdřímnutí, které trvá okolo 15-20 minut dochází k odpočinku a EDS se začne po 1-2 hodinách projevovat znovu (7). I přesto, že pacienti spí více přes den než jedinci běžné populace, nespí celkově více, protože jejich noční spánek je fragmentovaný (23).

U 25-50 % pacientů se vyskytují poruchy chování v REM spánku (RBD), náměsíčnost, syndrom nočního přejídání a poruchy dýchání ve spánku (6). RBD se řadí mezi parasomnie a jsou charakterizované nabitím svalového tonu v REM spánku a abnormálním chováním během této fáze spánku. Pro RBD je typické chování, kdy pacient během spánku vykonává podobné pohyby jako ve snu, čímž ohrožuje sebe i své okolí (24). Někteří pacienti také mohou trpět spánkovou paralýzou, což je stav, kdy u pacienta dochází k neschopnosti ovládnutí kosterní svaloviny na začátku nebo na konci spánku. Výskyt těchto poruch ve spánku pozitivně koreluje se závažností EDS a mírou deficitu orexinu (6). 50-60 % pacientů trpí halucinacemi spojenými se spánkem (7). Přítomnost halucinací u pacientů může způsobit záměnu diagnózy za schizofrenii (25). EDS je také asociovaná s depresí, obezitou, úzkostí, podrážděností a zejména u dětí s poruchami pozornosti a chování (26).

Narkolepsie je onemocnění, které negativně ovlivňuje psychické rozpoložení pacienta. Pacienti s narkolepsií mají obecně nižší sebevědomí, nízké výkony v zaměstnání a ve škole, horší mezilidské vztahy a často trpí psychiatrickými nemocemi. Až 30 % pacientů s narkolepsií trpí depresemi a úzkostmi (27). Rozvoj narkolepsie může být podnícen stresující životní situací (6). Pacienti jsou i

přes normální kalorický příjem a běžnou fyzickou aktivitu často obézní, mají o 10-20 % vyšší hodnoty indexu tělesné hmotnosti (BMI) oproti běžné populaci, vyskytuje se u nich častěji diabetes mellitus, hypertenze, snížená schopnost lipolýzy a snížená funkce metabolismu (28; 29). Dále trpí endokrinními poruchami, a to hlavně poruchami štítné žlázy (6). Děti po rozvoji NT1 velmi rychle přibírají na váze, a to až o 15 kg během prvních měsíců po začátku rozvoje tohoto onemocnění (30).

2.2.2 Epidemiologie a genetický podklad NT1

Prevalence narkolepsie v Evropě a Severní Americe se pohybuje v rozmezí 0,02-0,18 %. Nejvyšší prevalence narkolepsie je v japonské populaci a nejnižší v židovské a arabské populaci (1; 6). Variabilita prevalence narkolepsie je pravděpodobně způsobena odlišnou genetickou výbavou populace, informovaností obyvatelstva a lékařů a ekonomikou státu (1). Narkolepsie se většinou začne projevovat v období puberty či po 35. roce života. U 10-15 % pacientů se projeví ještě před 10. rokem života (31). Typicky má narkolepsie progresivní průběh, nicméně existuje i akutní průběh nemoci (32; 33). Narkolepsie je silně asociovaná s alelou HLA-DQB1*06:02, kdy 86-98 % pacientů s NT1 a 40-50 % s NT2 jsou nositelé této alely. Tato alela se vyskytuje u běžné populace v 5-38 % (34). Asociace narkolepsie s alelou HLA-DQB1*06:02 je dosud nejsilnější známou asociací mezi konkrétní HLA alelou a onemocněním. Další asociace byly nalezeny s polymorfismy genů kódujících např. α řetězec T buněčného receptoru, P2Y purinoceptor 11 a pro-katepsin H (35; 36). Narkolepsie je multifaktoriální onemocnění a samotná genetická predispozice nemusí způsobit projevení nemoci, což vychází ze studií sledujících jednovaječná dvojčata, u kterých se narkolepsie vyskytuje u obou jedinců pouze v 25 % (6).

2.2.3 Environmentální faktory ovlivňující rozvoj NT1

Rozvoj narkolepsie je u geneticky predisponovaného jedince pravděpodobně vyvolán dalším spouštěčem, kterým může být například infekce, vakcinace či úraz hlavy (32; 33). Začátek projevů narkolepsie je často zaznamenán na jaře a v létě, což by odpovídalo tomu, že pacient prodělal během zimního období infekci spouštějící destrukci orexinergních neuronů, která se začala projevovat až po několika měsících (37). Nejvíce je rozvoj narkolepsie spojován s infekcí způsobenou β -hemolytickým streptokokem a chřipkovým virem typu A H1N1. Existuje předpoklad, že tyto dvě infekční agens iniciují či katalyzují autoimunitní destrukci vlastních orexinergních neuronů (33; 38). Tento předpoklad podporuje i zvýšený nález protilátek proti streptolysinu O (ASO) u 51 % pacientů (do 3 let od projevení příznaků) oproti 19 % u zdravých kontrol. Titr protilátek proti ASO s dobou od začátku projevení nemoci klesá (38). Asociace viru H1N1 s rozvojem narkolepsie byla poprvé pozorována po pandemii v letech 2009-2010, kdy došlo k významnému zvýšení prevalence NT1. Nárůst

prevalence NT1 byl zaznamenán jak po infekci samotným virem v Číně (3x), tak po podání vakcíny Pandemrix (GlaxoSmithKline) proti viru H1N1 (2,54x) v severoevropských zemích, kde se vakcína používala (33). K nejvyššímu nárůstu nově diagnostikovaných pacientů došlo po podání vakcíny Pandemrix ve Finsku (9,78x). Zvýšení bylo pozorováno nejprve u dětí (39) a později v menší míře i u dospělých. Všichni pacienti, u kterých se NT1 rozvinula po pandemii virem H1N1, byly nositelé alely HLA-DQB1*06:02 a onemocnění se u nich projevilo během týdnů či měsíců po infekci či vakcinaci (33; 37). Po působení dosud neznámého faktoru byl v roce 2013 v Evropě zaznamenán další nárůst (2,09x) výskytu NT1 u dětí a adolescentů (39).

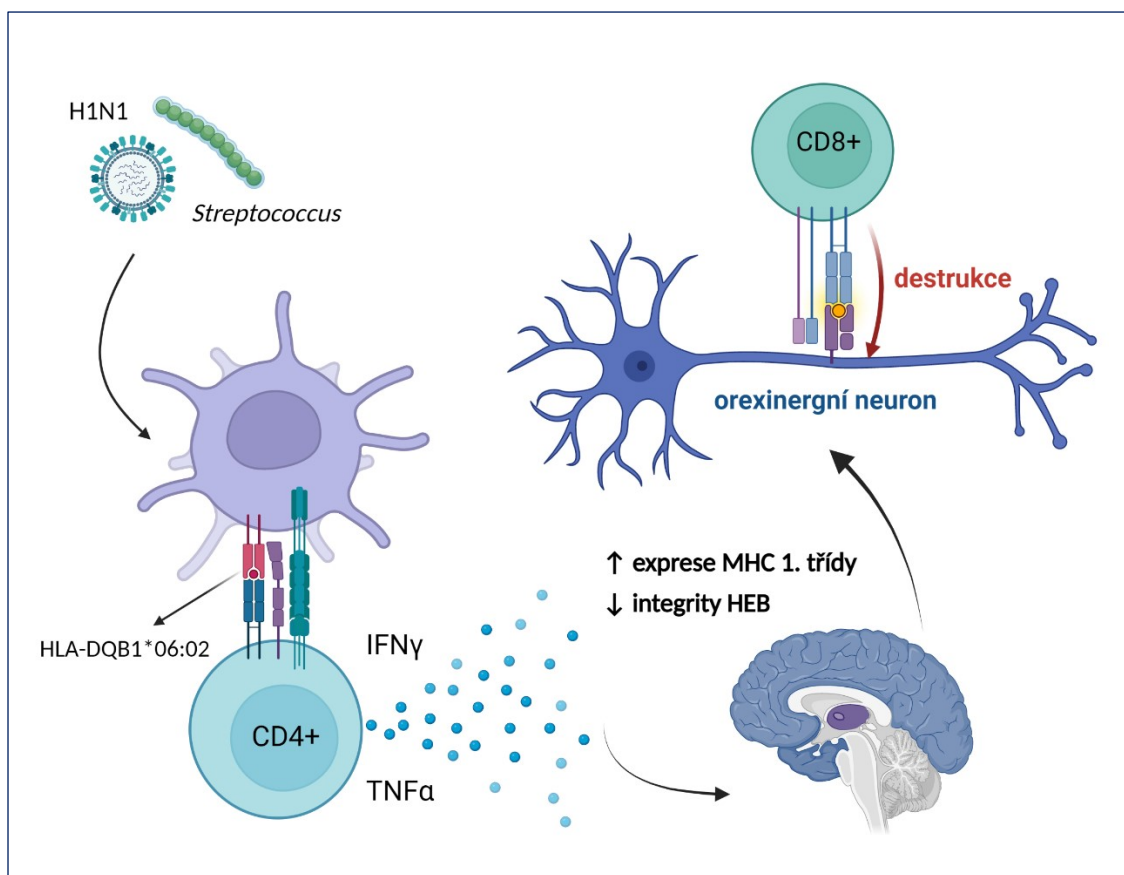
2.2.4 Etiologie NT1

Příčina rozvoje narkolepsie ještě není zcela objasněna, ale zdá se, že se jedná o autoimunitní onemocnění způsobené selektivní destrukcí orexinergních neuronů zprostředkovanou T lymfocyty (Obrazek 1) (40). T lymfocyty mohou být rozděleny na dvě základní populace – na pomocné CD4+ a cytotoxické CD8+ T lymfocyty. Oba typy T lymfocytů rozpoznávají pomocí specifických T buněčných receptorů peptidy navázané na MHC molekulách. CD4+ T lymfocyty rozpoznávají peptidy navázané na MHC molekulách 2. třídy, které jsou exprimované antigen prezentujícími buňkami, tedy i gliovými buňkami v mozku. CD8+ T lymfocyty rozpoznávají peptidy navázané na MHC molekulách 1. třídy, které jsou exprimované na všech jaderných buňkách. Neurony exprimují jen MHC molekuly 1. třídy, a to pouze po stimulaci prozánětlivými stimuly, kterými mohou být například cytokiny IFN- γ a TNF- α .

Kvůli asociaci NT1 s infekčními nemocemi se uvažuje o účinku molekulárních mimiker, které by se mohly podílet na rozvoji autoimunitní destrukce orexinergních neuronů (20). Mechanismus molekulárních mimiker je založený na podobnosti mezi cizími a vlastními strukturami, kdy aktivace imunitního systému proti cizorodému antigenu spustí u vnímavého jedince autoimunitní reakci (41). Tuto teorii podporuje studie z roku 2018 (42), kdy bylo zjištěno, že se peptidy orexinu a chřipkového viru H1N1 váží na DQB1*06:02 tetramery a jsou rozpoznávány CD4+ T buňkami ve větší míře u pacientů s NT1 než u zdravých kontrol. Orexiny se na DQB1*06:02 tetramery váží s vyšší afinitou, pokud jsou na svém C-konci posttranslačně upraveny amidací. Autoři také odhalili homologii mezi hemaglutininem viru H1N1 (pHA₂₇₃₋₂₈₇) a amidovaným orexinem_{54-66/86-97} (42).

Pomocné CD4+ T lymfocyty nejsou přímo cytotoxické a rozpoznávají peptidy navázané na MHC 2. třídy, které nejsou exprimovány neurony. Destrukce orexinergních neuronů CD4+ T lymfocyty tedy není pravděpodobná. Předpokládaná role CD4+ T lymfocytů v rozvoji NT1 je v produkci prozánětlivých cytokinů, které způsobí aktivaci jiných buněk imunitního systému, zejména makro-

fágů, CD8+ T lymfocytů a NK buněk. Zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů mohou také indukovat vyšší propustnost hematoencefalické bariéry (HEB) a expresi MHC molekul 1. třídy na neuronech. Přímoú destrukci orexinergních neuronů by mohly zprostředkovávat autoreaktivní cytotoxické CD8+ T lymfocyty (20; 40). Schopnost cytotoxických CD8+ T lymfocytů způsobovat destrukci neuronů byla ověřena na transgenních myších, které na svých orexinergních neuronech exprimovaly hemaglutinin. Po vpravení specifických CD8+ T lymfocytů rozpoznávajících hemaglutinin do krve těchto myší došlo k destrukci orexinergních neuronů a k rozvoji kataplexie a fragmentovaného spánku (43).



Obrázek 1 – Teoretický mechanismus destrukce orexinergních neuronů účinkem molekulárních mimiků. V tomto modelu exprimuje antigen prezentující buňka fragmenty chřipkového viru H1N1 či bakterie rodu *Streptococcus* na MHC molekulách 2. třídy (pravděpodobně na HLA-DQB1*06:02). Takto prezentované fragmenty rozpoznává CD4+ T lymfocyt, který následně začne produkovat prozánětlivé cytokiny (TNF α , IFN γ atd.). Prozánětlivé cytokiny způsobí rozvolnění HEB a zvýšení exprese MHC molekul 1. třídy na neuronech. Účinkem těchto cytokinů dochází k expanzi specifických CD8+ T lymfocytů, které rozpoznávají peptidy homologní s peptidy z chřipkového viru H1N1 či bakterie rodu *Streptococcus* navázané na orexinergních neuronech. Tyto specifické CD8+ T lymfocyty způsobují destrukci orexinergních neuronů. Obrázek byl vytvořen pomocí webové stránky www.Biorender.com.

Roli T lymfocytů při etiologii NT1 potvrzuje studie z roku 2018, ve které byly stanovovány specifické paměťové T lymfocyty pomocí velmi citlivé metody, při které se vytvoří knihovna těchto lymfocytů odebraných z periferní krve narkoleptických pacientů a zdravých kontrol. Pomocí této metody bylo zjištěno, že 17 z 18 narkoleptických pacientů a 3 z 12 kontrol mají specifické paměťové T lymfocyty rozpoznávající orexin. Z typizace bylo zjištěno, že se jedná o Th1 buňky, které rozpoznávají peptidy navázané na HLA-DR molekulách. U jednoho pacienta s nedávným rozvojem NT2 z této studie se našly také CD8+ T lymfocyty rozpoznávající orexin v likvoru (44). Při pitvě zemřelých pacientů s narkolepsií se v hypotalamu nenašli zvýšené cytotoxické T lymfocyty či jiné zánětlivé buňky, pouze zvýšená aktivace astrocytů (45) s výjimkou jednoho pacienta s nedávným nástupem NT1, u kterého byl zjištěn velký infiltrát CD8+ T lymfocytů v hypotalamu (46).

U narkoleptických pacientů byla v minulosti velká snaha nalézt autoprotilátky, nicméně výsledky byly nekonzistentní a snaha replikovat nalezené výsledky jinými laboratořemi byla často neúspěšná (40). U narkoleptických pacientů byly například nalezeny autoprotilátky proti neuropeptidu kyselina glutamová-isoleucin (NEI) a melanocyty stimulujícímu hormonu α (α MSH). NEI a α MSH jsou navzájem homologní a protilátky proti nim tedy mohou vázat oba peptidy. V mozku krys se tyto protilátky vážou na neurony produkující melanin koncentrující hormon (MCH) a na neurony produkující proopiomelanokortin, které se podílejí na regulaci spánku a chuti k jídlu. Myši, kterým byly podávány IgG protilátky proti NEI/ α MSH izolované z patientských sér do likvoru, měly sníženou kvalitu spánku (47). Dále byly nalezeny autoprotilátky proti ORX2, prostaglandinovému receptoru D2, neurexinu-1-alfa a proteinu tribbles homolog 2. Všechny autoprotilátky dosud nalezené u narkoleptiků ve vyšších hladinách nejsou specifické pouze pro orexinergní neurony a zdá se tedy, že nejspíš vznikají během autoimunitní reakce namířené proti orexinergním neuronům, ale nepodílejí se přímo na jejich destrukci (40). Role autoprotilátek není zatím jasná, ale je možné, že spoluúčinkují jako spouštěč nemoci, kdy by se mohly vázat na orexinergní neurony a označovat je tak k destrukci, či nespecificky aktivovat mikrogliu v jejich okolí (40; 48). U pacientů s NT1 nejsou v likvoru nalezeny oligoklonální pásy ani zvýšené protilátky jiného izotypu (20). Hodnoty ze séra pacientů obecně neukazují zvýšené hladiny protilátek, ale našly se zvýšené hladiny imunokomplexů IgG protilátek s orexinem A (20; 49).

Nekonzistentnost výsledků popisujících autoprotilátky a málo publikací popisujících autoreaktivní T-lymfocyty u narkoleptických pacientů může být vysvětlena tím, že průměrná doba od prvních projevů narkolepsie po stanovení diagnózy je 14 let, takže stav imunitního systému při výzkumu neodpovídá nastavení systému při rozvoji onemocnění či v blízké době po něm (50). Pro úspěšné vyhodnocení stavu imunitního systému narkoleptických pacientů by bylo vhodné provádět studii se vzorky získanými od nově diagnostikovaných pacientů či dětských pacientů, u kterých ještě neproběhla kompletní destrukce orexinergních neuronů či jsou u nich ještě přítomné autoreaktivní klony

T-lymfocytů a autoprotilátek (20; 40; 48), což je nicméně vzhledem k prevalenci onemocnění poměrně obtížné.

2.2.5 Diagnóza NT1

Narkolepsie je v populaci poddiagnostikovaná, případně často diagnostikována chybně. Pro diagnostiku NT1 musí být splněny tyto podmínky: přítomnost kataplexie, projev EDS po dobu delší než 3 měsíce a hladiny orexinu v likvoru nižší než 110 pg/ml (6). U pacientů se pro správnou diagnostiku dále provádí test mnohočetné latence usnutí (MSLT) a polysomnografie (1; 6). Během MSLT dostane jedinec pět příležitostí usnout na 15 minut. První možnost dostává do 3 hodin od ranního probuzení a dále vždy ve dvouhodinových intervalech. Výsledkem tohoto testu je hodnota průměrné latence usnutí a informace o přítomnosti REM fáze během spánku. Podmínka pro diagnózu NT1 je hodnota průměrné latence usnutí kratší než 8 minut a přítomnost REM spánku alespoň 2x v průběhu testu (1; 51). K doplnění diagnózy se u pacientů provádí stanovení přítomnosti alely HLA-DQB1*06:02. Přítomnost této alely u pacienta není podmínkou pro stanovení diagnózy NT1, nicméně při její nepřítomnosti je velmi pravděpodobné, že se jedná o jiné onemocnění, protože tato alela zvyšuje pravděpodobnost rozvoje narkolepsie až 200x (6).

2.2.6 Terapie NT1

Léčba narkolepsie se dá rozdělit na nelékovou a lékovou. Neléková léčba spočívá ve správné spánkové hygieně (pravidelný noční spánek a plánovaný spánek během dne), dietě s nízkým obsahem sacharidů, pravidelné fyzické aktivitě a behaviorální terapii (52). Léková terapie je pouze symptomatická. Pacienti používají léky, které snižují četnost a závažnost kataplektických atak a EDS. Jako antikataplektické léky se používají léky s γ -hydroxymáselnou kyselinou, která snižuje aktivitu nervových buněk ve svém okolí, přičemž nejčastěji používaný léčebný preparát s touto účinnou látkou je Xyrem (53; 54). Dále se jako antikataplektické léky dají využívat antidepressiva na bázi selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu. Na léčbu EDS se používají hlavně léky Vigil obsahující účinnou látku modafinil, který inhibuje zpětné vychytávání dopaminu, a Ritalin obsahující methylfenidát, což je stimulant podobný amfetaminům, který zvyšuje v těle hladiny dopaminu (53).

2.2.7 Narkolepsie u zvířat

Narkolepsie s kataplexií se vyskytuje u psů, koní, ovcí a krav. Nejčastěji postiženým psím plemenem jsou dobrmani a labradorští retrívři. U psů pozorujeme dvě formy narkolepsie, a to dědičnou a sporadickou. Dědičná narkolepsie se od sporadické liší zejména v tíži symptomů, které jsou závažnější u sporadické formy, protože je spojena přímo s úbytkem orexinu v likvoru. Nicméně příčina jejího

vzniku není ještě objasněna. U dědičné formy byla nalezena mutace v genu HCRT2, který kóduje OX2R. Dědičnost je zde autozomálně recesivní s úplnou penetrací (55; 56).

Dva nejčastěji používané myší modely pro studium narkolepsie jsou orexin knockoutované myši, které mají narušený gen pro prepro-orexin a orexin/ataxin-3 myši, u kterých se postnatálně indukuje selektivní destrukce orexinových neuronů. Oba myší modely vykazují symptomy narkolepsie podobné těm u lidí. U myšího modelu, kde chybí celé orexinové neurony, lze navíc pozorovat také nástup obezity (57).

2.3 Střevní mikrobiom

Mikrobiom označuje soubor genů všech mikroorganismů nacházejících se v daném prostředí. V lidském těle se nachází 100-150x více mikrobiálních než lidských genů. Složení mikrobiomu se liší v různých anatomických oblastech a je relativně stabilní na vyšších taxonomických úrovních. Střevní mikrobiota se skládá z bakterií, archeí, hub, virů a dalších mikroorganismů (58). V lidském těle se nachází přibližně 10^{14} bakteriálních buněk. Složení lidské mikrobioty se skládá převážně z šesti bakteriálních kmenů, z nichž jsou nejvíce dominantní kmeny Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria a Actinobacteria. Ostatní bakteriální kmeny u lidí tvoří méně než 0,01 % z celkového složení mikrobiomu (58; 59). Nejvíce mikroorganismů osidluje oblast trávicího traktu, přičemž složení mikrobiomu se v různých částech trávicí trubice liší. Nejvyšší počet bakterií a současně největší bakteriální diverzita v lidském těle se nachází v tlustém střevě, kde je až 1000 různých bakteriálních druhů (60; 61), které jsou převážně anaerobní a až 80 % z těchto bakterií jsou běžnými prostředky nekultivovatelné (62).

