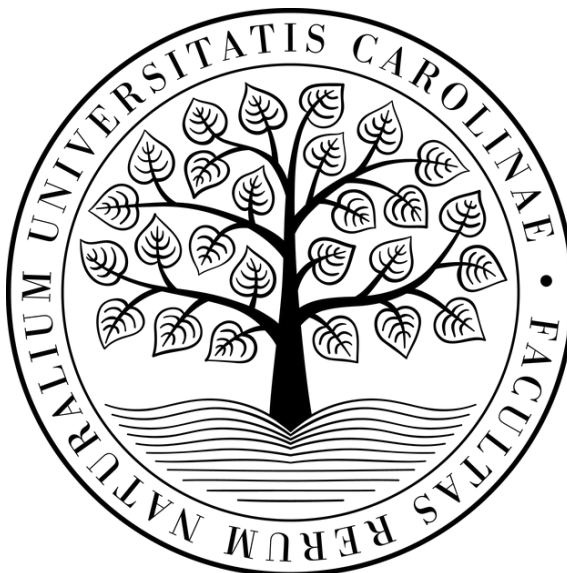


UNIVERZITA KARLOVA

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Studijní program: Biochemie



Bc. Kateřina Zadáková

**Vliv střevní mikrobioty a mikrobiálních metabolitů na vývoj
mentální anorexie v experimentálním myším modelu**

The impact of the gut microbiota and microbial metabolites on the
development of anorexia nervosa in an experimental animal model

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Školitel: RNDr. Radka Roubalová, Ph.D.

Praha 2025

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 dne: 17. 5. 2025


.....

Abstrakt

Mentální anorexie je závažné psychiatrické onemocnění, které postihuje především ženy (až 90 % případů). Pro pacientky je typický extrémně nízký energetický příjem, nízká tělesná hmotnost, zkreslené vnímání vlastního těla a často také nadměrná aktivita. Rostoucí množství důkazů naznačuje, že střevní mikrobiota a její metabolity mohou hrát v tomto onemocnění důležitou roli, neboť se podílejí na regulaci energetického metabolismu, neuroendokrinních funkcí a behaviorálních změn.

V první části této práce byly analyzovány hladiny mastných kyselin s krátkým řetězcem (SCFAs) a vybraných neurotransmiterů ve stolici a krevním séru zdravých kontrol a patientek s mentální anorexií, které byly rozděleny na akutní a chronické. Výsledky ukázaly výrazné nižší koncentrace hlavních mastných kyselin s krátkým řetězcem (acetát, propionát a butyrát) u obou skupin patientek, zatímco rozdíly v hladinách neurotransmiterů nebyly statisticky významné.

V druhé části byla pomocí experimentálního myšího modelu mentální anorexie založeného na aktivitě charakterizována změna vybraných střevních metabolitů a exprese vybraných genů spojených s neurotransmisí v mozku. Myši byly rozděleny do čtyř experimentálních skupin lišících se v přístupu ke krmivu (*ad libitum* vs. restriktce) a přítomnosti běhacího kolečka. Navíc jim byla transplantována střevní mikrobiota zdravých kontrol, akutních nebo chronických patientek. Ze vzorků stolic byly stanoveny hladiny SCFAs a izolována DNA pro účely sekvenace (která nebyla součástí této práce). Genová exprese v hypotalamu byla hodnocena pomocí kvantitativní PCR.

Výsledky ukazují, že u myši kolonizovaných mikrobiotou akutních patientek došlo ke zvýšení exprese všech sledovaných hypotalamických genů, a to zejména ve skupinách s přístupem k běhacímu kolečku. Myši kolonizované mikrobiotou od patientek s mentální anorexií zároveň vykazovaly výraznější nárůst hmotnosti a zvýšenou aktivitu, což může naznačovat specifické interakce mezi střevní mikrobiotou, energetickým metabolismem a behaviorálními projevy souvisejícími s mentální anorexií.

Klíčová slova: střevní mikrobiom, osa střevo-mozek, mentální anorexie, mastné kyseliny s krátkým řetězcem, neurotransmitery

Abstract

Anorexia nervosa is a serious psychiatric disorder that predominantly affects women (up to 90% of cases). Patients are characterized by extremely low energy intake, low body weight, distorted perception of their own body and often excessive activity. A growing body of evidence suggests that gut microbiota and its metabolites may play a crucial role in this condition, as they are involved in the regulation of energy metabolism, neuroendocrine functions, and behavioural changes.

In the first part of this thesis, levels of short-chain fatty acids (SCFAs) and selected neurotransmitters were analysed in the stool and blood serum of healthy controls and patients with anorexia nervosa, divided into acute and chronic patients. The results revealed significantly lower concentrations of the main SCFAs (acetate, propionate, and butyrate) in both patient groups, while differences in neurotransmitter levels were not statistically significant.

In the second part, an activity-based anorexia (ABA) mouse model was used to characterize changes in the selected gut metabolites and the expression of selected genes related to neurotransmission in the brain. Mice were divided into four experimental groups differing in food access (*ad libitum* vs. restriction) and access to a running wheel. Additionally, they received fecal microbiota transplants from healthy controls, acute patients, or chronic patients. Stool samples were used for SCFA quantification and DNA isolation for sequencing (sequencing itself was not part of this thesis). Gene expression in the hypothalamus was assessed using quantitative PCR.

The results show that mice colonized with microbiota from acute patients exhibited increased expression of all analysed hypothalamic genes, particularly in groups with access to the running wheel. Moreover, mice colonized with microbiota from anorexia nervosa patients demonstrated greater weight gain and higher activity, suggesting potential specific interactions between gut microbiota, energy metabolism, and behavioural manifestations associated with anorexia nervosa.

Key words: gut microbiome, gut-brain axis, anorexia nervosa, short-chain fatty acids, neurotransmitters

[IN CZECH]

Poděkování:

Tímto bych chtěla velmi poděkovat všem, kteří mě na mé cestě k dokončení této diplomové práce podporovali. Zvláštní poděkování patří mé vedoucí práce RNDr. Radce Roubalové, Ph.D za její odborné vedení, trpělivost, cenné rady a neustálou ochotu pomoci. Její podpora byla pro mě neocenitelná. Velké dík patří také všem mým kolegům z laboratoře buněčné a molekulární imunologie a z laboratoře enviromentální biotechnologie, kteří mi byli vždy nápomocní. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat celé mé rodině a přátelům, kteří při mně po celou dobu stáli a podporovali mě.

Obsah

Seznam zkratk a symbolů.....	9
1 Úvod	11
2 Literární přehled.....	12
2.1 Střevní mikrobiom	12
2.1.1 Mikrobiální metabolity	15
2.2 Osa střevo-mozek.....	21
2.3 Mentální anorexie	25
2.3.1 Diagnostika mentální anorexie.....	27
2.3.2 Léčba mentální anorexie	28
2.4 Myší model mentální anorexie.....	30
3 Cíle práce.....	32
4 Materiál a metody.....	33
4.1 Použité chemikálie a biologický materiál	33
4.2 Použité přístroje a programy	35
4.3 Použité metody.....	37
4.3.1 Skupina pacientek a zdravých kontrol	37
4.3.2 Analýza neurotransmiterů ve stolici zdravých kontrol a pacientek s AN... 38	
4.3.3 Analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem ve stolici zdravých kontrol a pacientek s AN.....	41
4.3.4 Analýza neurotransmiterů v krevním séru zdravých kontrol a pacientek s AN.....	43
4.3.5 Analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem v krevním séru zdravých kontrol a pacientek s AN	43
4.3.6 Myší model	44
4.3.7 Izolace DNA z myší stolice.....	46
4.3.8 Detekce genové exprese v hypotalamu myší.....	47
4.3.9 Analýzy mastných kyselin s krátkým řetězcem v myší stolici	50

5	Výsledky	54
5.1	Skupina pacientek a zdravých kontrol.....	54
5.2	Analýza neurotransmiterů ve stolici a krevním séru zdravých kontrol a pacientek s AN.....	54
5.3	Analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem ve stolici a krevním séru zdravých kontrol a pacientek s AN	57
5.4	Myší model.....	59
5.5	Změny genové exprese v hypotalamu myši s transplantovanou střevní mikrobiotou.....	63
5.6	Analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem a neurotransmiterů v myší stolici.....	72
6	Diskuze	77
7	Souhrn.....	84
	Seznam použité literatury	86

Seznam zkratk a symbolů

ABA – myší model mentální anorexie (z anglického „Activity-Based Anorexia“)

AgRP – peptid příbuzný agouti (z anglického „Agouti-Related Peptide“)

AN – mentální anorexie (z latinského „Anorexia Nervosa“)

CART – transkript regulovaný amfetaminem a kokainem (z anglického „Cocaine and Amphetamine Regulated Transcript“)

cDNA – komplementární DNA (z anglického „complementary DNA“)

CNS – centrální nervová soustava

CoA – koenzym A (z anglického „Coenzyme A“)

dA(C, T, G)TP – deoxyadenosin(cytidin, thymidin, guanosin)trifosfát (z anglického „deoxyAdenosine(Cytidine, Thymidine, Guanosine)TriPhosphate“)

dNTP – deoxynukleotidtrifosfát (z anglického „deoxyNucleoside TriPhosphate“)

DSM-5 – diagnostický a statistický manuál duševních poruch 5. vydání (z anglického „Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, fifth edition“)

DTT – DiThioThreitol

EI – elektronová ionizace (z anglického „Electron Ionization“)

F primer (z anglického „Forward“)

FMT – fekální transplantace střevní mikrobioty (z anglického „Fecal Microbiota Transplant“)

GABA – γ -aminomáselná kyseliny (z anglického „ γ -AminoButyric Acid“)

GC-MS – plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (z anglického „Gas Chromatography-Mass Spectrometry“).

GF – bezmikrobní (z anglického „Germ-Free“)

GIT – gastrointestinální trakt

LC-MS/MS – kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z anglického „Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry“)

L-DOPA – 3,4-dihydroxyfenylalanin (z anglického „L-3,4-DihydroxyPhenylAlanine“)

MKN-11 – mezinárodní klasifikace nemocí 11. vydání

NPY – neuropeptid Y

oligodT – oligodeoxyThymidin

POMC – proopiomelanokortin (z anglického „Pro-OpioMelanoCortin“)

qPCR – kvantitativní polymerasova řetězová (z anglického „quantitative Polymerase Chain Reaction“)

R primer (z anglického „Reverse“)

SCFAs – mastné kyseliny s krátkým řetězcem (z anglického „Short-Chain Fatty Acids“)

SIM – režim monitorování vybraných iontů (z anglického „Selected Ion Monitoring“)

TIC – režim celkového iontového proudu (z anglického „Total Ion Current“)

UV – ultrafialové záření (anglického „UltraViolet“)

1 Úvod

Mentální anorexie (AN) je závažné psychiatrické onemocnění, které se vyznačuje extrémním omezením energetického příjmu, výrazným úbytkem tělesné hmotnosti, intenzivním strachem z tloušťky a zkresleným vnímáním vlastního těla. Toto onemocnění má nejvyšší mortalitu ze všech psychiatrických diagnóz a v 90 % postihuje ženy. Nejčastěji se rozvíjí v období adolescence a její chronický průběh může vést k těžkým somatickým a psychickým následkům.

Přes rozsáhlý výzkum není dosud zcela objasněna etiopatogeneze mentální anorexie. Mezi hlavní rizikové faktory se řadí psychosociální stresory, neurobiologické změny a genetická predispozice, nicméně neexistuje nic, co by se dalo nazývat genem mentální anorexie. V posledních letech se pozornost výzkumníků stále více obrací i ke střevní mikrobiotě a jejím metabolickým produktům neboli ke střevnímu mikrobiomu. Střevní mikrobiota je komplexní ekosystém tvořený především bakteriemi, houbami, archei a viry, z čehož nejhojněji zastoupeny jsou bakterie. Její složení je pro každého jedince unikátní a závisí na mnoha faktorech jako je strava, spánek, pohyb, užívané léky a mnoho dalšího. Střevní mikrobiom hraje zásadní roli v trávení, imunitní regulaci a také v tzv. ose střevo-mozek, což je obousměrný komunikační systém propojující střevní mikrobiální prostředí s centrálním nervovým systémem [1, 2].