Složení střevního mikrobiomu je významně ovlivněno způsobem porodu a stravováním novorozence. Během vaginálního porodu dochází k inokulaci novorozence vaginální mikrobiotou, která se výrazně liší od složení kožní mikrobioty, se kterou se dostává do styku novorozenec během císařského řezu. Novorozenci, kteří jsou narozeni vaginální cestou, mají více zastoupené kmeny Bacteroidetes než Firmicutes oproti novorozencům narozeným císařským řezem (60; 63). Mateřské mléko obsahuje mimo jiné složky mikrobioty a nestravitelné oligosacharidy, které ve střevě působí jako prebiotikum podporující růst prospěšných bakterií, jako je například rod *Bifidobacterium*. Složení mikrobiomu se ustaluje okolo třetího roku života, ale je dále ovlivňováno složením stravy, užíváním antibiotik a jiné medikace, stresem, pohlavními hormony, zeměpisnými podmínkami a stárnutím (58; 60).

Mikrobiota se podílí na mnoha fyziologických procesech, mimo jiné ovlivňuje vývoj imunitního systému, imunitní reakce v hostiteli a chrání hostitelský organismus před patogenními mikroorganismy díky kompetici o prostor a živiny (60; 62). Střevní mikrobiota také napomáhá trávení a

ovlivňuje metabolismus hostitele. Některé bakterie například dokáží ve střevě fermentovat nestraavitelné polysacharidy, ze kterých vznikají mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), mezi něž patří acetát, propionát a butyrát. Tyto mastné kyseliny představují významný energetický zdroj pro kolonocyty a střevní bakterie, podílejí se na udržování střevní bariéry, stimulují maturaci protizánětlivých imunitních buněk, účastní se glukoneogeneze v játrech a metabolismu cholesterolu a hrají roli v regulaci chuti k jídlu (64; 65). Střevní mikrobiota se také účastní zpracování žlučových kyselin, při kterém vznikají nekonjugované a sekundární žlučové kyseliny a podílí se na výrobě vitaminů K, B2 (riboflavin), B9 (kyselina listová) a B12 (kobalamin) (60; 62). Střevní mikrobiota dokáže *de novo* syntetizovat esenciální aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, mezi které patří leucin, izoleucin a valin (65). Mikrobiálním rozkladem složek potravy, jakými jsou cholin, lecitin a karnitin vznikají trimethylaminy, které jsou asociované s prospěšnými, ale i negativními účinky na zdraví hostitele (66).

Dysbióza mikrobioty, neboli mikrobiální nerovnováha, je charakterizovaná sníženou mikrobiální diverzitou, sníženým zastoupením komenzálních a prospěšných bakterií a nárůstem patobioantů. Dysbióza vede ke změně produkce důležitých mikrobiálních produktů účastnících se biologických reakcí hostitelského organismu (67). Dysbióza mikrobioty je asociovaná s různými onemocněními, jako jsou idiopatické střevní záněty, metabolický syndrom, obezita, alergie a také s revmatoidní artritidou, diabetem 1. typu nebo roztroušenou sklerózou. Přesný vztah mezi mikrobiomem a autoimunitními onemocněními ještě nebyl zcela objasněn, ale zdá se, že mikrobiota narušuje imunitní toleranci účinkem molekulárních mimiker, bystander efektu a šířením epitopů (68).

2.4 Osa mikrobiom-střevo-mozek

Střevní mikrobiom je součástí obousměrné osy mikrobiom-střevo-mozek. Komunikace mezi střevní mikrobiotou a centrální nervovou soustavou (CNS) je zprostředkována signalizací v rámci bloudivého nervu, enterického a autonomního nervového systému, dále neuroendokrinním systémem, imunitním systémem, osou hypotalamus-hypofýza-nadledviny (HPA) a různými metabolickými drahami (69). Střevo je silně inervované enterickým nervovým systémem a bloudivým nervem, což je desátý hlavový nerv vycházející z mozkového kmene, který inervuje krční, hrudní a břišní dutinu (70). Nervovou signalizaci ovlivňuje střevní mikrobiota produkcí různých neuroaktivních látek, jakými mohou být například neurotransmitery serotonin, dopamin, noradrenalin a kyselina γ -aminomáselná či různé neurohormony a neuropeptidy. Většina z těchto neuroaktivních látek zůstává v prostředí střeva a ovlivňuje signalizaci nervů lokálně (66; 69; 70). Kromě přímé produkce neurotransmiterů dokáže střevní mikrobiota signalizací například přes Toll-like receptory stimulovat produkci těchto látek také epiteliálními, nervovými a imunitními buňkami (71). Některé mikrobiální

metabolity (např. SCFA) volně přechází přes HEB do mozku, kde ovlivňují neurologické funkce, propustnost této bariéry, slouží jako energetický zdroj pro buňky, podílejí se na maturaci mikroglíí a ovlivňují jejich cytokinový profil (72).

Endokrinní a neuroendokrinní komunikace v rámci osy mikrobiom-střevo-mozek je zprostředkovaná z velké části enteroendokrinními buňkami. Ty exprimují receptory spřažené s G proteiny vázající mimo jiné bakteriální metabolity, přičemž spouští signální dráhy vedoucí k produkci a sekreci peptidových hormonů a neuropeptidů, které ovlivňují řadu fyziologických procesů. Tyto látky regulují zejména motilitu střeva, absorpci a sekreci látek a ovlivňují homeostázu glukózy a chuť k jídlu. Takto vzniklé neuropeptidy a neurohormony stimulují enterické nervy a bloudivý nerv a také vstupují do periferní cirkulace, kde mohou aktivovat nervy inervující portální žílu. Některé z těchto neuroaktivních látek mohou dokonce z periferní cirkulace přecházet přes HEB do mozku (66; 73; 74). Některé enteroendokrinní buňky se chovají jako neuropody, což jsou buňky, které vytvářejí synapse s místními nervy a vytvářejí tím neuroepiteliální jednotky, které mohou přenášet chemické a elektrické signály přímo v reakci na vazbu metabolitu (75).

Střevní mikrobiota ovlivňuje integritu střevní bariéry a významně se podílí na vývoji, maturaci a aktivaci periferního imunitního systému (66). Intaktnost střevní bariéry může být narušena probíhající infekcí, dysbiózou mikrobioty, fyzikálním poškozením a s věkem spojenou destrukcí (76). Při narušení střevní bariéry se do periferní cirkulace mohou dostávat bakterie, jejich metabolity a toxiny, čímž se spouští prozánětlivá imunitní odpověď. Pokud tento stav přetrvává delší dobu, může docházet ke zvýšení hladin prozánětlivých cytokinů v séru, které mohou indukovat zvýšenou propustnost HEB a zpřístupňovat mozek různým toxinům a jiným mikrobiálními produkty (77). V mozku následně dochází k aktivaci mikroglíí a extravazaci periferních imunitních buněk, čímž se podporuje zánětlivý proces a může docházet k poškození CNS. Stimulace imunitních buněk mikrobiálními produkty, porucha intaktnosti střevní bariéry a infekce mohou tedy hrát významnou roli při iniciaci autoimunitních neurodegenerativních onemocnění (66). Modulace střevní mikrobioty pomocí probiotik, prebiotik či transplantace stolice u pacientů s neurodegenerativním onemocněním by mohla mít prospěšné účinky na zmírnění progresu a symptomů těchto onemocnění (70).

2.4.1 Mikrobiom a spánek

Spánek je ovlivňován mnoha faktory, jakými jsou cirkadiánní rytmy, stres, věk, propustnost střeva, zažívání, dieta, bakteriální diverzita, stav imunitního systému a zánětlivé procesy v těle. Složení mikrobioty a množství jednotlivých bakteriálních druhů ve střevě během dne osciluje v závislosti na cirkadiánním rytmu (78). Mikrobiota ovlivňuje délku a kvalitu spánku produkcí serotoninu, SCFA a

dalších bakteriálních metabolitů, kterými působí na bloudivý nerv, imunitní systém, a ovlivňuje propustnost střevní a hematoencefalické bariéry (79). V experimentálním myším modelu bylo zjištěno, že deplecí střevního serotoninu pomocí antibiotické léčby se zvyšuje fragmentace NREM spánku (80). Kromě toho jsou nízké hladiny SCFA asociované se spánkovou fragmentací. Vysoké hladiny propionátu zlepšují kvalitu spánku u novorozenců, butyrát prodlužuje délku NREM spánků u myši (81; 82). Spánková deprivace a fragmentace zvyšuje hladiny zánětlivých cytokinů, produkci reaktivních forem kyslíku imunitními buňkami ve střevě, náchylnost k infekcím a vyúsťuje v metabolické dysfunkce a poruchy HEB (79). Prozánětlivý stav organismu po spánkové deprivaci je pravděpodobně navozený stimulací bloudivého nervu bakteriálními produkty. Důkazem toho je pokus (83), kdy se fekální transplantací mikrobiomu ze spánkem deprivované myši do myši bez spánkové restrikce přenesl i prozánětlivý fenotyp, který vymizel po provedení vagotomie.

Nedostatečně dlouhý spánek a špatná kvalita spánku jsou spojené s různými metabolickými dysfunkcemi, které jsou pravděpodobně regulovány přes osu mikrobiom-střevo-mozek (79). U zvířecích modelů bylo například zjištěno, že spánková fragmentace vede ke zvýšení denního příjmu potravy, k hromadění tukové tkáně okolo orgánů, ke zvýšení zánětlivých procesů a k inzulínové rezistenci. Chronická restrikce spánku vede k rozrušení energetického metabolismu organismu (84; 85). Úpravou složení střevní mikrobioty užíváním probiotik, zejména přípravků obsahujících bakteriální druhy *Lactobacillus* a *Bifidobacterium*, dochází ke zlepšení kvality spánku (79).

2.4.2 Mikrobiom a regulace chuti k jídlu

Regulace chuti k jídlu a energetického metabolismu je zprostředkována interakcí periferních signálů (hormony, bakteriální metabolity, mediátory stresu) s CNS, zejména s hypotalamem, a také signály generovanými z dopaminergního centra odměn. Z těchto periferních signálů jsou velmi důležité gastrointestinální a tukovou tkání produkované peptidové hormony, mezi které patří ghrelin, insulin, peptid tyrosin tyrosin (PYY) a leptin (86). V hypotalamu, především v obloukovém jádře (nucleus arcuatus), tyto peptidové hormony interagují přímo s neurony produkujícími orexigenní a anorexigenní neuropeptidy či stimulují periferní nervy, které vysílají signály o hladu, nasycení a o úschově energie do mozku. Obloukové jádro, lokalizované na spodině hypotalamu, je důležité pro regulaci chuti k jídlu, protože není kompletně odděleno od periferní cirkulace pomocí HEB, a tudíž s ním mohou interagovat látky s relativně velkou molekulovou hmotností, jako jsou cirkulující hormony a živiny, které by nemohly působit v jiných místech CNS (87). Mezi orexigenní neuropeptidy patří neuropeptid Y (NPY), MCH, orexiny a agouti-signální protein. Mezi anorexigenní neuropeptidy patří α -MSH, oxytocin, vasopresin a hormon uvolňující kortikotropin. Kromě regulace chuti k jídlu tyto orexigenní a anorexigenní neuropeptidy regulují i stres, spánek a bdění, chování a emoce jedince

(86). Střevní mikrobiota se produkcí různých metabolitů podílí na regulaci energetické homeostázy, tělesné hmotnosti a chuti k jídlu. Bakteriální metabolity vzniklé procesem fermentace zbytků potravy mohou například stimulovat enteroendokrinní buňky k produkci orexigenních a anorexigenních hormonů. V posledních letech se objevují studie popisující nález autoprotilátek proti hormonům regulujícím chuť k jídlu u pacientů s poruchami příjmu potravy. Možný vznik těchto autoprotilátek je díky reakci imunitního systému se střevními antigeny, tedy díky účinkům molekulárních mimiker (88). V těchto studiích byly takovéto protilátky nalezeny i u zdravých kontrol, což naznačuje možný význam těchto protilátek například v úpravě hormonů k jejich lepší funkci. Nicméně tvorba autoprotilátek je běžně spojená s autoimunitními chorobami, a tudíž jejich přítomnost u zdravých kontrol musí být blíže prozkoumaná (89).

3 Cíl práce

NT1 je velmi pravděpodobně autoimunitní onemocnění, při jehož patogenезi a vývoji symptomů potenciálně hraje roli střevní mikrobiom. Cílem této práce bylo blíže objasnit roli střevního mikrobiomu a autoimunitních mechanismů u pacientů trpících NT1 pomocí porovnání:

- složení bakteriálního zastoupení ve střevech pacientů a zdravých kontrol využitím sekvenování nové generace a kvantitativní PCR
- hladin autoprotilátek proti vybraným neuropeptidům ze séra pacientů a zdravých kontrol detekovaných metodou ELISA
- hladin vybraných sérových cytokinů pacientů a zdravých kontrol pomocí multiplexové analýzy
- intaktnosti střevní a hematoencefalické bariéry pacientů a zdravých kontrol detekcí sérových markerů metodou ELISA

4 Metodika

4.1 Získání a zpracování vzorků

4.1.1 Odběr, zpracování a uskladnění vzorků krve

Vzorky krve použité v této práci byly získány od pacientů s NT1 a zdravých kontrol ve spolupráci s Neurologickou klinikou 1. lékařské fakulty a Všeobecné fakultní nemocnice v Praze a Národním ústavem duševního zdraví v Klecanech. Vzorky krve pro separaci séra byly odebrány do odběrových zkumavek značky BD Vacutainer®SST™, které obsahují oxid křemičitý a polymerní gel pro lepší separaci séra. Vzorky krve pro separaci plazmy byly odebrány do zkumavek stejné značky vhodných na separaci plazmy obsahující heparin. Ze vzorků krve byla oddělena plazma a sérum pomocí centrifugace při 1200 x g (plazma) nebo 1600 x g (sérum) po dobu 10 minut. Vzorky séra i plazmy byly rozpipetovány na alikvóty po 200 µl a uskladněny při teplotě -80 °C.

4.1.2 Odběr, izolace DNA a uskladnění vzorků stolice

Pacienti a zdravé kontroly odebrali vzorek stolice do odběrových zkumavek značky Sarstedt s 5 ml roztoku DNA/RNA Shield™ (ZymoResearch, USA) stabilizujícím DNA. Vzorky stolice byly uchovány do doby izolace DNA v chladničce při teplotě 4 °C. Ze vzorků byla izolována celková DNA pomocí ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep kitu (ZymoResearch, USA) podle komerčního protokolu. Kvalita a koncentrace DNA ze stolice byla stanovena pomocí přístroje NanoDrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, USA) podle návodu výrobce přístroje. Izolovaná DNA byla uchována v mrazničce při teplotě -20 °C.

4.2 Polymerázová řetězová reakce a DNA elektroforéza

Pro kontrolu kvality izolátů DNA byla použita metoda PCR, při které se DNA amplifikovala pomocí degenerovaných univerzálních primerů vázajících konzervovaný úsek bakteriálního 16S rRNA (Tabulka 1) a následně byla provedena agarózová elektroforéza. DNA izoláty se amplifikovaly pomocí PPP master mixu (Top Bio, ČR), který obsahuje Taq polymerázu, reakční pufr a také barviva a aditiva, která umožní po amplifikaci následné nanesení vzorku na gel bez nutnosti přidávat vkládací pufr. Ke 12,5 µl PPP mixu je pro amplifikaci DNA nutno přidat po 1 µl předních (tzv. forward, F) a zadních (tzv. revers, R) primerů ohraničujících amplifikovanou oblast, 1 µl vlastní DNA a 9,5 µl deionizované vody. Po amplifikaci DNA byly vzorky naneseny na 1% agarózový gel a byla provedena elektroforéza

při 300 mA po dobu 40 minut. Velikosti výsledných bandů jednotlivých vzorků byly porovnány s DNA markerem.

4.3 Kvantitativní PCR

Z izolátů DNA byla provedena kvantitativní PCR (dále jen qPCR) pomocí přístroje CFX96 Touch Real-Time Detection System (BioRad) pro kvantifikaci vybraných bakteriálních druhů (*Prevotella spp.*, *Akkermansia muciniphila*, *Flavonifractor plautii*), archea *Methanobrevibacter smithii* a celkového počtu bakterií ve 40 ng DNA. Pro amplifikaci byl použit gbSG PCR Master Mix (Generi biotech, ČR) obsahující SybrGreen. Ke 12 µl master mixu je nutno přidat 1 µl F a R primerů, 9,5 µl deionizované vody a 1 µl (40 ng) vzorku DNA izolovaného ze stolice. Pro stanovení zastoupení jednotlivých druhů bakterií byly použity odlišné sady primerů (Tabulka 1). Nastavení qPCR bylo pro všechny použité primery podobné s výjimkou degenerovaných univerzálních primerů, které je uvedeno samostatně (Tabulka 2). Pro ostatní sady primerů bylo nastavení qPCR následovné: počáteční fáze (94 °C, 10 min), fáze denaturace (94 °C, 10 s), fáze nasedání primerů (58 °C nebo 60 °C v případě *F. plautii*, 25 s), fáze syntézy DNA (72 °C, 35 s). Fáze denaturace, nasedání primerů a syntéza DNA se opakovaly ve 40 cyklech. Po proběhlé qPCR reakci se postupně zvyšuje teplota produktů z 55 °C na 95 °C. Tímto zjistíme tzv. křivku tání, ze které můžeme určit specifitu produktů. Pro zpracování dat byl využit program Bio-Rad CFX Manager. Pro kvantifikaci vzorků byly využity standardní křivky pro jednotlivé bakterie na základě DNA o známé koncentraci.

Tabulka 1 – Sekvence F a R primerů použitých pro kvantifikaci jednotlivých druhů bakterií, archea a celkového počtu bakterií.

Druh bakterie	Sekvence F a R primerů	Velikost produktu po amplifikaci
<i>Prevotella spp.</i>	F: 5´-CAGTTCGGACTGGGGTCTGC-3´ R: 5´-TTCAGGCACCCCCGGCTTTC-3´	138bp
<i>Akkermansia muciniphila</i>	F: 5´- CAGCACGTGAAGGTGGGGAC -3´ R: 5´- CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT -3´	329bp
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	F: 5´- CCGGGTATCTAATCCGGTTC -3´ R: 5´- CTCCCAGGGTAGAGGTGAAA -3´	123bp

Flavonifractor plautii	F: 5'-GAGTTACCTAGTGGCGGACG-3'	386bp
	R: 5'-TCGTCGGGTACCGTCATTTG-3'	
Celkový počet bakterií	F: 5'-CNACGCGAAGAACCTTANC-3'	79bp
	F: 5'-ATACGCGARGAACCTTACC-3'	
	F: 5'-CTAACCGANGAACCTYACC-3'	
	F: 5'-CAACGCGMARAACCTTACC-3'	
	R: 5'-CGACRRCCATGCANACCT-3'	

Pro zjištění celkového počtu bakterií byly použity degenerované primery obsahující variabilní místa, na která se mohou vázat různé báze. Primery byly připraveny smícháním čtyř různých F primerů a jednoho R primeru v poměru 1:1.

Tabulka 2 – Nastavení qPCR pro použití degenerovaných primerů.

Počáteční denaturace	95 °C	3 minuty	
Denaturace	95 °C	3 sekundy	← 40x
Nasedání primerů a syntéza DNA	64 °C	30 sekund	

4.4 Kontrola primerů

Před samotnou kvantifikací byla provedena kontrola specifity primerů pro jednotlivé bakteriální druhy. Tato kontrola proběhla pomocí TOPO® TA Cloning® kitu, který obsahuje pCR4-TOPO TA plazmidový vektor vybavený topoizomerázou kovalentně vázanou k tomuto vektoru a 2 volnými thyminovými bazemi, na které se může navázat nasyntetizovaný produkt vytvořený amplifikací DNA pomocí kontrolovaných primerů. Plazmidový vektor s navázaným produktem se vloží do speciální bakterie *Escherichia coli* (E. cloni® 10G Chemically Competent Cells; Lucigen, USA). Množením těchto buněk se množí i plazmidy, které byly následně izolovány pomocí PureLink™ Quick Plasmid Miniprep kitu (ThermoFisher Scientific, USA) a sekvenovány. Získanou sekvenci jsme porovnali s databázemi pomocí algoritmu Blast.

4.5 Sekvenování nové generace

Celková DNA získaná ze vzorků stolice byla použita pro vysoce výkonné sekvenování (HTS, platforma MiSeq, Illumina) bakteriální oblasti V3-V4 genu 16S rRNA. Kromě DNA byly pro kontrolu kvality sekvenovány standardy mikrobiální komunity (obsahující definovanou směs bakterií, ze které je DNA izolovaná stejně jako ze vzorků stolice) a DNA standardy mikrobiální komunity (obsahující definované koncentrace DNA konkrétních bakterií; Zymoresearch, USA). Pro kontrolu čistoty izolačního kitu byl k sekvenaci přidán vzorek vody a vzorek roztoku DNA/RNA Shield™, které prošly izolačním kitem použitým pro izolaci DNA ze vzorků stolice. Pro sekvenaci byly amplifikací DNA za použití PCR HiFi HotStart Ready mixu (Roche, Švýcarsko) a specifických degenerovaných primerů označených čárovými kódy (341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' a 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') vytvořeny dvě amplikonové knihovny. PCR reakce proběhla v 25 cyklech. Amplifikace byla provedena pro každý vzorek třikrát. Triplikáty byly spojeny do jedné jamky, normalizovány pomocí SequaIPrep™ Normalization Plate kitu (ThermoFisher Scientific, USA) a následně byly všechny vzorky spojeny do jedné zkumavky a koncentrovány na koncentrátoru 5301 (Eppendorf, Německo) po dobu přibližně 3 hodin při 30 °C ve vakuu. Knihovny byly potom purifikovány pomocí DNA Clean & Concentrator kitu (Zymoresearch, USA) a ligovány se sekvenačními adaptéry (TruSeq DNA PCR-free LT Sample Preparation Kit, Illumina, USA) za použití KAPA HyperPlus kitu (Roche, Švýcarsko). Koncentrace knihoven s ligovanými adaptéry byla validována pomocí KAPA Library Quantification kitu (Illumina, USA). Výsledné knihovny byly odeslány na vlastní sekvenaci, která proběhla na přístroji Illumina MiSeq s použitím MiSeq Reagent v3 kitu (Illumina, USA) v Centrální genomické laboratoři v CEITEC v Brně.