Existují důkazy, že změny ve složení mikrobioty (dysbióza) a produkci mikrobiálních metabolitů, jako jsou například mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFAs), mohou ovlivňovat neuroendokrinní signalizaci, úroveň úzkosti, náladu, a dokonce příjem potravy [3]. Pacientky s mentální anorexií často vykazují odlišné složení střevní mikrobioty, snížené hladiny SCFAs a zvýšenou propustnost střevní bariéry, což by mohlo přispívat k udržování patologického stavu [4].

Tato práce si klade za cíl prohloubit poznání vztahu mezi mikrobiotou a mozkem v kontextu mentální anorexie a otevřít možnosti budoucího využití mikrobiálně cílených terapií. V první části byly zjišťovány hladiny vybraných mikrobiálních metabolitů ve stolici zdravých kontrol a pacientek s AN, které byly podle délky trvání onemocnění rozděleny na akutní a chronické. Ve druhé části byl zaveden experimentální myší model anorexie založený na aktivitě, na kterém byl sledován vliv transplantované lidské mikrobioty na metabolické změny ve střevě a změny genové exprese v hypothalamu.

2 Literární přehled

2.1 Střevní mikrobiom

Střevní mikrobiom je soubor všech mikroorganismů osidlující střevo a jejich genetická výbava a produkty. Střevní mikrobiota představuje společenství mikroorganismů osidlující trávicí trakt, která zahrnuje bakterie, houby, archea, viry a další mikroorganismy [5–7]. Obecně se odhaduje, že střevní mikrobiota se skládá přibližně z 10^{14} mikroorganismů, jejichž genom obsahuje 100× více genů než vlastní lidský genom a počet buněk je přibližně 1,3× větší než počet lidských somatických a zárodečných buněk [8, 9]. Ze všech mikroorganismů jsou nejvíce zastoupeny bakterie, a ačkoliv má každý člověk jedinečné složení svého střevního mikrobiomu, obecně jsou nejvíce zastoupeny kmene *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* a *Actinobacteria* [1].

Pro osídlení střevní mikrobiotou jsou nejdůležitější první 2–3 roky života, kdy je utvářena mnoha faktory, jako je mateřská střevní mikroflóra, způsob porodu, kojení a antibiotika [10, 11]. První mikroorganismy novorozence pocházejí z mikrobioty matky v oblasti vagíny, stolice, mateřského mléka, kůže a úst. Děti narozené císařským řezem vykazují rozdílné složení střevní mikrobioty z důvodu absence průchodu porodními cestami matky [12, 13]. Za jeden z nejvlivnějších faktorů na správný vývoj střevní mikrobioty v prvních letech života je považováno kojení, díky kterému se ve střevě tvoří tzv. *Bifidus flora*. Mateřské mléko obsahuje živiny nezbytné pro správný růst a vývoj dítěte a nesčetné množství bioaktivních molekul ovlivňující mikrobiální kolonizaci. Nejhojněji zastoupenou makroživinou v mateřském mléce jsou sacharidy. Jako paradox se však může jevit fakt, že kojenci nejsou schopni oligosacharidy mateřského mléka plně strávit. Tyto oligosacharidy jsou primárně fermentovány ve střevě pomocí bakterie rodu *Bifidobacterium* a slouží tak jako prebiotika – potrava pro zdraví prospěšné bakterie [13–16]. Dětská mikrobiota prochází velikou změnou po přechodu na pevnou stravu, kdy do té doby převažující rod *Bifidobacterium* začíná být nahrazován především bakteriemi kmene *Bacteroidetes* a *Firmicutes*. V této době se zvyšuje diverzita střevní mikrobioty a začíná se měnit také její funkce, jelikož pevná strava podporuje růst bakterií schopných využívat širší škálu látek, syntetizovat vitamíny a metabolizovat xenobiotika. Okolo třetího roku života se začíná složení střevní mikrobioty stabilizovat a získává podobu dospělého střevního mikrobiomu, který však může být stále ovlivňován mnoha faktory [13, 17, 18].

Nepopíratelně největší vliv na složení střevní mikrobioty má strava. Zdravý střevní mikrobiom je víceméně vždy spojen s dostatečnou konzumací vlákniny, která je v civilizovaných částech světa velice podceňována. Vláknina se skládá z rostlinných sacharidů, které jsou pro člověka nestravitelné, avšak mohou být metabolizovány anaerobní fermentací některými střevními mikroorganismy za produkce mastných kyselin s krátkým řetězcem [19]. Strava s vysokým obsahem vlákniny podporuje ve střevech růst bakterií rodů *Bifidobacterium* a *Lactobacillus*, které jsou známé pro svoji schopnost degradovat vlákninu [20]. Kromě zvýšení rozmanitosti střevní mikrobioty konzumace vlákniny zabraňuje vyššímu nárůstu bakterií degradující mucin, které porušují hlenovou bariéru střeva a zvyšují tak náchylnost k patogenům [21]. V současné době mnoho lidí ve vyspělých zemích nedosahuje doporučeného denního příjmu vlákniny (dle WHO: dospělý 25 g/den), což může přispívat k nárůstu obezity a onemocnění spojených s ní, jelikož bylo zjištěno, že vláknina má pozitivní vliv na prevenci obezity. Nicméně přesné mechanismy nejsou zatím plně známy [22, 23].

Kromě vlákniny je pro zdravou střevní mikrobiotu doporučována tzv. středomořská strava, která je obecně spojena s prevencí chronických onemocnění a dlouhověkostí [24, 25]. Středomořská strava je založena na konzumaci rostlinných potravin, olivového oleje, mléčných výrobků (hlavně jogurty a sýry) a střídme konzumaci drůbežího masa, ryb a omezeném množství červeného masa [26]. Lidé stravující se tímto způsobem mívají větší rozmanitost střevní mikrobioty než lidé konzumující západní typ stravy (hodně průmyslově zpracovaných potravin a málo rostlinné stravy). Hlavní rozdíly byly zjištěny ve vyšším zastoupení bakterií rodu *Prevotella*, které jsou schopny fermentovat vlákninu, a ve vyšší produkci SCFAs u lidí konzumující středomořský typ stravy [24, 27].