4.6 Bioinformatická analýza střevního mikrobiomu

Analýza sekvenačních dat byla provedena pomocí programu SEED v2.0. V prvním kroku analýzy byla data získaná ze sekvenace obou amplikonových knihoven spojena do jednoho souboru a proběhlo odstranění sekvencí s nízkou kvalitou. Dále byly odstraněny sekvence delší než 350 bp a kratší než 200 bp, které nemají bakteriální původ. Následně proběhlo spojování sekvencí na základě shodných čárových kódů a unikátní sekvence nukleotidů komplementární k sekvenci použitých primerů. Sekvence byly přejmenovány a sdruženy s dalšími podobnými sekvencemi do klastrů neboli operačních taxonomických jednotek (OTU). Jednotlivé klastry byly porovnány s offline databází, čímž se k danému klastru přiřadil konkrétní bakteriální druh. Z dat byly odstraněny singletony, tedy klastry nacházející se pouze v jednom vzorku a byla vytvořena OTU tabulka.

4.7 Detekce autoprotilátek proti vybraným peptidům

Detekovali jsme autoprotilátky proti vybraným neuropeptidům (α -MSH, MCH, NEI, Orexin A, Orexin B, NPY) a střevnímu peptidu PYY ve třech izotypech (IgG, IgA, IgM). Hladiny sérových autoprotilátek byly stanoveny pomocí in-house metody ELISA. Všechny peptidy (Bachem AG, Švýcarsko) použité při detekci autoprotilátek byly skladovány v alikvótách v mrazničce při -80°C . Pro detekci autoprotilátek bylo použito stejné schéma detekce, přičemž se lišilo pouze ředění séra (Tabulka 3). Séra byla ředěna v 2% roztoku rybí želatiny s PBS.

Tabulka 3 – Ředění séra pro detekci autoprotilátek proti konkrétním peptidům.

	IgG	IgA	IgM
α-MSH*	1:50-1:400	1:50-1:400	1:50-1:400
MCH	1:50-1:100	1:25-1:50	1:25-1:50
NEI*	1:50	1:25	1:25
Orexin A	1:50-1:100	1:25-1:50	1:25-1:50
Orexin B	1:50-1:100	1:25-1:50	1:25-1:50
NPY	1:50	1:25	1:25
PYY	1:50	1:25	1:25

*séra, která vykazovala pozitivitu i při ředění 1:400 (v případě α MSH) či 1:100 (v případě NEI), byla přeměřena při ředění 1:100/1:400-1:3200

V prvním kroku byla 96-ti jamková destička (Nunc Immunoplate Maxisorp, Thermo Scientific, USA) potažena roztokem 2 $\mu\text{g/ml}$ peptidu (α -MSH, MCH, NEI, Orexin A, Orexin B, NPY nebo PYY) rozpuštěného v potahovacím pufru (0,5 M Na_2CO_3 , 0,5 M NaHCO_3 , pH 9,6) v objemu 100 μl /jamka a byla inkubována po dobu 24 h při 4°C . Po inkubaci byly destičky 3x promyty v PBS roztoku s 0,05% Tween (Sigma-Aldrich, USA) na automatické promývačce (Autobio, Čína). Po promytí byly destičky zablokovány 2% roztokem rybí želatiny v PBS v objemu 100 μl /jamka (Sigma-Aldrich, USA) a inkubovány 24 h při 4°C .

Po inkubaci byly destičky znovu promyty stejným způsobem a následně bylo přidáno sérum v různém ředění podle použitého peptidu v objemu 100 μl /jamka a následovala další inkubace po dobu 2 h při pokojové teplotě. Destičky byly znovu promyty a byly přidány kozí peroxidázou-konjugované protilátky proti lidským protilátkám Anti-Human Serum IgG (ředěno 1:8000 v 2% rybí želatině, protilátka namířená proti Fc γ fragmentu, Jackson Immuno Research, USA), Anti-Human Serum IgA (ředěno 1:8000 v 2% rybí želatině, namířená proti α řetězci protilátky, Jackson Immuno Research, USA) nebo Anti-Human Serum IgM (ředěno 1:4000 v 2% rybí želatině, namířená proti Fc $_{5\mu}$

řetězci protilátky, Jackson Immuno Research, USA) v objemu 50 μ l/jamka. Destičky se následně nechaly inkubovat ve tmě po dobu 2 h při pokojové teplotě.

Po inkubaci byly destičky znovu promyty a byl přidán substrát (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine TMB; Sigma-Aldrich, USA) v objemu 50 μ l/jamka. Destičky se takto nechaly inkubovat po dobu 20 min ve tmě při pokojové teplotě. Reakce substrátu s protilátkou byla zastavena pomocí 2M H_2SO_4 roztoku v objemu 50 μ l/jamka. Optická hustota vzorků byla stanovena pomocí spektrometru (Multiskan Ascent Plate Reader, MTX Lab Systems, USA) při 450 a 650 nm. Po naměření byl od hodnot optické hustoty vzorků odečten slepý vzorek (tj. vzorek bez přidaného séra). Vzorky byly analyzovány v duplikátech a každá třetí jamka na desce nebyla potažena peptidem. Hodnoty optické hustoty těchto nepotažených jamek se následně odečetly od jamek potažených. Odečtením těchto nepotažených jamek můžeme od vzorku odečíst tzv. hluk pozadí, což je jev charakteristický pro lidské sérum, který může způsobovat naměření falešně pozitivních výsledků, a to kvůli tomu, že lidské sérum obsahuje velké množství imunokomplexů, na které se může vázat sekundární protilátka. Směrodatná odchylka mezi duplikáty nepřevyšovala hodnotu 0,1. Výsledky jsou udávány jako titry protilátek.

Při optimalizaci metody byla provedena inhibiční ELISA, která pomůže odhalit, jestli jsou protilátky ze séra specifické pro daný peptid. Při inhibiční metodě ELISA se před přidáním séra na destičku sérum inkubuje se zvyšující se koncentrací peptidu. Pro dokázání specifity protilátek proti danému peptidu musejí výsledky inhibiční metody ELISA ukazovat, že s narůstající koncentrací peptidu přidaného k séru se snižuje optická hustota vzorku. Inhibiční ELISA byla provedena pro odhalení specifity protilátek proti peptidům α MSH a NEI.

4.8 Detekce intaktnosti biologických bariér

Intaktnost střevní bariéry jsme detekovali pomocí metody ELISA. Touto metodou jsme stanovovali koncentraci střevního proteinu vázajícího mastné kyseliny (I-FABP) ze séra pacientů a zdravých kontrol. K analýze jsme využili I-FABP Human ELISA kit (HyCult Biotechnology, Uden, Nizozemsko). Vzorky séra byly analyzovány v duplikátech podle návodu výrobce. Sérum bylo ředěno v poměru 1:5 s komerčním ředícím roztokem. Koncentrace I-FABP byla stanovena pomocí standardní křivky z výsledných hodnot absorbance naměřených spektrometrem (Multiskan Ascent Plate Reader, MTX Lab Systems, USA) při 450 nm.

Intaktnost HEB jsme detekovali pomocí metody ELISA za použití S100B Human ELISA kitu (Abnova, Tchaj-wan). Pomocí tohoto kitu jsme stanovovali koncentraci proteinu B vázajícího vápník z rodiny S100 proteinů (S100B) ze séra pacientů a zdravých kontrol. Vzorky séra byly ředěny v poměru 1:5 s komerčním ředícím roztokem. Koncentrace S100B byla stanovena pomocí standardní

křivky z hodnot výsledných absorbance naměřených spektrometrem (Multiskan Ascent Plate Reader, MTX Lab Systems, USA) při 450 nm.

4.9 Detekce cytokinů

Ze vzorků séra byla stanovena koncentrace vybraných cytokinů (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12 p70, IL-10) pomocí Human High Sensitivity Cytokine Premixed kitu A (R&D systems, USA). Tato metodika využívá magnetické kuličky o velikosti 5,6 μ m, které se liší typem protilátek navázaných na povrchu kuličky. Kuličky se mezi sebou odlišují pomocí spektrálního kódu vytvořeným fluorofory. Po přidání séra ke kuličkám (inkubace 3h) dochází k navázání cytokinu na konkrétní protilátku. Dále jsou k reakci přidány biotinylované protilátky (inkubace 1 h) specifické pro daný cytokin, a nakonec streptavidin PE (inkubace 0,5 h), který se na tyto protilátky váže. Kuličky při měření protékají v nosné tekutině mezi dvěma spektrálně odlišnými lasery. První laser excituje fluorescenční barvu kuličky, čímž dochází k rozpoznání specifického typu kuličky, tedy konkrétního detekovaného cytokinu. Druhý laser excituje streptavidin PE, čímž se naměří množství analytu navázaného na danou kuličku. Vzorky séra byly analyzovány v duplikátech podle návodu výrobce použitého kitu. Sérum bylo ředěno v poměru 1:1 s komerčním ředícím roztokem. Koncentrace cytokinů byla stanovena pomocí standardní křivky z výsledných hodnot střední intenzity fluorescence (MFI) naměřených na přístroji Luminex (LABScan3DTM, OneLambda, Thermo Fisher Scientific, USA).

4.10 Statistické zpracování výsledků

Všechna klinická a antropometrická data získaná od skupiny pacientů a zdravých kontrol byla vzájemně porovnána parametrickým t-testem kromě hodnot BMI, věku a hladin triacylglycerolu, které byly porovnány neparametrickým Mann-Whitney testem.

Výsledky zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů a archea detekovaných pomocí qPCR a hladiny autoprotiátek, cytokinů, I-FABP a S100B u kontrol a pacientů byly porovnány neparametrickým Mann-Whitney testem.

Alfa diverzita střevního mikrobiomu pacientů a zdravých kontrol byla stanovena pomocí Chao-1 indexu, Shannon-Weiner indexu a testu stanovující celkový počet OTU. Rozdíly v beta diverzitě střevního mikrobiomu pacientů a zdravých kontrol byly zobrazeny pomocí nemetrického více-rozměrného škálování, při kterém byly použity dvě asociační matice podobnosti, a to Bray-Curtisova a Jaccardova. Beta diverzita střevního mikrobiomu pacientů a kontrol byla dále porovnána pomocí

testu PERMANOVA s Bonferoniho korekcí, využívající opět Bray-Curtisovu a Jaccardovu matici. Detekce potenciálních biomarkerů ze střevního mikrobiomu byla provedena pomocí lineární diskriminační analýzy (linear discriminant analysis effect size; LEfSE).

Korelace uvedené v této práci byly analyzovány pomocí Spearmanova a Pearsonova korelačního testu podle normálního rozdělení. K statistickému zpracování a k vizualizaci dat byly použity programy GraphPad a PAST.

5 Výsledky

5.1 Porovnání skupiny pacientů a kontrol

Skupinu pacientů tvořilo 41 jedinců (13 mužů a 28 žen) trpících NT1. Skupinu zdravých kontrol tvořilo 32 jedinců (12 mužů a 20 žen) z běžné populace. U všech pacientů byla přítomná alela HLA-DQB1*06:02. Většina pacientů užívala více léků zmírňujících symptomy narkolepsie v různé kombinaci. Nejčastěji užívaný léčebný přípravek byl Vigil (21), Anafranil (8), Xyrem (8) a Ritalin (5). Tři pacienti neužívali pravidelně žádné léčebné přípravky. Průměrná doba od stanovení diagnózy u naší skupiny pacientů činí 12 let. Vybrané parametry zdravých kontrol a pacientů trpících narkolepsií byly statisticky porovnány (Tabulka 4).

Tabulka 4 – Porovnávání antropometrických a klinických hodnot NT1 pacientů a zdravých kontrol.

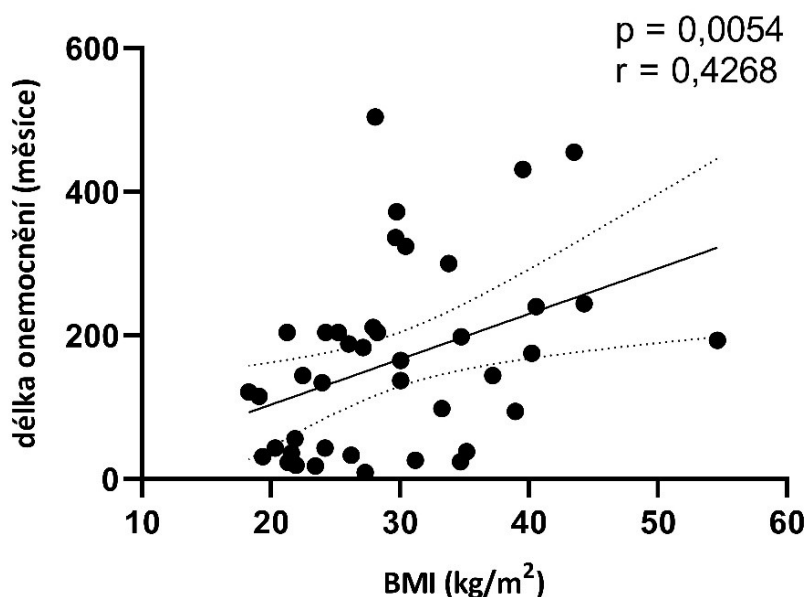
	Kontroly (n=32)	Pacienti (n=41)	p-hodnota	Referenční rozmezí
Věk (roky)	25,5 (21, 35)	32 (23; 46)	*	-
BMI (kg/m²)	24,34 (21,53; 26,46)	28,10 (22,98; 34,75)	**	-
Délka onemocnění (měsíce)	-	144 (40,5; 208,5)	-	-
Celková bílkovina (g/l)	69,50 (67; 71,75)	72 (69,80; 76,30)	**	57-82
Albumin %	57,50 (55,68; 59,28)	60,60 (58,80; 62,90)	***	52-65,1
α1 globulin %	2,3 (2,1; 2,5)	3,7 (3,3; 4,150)	****	1-3
α2 globulin %	10,95 (9,975;12,05)	8,9 (7,5; 10,2)	****	9,5-14,4
β1 globulin %	9,3 (8,45; 9,8)	6 (5,6; 6,65)	****	6-9,8
β2 globulin %	5,45 (4,725; 5,8)	5,4 (4,65; 5,75)	ns	2,6-5,8
γ globulin %	14,75 (12,83; 16,5)	15 (13,80; 16,45)	ns	10,7-20,3
Cholesterol (mmol/l)	4,4 (3,85; 5,15)	4,86 (4,27; 5,54)	ns	2,9-5
Triacylglycerol (mmol/l)	1,21 (0,75; 1,745)	1,43 (1,025; 1,965)	ns	0,45-1,7

Hodnoty byly statisticky porovnány Mann-Whitney testem a uvedeny jako medián s kvartily. *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, ns – nesignifikantní rozdíl.

Pacienti měli oproti zdravým kontrolám zvýšené hodnoty BMI, hladiny celkové bílkoviny, albuminu a α1 globulinů. Snížené hodnoty u pacientů oproti zdravým kontrolám pozorujeme u hladin α2 globulinů a β1 globulinů. Skupina pacientů je oproti skupině kontrol v průměru o 6,5 let

starší, což je dáno hlavně tím, že velká část zdravých kontrol byla rekrutována z řad studentů lékařských fakult.

Hodnoty BMI byly statisticky porovnány a byla zjištěna pozitivní korelace mezi BMI a délkou onemocnění pacientů (Obrázek 2). Hodnoty BMI při korelaci dat můžeme označit jako tzv. zavádějící proměnnou, tedy proměnnou, která sama o sobě může mít vliv na složení mikrobiomu a na tvorbu protilátek a je tedy potřeba v dalších testech tento vliv vždy odlišit.



Obrázek 2 – Korelace BMI s délkou onemocnění. Hodnoty byly statisticky porovnány neparametrickou Spearmanovou korelací.

5.2 Sekvence střevního mikrobiomu

V rámci přípravy sekvenačních knihoven byly přidány kontroly o známém mikrobiálním složení. Složení standardů podle návodu a získaná sekvenační data standardů byly porovnány v Tabulce 5. Teoretické složení četnosti genu 16S rRNA bylo vypočteno z teoretického složení gDNA podle následujícího vzorce: počet kopií 16S = celková gDNA (g) × konstanta konverze jednotek (bp/g) / velikost genomu (bp) × 16S kopií v genomu. Získané procentuální zastoupení genu 16S rRNA konkrétních mikroorganismů bylo vypočteno jako průměr hojnosti daných bakterií z dat přímého i zpětného sekvenování. Zastoupení jednotlivých bakterií v těchto standardech přibližně odpovídala deklarovanému složení s výjimkou zastoupení bakterie *Pseudomonas aeruginosa*, která byla v analyzovaném vzorku přítomna ve větší míře oproti očekávanému výsledku. To lze vysvětlit tím, že standardy poskytují pouze teoretické složení vypočtené z teoretického složení DNA s přihlédnutím k velikosti

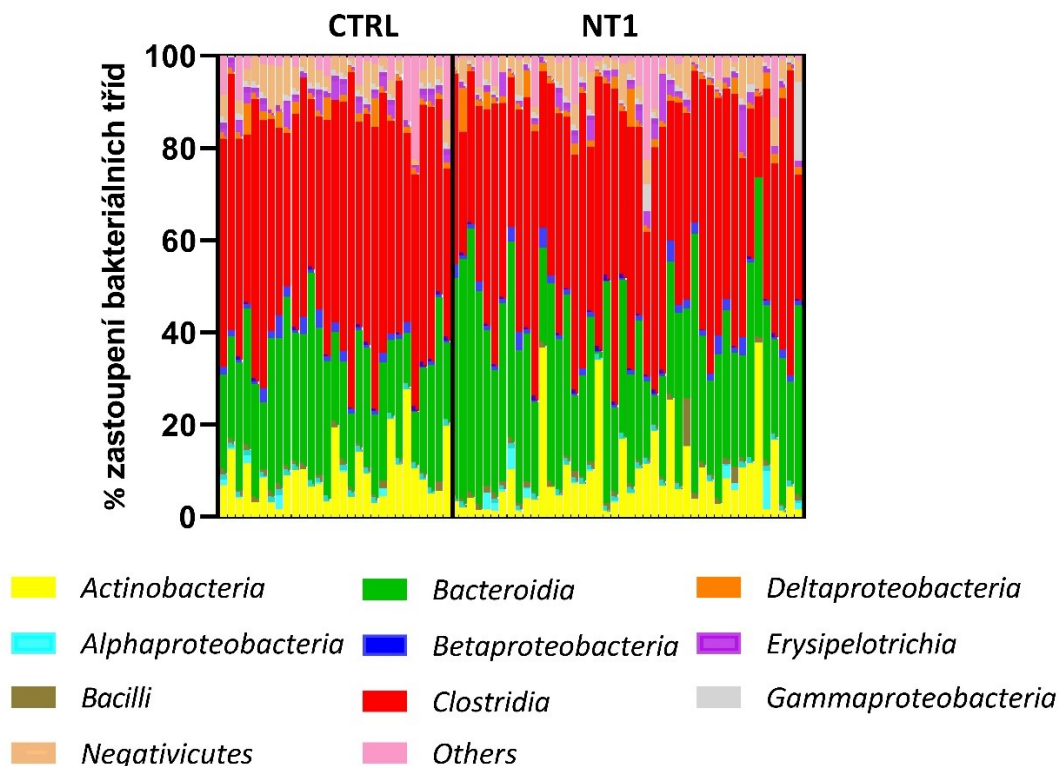
genomu a počtem 16S rRNA kopií. V závislosti na použitém standardu bylo 2,5-4,8 % bakteriálních sekvencí zařazeno do jiné taxonomické třídy nebo nebylo zařazeno vůbec. U kontrolních vzorků vody a roztoku DNA/RNA Shield™ nebyla nalezena žádná bakteriální kontaminace. Bakteriální datový soubor celkem tvořil 3885 OTU reprezentovaných 1.951.930 vysoce kvalitními sekvencemi s průměrnou hloubkou sekvenování 24.901,71 datových výstupů analýzy jednoho vzorku v rozmezí 10.584-76.355 datových výstupů.

Tabulka 5 – Složení mikrobiálních standardů podle návodu v porovnání se získanými sekvenačními daty.

Standardy mikrobiální komunity I	% gDNA	% 16S	% získané 16S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	4,2	6,8
<i>Escherichia coli</i>	12	10,1	13,2
<i>Salmonella enterica</i>	12	10,4	11,6
<i>Lactobacillus fermentum</i>	12	18,4	13,8
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	9,9	9,0
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	15,5	11,4
<i>Listeria monocytogenes</i>	12	14,1	12,7
<i>Bacillus subtilis</i>	12	17,4	16,6
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	/	/
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	/	/
Standardy mikrobiální komunity II	% gDNA	% 16S	% získané 16S
<i>Listeria monocytogenes</i>	89,1	95,9	85,2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,9	2,8	9,2
<i>Bacillus subtilis</i>	0,89	1,2	1,7
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,89	/	/
<i>Escherichia coli</i>	0,089	0,069	0,39
<i>Salmonella enterica</i>	0,089	0,07	0,36
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,0089	0,012	0,007
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,0089	0,00067	0
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,00089	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,00089	0,0001	0
DNA standardy mikrobiální komunity I	% gDNA	% 16S	% získané 16S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12	4,2	7,2
<i>Escherichia coli</i>	12	10,1	12,3
<i>Salmonella enterica</i>	12	10,4	10,7
<i>Lactobacillus fermentum</i>	12	18,4	12,1
<i>Enterococcus faecalis</i>	12	9,9	8,4
<i>Staphylococcus aureus</i>	12	15,5	16,6
<i>Listeria monocytogenes</i>	12	14,1	13,8
<i>Bacillus subtilis</i>	12	17,4	16,3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	/	/
<i>Cryptococcus neoformans</i>	2	/	/

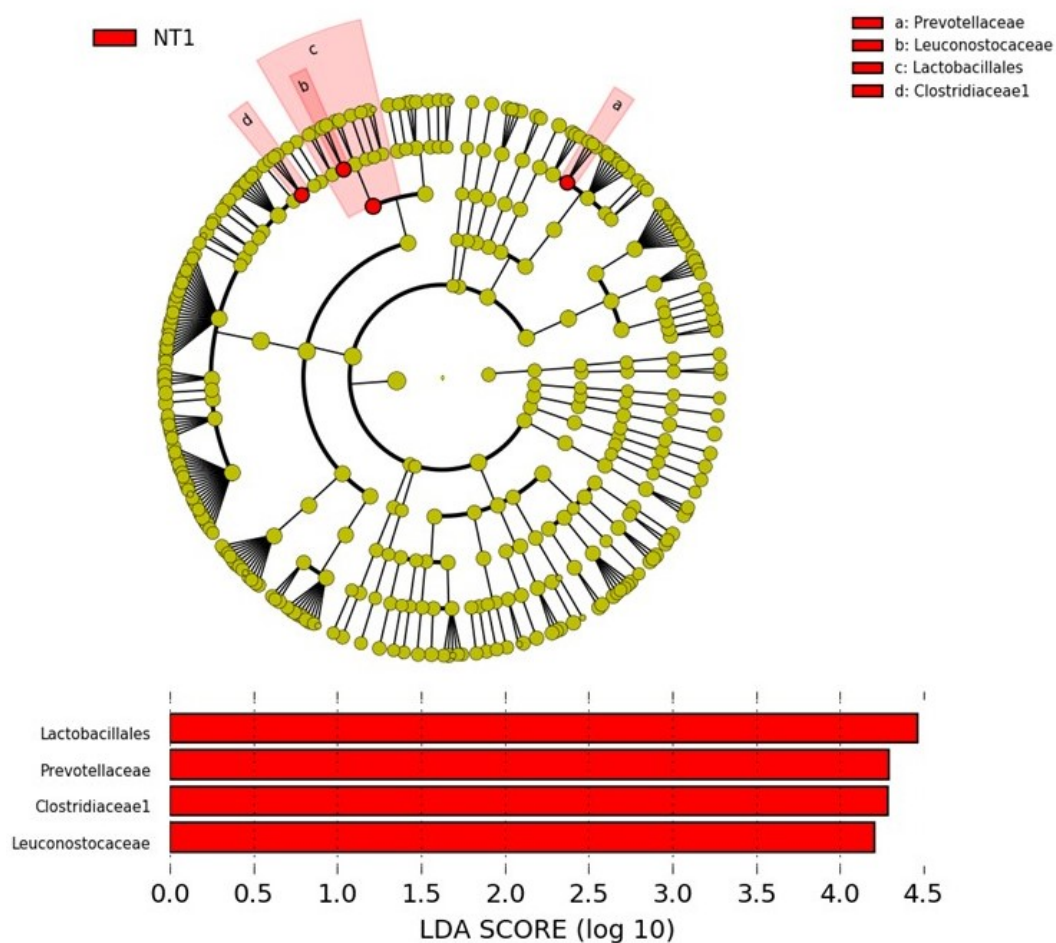
DNA standardy mikrobiální komunity II	% gDNA	% 16S	% získané 16S
<i>Listeria monocytogenes</i>	89,1	95,9	78,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	8,9	2,8	14,8
<i>Bacillus subtilis</i>	0,89	1,2	1,4
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	0,89	/	/
<i>Escherichia coli</i>	0,089	0,069	0,28
<i>Salmonella enterica</i>	0,089	0,07	0,34
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0,0089	0,012	0,35
<i>Enterococcus faecalis</i>	0,0089	0,00067	0,01
<i>Cryptococcus neoformans</i>	0,00089	/	/
<i>Staphylococcus aureus</i>	0,00089	0,0001	0,12

Složení střevního mikrobiomu pacientů se od zdravých kontrol na žádné taxonomické úrovni významně nelišilo. Obrázek 3 zobrazuje zastoupení bakteriálních tříd tvořících více než 1 % z celkového mikrobiomu. U obou skupin byly nejvíce zastoupeny bakteriální třídy *Actinobacteria*, *Bacteroidia* a *Clostridia*. Hladina významnosti statistického testu se pohybovala v rozmezí $p=0,2084-0,9780$.



Obrázek 3 – Procentuální zastoupení bakteriálních tříd ve střevním mikrobiomu pacientů a zdravých kontrol. Jednotlivé bakteriální třídy byly porovnány pomocí neparametrického Mann-Whitney testu. CTRL – skupina zdravých kontrol, NT1 – skupina pacientů.

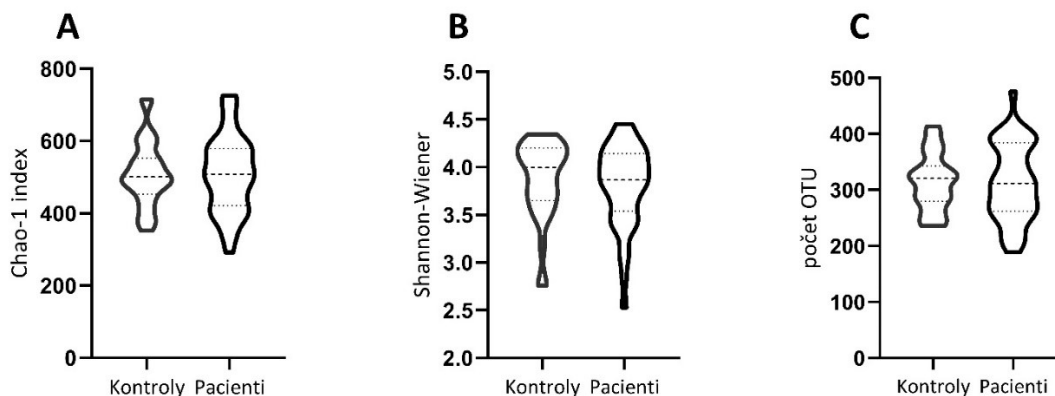
Detekce potenciálních biomarkerů (Obrázek 4) ze střevního mikrobiomu pacientů odhalila zvýšené zastoupení jednoho řádu (*Lactobacillales*) a dvou čeledí kmene Firmicutes (*Leuconostocaceae* a *Clostridiaceae1*) a jedné čeledi kmene Bacteroidetes (*Prevotellaceae*). Bakterie označené jako potenciální biomarkery onemocnění byly v kladogramu vyznačeny jako výřezy a byly barevně a písemně označeny. Graf LDA skóre zobrazuje vybrané bakterie jako potenciální biomarkery onemocnění seřazené podle logaritmického ohodnocení.



Obrázek 4 – Detekce potenciálních biomarkerů ze střevního mikrobiomu pacientů. Červeně jsou označené bakteriální skupiny významně více zastoupené v mikrobiomu pacientů s NT1.

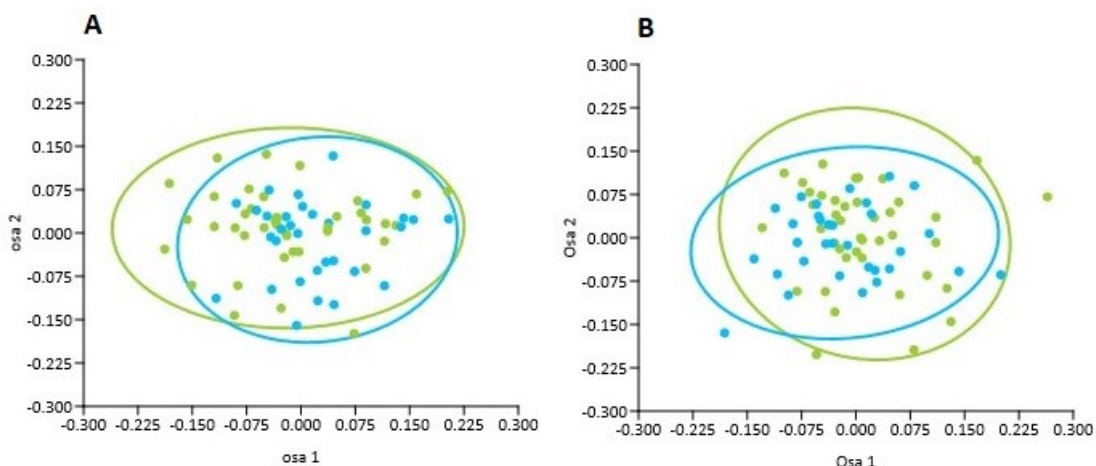
Střevní mikrobiom skupiny pacientů a zdravých kontrol byl porovnán za pomoci indexů alfa a beta diverzity. Alfa diverzita porovnává rozmanitost druhů nalezených v jednotlivých vzorcích dané skupiny. Ke stanovení alfa diverzity byly použity tři statistické testy, které porovnávají alfa diverzitu na základě různých znaků. Test stanovující Chao-1 index porovnává jednotlivé vzorky na základě druhové rozmanitosti a dává větší důraz na přítomnost málo zastoupených bakterií. Test

stanovující Shannon-Weiner index ve vzorcích porovnává typ a četnost bakteriálních druhů. Poslední test stanovuje počet jednotlivých OTU, tedy bakteriálních taxonů ve vzorku. Skupina pacientů se od skupiny kontrol v alfa diverzitě střevního mikrobiomu při použití těchto testů významně nelišila (Obrázek 5). Jednotlivci obou skupin tedy měli přibližně stejné zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů v podobné hojnosti.



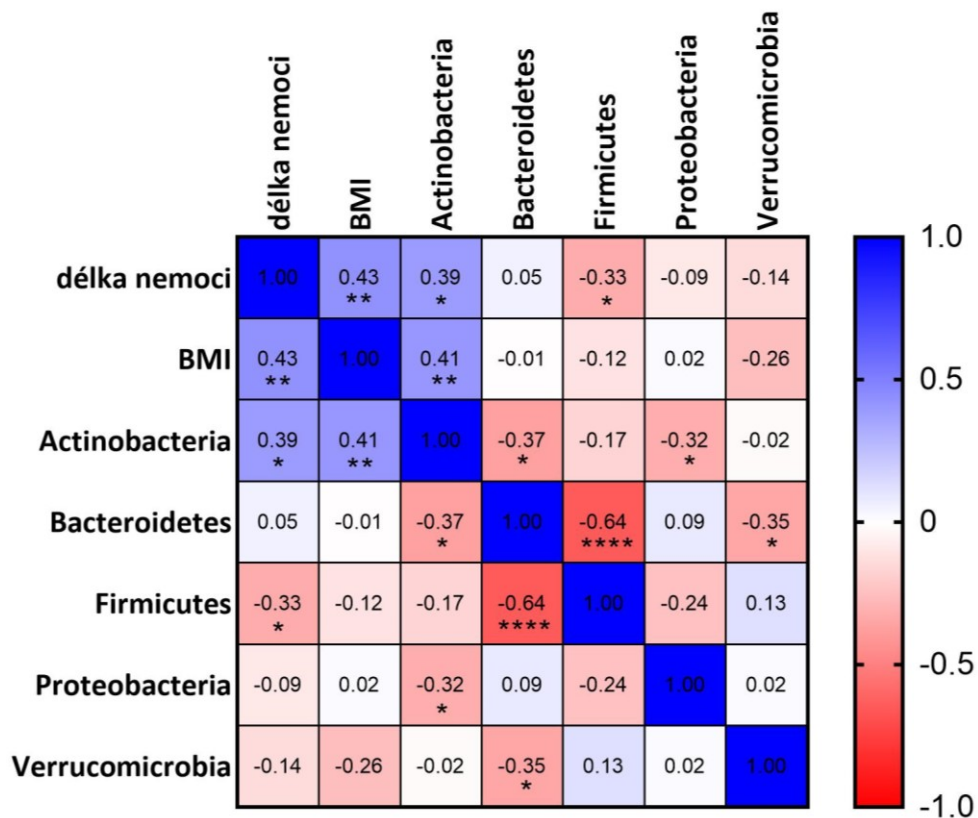
Obrázek 5 – Alfa diverzita střevního mikrobiomu pacientů a zdravých kontrol. A) alfa diverzita stanovená pomocí Chao-1 indexu ($p = 0,9580$), B) Shannon-Wiener indexu ($p = 0,4487$) a C) celkového počtu OTU ($p = 0,9593$). Skupiny byly navzájem porovnány pomocí neparametrického Mann-Whitney testu.

Ze sekvenace střevního mikrobiomu byla dále stanovena beta diverzita, která porovnává odlišnost střevního mikrobiomu celých skupin, tj. zdravých kontrol a pacientů trpících narkolepsií. Beta diverzita střevního mikrobiomu byla porovnáвана pomocí Bray-Curtisova indexu nepodobnosti (Obrázek 6A), který porovnává podobnost skupin na základě hojnosti bakteriálních druhů a Jaccardově indexu nepodobnosti (Obrázek 6B), která porovnává podobnost na základě přítomnosti či nepřítomnosti jednotlivých bakteriálních druhů. Beta diverzita střevního mikrobiomu se ani v jednom z indexů významně nelišila.

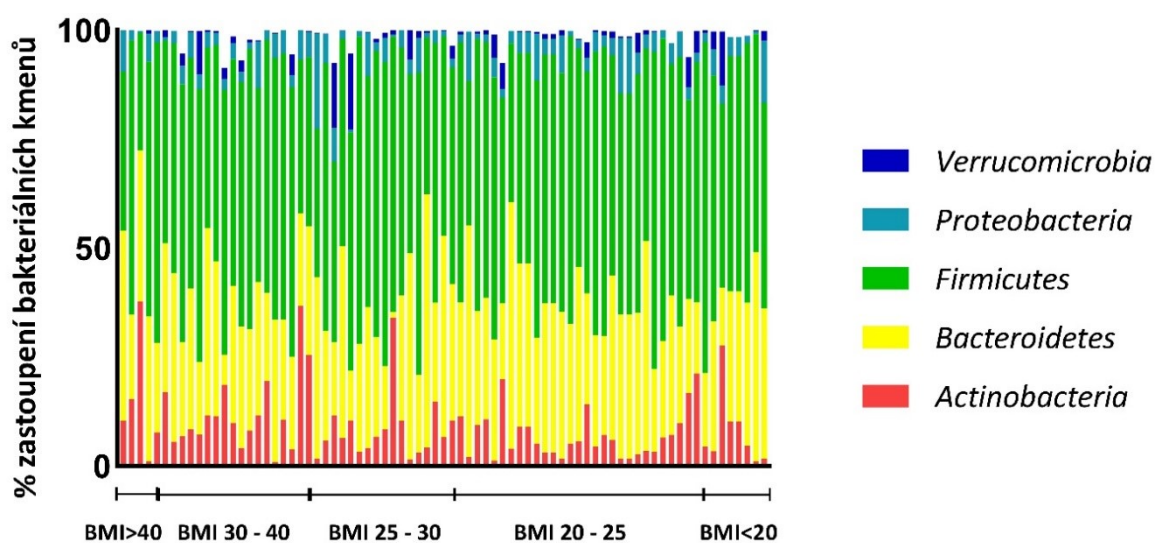


Obrázek 6 – Beta diverzita střevního mikrobiomu pacientů a zdravých kontrol zobrazená vícemětrickým škálováním pomocí A) Bray-Curtisovy a B) Jaccardovy matice. Skupina pacientů (zelená) se od skupiny zdravých kontrol (modrá) v analýze variance Bray-Curtisovy ($p = 0,2135$) a Jaccardovy ($p = 0,2981$) vzdálenosti významně nelišila. Hodnoty byly porovnány pomocí statistického testu PERMANOVA.

Zastoupení jednotlivých bakteriálních kmenů tvořících alespoň 1 % zastoupení ve střevním mikrobiomu bylo u pacientů korelováno s hodnotami BMI a s délkou onemocnění (Obrázek 7). U pacientů byla nalezena pozitivní korelace mezi délkou onemocnění a kmenem Actinobacteria a negativní korelace mezi délkou onemocnění a kmenem Firmicutes. Z těchto výsledků vyplývá, že čím déle pacienti narkolepsií trpí, tím mají více zastoupený kmen Actinobacteria a méně zastoupený kmen Firmicutes ve střevním mikrobiomu. Zastoupení kmene Actinobacteria současně s délkou onemocnění pozitivně koreluje s hodnotami BMI, nicméně nebyla nalezena přímá souvislost mezi zastoupením tohoto kmene a vysokými hodnotami BMI (Obrázek 8). Dále byly nalezeny asociace mezi jednotlivými kmeny: mezi kmenem Actinobacteria a Bacteroidetes, mezi kmenem Actinobacteria a Proteobacteria, mezi kmenem Bacteroidetes a Firmicutes a mezi kmenem Bacteroidetes a Verrucomicrobia.

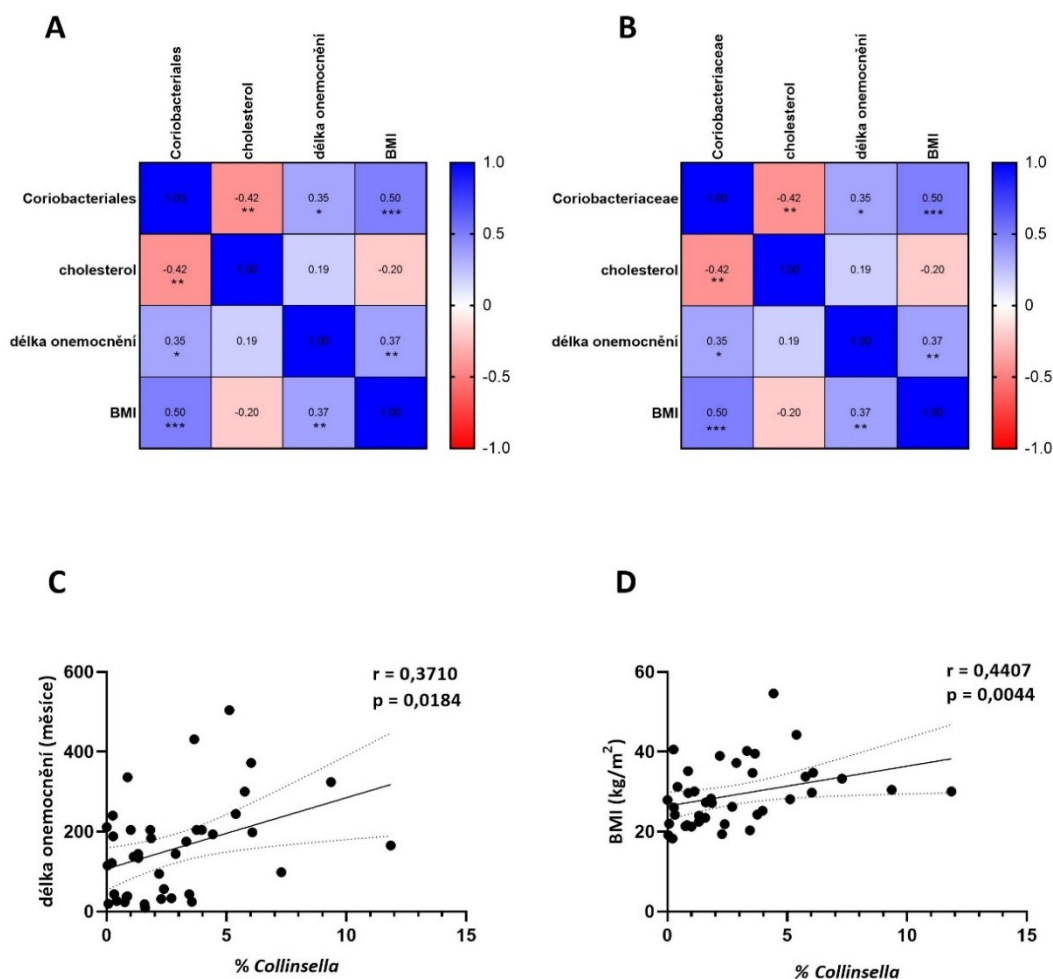


Obrázek 7 – Korelace zastoupení bakteriálních kmenů střevního mikrobiomu pacientů s délkou onemocnění a BMI. Zvyšující se gradient modré barvy značí vyšší pozitivní korelaci. Gradient červené barvy značí negativní korelaci. Hodnoty byly porovnány neparametrickou Spearmanovou korelací. * $p < 0,05$, ** $p < 0,1$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$



Obrázek 8 – Zastoupení bakteriálních kmenů střevního mikrobiomu pacientů a zdravých kontrol v asociaci s BMI.

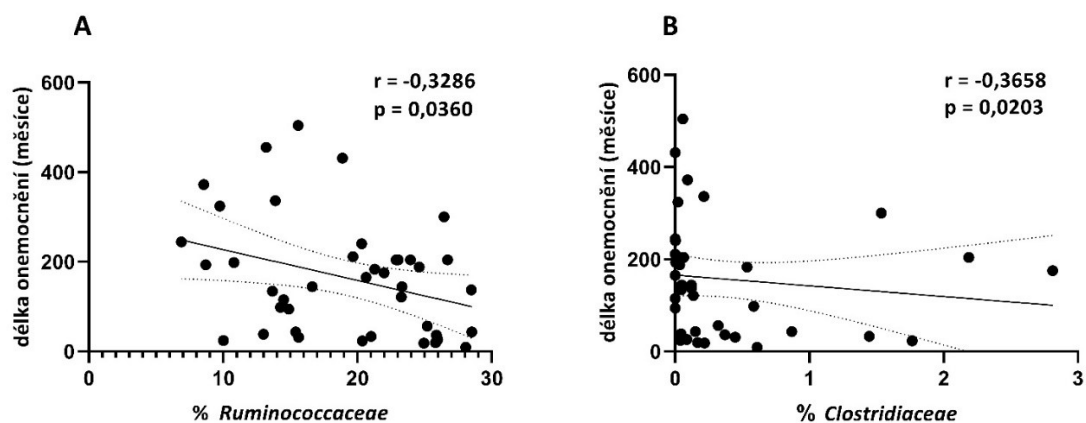
Pozitivní korelace kmene Actinobacteria s délkou onemocnění a hodnotami BMI si udržuje statistickou významnost i na nižších taxonomických úrovních tohoto kmene přes třídu Actinobacteria, řád *Coriobacteriales*, čeleď *Coriobacteriaceae* až do rodu *Collinsella* (Obrázek 9). U pacientů dále pozorujeme negativní korelaci mezi zastoupením řádu *Coriobacteriales* a čeledi *Coriobacteriaceae* s hladinami celkového cholesterolu (Obrázek 9A, B).