Důležitou roli ve složení a diverzitě střevní mikrobioty hraje také geografie. Urbanizovaná a industrializovaná prostředí mají obvykle nižší rozmanitost mikroorganismů, kterým jsme v takovýchto prostředí vystavováni, než v přírodnějším prostředí [28]. U lidí žijících ve městech obvykle převažuje rod *Bacteroides*, kdežto u obyvatel vesnic bývá hojněji zastoupen rod *Prevotella*. Ke stejným závěrům došly i studie zabývající se rozdílem složení střevní mikrobioty u obyvatel civilizovaných a rurálních oblastí světa. Na tento rozdíl má nepochybně vliv také strava. Lidé žijící ve městech a obecně civilizovaných částí světa více konzumují průmyslově zpracované potraviny (obsahující řadu konzervantů, umělých barviv a sladidel) a živočišné bílkoviny, což jednak snižuje diverzitu střevní mikrobioty a také podporuje vyšší

zastoupení rodu *Bacteroides*. Lidé žijící na vesnicích, a hlavně v rurálnějších oblastech světa mají stravu více založenou na sacharidech a bohatší na vlákninu, což podporuje vyšší zastoupení rodu *Prevotella*, který lze hojněji nalézt také u vegetariánů, veganů lidí konzumujících výše zmíněnou středomořskou stravu [28–32].

Faktorů, které mají pozitivní vliv na střevní mikrobiotu, existuje celá řada, ale obecně je odborníky doporučován dostatečný spánek, pravidelný pohyb a samozřejmě kvalitní strava s dostatečným množstvím vlákniny [33–35]. Nicméně ačkoliv se doporučují určité stravovací návyky pro zdravý střevní mikrobiom, tak konzumují-li stejnou stravu dva různí jedinci, efekt na jejich střevo a jeho reakce může být různá [36].

Tak jako existuje mnoho faktorů, které mohou střevní mikrobiotu podporovat, existuje mnoho těch, které mohou naopak narušit střevní mikrobiotu a způsobit dysbiózu. Nejběžnějšími rysy střevní dysbiózy jsou snížení diverzity střevní mikrobioty, snížení množství prospěšných mikroorganismů a zároveň přemnožení škodlivých mikroorganismů. Během posledních několika let se stále více ukazuje, že dysbióza střevní mikrobioty může mít vliv na řadu imunitně zprostředkovaných, metabolických, neurodegenerativních a psychiatrických onemocnění, kterých v západních zemích rapidně přibývá. Střevní dysbióza může být způsobena nekvalitním spánkem, stravou založenou na průmyslově zpracovaných potravinách, nadužíváním antibiotik a různými dalšími individuálními aspekty [37, 38]. V posledních letech se začínají studovat potravinové přísady (např. konzervanty), které jsou sice dle příslušných institucí nezávadné, ale u mnoha z nich nebyl jejich vliv na střevní mikrobiom zatím studován [39].

Nedávný vývoj sekvenačních metod a bioinformatiky umožnil podrobnější studium funkcí střevní mikrobioty, která má v lidském těle úlohu především ochrannou, strukturální, neurologickou a metabolickou [40]. Jelikož se ve střevě mohou nacházet i patogenní bakterie, je nutné zabránit jejich přemnožení a šíření dále do organismu. Jedním ze základních mechanismů antimikrobiální ochrany je tvorba mucinového hlenu, který brání kontaktu mikroorganismů s epitelem. Některé druhy bakterií mohou mucin využívat jako zdroj energie [40, 41]. Většinu energie a živin nicméně získávají střevní mikroorganismy fermentací sacharidů, které nebyly stráveny v proximální části GIT, a nestravitelných oligosacharidů za vzniku SCFAs. Členové rodu *Bacteroides* jsou hlavními mikroorganismy podílející se na metabolismu sacharidů a bylo zjištěno, že genom *Bacteroides thetaiotaomicron* kóduje dokonce více než 260 hydrolas, což je

mnohem více, než kóduje celý lidský genom [42, 43]. Stejně tak má střevní mikrobiota pozitivní vliv na metabolismus lipidů a proteinů, přičemž některé aminokyseliny jsou bakteriemi přeměněny na antimikrobiální peptidy bakteriociny a další metabolity (viz kap. 2.1.1)[43].

Střevní mikrobiota chrání organismus dvěma hlavními způsoby. Za prvé tím, že přímo soupeří s patogenními mikroorganismy o místo ve střevě a někdy je aktivně potlačuje (například pomocí bakteriocinů). Za druhé tím, že nepřímě ovlivňuje metabolismus a imunitní systém hostitele [44]. Komenzální mikrobiota soutěží s invazivními mikroorganismy o dostupnost zdrojů. Tato kompetice je umožněna díky signálním molekulám, kterými bakteriální buňky nepřetržitě monitorují prostředí a hustotu populace a na základě toho upravují svojí genovou expresi [45]. Střevní mikrobiota je schopna řídit imunitní odpověď také přes metabolity, které mohou například zvýšit produkci antimikrobiálních peptidů nebo regulovat expresi peptidů udržující těsná spojení střeva [43, 45].

2.1.1 Mikrobiální metabolity

Bylo prokázáno, že střevní mikrobiota produkuje mnoho různých metabolitů. Tyto mikrobiální produkty hrají pro svého hostitele zásadní roli, jelikož mohou ovlivňovat zdraví jedince po metabolické, neurologické, ale i kardiovaskulární stránce [46].