Obrázek 9 – Korelace konkrétních bakteriálních skupin s délkou onemocnění, BMI a hladinou cholesterolu. A) řád *Coriobacteriales*, B) čeleď *Coriobacteriaceae*, C) korelace rodu *Collinsella* s délkou onemocnění, D) korelace rodu *Collinsella* s BMI. Hodnoty byly porovnány neparametrickou Spearmanovou korelací. * $p < 0,05$, ** $p < 0,1$, *** $p < 0,001$

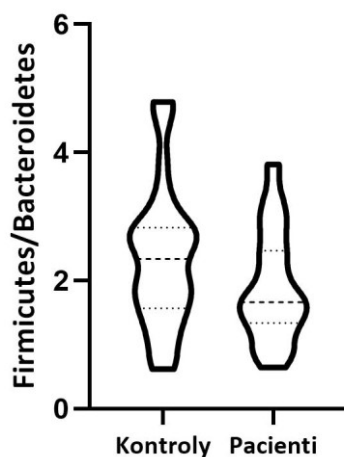
Negativní korelace kmene Firmicutes s délkou onemocnění byla také pozorována na nižších taxonomických úrovních tohoto kmene, konkrétně u třídy *Clostridia*, čeledi *Ruminococcaceae* (Obrázek 10A) a *Clostridiaceae* (Obrázek 10B). U čeledi *Clostridiaceae* byla tato negativní asociace

pozorována až do různých rodových linií této čeledi (*Anaerobacterium*, *Anaerosporebacter*, *Butyrivibrio* a *Clostridium sensu stricto*). U čeledi *Ruminococcaceae* byla tato asociace pozorována s rodem *Acetivibrio* (data nejsou zobrazena).



Obrázek 10 - Korelace délky onemocnění s procentuálním zastoupením bakteriální čeledi A) *Ruminococcaceae* a B) *Clostridiaceae*. Hodnoty byly porovnány neparametrickou Spearmanovou korelací.

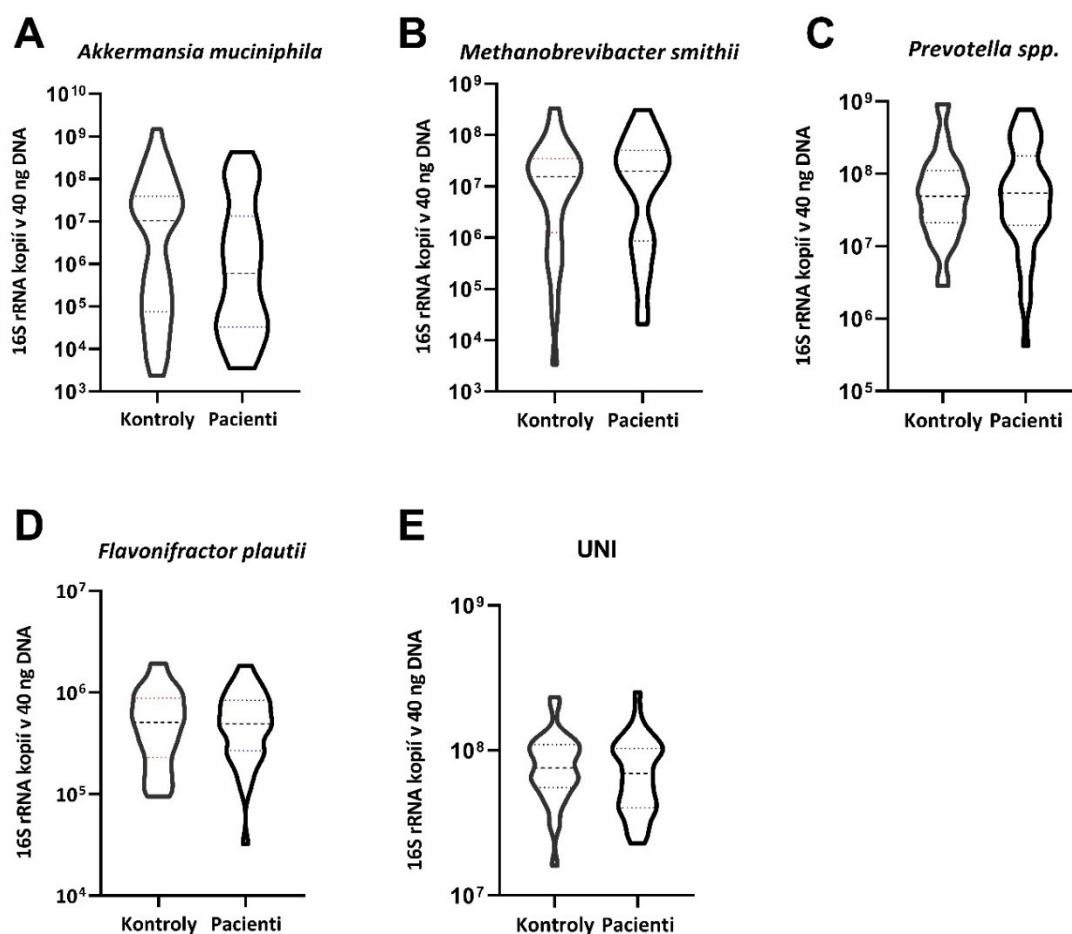
Poměr bakteriálních kmenů Firmicutes a Bacteroidetes byl nesignifikantně snížený u skupiny pacientů oproti skupině zdravých kontrol (Obrázek 11).



Obrázek 11 – Poměr zastoupení bakteriálních kmenů Firmicutes ku Bacteroidetes (p = 0,0974). Hodnoty byly porovnány neparametrickým Mann-Whitney testem.

5.3 Kvantifikace bakterií pomocí qPCR

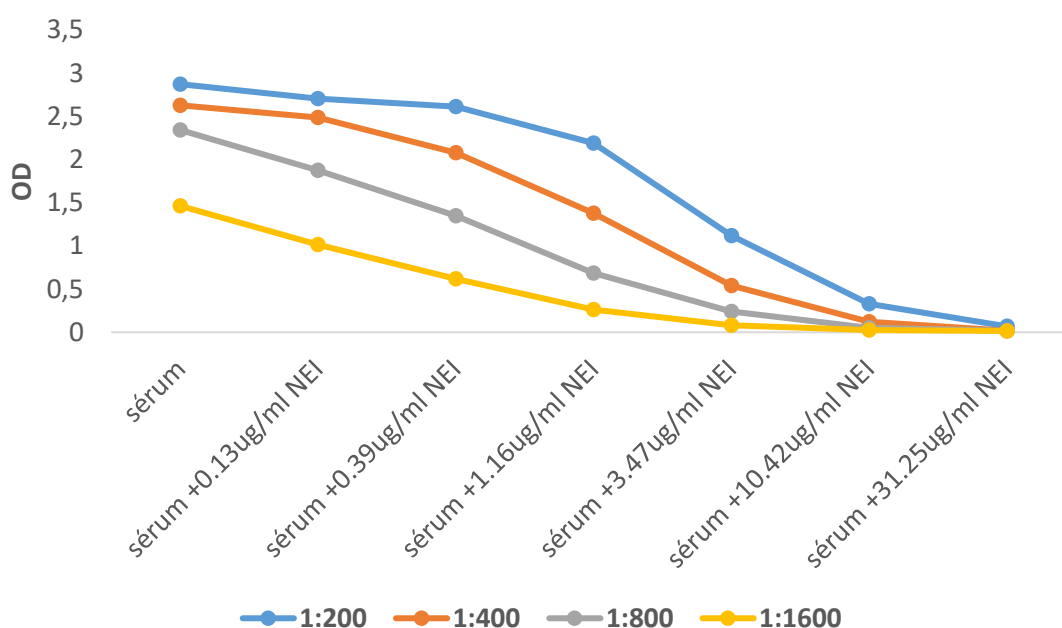
Zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů (*Prevotella spp.*, *Akkermansia muciniphila*, *Flavonifractor plautii*), archea *Methanobrevibacter smithii* a celkového počtu bakterií detekované pomocí kvantitativní PCR u skupiny pacientů s NT1 se statisticky nelišilo oproti skupině zdravých kontrol (Obrázek 12). Nicméně průměrné zastoupení bakterie *Akkermansia muciniphila* je u skupiny zdravých kontrol vyšší.



Obrázek 12 – Zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů, archea a celkového počtu bakterií ve střevě pacientů a zdravých kontrol. A) Zastoupení bakterie *Akkermansia muciniphila* ($p = 0,1037$), B) archea *Methanobrevibacter smithii* ($p = 0,6287$), C) bakteriálního druhu *Prevotella* ($p = 0,9054$), D) bakterie *Flavonifractor plautii* ($p = 0,4571$) a E) celkového počtu bakterií ($p = 0,3671$) u skupiny pacientů a zdravých kontrol. Hodnoty byly porovnány pomocí Mann-Whitney testu. UNI – celkový počet bakterií.

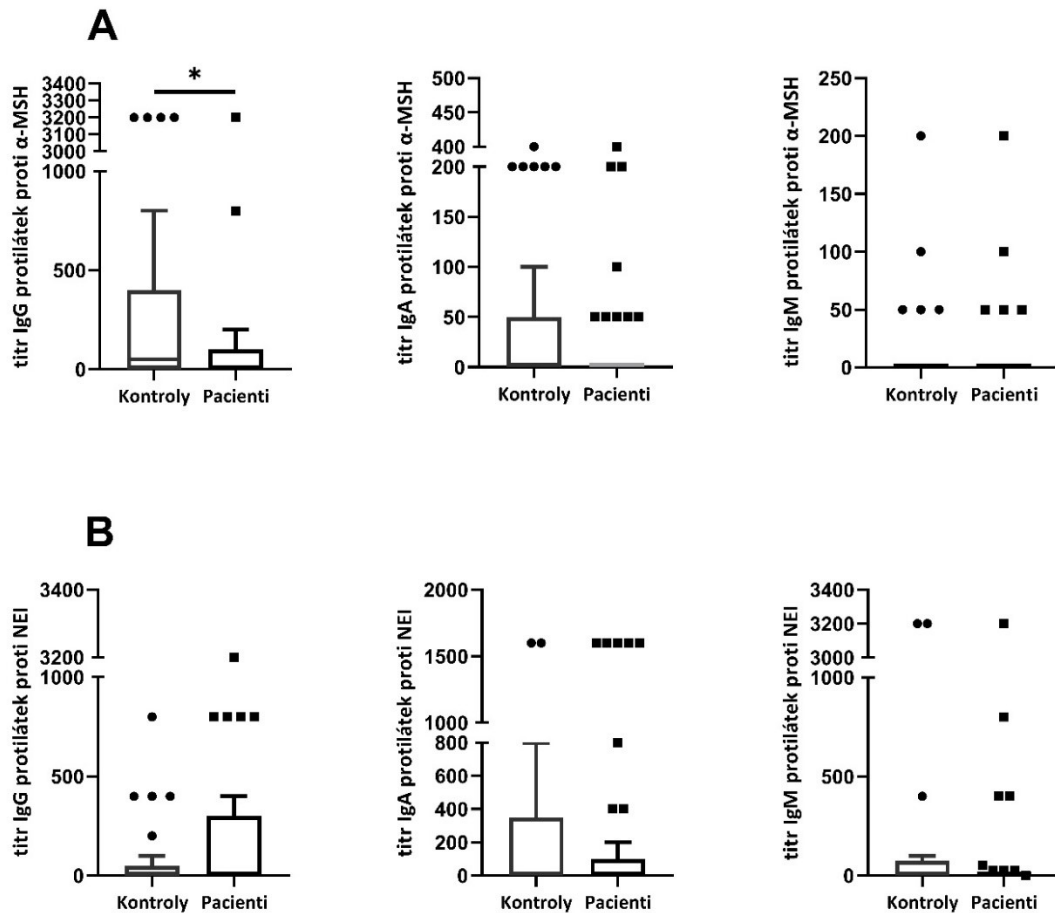
5.4 Detekce hladin sérových protilátek

Inhibiční ELISA byla provedena pro ověření specifiity reakce při detekci autoproti látek proti peptidu NEI. Bylo zjištěno, že s narůstající koncentrací peptidu přidaného k séru se snižovala výsledná OD hodnota (Obrázek 13). Výsledky inhibiční metody ELISA tedy potvrzují specifitu sérových protilátek proti peptidu NEI. Inhibiční metoda ELISA byla obdobně provedena i pro detekci specifiity protilátek proti peptidu α MSH.



Obrázek 13 – Inhibiční ELISA detekující protilátky proti peptidu NEI. Na ose x je zobrazena zvyšující se koncentrace peptidu NEI preinkubovaná se sérem. Barevné křivky zobrazují různá ředění séra (1:200-1:1600).

Ze všech sledovaných protilátek byly v sérech obou skupin nejvíce zastoupeny protilátky proti peptidům α MSH a NEI (Obrázek 14). Hladiny titrů IgG protilátek proti α MSH byly signifikantně sníženy u pacientů oproti zdravým kontrolám. Hladiny IgA protilátek proti α MSH nebyly u skupin významně odlišné. IgM protilátky proti α MSH byly v sérech obou skupin zastoupené ve stejném titru. Hladiny sérových protilátek izotypů IgG, IgA i IgM proti peptidu NEI byly u skupiny pacientů statisticky podobné se skupinou zdravých kontrol.



Obrázek 14 – Hladiny titrů protilátek proti A) αMSH a B) NEI v sérech pacientů a zdravých kontrol. Hladiny protilátek byly detekovány v izotypech IgG, IgM a IgA. Skupiny byly porovnány pomocí neparametrického Mann-Whitney testu. * $p < 0,05$

Protilátky proti Orexinu A a B, MCH, NPY a PYY byly v sérech nalezeny pouze zřídka a pouze v některých izotypech (Tabulka 6). Skupina pacientů měla statisticky významně snížené hladiny IgA protilátek proti Orexinu A oproti skupině zdravých kontrol. Protilátky všech pozorovaných izotypů proti orexinu A i B byly u pacientů sniženy. Protilátky všech sledovaných izotypů proti MCH byly u obou skupin zastoupeny srovnatelně. IgM protilátky proti MCH nebyly detekovány ani u jedné skupiny. IgG, IgA a IgM protilátky proti NPY a PYY byly srovnatelně zastoupeny u obou skupin.

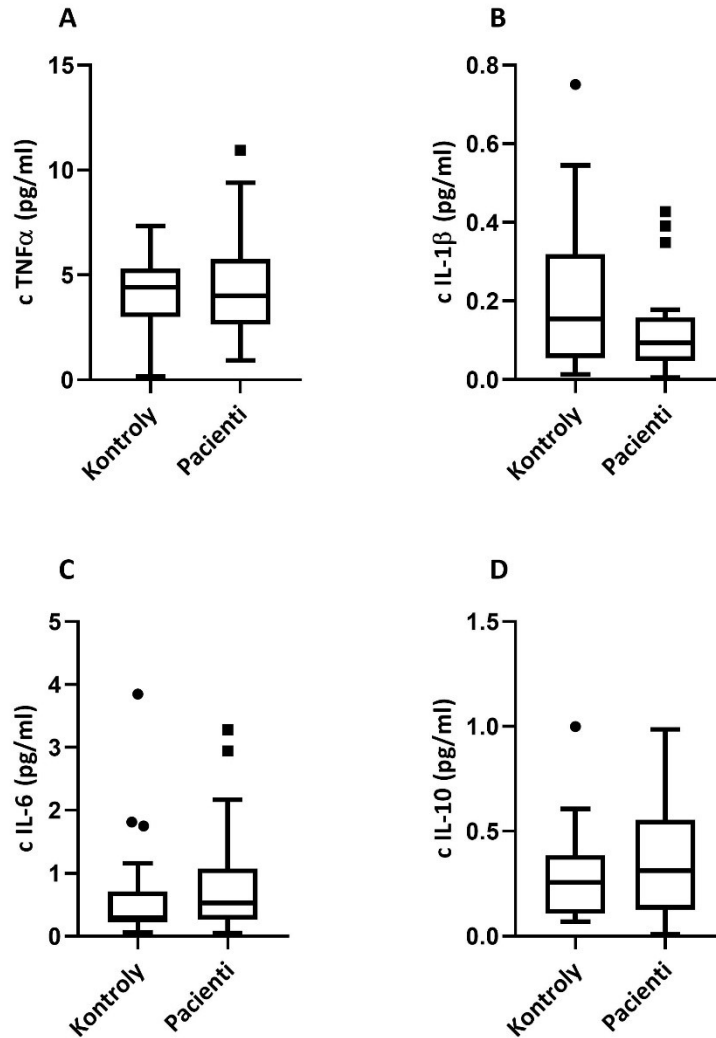
Tabulka 6 – Procentuální zastoupení sér pozitivních na přítomnost protilátek proti Orexinu A a B, MCH, NPY a PYY.

		IgG %	IgA %	IgM %
Orexin A	Kontroly	9,4	18,8	9,4
	Pacienti	2,4	0	2,4
	p hodnota	0,313	0,005**	0,313
Orexin B	Kontroly	6,3	6,3	18,8
	Pacienti	4,9	0	4,9
	p hodnota	>0,999	0,189	0,127
MCH	Kontroly	6,3	6,3	0
	Pacienti	2,4	4,9	0
	p hodnota	0,578	>0,999	>0,999
NPY	Kontroly	0	0	6,3
	Pacienti	4,9	4,9	4,9
	p hodnota	0,501	0,501	>0,999
PYY	Kontroly	6,3	9,4	18,8
	Pacienti	4,9	9,8	19,5
	p hodnota	>0,999	>0,999	>0,999

Hodnoty byly statisticky porovnány neparametrickým Mann-Whitney testem.

5.5 Koncentrace sérových cytokinů

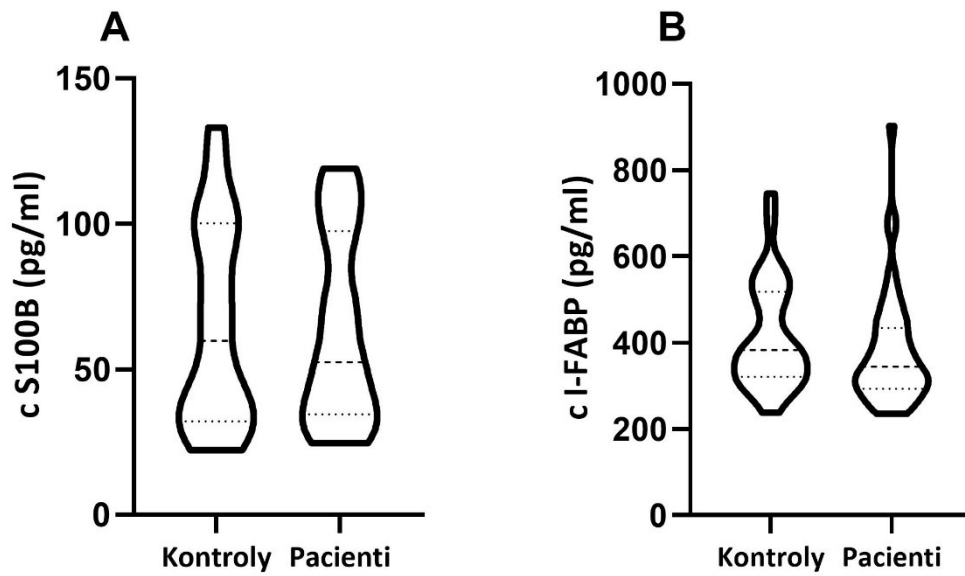
Koncentrace všech sledovaných cytokinů byly v sérech obou skupin zastoupeny ve fyziologickém množství (Obrázek 15). Hladiny sérového IL-12p70 byly u obou skupin pod detekčním limitem použité metody. Hladiny TNF α , IL-6 a IL-10 byly srovnatelné u obou skupin. U skupiny pacientů byly nalezeny tři odlehlé hodnoty v koncentraci sérového IL-1 β . Tyto odlehlé hodnoty způsobily zvýšení průměrné hodnoty a tím zvýšení podobnosti skupin. Většina pacientů má nižší sérovou koncentraci IL-1 β , než skupina zdravých kontrol.



Obrázek 15 – Koncentrace sérových cytokinů u skupiny pacientů a zdravých kontrol. A) TNF α ($p = 0,892$), B) IL-1 β ($p = 0,308$), C) IL-6 ($p = 0,115$) a D) IL-10 ($p = 0,437$) v sérech pacientů a zdravých kontrol. Skupiny byly statisticky porovnány pomocí neparametrického Mann-Whitney testu.

5.6 Koncentrace sérového I-FABP a S100B

Koncentrace sérového S100B a I-FABP byly u pacientů srovnatelné se skupinou zdravých kontrol (Obrázek 16). Hladiny proteinu S100B se u 12 pacientů a 11 zdravých kontrol nacházely pod detekčním limitem metody. Všechna séra obou skupin obsahovala fyziologické hodnoty proteinu S100B. Při analýze dat byly u skupiny kontrol identifikovány a odstraněny dvě velmi odlehlé hodnoty koncentrace sérového I-FABP. V séru jedné kontroly byly nalezeny patologicky zvýšené hodnoty sérového I-FABP. Koncentrace sérového I-FABP u ostatních sér obou skupin byla fyziologická.



Obrázek 16 – Koncentrace sérových proteinů S100B a I-FABP u skupiny pacientů a zdravých kontrol. A) S100B v sérech 29 pacientů a 21 kontrol, B) I-FABP v sérech 41 pacientů a 30 kontrol. Hodnoty byly porovnány pomocí neparametrického Mann-Whitney testu.