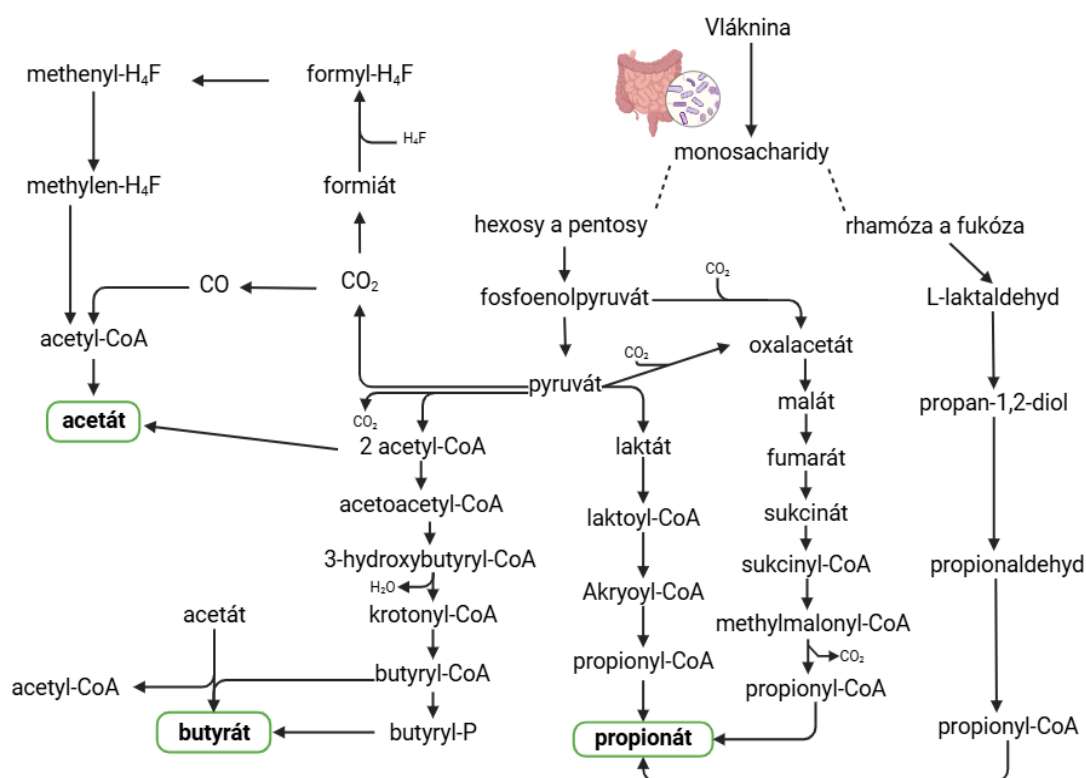
Jak již bylo v předchozí kapitole zmíněno, střevní mikrobiota je schopna anaerobní fermentací vlákniny produkovat mastné kyseliny s krátkým řetězcem. Některé SCFAs mohou vznikat také při metabolismu aminokyselin, avšak tato produkce je minoritní [47]. Z chemického hlediska jsou SCFAs nasycené monokarboxylové organické kyseliny s jedním až šesti uhlíky. Více než 95 % produkovaných SCFAs tvoří acetát (C2), propionát (C3) a butyrát (C4) a to v poměru 60:20:20 [48].

Nejhojněji zastoupený acetát může být střevními bakteriemi produkován z pyruvátu přes acetyl-CoA nebo Wood-Ljungdahlovou cestou, která zahrnuje dvě větve: methylovou – oxid uhličitý je redukován na formiát, který je následně přeměněn na methylovou skupinu, která se váže na kofaktor tetrahydrofolát a karbonylovou, kde je oxid uhličitý redukován až na oxid uhelnatý. Obě větve se následně spojí a pomocí enzymu acetyl-CoA syntasy vzniká acetyl-CoA. Přeměna acetyl-CoA na výsledný acetát je reakce katalyzována enzymy fosfotransacetylase a acetátkinasou za vzniku energie ve formě ATP [49, 50]. Syntéza acetátu je schematicky znázorněna na Obrázku 1 na str.17.

Propionát je ve střevě produkován třemi různými metabolickými cestami. Nejběžnější je cesta přes sukcinát, který vzniká z pyruvátu. Tato dráha je založena na konverzi sukcinátu na methylmalonyl-CoA, který je následně dekarboxylován na propionyl-CoA. Tato dekarboxylace je u některých druhů bakterií spojena s transportem sodíků přes membránu, což usnadňuje tvorbu ATP prostřednictvím ATPasy translokující sodík [49, 51]. Další možností syntézy je akrylátová dráha, při které je výchozím produktem laktát. Bakterie využívající tuto cestu syntézy si neumí vytvořit laktát sami (např. *Clostridium propionicum*) a využívají laktát produkováný jinými střevními bakteriemi (např. *Bifidobacterium adolescentis*), což je krásným důkazem mikrobiální spolupráce. Po připojení koenzymu A na laktát dochází k oxidaci na akryoyl-CoA, který je následně redukován na propionyl-CoA. Posledním krokem je přeměna na propionát. Tato konverze díky spotřebě elektronů (z $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$) pomáhá udržovat redoxní rovnováhu, avšak nevede k tvorbě proton-motivní síly [49, 51, 52]. Poslední známou cestou syntézy propionátu je propandiolová dráha, která k tvorbě propionátu využívá deoxyhexózové cukry (fukóza a rhamnóza), které se nacházejí hlavně v rostlinných buněčných stěnách a střevním hlenu [49, 53]. L-fukóza/rhamnóza je přes L-laktaldehyd metabolizována až na 1,2-propandiol za spotřeby NADH. Následuje dehydratace za vzniku propionaldehydu, který je přes propionyl-CoA přeměněn až na propionát. Při této konverzi dochází k tvorbě ATP prostřednictvím substrátové fosforylace, což zajišťuje energetický zisk této dráhy [54, 55]. Syntéza propionátu je schematicky znázorněna na Obrázku 1 na str. 17.

Třetí hlavní SCFA butyrát vzniká kondenzací dvou molekul acetyl-CoA a následnou redukcí na butyryl-CoA. Pro konečný krok přeměny na butyrát jsou známy dvě cesty. V první dráze je butyryl-CoA přeměněn na butyrát pomocí enzymů fosfotransbutyrylasa a butyrátkinasa za produkce ATP [56]. V druhé dráze je butyryl-CoA přeměněn pomocí enzymu butyryl-CoA:acetát-CoA transferasa na butyrát. Během této konverze se koenzym A přenáší na exogenně získaný acetát, čímž vzniká acetyl-CoA [57]. Syntéza butyrátu je schematicky znázorněna na Obrázku 1 na str. 17.

Minoritně zastoupené SCFAs, jako je isobutyřát, valerát, isovalerát, 2-methylvalerát, hexanoát a heptanoát, jsou střevní mikrobiotou produkovány fermentací z aminokyselin. Konkrétně isobutyřát, isovalerát a 2-methylvalerát vznikají z aminokyselin valinu, leucinu a isoleucinu, které jsou nejprve transaminovány na příslušné větvené α -ketokyseliny a následně dekarboxylovány na příslušné acyl-CoA deriváty. Konečný krok syntézy je katalyzován enzymem syntasa mastných kyselin, která má schopnost prodlužovat řetězec pomocí malonyl-CoA, a vzniká tak isobutyřát, isovalerát a 2-methylvalerát [58]. U hexanoátu a heptanoátu nebyly zatím cesty syntézy ve střevě příliš prozkoumány, nicméně bylo zjištěno více cest syntézy hexanoátu v anaerobním prostředí, a to fermentací ze sacharidů nebo prodlužováním řetězce, nicméně součástí výzkumu byly bakterie, které se nenacházejí v lidském střevě [59, 60].



Obrázek 1: Schéma metabolických drah hlavních SCFAs – acetátu, propionátu a butyrátu využívané střevní mikrobiotou. Schéma bylo vytvořeno pomocí programu BioRender na základě publikace Koh a kolektivu [46].

Po produkci jsou osudy hlavních SCFAs ve střevě různé. Butyrát je pro kolonocyty preferovaným zdrojem energie, a tudíž dochází k jeho rychlému vychytávání. Neiontová forma je absorbována prostřednictvím pasivní difúze nebo aktivního transportu s nosičem. Butyrát se však v důsledku pH vyskytuje ve střevě především ve své aniontové formě a tato ionizovaná forma je absorbována aktivním transportem zprostředkovaným H^+ -dependentním monokarboxylátovým transportérem 1 a Na^+ -dependentním

monokarboxylátovým transportérem 1 [49, 61]. V kolonocytech je butyrát přeměňován na acetyl-CoA, který může vstupovat do cyklu trikarboxylových kyselin za produkce ATP. Butyrát, který není využit kolonocyty, může vstupovat portálním oběhem do jater, kde je též metabolizován na acetyl-CoA sloužící jako substrát pro mastné kyseliny, cholesterol a ketolátky [62, 63, 61].

Propionát je do kolonocytů absorbován stejně jako butyrát aktivním transportem zprostředkovaným H^+ -dependentním monokarboxylátovým transportérem 1 s tím rozdílem, že není využíván jako primární zdroj energie, ale je odváděn portální žílou do jater [49, 64]. V játrech složí propionát především jako substrát pro glukoneogenezi, kdy je přeměněn na sukcinyl-CoA, který vstupuje do Krebsova cyklu a dochází k produkci oxalacetátu. Ten může být následně využit pro syntézu glukózy [65].

Acetát mohou kolonocyty absorbovat stejným způsobem jako butyrát a propionát a většina acetátu pokračuje dále do portálního oběhu [49, 66]. V játrech je část acetátu metabolizována za vzniku acetyl-CoA, který může být využit jako substrát pro mastné kyseliny, ketolátky či Krebsův cyklus [67]. V celkovém oběhu je acetát nejhojněji zastoupenou SCFAs, avšak cirkulující acetát pochází ze tří zdrojů: (1) endogenní acetogeneze z hydrolýzy acetyl-CoA, (2) exogenní acetát ze stravy a (3) acetogeneze ze střevních bakterií [68].

Stejně jako hlavní SCFAs jsou i ty minoritně zastoupené absorbovány obdobnými mechanismy kolonocytů, kde mohou být stejně jako butyrát využity jako zdroj energie [69]. Nejsou-li využity, putují dále do portálního oběhu až do jater, kde se mohou podílet na regulaci metabolismu cholesterolu a glukózy nebo na produkci ATP [70, 71].

Funkce SCFAs v lidském těle je velice rozmanitá. Krom toho, že některé SCFAs mohou sloužit jako substrát pro produkci jiných SCFAs střevní mikrobiotou, mají vliv také na zdraví střeva obecně. Butyrát se kromě výživy střevního epitelu podílí na obnově střevní integrity a zároveň reguluje proliferaci, apoptózu a buněčnou diferenciaci. Tento účinek může být zprostředkován upregulací těsných spojů. Zároveň některé studie naznačují, že butyrát může také regulovat remodelaci těsných spojů během dozrávání bariérové funkce [72]. Dále se SCFAs podílejí na signalizaci díky své schopnosti vázat se na receptory spřažené s G-proteiny. Takto mohou ve střevě například stimulovat sekreci peptidu YY nebo glukagon-like peptidu 1 (GLP-1), které navozují pocit sytosti [73]. Další možnost signalizace spočívá v inhibici histonových deacetylas (HDAC). Acetylace

lysínových zbytků v histonech indukuje aktivaci genu tím, že je usnadněn přístup transkripčních faktorů k oblastem promotoru, a právě inhibice HDAC vede k vyšší genové expresi. Za nejúčinnější inhibitor HDAC je považován butyrát a tento signalizační mechanismus byl nalezen jak ve střevě, tak i v periferním a centrálním nervovém systému [74, 75]. Ačkoliv se dostane pouze malé množství z vyprodukovaných SCFAs do systémové cirkulace, i zde mají svůj význam. Již byl nastíněn vliv SCFAs na metabolismus glukózy a lipidů, avšak SCFAs mají vliv také například na imunitní systém, jelikož jsou schopny indukovat diferenciaci T buněk a kontrolovat zánět [76]. SCFAs jsou schopné projít skrz hematoencefalickou bariéru a tím přímo působit v mozku. Integrita hematoencefalické bariéry je ovlivnitelná SCFAs. Bylo zjištěno, že snížené množství SCFAs ve střevě bylo doprovázeno sníženou expresí claudinu-5 a okcludinu, což jsou hlavní strukturní a funkční složky těsných spojů [77]. Přibližně 10–15 % buněk v mozku tvoří mikroglie, což jsou specializované imunitní buňky CNS. Ukazuje se, že jsou mikroglie citlivé na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, jejichž koncentrace v mozku bývá obdobná s koncentrací v krevní plazmě. Bylo zjištěno, že SCFAs mají vliv na správné dozrávání mikroglie a současně mohou snižovat produkci prozánětlivých cytokinů [75, 77].