6 Diskuze

V poslední době se stále více objevují důkazy o tom, že mikroorganismy osídlující lidské tělo mají velice významný vliv na fyziologii a chování člověka. Střevní mikrobiota hraje důležitou roli v udržování homeostázy hostitelského organismu, ale na druhou stranu se může podílet na patogenezi některých onemocnění. Střevní mikrobiota má vliv na délku a kvalitu spánku a je také spánkem ovlivňována. Mnoho patologických stavů, které vznikají v důsledku nedostatečného či narušeného spánku, se také vyskytuje ve spojení s dysbiózou střevní mikrobioty. Jedná se mimo jiné o metabolické, kognitivní a behaviorální poruchy. Mezi tyto poruchy patří i časté komorbidity NT1, jako jsou obezita, diabetes 2. typu, deprese a úzkosti. Existuje předpoklad, že vzhledem ke špatné kvalitě spánku a přítomnosti těchto komorbidit by pacienti trpící NT1 mohli mít odlišné složení mikrobioty oproti běžné populaci. Výzkum střevního mikrobiomu u pacientů s NT1 je novou oblastí zájmu a jeho potenciální role v patogenezi tohoto onemocnění zůstává otevřenou otázkou.

V současné době existují dvě publikované studie zabývající se střevním mikrobiomem pacientů trpících NT1. Studie z roku 2020 (90), porovnává složení střevního mikrobiomu 35 pacientů s NT1 se skupinou 41 zdravých kontrol. Pacienti v této studii mají zvýšené BMI oproti zdravým kontrolám, užívají podobnou medikaci a od doby jejich diagnózy uběhl podobný čas jako u pacientů z naší studie. Pacienti z této studie mají sníženou beta diverzitu, tedy složení střevního mikrobiomu oproti zdravým kontrolám, dokonce i po odečtení efektu zvýšeného BMI. V naší studii beta diverzita střevního mikrobiomu pacientů oproti zdravým kontrolám nebyla významně odlišná. Důvodem tohoto rozdílu může být jiná dieta a životní styl pacientů či nějaká z komorbidit ovlivňující složení mikrobiomu, která není v souboru našich pacientů přítomná či není zastoupená ve velké míře. Nicméně přítomnost těchto komorbidit ve studii popsána není. Autoři studie dále popisují snížené množství bakteriálního rodu *Bacteroides* a zvýšené množství bakteriálního rodu *Flavonifractor*, které ale po odečtení efektu zvýšeného BMI nezůstalo signifikantní. Na základě této studie jsme se zaměřili na zastoupení bakteriálního druhu *Flavonifractor plautii* a zjistili jsme, že se zastoupení této bakterie u pacientů významně nelišilo od zdravých kontrol, a tudíž se nejspíše jednalo o náhodné zvýšení tohoto bakteriálního druhu nezávisle na NT1.

Druhá studie z roku 2021 (91), se zabývá střevním mikrobiomem u 20 pacientů trpících NT1 a 16 zdravých kontrol a je výjimečná tím, že pacienti během studie neužívali žádnou léčbu na zmírnění symptomů narkolepsie, netrpěli žádnými typickými komorbiditami NT1 a neměli zvýšené BMI oproti skupině kontrol, což autorům umožnilo prezentovat výsledky nezatížené těmito faktory. Doba od vypuknutí symptomů narkolepsie u pacientů z této studie je v průměru 3 roky, tedy výrazně kratší než u pacientů z naší studie. Studie nepopisuje u skupin významný rozdíl v alfa ani beta

diverzitě, nicméně popisuje u pacientů vyšší zastoupení rodu *Klebsiella*, které jsme v našem souboru nepozorovali, a nižší zastoupení bakterií *Blautia*, *Barnesiellaceae*, *Barnesiella*, *Phoceia*, *Lactococcus*, *Coriobacteriia*, *Coriobacteriales*, *Ruminiclostridium_5* a *Bilophila*. Z tohoto výčtu bakterií je pro nás zajímavá bakteriální třída *Coriobacteriia*, do které patří bakteriální řád *Coriobacteriales*, čeleď *Coriobacteriaceae* a rod *Collinsella*. V naší studii zastoupení těchto bakteriálních skupin pozitivně korelovalo s délkou onemocnění a s hladinami BMI a negativně s hladinami celkového cholesterolu. Zastoupení třídy *Coriobacteriia* v původní studii negativně koreluje s délkou a kvalitou spánku. Jiné korelace v souvislosti s touto bakteriální třídou popsány nejsou.

Ve studii, která se věnovala metabolickým změnám u spánkově deprivovaných myší, autoři ukázali, že při narušení cirkadiánních rytmů dochází k deregulaci transkripce některých genů, jenž se v játrech účastní přeměny cholesterolu na žlučové kyseliny (92). Ty jsou potom zásadní pro metabolismus lipidů a narušení homeostázy těchto mechanismů vede k deregulaci akumulace či mobilizace lipidů. Narušení cirkadiánních rytmů například fragmentací spánku či prací na směny může vést k vývoji obezity a metabolickému syndromu (93). Ačkoli u pacientů trpících narkolepsií toto dosud nebylo popsáno, je možné, že negativní korelace mezi řádem *Coriobacteriales* a čeledí *Coriobacteriaceae* s hladinami cholesterolu, které jsme pozorovali, souvisí právě s narušeným metabolismem lipidů. U těchto bakterií byla totiž popsána vysoká rezistence k žlučovým kyselinám, které jinak působí výrazně antimikrobiálně (94). Předpokládáme, že pacienti, kteří měli v rámci naší studie vyšší hladiny cholesterolu, měli zároveň ve střevě nižší hladiny žlučových kyselin a tím pádem se u nich ve střevě mohly množit ve větší míře i bakterie, které takovou rezistenci ke žlučovým kyselinám nemají. Pozitivní korelace mezi zastoupením těchto bakterií, BMI a délkou onemocnění lze dát do souvislosti s obezitou a častým metabolickým syndromem u těchto pacientů, což opět pravděpodobně souvisí s narušením regulace exprese jaterních genů hrajících důležitou úlohu v metabolismu lipidů a glukózy.

V dalších studiích byly zjištěny pozitivní korelace mezi zastoupením čeledi *Coriobacteriaceae* a hladinou non-HDL cholesterolu na modelovém organismu křečka zlatého (95) a později byl tento objev ověřen také u lidí, kde byl blíže určen konkrétně rod *Collinsella*, který je pravděpodobně zodpovědný za tento efekt (96). Zajímavé je, že zvýšené množství bakterií *Coriobacteriaceae* bylo také popsáno u mužů po vystavení spánkové deprivaci, takže by zastoupení této čeledi u pacientů mohlo hrát roli i v regulaci spánku a bdění (97). *Collinsella* je hojně zastoupená v lidském střevním mikrobiomu a její množství je ovlivněno dietou, a to zejména množstvím vlákniny v potravě, která její množství ve střevě snižuje (98). Zvýšené množství bakterie *Collinsella* bylo pozorováno u pacientů s aterosklerózou a u pacientů s diabetem 2. typu (99; 100). *Collinsella* je pozitivně korelována s hladinami insulinu a VLDL cholesterolu a negativně korelována s hladinami HDL cholesterolu tě-

hotných žen s nadváhou či obezitou. Žádné asociace však nebyly nalezeny s hladinou LDL cholesterolu (101). Mechanismus, jakým bakterie čeledi *Coriobacteriaceae* ovlivňují metabolismus lipidů a cholesterolu není zcela objasněn, ale existuje předpoklad, že ve střevě podporují zpětnou absorpci cholesterolu do krve (98). Objev negativní korelace mezi hladinami cholesterolu a zastoupením bakterie *Collinsella* v naší studii může být vysvětlen tím, že v ostatních studiích se popisuje množství HDL/LDL či non-HDL cholesterolu, nikoliv celkového cholesterolu, jako je to v našem případě. V našem souboru bohužel tuto analýzu nelze provést kvůli nedostatku dat. Gnotobiotické studie též ukázaly na to, že *Collinsella* snižuje expresi proteinů pevných spojů u enterocytů a tím zvyšuje propustnost střeva (102), čímž by mohla podporovat prozánětlivý stav organismu a podporovat rozvoj NT1. *Collinsella* bývá více zastoupená u lidí s obezitou, což bylo potvrzeno také v naší studii u pacientů s NT1. Nicméně u zdravých kontrol jsme nepozorovali asociaci mezi množstvím bakteriálního rodu *Collinsella* a vysokým BMI, její zvyšující se množství u pacientů by tedy mohlo přímo souviset s vývojem NT1. Na základě našich výsledků lze předpokládat, že zastoupení těchto bakterií je ovlivněno kvalitou spánku a zároveň tyto bakterie ovlivňují metabolismus lipidů, což by mohlo souviset s výrazným zvýšením hmotnosti pacientů brzy po propuknutí onemocnění. Tuto naši hypotézu podporuje fakt, že u zdravých kontrol jsme žádné takové asociace nenalezli.

Cirkadiánní rytmus je ovlivňován mikrobiálními produkty, například množstvím SCFA, mezi které patří butyrát. Bylo popsáno, že spánková fragmentace, která je u pacientů s NT1 přítomná, indukuje zvýšení bakterií produkujících butyrát, což zlepšuje kvalitu spánku a snižuje prozánětlivý stav a inzulinovou rezistenci spojenou se spánkovou deprivací (103). U pacientů bylo zjištěno zvýšené zastoupení čeledí *Leuconostocaceae* a *Clostridiaceae* a zároveň negativní korelace mezi čeledí *Clostridiaceae* a délkou onemocnění. Pacienti tedy měli vyšší zastoupení čeledi *Clostridiaceae*, ale zároveň se její množství s délkou onemocnění snižovalo. Negativní korelace mezi čeledí *Clostridiaceae* byla u pacientů pozorována až do různých rodových linií této čeledi (*Butyricoccus*, *Anaerosporebacter*, *Anaerobacterium* a *Clostridium sensu stricto*). Zvýšené množství bakterií třídy *Clostridia* bylo popsáno u myši s narušeným spánkovým režimem (104). Třída *Clostridia* je ve střevě hojně zastoupena a je tvořena komenzálními i patogenními druhy bakterií. Komenzální bakterie této třídy jsou často producenti SCFA, a to zejména butyrátu (105). Bakteriální rod *Butyricoccus* je významným producentem butyrátu a uvažuje se o jeho používání jako probiotického preparátu (106). Bakterie čeledi *Leuconostocaceae*, jejichž výskyt byl v naší studii u pacientů s NT1 vyšší než u kontrol, jsou také producenti SCFA (107).

Kvalitní spánek byl ve střevech zdravých jedinců pozitivně korelován se zastoupením bakterií čeledi *Ruminococcaceae* a rodu *Blautia*, což jsou anaerobní, gram pozitivní bakterie produkující butyrát. Nekvalitní spánek, obezita a inzulinová rezistence byly naopak asociovány se zvýšeným množstvím anaerobní, gram negativní bakterie *Prevotella* patřící do kmene Bacteroidetes (103).

Proliferace bakterií *Ruminococcaceae* a *Blautia* je podporována vyššími hladinami sukcinátu, který produkují právě bakterie rodu *Prevotella*. Zvýšení množství bakterií *Prevotella* při spánkové deprivaci by mohlo tedy být kompenzačním mechanismem organismu, jak zvýšit ve střevech množství pro spánek prospěšných bakterií (103). V rámci naší studie jsme u pacientů s NT1 jsme pozorovali zvýšené zastoupení bakterií z čeledi *Prevotellaceae* a bakterií produkujících butyrát. Nicméně zároveň jsme zjistili, že s rostoucí délkou onemocnění dochází ke snižování zastoupení butyrát-produkujících čeledi *Ruminococcaceae* a *Clostridiaceae*. Je možné, že kompenzační mechanismy na úrovni střevního mikrobiomu se odehrávají převážně na počátku onemocnění a že později dochází ke změnám na neuronální úrovni. A to konkrétně k navýšování histaminergních neuronů, jak bylo zmíněno v úvodu.

Bakteriální rod *Anaerosporebacter* je popisován v souvislosti se zvýšeným množstvím mastných kyselin v séru, což naznačuje, že by se mohl u pacientů podílet na regulaci metabolismu lipidů (108). Snížené zastoupení rodu *Anaerobacterium* bylo pospané u pacientů s Alzheimerovou chorobou s neuropsychiatrickými symptomy oproti pacientům s touto chorobou bez těchto symptomů. Bakteriální rod *Anaerobacterium* má imunomodulační a protizánětlivé účinky, což může hrát roli v zmírňování symptomů této neurodegenerativní choroby (109). Podobný efekt by mohl probíhat i u pacientů trpících NT1, nicméně není jisté, zda se psychiatrické choroby vyskytující se u pacientů zhoršují s časem nebo se vyskytují již v začátcích onemocnění a nemají progresivní průběh.

Spánková deprivace také vedla v rámci jedné studie ke zvýšení poměru bakteriálních kmenů Firmicutes/Bacteroidetes a zvýšenému zastoupení bakterií asociovaných s metabolickými poruchami (97). V naší skupině pacientů s NT1 jsme pozorovali nesignifikantní snížení poměru bakterií kmene Firmicutes/Bacteroidetes oproti zdravým kontrolám. Tento objev můžeme diskutovat s tím, že pro pacienty trpící NT1 je spíše typická spánková fragmentace a nikoliv deprivace. Zvýšený poměr kmenů Firmicutes/Bacteroidetes je také často spojovaný s obezitou, a to pravděpodobně z toho důvodu, že bakterie kmene Firmicutes jsou efektivnější v získávání energie z potravy. Poměr těchto dvou bakteriálních kmenů může být ovlivněn složením stravy. Vyšší zastoupení kmene Bacteroidetes je asociováno se stravou bohatou na vlákninu a vyšší zastoupení kmene Firmicutes je spojováno se stravou s vysokým obsahem tuků, cukrů a proteinů (110). I přestože mají pacienti v našem souboru obecně zvýšené hodnoty BMI oproti zdravým kontrolám a 46 % z nich trpí obezitou, nemají zvýšený poměr kmenů Firmicutes/Bacteroidetes. Souvislost tohoto poměru s obezitou je v posledních letech zpochybňována, protože se objevily studie zabývající se obézními jedinci, u nichž tento poměr zvýšený nebyl a v některých studiích byl dokonce snížený (111; 112).

V naší studii jsme se blíže zaměřili na zastoupení bakterie *Akkermansia muciniphila* a archea *Methanobrevibacter smithii*. *A. muciniphila* patřící do kmene *Verrucomicrobia* je bakterie degrada-

jící mucin, která se podílí na regulaci propustnosti střevní bariéry, produkci sekrece antimikrobiálních peptidů a podporuje protizánětlivý stav ve střevech hostitele (113). Zastoupení této bakterie je negativně korelováno s obezitou a s diabetem 2. typu (114) a proto nás zajímalo její zastoupení u pacientů trpících NT1. Zjistili jsme, že zastoupení bakterie *A. muciniphila* je u naší skupiny pacientů oproti zdravým kontrolám pouze nesignifikantně snižené. Archeon *M. smithii* fermentací složek potravy produkuje metan a podporuje produkci SCFA střevními bakteriemi (115). Zvýšené množství tohoto archeonu bylo popsáno u pacientek s mentální anorexií a bylo zjištěno, že se u lidí se zvyšující hmotností jeho množství snižuje (116). Tyto informace naznačují, že zastoupení *M. smithii* by mohlo být u pacientů s NT1 sníženo, což v našem souboru potvrzeno nebylo. I přesto, že existuje více studií popisujících zastoupení tohoto archeonu v souvislosti s nízkou tělesnou váhou, existují i studie, které popisují jeho zvýšené množství u lidí s obezitou (117), a je tedy potřeba jeho vztah s BMI v budoucnu ujasnit.

Obezita obecně vzniká důsledkem nadměrného přejídání, nevhodného složení stravy, dědičných faktorů, nedostatku pohybu, ale také metabolických poruch, hormonální nerovnováhy a některé medikace (118). U pacientů trpících NT1 není přibírání na váze spojeno s vyšším příjmem kalorií ani se složením stravy podporujícím rozvoj obezity, a proto není překvapující, že složení jejich střevní mikrobioty neodpovídá složení mikrobioty obézních jedinců, u kterých jsou tyto faktory hlavní příčinou jejich vysoké tělesné hmotnosti. Zvýšená tělesná hmotnost u pacientů trpících NT1 je pravděpodobně spojená s patofyziologií tohoto onemocnění, ale může být také důsledkem zvýšené spavosti či fragmentace spánku (29). Zajímavé je, že myši, kterým chybí celé orexinergní neurony, přibírají na váze, ale myši, kterým chybí pouze orexinové receptory, nikoliv. Zdá se tedy, že se i samotné orexinergní neurony podílejí na regulaci metabolismu (119).

Je známo, že některé léky způsobují přibírání na váze, ovšem zdá se, že medikace předepsaná na zmírnění symptomů narkolepsie tento efekt nemá (29). Medikace také ovlivňuje složení střevního mikrobiomu, a naopak střevní mikrobiota má vliv na účinek léků na hostitelský organismus, protože může produkcí enzymů pozměnit jejich chemickou strukturu, a tak ovlivnit jejich bioaktivitu a toxicitu. V posledních letech roste zájem o odhalení účinku antidepresiv na bázi selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu na složení střevního mikrobiomu, a to hlavně proto, že tato antidepresiva ovlivňují signalizaci enterických nervů, mají antimikrobiální účinky a patrně ovlivňují produkci serotoninu střevní mikrobiotou (120). Antidepresiva tohoto typu jsou často užívaná i pacienty s NT1, a to buď jako antikataleptická terapie nebo léčba deprese a úzkosti. V naší skupině pacientů ovšem léky tohoto typu nepatří mezi často užívané preparáty. Zatím nebylo popsáno, že by léčiva užívaná skupinou pacientů v naší studii způsobovala dysbiózu střevního mikrobiomu.

Deprese a úzkosti, které bývají častou komorbiditou NT1, jsou také hojně studovány ve vztahu s mikrobiotou. Depresivní a úzkostné poruchy jsou charakterizované jako poruchy nálady s neschopností alostázy, tedy adaptační úpravy na stresovou situaci. Alostáza zahrnuje regulaci neuroendokrinního systému skrze HPA osu, která je ovlivňována různými mikrobiálními metabolity. Střevní mikrobiom tedy ovlivňuje HPA osu, ale také naopak aktivace této osy má vliv na složení střevního mikrobiomu a propustnost střeva (69; 121). Na rozvoj depresí u pacientů s NT1 se pravděpodobně podílí psychická zátěž spojená s onemocněním, nedostatek kvalitního spánku, spánková fragmentace, patologické děje v mozku a v poslední době se ukazuje, že patrně i střevní mikrobiota. Již zmiňovaná bakteriální třída *Coriobacteriia*, která pozitivně koreluje s délkou onemocnění u pacientů s narolepsií, je také popisovaná v souvislosti s depresemi a její zastoupení by mohlo mít vliv na psychické zdraví pacientů (122).

Deprese zvyšují šance na rozvoj diabetu 2. typu, ale také naopak. Společným patofyziologickým mechanismem těchto dvou častých komorbidit NT1 je psychologický stres, který působí na HPA osu a způsobuje hormonální nerovnováhu. Hormonální nerovnováha následně ovlivňuje i spánek, komunikaci na ose mikrobiom-střevo-mozek, metabolismus a náladu. Výskyt těchto komorbidit u pacientů se tedy může podílet na zhoršování symptomů narkolepsie (123). Chronický stres ovlivňuje hladiny cirkulujících orexigenních hormonů, a může přispívat ke zvýšenému příjmu kalorií a k přibírání na váze (124), a tedy podporovat rozvoj obezity. Toto podporuje naše zjištění, že s délkou onemocnění roste také BMI pacientů s NT1. Depresivní porucha je asociovaná s vyšší propustností střevní bariéry a s vyššími hladinami prozánětlivých cytokinů IL-1 β , IL-6 a TNF- α a rozdílným složením střevního mikrobiomu oproti zdravým kontrolám (69). V souboru našich pacientů nebyly pozorovány žádné rozdíly v těchto stanovovaných parametrech, což může být vysvětleno tím, že v našem souboru pacientů trpí depresemi nebo úzkostmi méně než 10 % pacientů.

U pacientů jsme zjišťovali přítomnost autoprotilátek proti různým neuropeptidům, které by mohly souviset s patogenezí narkolepsie. Tyto autoprotilátky by mohly vznikat účinkem molekulárních mimiker ve střevě a mohly by se podílet na autoimunitní destrukci orexigenních neuronů. U pacientů jsme detekovali autoprotilátky proti jednomu střevnímu (PYY) a šesti hypotalamickým (α -MSH, NEI, Orexin A a B, NPY, MCH) neuropeptidům, které se podílejí na regulaci spánku a chuti k jídlu. Všechny autoprotilátky byly stanoveny v izotypech IgG, IgM a IgA. Důvodem stanovení protilátek izotypu IgA ze séra byla nedávno publikovaná studie (125), která popisuje plazmatocyty produkující IgA protilátky v oblasti mozkových blan, zejména v blízkosti žil tvrdé pleny mozkové (dura mater), kde je zpomalený tok krve a tím zvýšené riziko přístupu patogenů do mozku. Tyto IgA protilátky rozpoznávají mikrobiální antigenní struktury, se kterými se organismus setkává ve střevě. Plazmatocyty rezidující v této oblasti zde pravděpodobně zabraňují rozvoji infekce v mozku způsobené střevními patogeny.

Autoprotilátky proti vybraným neuropeptidům mohou také ovlivňovat jejich funkce a mohly by se potenciálně podílet na rozvoji či progresi některých komorbidit NT1 (obezita, deprese a úzkosti). Orexigenní a anorexigenní hormony hrají velmi důležitou roli v regulaci příjmu potravy, chuti k jídlu a emocí. Změněné množství těchto hormonů může vést k poruchám regulace spánku, energetické homeostázy, tukové tkáně, chuti k jídlu a možná také k rozvoji psychických poruch (86). Autoprotilátky proti takovýmto hormonům byly nalezeny například u pacientek trpících mentální anorexií. Konkrétně byly u těchto pacientek nalezeny zvýšené hladiny autoprotilátek proti peptidu α -MSH, který je strukturně podobný kaseinolytické proteáze B, jenž je produkována bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* (126).