Střevní mikrobiota je producentem i dalších velmi důležitých metabolitů a jednu celou skupinu tvoří neurotransmitery, které mohou být střevní mikrobiotou produkovány a modulovány. Střevo je hlavním místem produkce serotoninu, neboť přibližně 90 % celkového serotoninu je tvořeno střevními enterochromafinními buňkami [78]. Serotonin neboli 5-hydroxytryptamin je syntetizován z L-tryptofanu, který je esenciální aminokyselinou získávanou výhradně ze stravy [79]. L-tryptofan je pomocí enzymu tryptofanhydroxylasy 1 přeměněn na L-5-hydroxytryptofan a následně dekarboxylován na 5-hydroxytryptamin, který je vylučován do lumen střeva a do krve. Střevní mikrobiota jako taková serotonin produkuje jen v zanedbatelném množství, avšak může ovlivňovat jeho syntézu. Mikrobiální produkty SCFAs mohou syntézu serotoninu zvýšit stimulací syntézy tryptofanhydroxylasy 1 nebo tím, že dodávají energii enterochromafinním buňkám [80]. Ve střevě podporuje serotonin motilitu střev a po svém využití je zpětně vychytáván prostřednictvím serotoninových transportérů [81]. Ačkoliv serotonin produkován ve střevě nemůže překročit hematoencefalickou bariéru, může ovlivňovat lidský mozek prostřednictvím dráhy střevo-mozek. Naopak prekurzor L-tryptofan se přes hematoencefalickou bariéru dostat může [82].

Kromě serotoninu je tryptofan ve střevě metabolizován také kynureninovou dráhou, která zpracuje přibližně 90 % veškerého tryptofanu. Prvním krokem této dráhy je přeměna tryptofanu na kynurenin pomocí enzymu indoleamin-2,3-dioxygenasy [83]. Exprese tohoto enzymu je indukována především prozánětlivými cytokiny, zejména interferonem γ , a proto byla proto navržena jako biomarker pro zánětlivá onemocnění GIT. Ve střevě se kynurenin podílí na udržování střevní integrity. Kynurenin může být dále metabolizován dvěma odlišnými větvemi – buď na kyselinu kynurenovou, která má neuroprotektivní účinky, nebo na kyselinu chinolinovou, která je naopak neurotoxická. Aktivita těchto větví závisí na poměru enzymů kynureninaminotransferasy a kynurenin-3-monooxygenasy. Střevní mikrobiota může ovlivnit jak expresi enzymu indoleamin-2,3--dioxygenasy, tak i rovnováhu mezi produkcí kyseliny kynurenové a chinolinové. Oba tyto metabolity nejsou na rozdíl od kynureninu schopné přecházet přes hematoencefalickou bariéru [83–88].

Dalším neurotransmiterem produkovaným ve střevě je kyselina γ -aminomáselná (GABA), která je hlavním inhibičním neurotransmiterem CNS [89]. Hlavní cestou syntézy GABA je dekarboxylace L-glutamátu, který je naopak excitačním neurotransmiterem, za přítomnosti enzymu glutamátdekarboxylasy, jehož funkčnost je závislá na pyridoxal-5-fosfátu [90]. L-glutamát se běžně vyskytuje v mase, sýrech a dnes často používaném dochucovadle glutamátu sodném, nicméně enterocyty či některé střevní bakterie ho umí syntetizovat z glutaminu pomocí glutaminasy [91]. Krom toho že je GABA součástí osy střevo-mozek, působí také pozitivně přímo ve střevech na motilitu GIT díky přítomnosti GABA receptorů [92]. Pro některé bakterie (např. *E. coli*) je GABA dokonce hlavním zdrojem dusíku a uhlíku [93]. GABA i L-glutamát jsou transportovány do portálního oběhu, avšak u obou neurotransmiterů jde pouze o malé množství. Ohledně přechodu přes hematoencefalickou bariéru stále kolují nejasnosti, avšak obecně se uvádí, že dostat se skrz ní nemohou [94].

Neméně důležitým neurotransmiterem vznikajícím ve střevě je dopamin, přičemž enterocyty GIT tvoří přibližně 50 % celkového dopaminu v těle. Prekurzorem dopaminu je aminokyselina L-tyrosin, která je pomocí enzymu tyrosinhydroxylasy hydroxylována na 3,4-dihydroxyfenylalanin neboli L-DOPA. Následně je L-DOPA dekarboxylována enzymem dekarboxylasou aromatických kyselin na dopamin [95]. Výchozí látkou pro syntézu dopaminu může být rovněž fenylalanin, který ale musí být fenylalaninhydroxylasou přeměněn na tyrosin [93]. Dopamin může být dále β -oxidací

přeměněn na norepinefrin (noradrenalin) a ten následně na epinefrin (adrenalin), avšak jejich produkce je ve střevě pouze minoritní [95]. Většina dopaminu vyprodukovaná ve střevě působí lokálně – vazbou na dopaminové receptory může ovlivňovat motilitu střev, přičemž většinou ji tlumí [96]. Ze střeva může být dopamin také transportován do portálního oběhu, kde je částečně degradován v játrech. Malé množství však může přecházet do systémové cirkulace, kde přispívá k regulaci krevního tlaku, hladiny inzulinu a dalších fyziologických procesů [97]. Dopamin samotný nemůže přestoupit hematoencefalickou bariéru, avšak jeho prekurzory L-glutamát a L-DOPA ano [93]. Přesto je dostupnost glutamátu v systémové cirkulaci omezená, neboť je ve velké míře využíván enterocyty již během absorpce a následně metabolizován v játrech, tudíž do systémové cirkulace se dostane jen malé množství i přes jeho vysokou dostupnost ve stravě [98].

Z dalších metabolitů stojí za zmínku hormon a neurotransmiter histamin, který je syntetizován některými střevními bakteriemi z L-histidinu prostřednictvím enzymu histidindekarboxylasy [99]. Dále jsou určité bakterie střevní mikrobioty schopny syntetizovat vitaminy skupiny B a K, které mají řadu významných fyziologických funkcí [100]. Pro vstřebávání lipidů a vitamínů rozpustných v tucích jsou zásadní i cholové kyseliny, což jsou deriváty cholesterolu [101]. Je tedy zřejmé, že střevní mikrobiota produkuje pestrou škálu biologicky aktivních metabolitů. Metabolity zmíněné v tomto odstavci, stejně jako další zde nezmíněné, však již nebudou dále rozebírány, neboť nebyly předmětem experimentální části této diplomové práce.