U pacientů s narkolepsií byly nalezeny protilátky proti α -MSH a NEI, které se váží na neurony produkující MCH (47). Hladiny MCH nejsou u pacientů s NT1 snižené ani proti tomuto hormonu nebyly nalezeny zvýšené hladiny autoprotilátek. U pacientů s narkolepsií byla velká snaha detekovat autoprotilátky proti orexinům A i B, nicméně tyto protilátky nalezeny nebyly. U skupiny pacientů i zdravých kontrol v naší studii jsme detekovali autoprotilátky proti neuropeptidům α -MSH a NEI, mezi nimiž existuje strukturní homologie. Vzhledem k podobnosti těchto neuropeptidů lze předpokládat, že se budou protilátky proti oběma neuropeptidům vyskytovat u stejných pacientů, což jsme nicméně nepotvrdili. Stejný nález jsme zjistili i u neuropeptidů NPY a PYY, které jsou také homologní (127). Hladiny IgG autoprotilátek proti α -MSH a IgA proti orexinu A byly signifikantně zvýšené u zdravých kontrol. Tyto autoprotilátky však nemusejí plnit pouze patologickou roli, ale mohou se účastnit fyziologických procesů, takže jejich zvýšené hladiny u zdravých kontrol nejsou nijak překvapivé. Hladiny ostatních protilátek, které jsme detekovali, nebyly významně odlišné u pacientů a zdravých kontrol. Vzhledem k předpokladu, že patogeneze NT1 je zprostředkovaná spíše buněčnou imunitou není tento nález neočekávaný. Nicméně je možné, že jsou u pacientů tyto autoprotilátky přítomné, ale jejich hladiny mohou být detekované pouze v kratším období od začátku progresse onemocnění. Pro odhalení přítomnosti autoprotilátek u narkoleptických pacientů je zapotřebí zlepšit a zrychlit diagnostické postupy a zaměřit budoucí výzkumy na pacienty, u kterých potenciálně stále probíhá autoimunitní reakce.

Vzhledem k předpokladu, že se pomocné CD4+ T-lymfocyty produkcí prozánětlivých cytokinů patrně podílejí na patogenezi NT1, je snaha tyto cytokiny detekovat. Většina studií zabývajících se narkolepsií však zahrnuje pacienty, u nichž se onemocnění projevilo již před dlouhou dobou a u kterých tyto cytokiny již nejde detekovat. Zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů lze u pacientů předpokládat nejen z hlediska patogeneze onemocnění, ale také vzhledem k symptomům narkolepsie. Je známo, že cytokiny jako například IL-1, IL-6 a TNF- α hrají roli v regulaci spánku a bdění a vyskytují se ve zvýšeném množství u pacientů s poruchami spánku (128; 129).

Metaanalýza cytokinů naměřených u narkoleptických pacientů popisuje zvýšené hladiny plazmatických IL-6 a TNF- α , nikoliv ale sérových cytokinů (129), což je zvláštní, protože korelace sérových a plazmatických cytokinů bývá většinou vysoká. V naší studii byly měřeny cytokiny IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 p70 a TNF- α . Hladiny prozánětlivých cytokinů IL-1, IL-6 a TNF α jsou obecně zvýšené v časně fázi zánětlivé odpovědi a jejich množství je pozitivně korelováno s autoimunitními a chronickými zánětlivými onemocněními. IL-6 a TNF- α mohou navíc procházet přes HEB a není tedy překvapivé, že jsou spojovány se zánětlivými nemocemi CNS. IL-10 je všeobecně známý jako protizánětlivý cytokin, nicméně se také podílí na aktivaci B lymfocytů, izotypovém přesmyku a produkci INF- γ . Skupina pacientů v naší studii neměla zvýšené hladiny těchto sérových cytokinů oproti skupině zdravých kontrol, což je v souladu s předchozími studiemi.

Zvýšené BMI je spojováno s vyššími hladinami prozánětlivých cytokinů v periferním oběhu. Studie popisující cytokinový profil u pacientů s narkolepsií by pro odlišení tohoto efektu měly tedy nález vysokých hladin prozánětlivých cytokinů korelovat s hladinami BMI. V naší studii tyto hodnoty korelovány nebyly z důvodu nízkých hladiny sérových cytokinů. Vysoké BMI u pacientů by vlivem cytokinů regulujících spánek mohlo prohlubovat symptomy spojené s NT1. Dalším faktorem ovlivňujícím hladiny cytokinů u pacientů je užívání medikace. Užívání stimulačních přípravků jako je například Ritalin má u pacientů vliv na hladiny TNF- α (129). Tento efekt jsme v naší studii nepozorovali, protože stimulační přípravky užívalo pouze 5 pacientů. Hladiny cytokinů jsou ovlivňované cirkadiánními rytmy a jejich množství v těle osciluje. Pro přesné popsání cytokinového profilu u pacientů by bylo tedy zapotřebí provést více krevních odběrů během dne, což by bylo vzhledem k počtu sledovaných subjektů komplikované.

Mozek patří mezi imunoprivilegovaná místa a je od periferní cirkulace oddělen pomocí HEB, která za fyziologických podmínek omezuje migraci periferních leukocytů do CNS. Některé cytokiny jako například TNF- α stimulují zvýšení exprese adhezivních molekul na endoteliálních buňkách a podporují tím extravazaci T lymfocytů přes HEB do CNS. TNF- α navíc působí v synergii s INF- γ na zvyšování exprese MHC molekul 1. třídy na buňkách CNS, čímž zvyšuje náchylnost k jejich destrukci pomocí CD8+ T lymfocytů. Rozvolnění HEB během patogeneze NT1 může být důsledkem probíhající infekce (například chřipkové či streptokokové), ale může se na ní také podílet střevní mikrobiota, která ovlivňuje produkci prozánětlivých cytokinů zvyšujících propustnost této bariéry (66). Velké množství takových cytokinů je produkováno při zvýšeném průchodu mikroorganismů a jejich metabolitů do lamina propria v důsledku porušené funkce střevní bariéry. Z těchto důvodů jsme se v naší studii zaměřili na měření intaktnosti střevní a hematoencefalické bariéry. Intaktnost střevní bariéry byla stanovena detekcí I-FABP, markeru poškození epiteliálních buněk tenkého střeva. I-FABP je malý intracelulární protein vyskytující se pouze v epiteliálních buňkách tenkého střeva, kde se podílí na transportu, utilizaci a metabolismu mastných kyselin. Při poškození epiteliálních buněk tenkého

střeva se díky své velikosti dostává do séra, ze kterého ho lze stanovit (130). Pro stanovení intakt-
nosti HEB byl využit protein S100B. Jedná se o malý protein patřící do rodiny S100 proteinů vysky-
tujících v buňkách nervového systému, kde plní rozličné funkce. S100B je exprimován zejména astro-
cyty, oligodendrocyty a Schwannovými buňkami. Při poškození hematoencefalické bariéry se tento
malý protein dostává do séra. Zvýšené sérové koncentrace S100B byly naměřeny u poranění hlavy,
u pacientů po mozkové příhodě či při nádorových onemocnění mozku. Hladiny sérového S100B a I-
FABP byly u pacientů fyziologické a můžeme tedy říci, že pacienti pravděpodobně nemají narušenou
propustnost střevní ani hematoencefalické bariéry. Zvýšená propustnost střevní bariéry je kromě
mechanického poranění popisována také ve spojitosti s dysbiózou střevní mikrobioty (130), která u
pacientů z naší skupiny pozorovaná nebyla. Pro odhalení etiologie NT1 by bylo přínosné odhalit stav
bariér v období, kdy dochází k rozvoji tohoto onemocnění, což je komplikované vzhledem k tomu,
že diagnóza narkolepsie je často stanovena až několik let po jejím propuknutí.

7 Závěr

Cílem diplomové práce bylo blíže objasnit roli střevního mikrobiomu a autoimunitních mechanismů u pacientů trpících NT1. Složení střevní mikrobioty bylo analyzováno pomocí sekvenování nové generace. Diverzita střevní mikrobioty skupiny pacientů se významně nelišila od skupiny zdravých kontrol. U pacientů byly detekovány bakteriální skupiny, které se mohou potenciálně podílet na patogenезi NT1, případně na vzniku či progresi přidružených komorbidit. Mezi tyto bakteriální skupiny patří čeleď *Coriobacteriaceae* z kmene Actinobacteria, jejíž množství asociovalo s délkou onemocnění, BMI a hladinami cholesterolu u pacientů, ale ne u zdravých kontrol. Zastoupení této bakteriální čeledi ve střevech pacientů pravděpodobně ovlivňuje metabolismus lipidů a možná se podílí na rozvoji obezity. U pacientů bylo dále nalezeno zvýšené množství bakteriálních čeledí *Leuconostocaceae* a *Clostridiaceae*¹. Bakterie obou těchto čeledí jsou významní producenti butyrátu, který má příznivé účinky na kvalitu spánku. Zvýšené množství těchto bakteriálních čeledí u pacientů pravděpodobně zlepšuje kvalitu jejich spánku a kompenzuje spánkovou fragmentaci, nicméně je nutno podotknout, že zastoupení těchto bakterií ve střevech pacientů s délkou onemocnění klesá.

U pacientů nebyly detekovány vyšší hladiny autoprotilátek proti vybraným neuropeptidům stanovovaným pomocí in-house metody ELISA. Vyšší hladiny autoprotilátek proti α -MSH a orexinu A oproti skupině pacientů byly nalezeny u skupiny zdravých kontrol. Hladiny vybraných cytokinů stanovovaných multiplexovou analýzou byly podobné u obou pozorovaných skupin. U skupin pacientů i zdravých kontrol jsme detekovali markery poškození střevní a hematoencefalické bariéry pomocí komerčních ELISA kitů. U skupiny pacientů nebyly naměřeny patologické hodnoty těchto markerů a můžeme tedy říct, že nemají narušenou střevní ani hematoencefalickou bariéru. Pro odhalení imunitních mechanismů zodpovědných za destrukci orexinergních neuronů a popsání patogenезe NT1 by bylo zapotřebí zaměřit studie na pacienty v začátcích rozvoje NT1, což je ale vzhledem k prevalenci tohoto onemocnění a době od propuknutí NT1 k její diagnóze velice složité. Diplomová práce je pouze částí větší studie popisující složení střevního mikrobiomu 92 pacientů trpících NT1, ale také pacientů trpících NT2 a idiopatickou hypersomnií, která přinese další poznatky o vlivu střevní mikrobioty na tyto spánkové poruchy.

8 Seznam použité literatury

- (1) NEVŠÍMALOVÁ, Soňa a Karel ŠONKA. *Poruchy spánku a bdění*. Třetí, doplněné a přepracované vydání. Praha: Galén, 2020. ISBN 978-807-4924-781.
- (2) SAPER, Clifford, Thomas SCAMMELL a Jun LU. Hypothalamic regulation of sleep and circadian rhythms. *Nature*. 2005, 437(7063), 1257-1263. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/nature04284
- (3) MILEYKOVSKIY, Boris, Lyudmila KIYASHCHENKO a Jerome SIEGEL. Behavioral Correlates of Activity in Identified Hypocretin/Orexin Neurons. *Neuron*. 2005, 46(5), 787-798. ISSN 08966273. doi:10.1016/j.neuron.2005.04.035
- (4) VAN DEN POL, Anthony N. Hypothalamic Hypocretin (Orexin): Robust Innervation of the Spinal Cord. *The Journal of Neuroscience*. 1999, 19(8), 3171-3182. ISSN 0270-6474. doi:10.1523/JNEUROSCI.19-08-03171.1999
- (5) VRANA, Milena *et al.* Distribution of HLA-DQB1 in Czech Patients with Central Hypersomnias. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*. 2016, 64(1), 89-98. ISSN 0004-069X. doi:10.1007/s00005-016-0435-5
- (6) BASSETTI, Claudio, Antoine ADAMANTIDIS, Denis BURDAKOV *et al.* Narcolepsy — clinical spectrum, aetiopathophysiology, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Neurology*. 2019, 15(9), 519-539. ISSN 1759-4758. doi:10.1038/s41582-019-0226-9
- (7) STURZENEGGER, Christian a Claudio BASSETTI. The clinical spectrum of narcolepsy with cataplexy: a reappraisal. *Journal of Sleep Research*. 2004, 13(4), 395-406. ISSN 0962-1105. doi:10.1111/j.1365-2869.2004.00422.x
- (8) SAKURAI, Takeshi *et al.* Orexins and Orexin Receptors: A Family of Hypothalamic Neuropeptides and G Protein-Coupled Receptors that Regulate Feeding Behavior. *Cell*. 1998, 92(4), 573-585. ISSN 00928674. doi:10.1016/S0092-8674(00)80949-6
- (9) THANNICKAL, Thomas, Robert NIENHUIS a Jerome SIEGEL. Localized Loss of Hypocretin (Orexin) Cells in Narcolepsy Without Cataplexy. *Sleep*. 2009, 32(8), 993-998. ISSN 0161-8105. doi:10.1093/sleep/32.8.993
- (10) JOHN, Joshi, Thomas THANNICKAL, Ronald MCGREGOR *et al.* Greatly increased numbers of histamine cells in human narcolepsy with cataplexy. *Annals of Neurology*. 2013, 74(6), 786-793. ISSN 03645134. doi:10.1002/ana.23968
- (11) SHIRASAKA, Tetsuro *et al.* Sympathetic and cardiovascular actions of orexins in conscious rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 1999, 277(6), 1780-1785. ISSN 0363-6119. doi:10.1152/ajpregu.1999.277.6.R1780
- (12) MOHAMMED, Mazher *et al.* Reduced brown adipose tissue thermogenesis during environmental interactions in transgenic rats with ataxin-3-mediated ablation of hypothalamic orexin neurons. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 2014, 307(8), 978-989. ISSN 0363-6119. doi:10.1152/ajpregu.00260.2014

- (13) MUSCHAMP, John, Jonathan HOLLANDER, Jennifer THOMPSON et al. Hypocretin (orexin) facilitates reward by attenuating the antireward effects of its cotransmitter dynorphin in ventral tegmental area. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, 111(16), 1648-55. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.1315542111
- (14) BAUMANN-VOGEL, Heide et al. Narcolepsy type 2: A rare, yet existing entity. *Journal of Sleep Research*. 2021, 30(3), 1-4. ISSN 0962-1105. doi:10.1111/jsr.13203
- (15) PLAZZI, Giuseppe, Keivan MOGHADAM et al. Autonomic disturbances in narcolepsy. *Sleep Medicine Reviews*. 2011, 15(3), 187-196. ISSN 10870792. doi:10.1016/j.smrv.2010.05.002
- (16) OVEREEM, Sebastiaan, Sofie VAN NUES et al. The clinical features of cataplexy: A questionnaire study in narcolepsy patients with and without hypocretin-1 deficiency. *Sleep Medicine*. 2011, 12(1), 12-18. ISSN 13899457. doi:10.1016/j.sleep.2010.05.010
- (17) PIZZA, Fabio, Elena ANTELMINI, Stefano VANDI et al. The distinguishing motor features of cataplexy: a study from video-recorded attacks. *Sleep*. 2018, 41(5), 1-9. ISSN 0161-8105. doi:10.1093/sleep/zsy026
- (18) VGONTZAS, A. et al. Narcolepsy-cataplexy and loss of sphincter control. *Postgraduate Medical Journal*. 1996, 72(850), 493-494. ISSN 0032-5473. doi:10.1136/pgmj.72.850.493
- (19) ATTARIAN, H. Presumed REM sleep behavior disorder arising from cataplexy and wakeful dreaming. *Sleep Medicine*. 2000, 1(2), 131-133. ISSN 13899457. doi:10.1016/S1389-9457(99)00013-1
- (20) MAHONEY, Carrie et al. The neurobiological basis of narcolepsy. *Nature Reviews Neuroscience*. 2019, 20(2), 83-93. ISSN 1471-003X. doi:10.1038/s41583-018-0097-x
- (21) GANDHI, Kriti et al. Excessive Daytime Sleepiness. *Mayo Clinic Proceedings*. 2021, 96(5), 1288-1301. ISSN 00256196. doi:10.1016/j.mayocp.2020.08.033
- (22) PIZZA, Fabio, Marco FILARDI et al. Excessive daytime sleepiness in narcolepsy and central nervous system hypersomnias. *Sleep and Breathing*. 2020, 24(2), 605-614. ISSN 1520-9512. doi:10.1007/s11325-019-01867-7
- (23) ROTH, Thomas, Yves DAUVILLIERS et al. Disrupted Nighttime Sleep in Narcolepsy. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. 2013, 09(09), 955-965. ISSN 1550-9389. doi:10.5664/jcsm.3004
- (24) DAUVILLIERS, Yves, Carlos SCHENCK et al. REM sleep behaviour disorder. *Nature Reviews Disease Primers*. 2018, 4(1), 1-16. ISSN 2056-676X. doi:10.1038/s41572-018-0016-5
- (25) FORTUYN, Hal et al. Psychotic symptoms in narcolepsy: phenomenology and a comparison with schizophrenia. *General Hospital Psychiatry*. 2009, 31(2), 146-154. ISSN 01638343. doi:10.1016/j.genhosppsych.2008.12.002
- (26) FERNANDEZ-MENDOZA et al. Natural History of Excessive Daytime Sleepiness: Role of Obesity, Weight Loss, Depression, and Sleep Propensity. *Sleep*. 2015, 38(3), 351-360. ISSN 0161-8105. doi:10.5665/sleep.4488

- (27) DOUGLAS, N. J. The psychosocial aspects of narcolepsy. *Neurology*. 1998, 50(21), 27-30. ISSN 0028-3878. doi:10.1212/WNL.50.2_Suppl_1.S27
- (28) MOHAMMADI, Soheil *et al.* Metabolic profile in patients with narcolepsy: a systematic review and meta-analysis. *Sleep Medicine*. 2021, 81, 268-284. ISSN 13899457. doi:10.1016/j.sleep.2021.02.040
- (29) SCHULD, Andreas *et al.* Increased body-mass index in patients with narcolepsy. *The Lancet*. 2000, 355(9211), 1274-1275. ISSN 01406736. doi:10.1016/S0140-6736(05)74704-8
- (30) PONZIANI, Virginia *et al.* Growing Up with Type 1 Narcolepsy: Its Anthropometric and Endocrine Features. *Journal of Clinical Sleep Medicine*. 2016, 12(12), 1649-1657. ISSN 1550-9389. doi:10.5664/jcsm.6352
- (31) DAUVILLIERS, Y. *et al.* Age at onset of narcolepsy in two large populations of patients in France and Quebec. *Neurology*. 2001, 57(11), 2029-2033. ISSN 0028-3878. doi:10.1212/WNL.57.11.2029
- (32) PIZZA, F., S. VANDI, R. LIGUORI, P. PARCHI, P. AVONI, E. MIGNOT a G. PLAZZI. Primary progressive narcolepsy type 1: The other side of the coin. *Neurology*. 2014, 83(23), 2189-2190. ISSN 0028-3878. doi:10.1212/WNL.0000000000001051
- (33) SARKANEN, Tomi *et al.* Clinical course of H1N1-vaccine-related narcolepsy. *Sleep Medicine*. 2016, 19, 17-22. ISSN 13899457. doi:10.1016/j.sleep.2015.11.005
- (34) MIGNOT, Emmanuel, Ling LIN, William ROGERS *et al.* Complex HLA-DR and -DQ Interactions Confer Risk of Narcolepsy-Cataplexy in Three Ethnic Groups. *The American Journal of Human Genetics*. 2001, 68(3), 686-699. ISSN 00029297. doi:10.1086/318799
- (35) SINGH, Abinav, Josh MAHLIOS a Emmanuel MIGNOT. Genetic association, seasonal infections and autoimmune basis of narcolepsy. *Journal of Autoimmunity*. 2013, 43, 26-31. ISSN 08968411. doi:10.1016/j.jaut.2013.02.003
- (36) MIYAGAWA, Taku a Katsushi TOKUNAGA. Genetics of narcolepsy. *Human Genome Variation*. 2019, 6(1), 2-8. ISSN 2054-345X. doi:10.1038/s41439-018-0033-7
- (37) HAN, Fang *et al.* Narcolepsy onset is seasonal and increased following the 2009 H1N1 pandemic in china. *Annals of Neurology*. 2011, 70(3), 410-417. ISSN 03645134. doi:10.1002/ana.22587
- (38) ARAN, Adi, Ling LIN, Sona NEVSIMALOVA *et al.* Elevated Anti-Streptococcal Antibodies in Patients with Recent Narcolepsy Onset. *Sleep*. 2009, 32(8), 979-983. ISSN 0161-8105. doi:10.1093/sleep/32.8.979
- (39) ZHANG, Zhongxing *et al.* New 2013 incidence peak in childhood narcolepsy: more than vaccination?. *Sleep*. 2021, 44(2). ISSN 0161-8105. doi:10.1093/sleep/zsaa172
- (40) KORNUM, Birgitte R. Narcolepsy type 1: what have we learned from immunology?. *Sleep*. 2020, 43(10), 1-5. ISSN 0161-8105. doi:10.1093/sleep/zsaa055

- (41) ROJAS, Manuel et al. Molecular mimicry and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 2018, 95, 100-123. ISSN 08968411. doi:10.1016/j.jaut.2018.10.012
- (42) LUO, Guo, Aditya AMBATI et al. Autoimmunity to hypocretin and molecular mimicry to flu in type 1 narcolepsy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2018, 115(52), 12323-12332. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.1818150116
- (43) BERNARD-VALNET et al. CD8 T cell-mediated killing of orexinergic neurons induces a narcolepsy-like phenotype in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016, 113(39), 10956-10961. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.1603325113
- (44) LATORRE, Daniela, Ulf KALLWEIT, Eric ARMENTANI et al. T cells in patients with narcolepsy target self-antigens of hypocretin neurons. *Nature*. 2018, 562(7725), 63-68. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/s41586-018-0540-1
- (45) THANNICKAL, Thomas, Jerome SIEGEL, Robert NIENHUIS a Robert MOORE. Pattern of Hypocretin (Orexin) Soma and Axon Loss, and Gliosis, in Human Narcolepsy. *Brain Pathology*. 2003, 13(3), 340-351. ISSN 10156305. doi:10.1111/j.1750-3639.2003.tb00033.x
- (46) DAUVILLIERS, Yves, Jan BAUER, Valérie RIGAU et al. Hypothalamic Immunopathology in Anti-Ma–Associated Diencephalitis With Narcolepsy-Cataplexy. *JAMA Neurology*. 2013, 70(10), 1305–1310. ISSN 2168-6149. doi:10.1001/jamaneurol.2013.2831
- (47) BERGMAN, Peter et al. Narcolepsy patients have antibodies that stain distinct cell populations in rat brain and influence sleep patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014, 111(35), 3735-3744. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.1412189111
- (48) HÄGGMARK-MÅNBERG, Anna, Arash ZANDIAN, Björn FORSTRÖM et al. Autoantibody targets in vaccine-associated narcolepsy. *Autoimmunity*. 2016, 49(6), 421-433. ISSN 0891-6934. doi:10.1080/08916934.2016.1183655
- (49) AHMED, Syed, Wayne VOLKMUTH, José DUCA et al. Antibodies to influenza nucleoprotein cross-react with human hypocretin receptor 2. *Science Translational Medicine*. 2015, 7(294). ISSN 1946-6234. doi:10.1126/scitranslmed.aab2354
- (50) LUCA, Gianina, José HABA-RUBIO, Yves DAUVILLIERS et al. Clinical, polysomnographic and genome-wide association analyses of narcolepsy with cataplexy: a European Narcolepsy Network study. *Journal of Sleep Research*. 2013, 22(5), 482-495. ISSN 09621105. doi:10.1111/jsr.12044
- (51) GOLDBART, Aviv et al. Narcolepsy and Predictors of Positive MSLTs in the Wisconsin Sleep Cohort. *Sleep*. 2014, 37(6), 1043-1051. ISSN 0161-8105. doi:10.5665/sleep.3758
- (52) FILARDI, Marco et al. Physical Activity and Sleep/Wake Behavior, Anthropometric, and Metabolic Profile in Pediatric Narcolepsy Type 1. *Frontiers in Neurology*. 2018, 9(707). ISSN 1664-2295. doi:10.3389/fneur.2018.00707
- (53) KALLWEIT, Ulf a Claudio BASSETTI. Pharmacological management of narcolepsy with and without cataplexy. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*. 2017, 18(8), 809-817. ISSN 1465-6566. doi:10.1080/14656566.2017.1323877

- (54) MIGNOT, Emmanuel J. M. A Practical Guide to the Therapy of Narcolepsy and Hypersomnia Syndromes. *Neurotherapeutics*. 2012, 9(4), 739-752. ISSN 1933-7213. doi:10.1007/s13311-012-0150-9
- (55) SANTIFORT, Koen, Edward IVES *et al.* Suspected acquired narcolepsy in 8 dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2021, 35(3), 1448-1454. ISSN 0891-6640. doi:10.1111/jvim.16116
- (56) LIN, Ling, Juliette FARACO, Robin LI *et al.* The Sleep Disorder Canine Narcolepsy Is Caused by a Mutation in the Hypocretin (Orexin) Receptor 2 Gene. *Cell*. 1999, 98(3), 365-376. ISSN 00928674. doi:10.1016/S0092-8674(00)81965-0
- (57) TISDALE, Ryan *et al.* Animal models of narcolepsy and the hypocretin/orexin system: Past, present, and future. *Sleep*. 2021, 44(6). ISSN 0161-8105. doi:10.1093/sleep/zsaa278
- (58) TANEJA, Veena. Microbiome. *Principles of Gender-Specific Medicine*. Elsevier, 2017, 569-583. ISBN 9780128035061. doi:10.1016/B978-0-12-803506-1.00027-9
- (59) CHO, Ilseung a Martin BLASER. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*. 2012, 13(4), 260-270. ISSN 1471-0056. doi:10.1038/nrg3182
- (60) CRESCI, Gail a Emmy BAWDEN. Gut Microbiome. *Nutrition in Clinical Practice*. 2015, 30(6), 734-746. ISSN 0884-5336. doi:10.1177/0884533615609899
- (61) RAJILIĆ-STOJANOVIĆ, Mirjana a Willem DE VOS. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiology Reviews*. 2014, 38(5), 996-1047. ISSN 1574-6976. doi:10.1111/1574-6976.12075
- (62) DAVE, Maneesh, Peter HIGGINS, Sumit MIDDHA a Kevin RIOUX. The human gut microbiome: current knowledge, challenges, and future directions. *Translational Research*. 2012, 160(4), 246-257. ISSN 19315244. doi:10.1016/j.trsl.2012.05.003
- (63) JAKOBSSON, Hedvig, Thomas ABRAHAMSSON, Maria JENMALM *et al.* Decreased gut microbiota diversity, delayed Bacteroidetes colonisation and reduced Th1 responses in infants delivered by Caesarean section. *Gut*. 2014, 63(4), 559-566. ISSN 0017-5749. doi:10.1136/gutjnl-2012-303249
- (64) VALDES, Ana, Jens WALTER, Eran SEGAL a Tim SPECTOR. Role of the gut microbiota in nutrition and health. *BMJ*. 2018, (361), 2179. ISSN 0959-8138. doi:10.1136/bmj.k2179
- (65) GOJDA, Jan a Monika CAHOVA. Gut Microbiota as the Link between Elevated BCAA Serum Levels and Insulin Resistance. *Biomolecules*. 2021, 11(10). ISSN 2218-273X. doi:10.3390/biom11101414
- (66) PARKER, Aimée, Sonia FONSECA a Simon CARDING. Gut microbes and metabolites as modulators of blood-brain barrier integrity and brain health. *Gut Microbes*. 2020, 11(2), 135-157. ISSN 1949-0976. doi:10.1080/19490976.2019.1638722

- (67) CARDING, Simon, Kristin VERBEKE, Daniel VIPOND, Bernard CORFE a Lauren OWEN. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis.* 2015, 26(0). ISSN 1651-2235. doi:10.3402/mehd.v26.26191
- (68) LI, Bo, Carlo SELMI, Ruqi TANG, M GERSHWIN a Xiong MA. The microbiome and autoimmunity: a paradigm from the gut–liver axis. *Cell Mol Immunol.* 2018, 15(6), 595-609. ISSN 1672-7681. doi:10.1038/cmi.2018.7
- (69) MORAIS, Livia, Henry SCHREIBER a Sarkis MAZMANIAN. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nature Reviews Microbiology.* 2021, 19(4), 241-255. ISSN 1740-1526. doi:10.1038/s41579-020-00460-0
- (70) CRYAN, John a Timothy DINAN. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nature Reviews Neuroscience.* 2012, 13(10), 701-712. ISSN 1471-003X. doi:10.1038/nrn3346
- (71) BRUN, Paola, Maria GIRON, Marsela QESARI et al. Toll-Like Receptor 2 Regulates Intestinal Inflammation by Controlling Integrity of the Enteric Nervous System. *Gastroenterology.* 2013, 145(6), 1323-1333. ISSN 00165085. doi:10.1053/j.gastro.2013.08.047
- (72) SILVA, Ygor, Andressa BERNARDI a Rudimar FROZZA. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Frontiers in Endocrinology.* 2020, 11. ISSN 1664-2392. doi:10.3389/fendo.2020.00025
- (73) LATORRE, R., C. STERNINI, R. DE GIORGIO a B. GREENWOOD-VAN MEERVELD. Enteroendocrine cells: a review of their role in brain-gut communication. *Neurogastroenterol Motil.* 2016, 28(5), 620-630. ISSN 13501925. doi:10.1111/nmo.12754
- (74) KASTIN, Abba, Victoria AKERSTROM a Weihong PAN. Interactions of Glucagon-Like Peptide-1 (GLP-1) with the Blood-Brain Barrier. *Journal of Molecular Neuroscience.* 2002, 18(1-2), 07-13. ISSN 0895-8696. doi:10.1385/JMN:18:1-2:07
- (75) BOHÓRQUEZ, Diego, Rafiq SHAHID et al. Neuroepithelial circuit formed by innervation of sensory enteroendocrine cells. *Journal of Clinical Investigation.* 2015, 125(2), 782-786. ISSN 0021-9738. doi:10.1172/JCI78361
- (76) ZHAO, Hong-Wei et al. Effect of toll-like receptor 3 agonist poly I: C on intestinal mucosa and epithelial barrier function in mouse models of acute colitis. *World Journal of Gastroenterology.* 2017, 23(6), 999-1009. ISSN 1007-9327. doi:10.3748/wjg.v23.i6.999
- (77) MARK, Karen a Donald MILLER. Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF- α exposure. *Life Sciences.* 1999, 64(21), 1941-1953. ISSN 00243205. doi:10.1016/S0024-3205(99)00139-3
- (78) WAGNER-SKACEL, Jolana, Nina DALKNER, Sabrina MOERKL et al. Sleep and Microbiome in Psychiatric Diseases. *Nutrients.* 2020, 12(8). ISSN 2072-6643. doi:10.3390/nu12082198
- (79) SEN, Paromita, Alicia MOLINERO-PEREZ et al. Microbiota and sleep: awakening the gut feeling. *Trends in Molecular Medicine.* 2021, 27(10), 935-945. ISSN 14714914. doi:10.1016/j.molmed.2021.07.004

- (80) OGAWA, Yukino, Chika MIYOSHI, Nozomu OBANA et al. Gut microbiota depletion by chronic antibiotic treatment alters the sleep/wake architecture and sleep EEG power spectra in mice. *Scientific Reports*. 2020, 10(1). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-020-76562-9
- (81) HEATH, Anne-Louise, Jillian HASZARD, Barbara GALLAND et al. Association between the faecal short-chain fatty acid propionate and infant sleep. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2020, 74(9), 1362-1365. ISSN 0954-3007. doi:10.1038/s41430-019-0556-0
- (82) SZENTIRMAI, Éva et al. Butyrate, a metabolite of intestinal bacteria, enhances sleep. *Scientific Reports*. 2019, 9(1). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/s41598-019-43502-1
- (83) ZHANG, Yujing, Bing XIE, Xiaoyan CHEN, Jiancheng ZHANG a Shiyang YUAN. A key role of gut microbiota-vagus nerve/spleen axis in sleep deprivation-mediated aggravation of systemic inflammation after LPS administration. *Life Sciences*. 2021, 265(118736). ISSN 00243205. doi:10.1016/j.lfs.2020.118736
- (84) POROYKO, Valeriy et al. Chronic Sleep Disruption Alters Gut Microbiota, Induces Systemic and Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Mice. *Scientific Reports*. 2016, 6(35405). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/srep35405
- (85) MA, Weini, Jing SONG, Heran WANG et al. Chronic paradoxical sleep deprivation-induced depressionlike behavior, energy metabolism and microbial changes in rats. *Life Sciences*. 2019, 225, 88-97. ISSN 00243205. doi:10.1016/j.lfs.2019.04.006
- (86) FETISSOV, Sergueï, Maria HAMZE SINNO et al. Autoantibodies against appetite-regulating peptide hormones and neuropeptides: Putative modulation by gut microflora. *Nutrition*. 2008, 24(4), 348-359. ISSN 08999007. doi:10.1016/j.nut.2007.12.006
- (87) KORF, Horst-Werner a Morten MØLLER. Arcuate nucleus, median eminence, and hypophysial pars tuberalis. *The Human Hypothalamus - Middle and Posterior Region*. Elsevier, 2021, 180, 227-251. Handbook of Clinical Neurology. ISBN 9780128201077. doi:10.1016/B978-0-12-820107-7.00015-X
- (88) SMITKA, Kvido et al. Current Aspects of the Role of Autoantibodies Directed Against Appetite-Regulating Hormones and the Gut Microbiome in Eating Disorders. *Frontiers in Endocrinology*. 2021, 12(613983). ISSN 1664-2392. doi:10.3389/fendo.2021.613983
- (89) FETISSOV, Sergueï, Jaanus HARRO, Maiken JAANISK et al. Autoantibodies against neuropeptides are associated with psychological traits in eating disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2005, 102(41), 14865-14870. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.0507204102
- (90) LECOMTE, Alexandre et al. Gut microbiota composition is associated with narcolepsy type 1. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*. 2020, 7(6), 896. ISSN 2332-7812. doi:10.1212/NXI.0000000000000896
- (91) ZHANG, Ruirui et al. Gut Microbiota in Patients with Type 1 Narcolepsy. *Nature and Science of Sleep*. 2021, 13, 2007-2018. ISSN 1179-1608. doi:10.2147/NSS.S330022

- (92) FERRELL, Jessica a John CHIANG. Short-Term Circadian Disruption Impairs Bile Acid and Lipid Homeostasis in Mice. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. 2015, 1(6), 664-677. ISSN 2352345X. doi:10.1016/j.jcmgh.2015.08.003
- (93) WANG, F., L. ZHANG, Y. ZHANG et al. Meta-analysis on night shift work and risk of metabolic syndrome. *Obesity Reviews*. 2014, 15(9), 709-720. ISSN 14677881. doi:10.1111/obr.12194
- (94) RIDLON, Jason et al. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *Journal of Lipid Research*. 2006, 47(2), 241-259. ISSN 00222275. doi:10.1194/jlr.R500013-JLR200
- (95) MARTÍNEZ, Inés, Grant WALLACE et al. Diet-Induced Metabolic Improvements in a Hamster Model of Hypercholesterolemia Are Strongly Linked to Alterations of the Gut Microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75(12), 4175-4184. ISSN 0099-2240. doi:10.1128/AEM.00380-09
- (96) LAHTI, Leo, Anne SALONEN et al. Associations between the human intestinal microbiota, Lactobacillus rhamnosus GG and serum lipids indicated by integrated analysis of high-throughput profiling data. *PeerJ*. 2013, 1(32). ISSN 2167-8359. doi:10.7717/peerj.32
- (97) BENEDICT, Christian et al. Gut microbiota and glucometabolic alterations in response to recurrent partial sleep deprivation in normal-weight young individuals. *Molecular Metabolism*. 2016, 5(12), 1175-1186. ISSN 22128778. doi:10.1016/j.molmet.2016.10.003
- (98) GOMEZ-ARANGO et al. Low dietary fiber intake increases Collinsella abundance in the gut microbiota of overweight and obese pregnant women. *Gut Microbes*. 2018, 9(3), 189-201. ISSN 1949-0976. doi:10.1080/19490976.2017.1406584
- (99) CANDELA, Marco et al. Modulation of gut microbiota dysbioses in type 2 diabetic patients by macrobiotic Ma-Pi 2 diet. *British Journal of Nutrition*. 2016, 116(1), 80-93. ISSN 0007-1145. doi:10.1017/S0007114516001045
- (100) KARLSSON, Fredrik et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nature Communications*. 2012, 3(1). ISSN 2041-1723. doi:10.1038/ncomms2266
- (101) GOMEZ-ARANGO et al. Connections Between the Gut Microbiome and Metabolic Hormones in Early Pregnancy in Overweight and Obese Women. *Diabetes*. 2016, 65(8), 2214-2223. ISSN 0012-1797. doi:10.2337/db16-0278
- (102) CHEN, Jun, Kerry WRIGHT, John DAVIS et al. An expansion of rare lineage intestinal microbes characterizes rheumatoid arthritis. *Genome Medicine*. 2016, 8(1). ISSN 1756-994X. doi:10.1186/s13073-016-0299-7
- (103) GROSICKI, Gregory et al. Self-reported sleep quality is associated with gut microbiome composition in young, healthy individuals: a pilot study. *Sleep Medicine*. 2020, 73, 76-81. ISSN 13899457. doi:10.1016/j.sleep.2020.04.013
- (104) BOWERS, Samuel, Fernando VARGAS, Antonio GONZÁLEZ et al. Repeated sleep disruption in mice leads to persistent shifts in the fecal microbiome and metabolome. *PLOS ONE*. 2020, 15(2). ISSN 1932-6203. doi:10.1371/journal.pone.0229001

- (105) LOPETUSO, Loris, Franco SCALDAFERRI, Valentina PETITO a Antonio GASBARRINI. Commensal Clostridia: leading players in the maintenance of gut homeostasis. *Gut Pathogens*. 2013, 5(1). ISSN 1757-4749. doi:10.1186/1757-4749-5-23
- (106) BOESMANS, Leen et al. Butyrate Producers as Potential Next-Generation Probiotics: Safety Assessment of the Administration of *Butyricoccus pullicaecorum* to Healthy Volunteers. *MSystems*. 2018, 3(6), 00094-18. ISSN 2379-5077. doi:10.1128/mSystems.00094-18
- (107) FORBES, Jessica et al. The Gut Microbiota in Immune-Mediated Inflammatory Diseases. *Frontiers in Microbiology*. 2016, 7(1081). ISSN 1664-302X. doi:10.3389/fmicb.2016.01081
- (108) FENG, Tao, Hongxiang DING, Jing WANG, Wei XU, Yan LIU a Ákos KENÉZ. Alterations of Serum Metabolites and Fecal Microbiota Involved in Ewe Follicular Cyst. *Frontiers in Microbiology*. 2021, 12(675480). ISSN 1664-302X. doi:10.3389/fmicb.2021.675480
- (109) ZHOU, Yunzhe et al. Gut Microbiota Changes and Their Correlation with Cognitive and Neuropsychiatric Symptoms in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2021, 81(2), 583-595. ISSN 13872877. doi:10.3233/JAD-201497
- (110) KRAJMALNIK-BROWN, Rosa, Zehra-Esra ILHAN, Dae-Wook KANG a John DIBAISE. Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. *Nutrition in Clinical Practice*. 2012, 27(2), 201-214. ISSN 0884-5336. doi:10.1177/0884533611436116
- (111) TIMS, Sebastian, Catherine DEROM et al. Microbiota conservation and BMI signatures in adult monozygotic twins. *The ISME Journal*. 2013, 7(4), 707-717. ISSN 1751-7362. doi:10.1038/ismej.2012.146
- (112) SCHWIERTZ, Andreas et al. Microbiota and SCFA in Lean and Overweight Healthy Subjects. *Obesity*. 2010, 18(1), 190-195. ISSN 19307381. doi:10.1038/oby.2009.167
- (113) CANI, Patrice, Clara DEPOMMIER, Muriel DERRIEN, Amandine EVERARD a Willem DE VOS. *Akkermansia muciniphila*: paradigm for next-generation beneficial microorganisms. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2022. ISSN 1759-5045. doi:10.1038/s41575-022-00631-9
- (114) SCHNEEBERGER, Marc et al. *Akkermansia muciniphila* inversely correlates with the onset of inflammation, altered adipose tissue metabolism and metabolic disorders during obesity in mice. *Scientific Reports*. 2015, 5(1). ISSN 2045-2322. doi:10.1038/srep16643
- (115) MBAKWA, Catherine et al. Gut colonization with *Methanobrevibacter smithii* is associated with childhood weight development. *Obesity*. 2015, 23(12), 2508-2516. ISSN 19307381. doi:10.1002/oby.21266
- (116) PROCHAZKOVA, Petra, Radka ROUBALOVA, Jiri DVORAK et al. The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. *Gut Microbes*. 2021, 13(1). ISSN 1949-0976. doi:10.1080/19490976.2021.1902771
- (117) SAMUEL, Buck et al. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007, 104(25), 10643-10648. ISSN 0027-8424. doi:10.1073/pnas.0704189104

- (118) WRIGHT, Suzanne a Louis ARONNE. Causes of obesity. *Abdominal Radiology*. 2012, 37(5), 730-732. ISSN 2366-004X. doi:10.1007/s00261-012-9862-x
- (119) TABUCHI, S. et al. Conditional Ablation of Orexin/Hypocretin Neurons: A New Mouse Model for the Study of Narcolepsy and Orexin System Function. *Journal of Neuroscience*. 2014, 34(19), 6495-6509. ISSN 0270-6474. doi:10.1523/JNEUROSCI.0073-14.2014
- (120) WEERSMA, Rinse *et al.* Interaction between drugs and the gut microbiome. *Gut*. 2020, 69(8), 1510-1519. ISSN 0017-5749. doi:10.1136/gutjnl-2019-320204
- (121) MCEWEN, Bruce a John WINGFIELD. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*. 2003, 43(1), 2-15. ISSN 0018506X. doi:10.1016/S0018-506X(02)00024-7
- (122) HUANG, Niannian et al. Role of Actinobacteria and Coriobacteriia in the antidepressant effects of ketamine in an inflammation model of depression. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2019, 176, 93-100. ISSN 00913057. doi:10.1016/j.pbb.2018.12.001
- (123) SUBBA, Rhea *et al.* Pathophysiology linking depression and type 2 diabetes: Psychotherapy, physical exercise, and fecal microbiome transplantation as damage control. *European Journal of Neuroscience*. 2021, 53(8), 2870-2900. ISSN 0953-816X. doi:10.1111/ejn.15136
- (124) SINHA, Rajita. Chronic Stress, Drug Use, and Vulnerability to Addiction. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2008, 1141(1), 105-130. ISSN 00778923. doi:10.1196/annals.1441.030
- (125) FITZPATRICK, Zachary, Gordon FRAZER, Ashley FERRO et al. Gut-educated IgA plasma cells defend the meningeal venous sinuses. *Nature*. 2020, 587(7834), 472-476. ISSN 0028-0836. doi:10.1038/s41586-020-2886-4
- (126) BRETON, Jonathan *et al.* Elevated plasma concentrations of bacterial ClpB protein in patients with eating disorders. *International Journal of Eating Disorders*. 2016, 49(8), 805-808. ISSN 0276-3478. doi:10.1002/eat.22531
- (127) MICHAEL CONLON, J. The origin and evolution of peptide YY (PYY) and pancreatic polypeptide (PP). *Peptides*. 2002, 23(2), 269-278. ISSN 01969781. doi:10.1016/S0196-9781(01)00608-8
- (128) OKUN, M.L., S. GIESE, L. LIN, M. EINEN, E. MIGNOT a M.E. COUSSONS-READ. Exploring the cytokine and endocrine involvement in narcolepsy. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2004, 18(4), 326-332. ISSN 08891591. doi:10.1016/j.bbi.2003.11.002
- (129) MOHAMMADI, Soheil, Mahsa MAYELI, Amene SAGHAZADEH a Nima REZAEI. Cytokines in narcolepsy: A systematic review and meta-analysis. *Cytokine*. 2020, 131(155103). ISSN 10434666. doi:10.1016/j.cyto.2020.155103
- (130) LAU, Eva, *et al.* The role of I-FABP as a biomarker of intestinal barrier dysfunction driven by gut microbiota changes in obesity. *Nutr Metab (Lond)*. 2016, 13(1). ISSN 1743-7075. doi:10.1186/s12986-016-0089-7