2.2 Osa střevo-mozek

Střevní mikrobiota nehraje roli pouze v lokálním prostředí trávicího traktu, ale má zásadní vliv i na regulaci funkcí CNS. Osa střevo-mozek představuje komplexní obousměrný komunikační systém, který propojuje střevo a CNS prostřednictvím nervových, endokrinních a imunitních drah. Mezi hlavní funkce této osy patří nejen regulace gastrointestinálních funkcí, ale také propojení dalších střevních procesů, jako je imunitní odpověď, regulace střevní propustnosti či enteroendokrinní signalizace, s emočními a kognitivními centry mozku [2]. Osa střevo-mozek je schématicky znázorněna na Obrázku 2 na str. 24.

Enterický nervový systém je mnohdy označován jako „druhý mozek“ a je největší a nejsložitější jednotkou periferního nervového systému (přibližně 100–500 milionů

neuronů), který sahá od jícnu až ke konečníku [102]. Dalším zásadně důležitým komunikačním spojením mezi střevem a CNS je bloudivý nerv (*nervus vagus*), který je desátým a nejdelším hlavovým nervem. Vagová vlákna neprocházejí epiteliální vrstvou střeva a tudíž nejsou v přímém kontaktu se střevní lumenální mikrobiotou a signály mikrobioty snímají nepřímo prostřednictvím difuze bakteriálních metabolitů nebo díky jiným epiteliálním buňkám, které přenášejí lumenální signály [103]. Snímání signálů prostřednictvím přímých mechanismů bylo zjištěno u mastných kyselin s krátkým řetězcem, zatímco u mastných kyselin s dlouhým řetězcem probíhá přenos signálu nepřímo pomocí hormonu cholecystokininu [104]. Nervus vagus zajišťuje komunikaci v eferentním i aferentním směru, nicméně 80–90 % vagových vláken je aferentního typu tedy přenáší informace ze střeva do mozku [105]. Enterický nervový systém může nezávisle na CNS ovlivňovat například gastrointestinální peristaltiku [106].

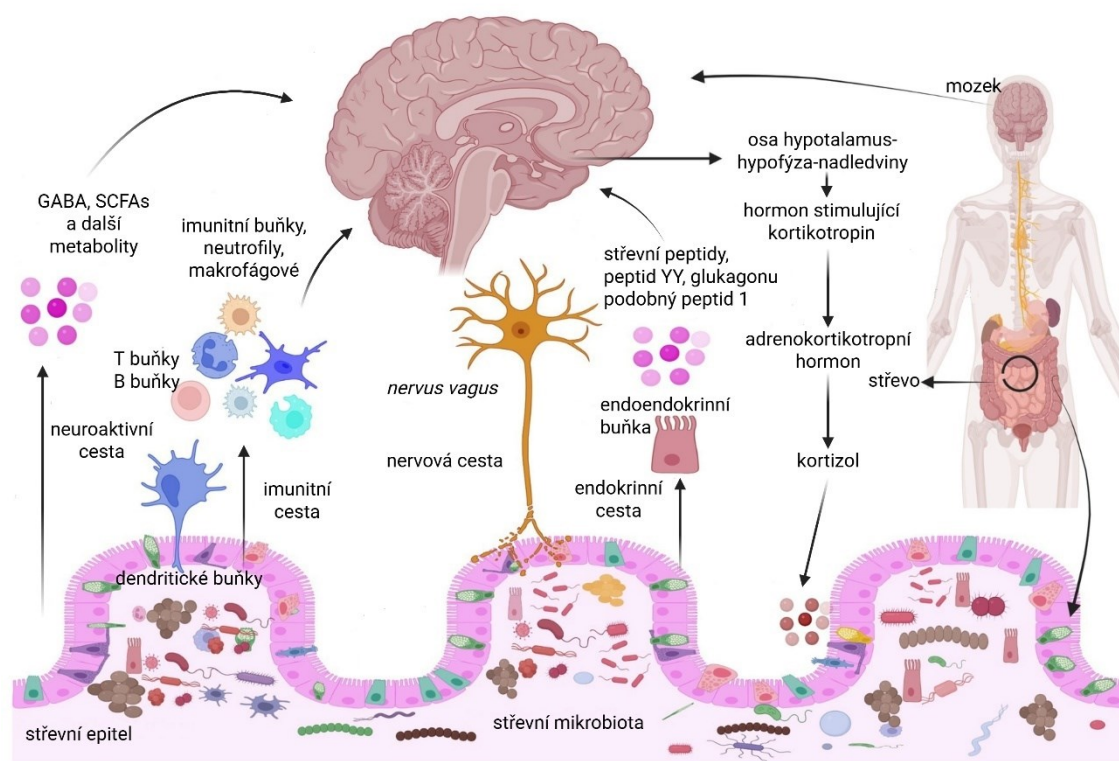
Vagové chemoreceptory se účastní komunikace mezi střevem a mozkem prostřednictvím SCFAs a střevních hormonálních metabolitů. Receptory volných mastných kyselin 2 a 3 (FFAR2 a FFAR3) spřažené s G proteiny, jejichž specifita je dána délkou řetězce mastné kyseliny, jsou jedním z hlavních účastníků signalizace na ose střevo-mozek. Po aktivaci FFAR receptorů mohou být potlačené orexigenní (podporující chuť k jídlu) hypotalamické aktivity v neuronech exprimujících neuropeptid Y. Ukazuje se, že SCFAs mohou nepřímo snižovat sekreci hormonu ghrelinu (hormon hladu). Zároveň mohou SCFAs přes své receptory stimulovat sekreci anorexigenních hormonů (potlačující chuť k jídlu) jako je glukagonu podobný peptid 1 [107]. Jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole, SCFAs mohou stimulovat syntézu serotoninu, který je jedním z nejdůležitějších mikrobiálních metabolitů podílejících se na ose střevo-mozek. Volný serotonin aktivuje receptory na aferentních vláknech bloudivého nervu a signál je přenášen až do *nucleus tractus solitarius*, které je hlavním centrem pro zpracování a distribuci aferentních signálů až do vyšších center mozku [82]. Tímto serotonin zprostředkovává nejen senzorické vnímání trávicího traktu, ale ovlivňuje i srdeční rytmus, chuť k jídlu či pocit sytosti. Zároveň může tento serotogenní systém ovlivnit osu hypotalamus-hypofýza-nadledviny a tím se podílet na regulaci odpovědi na stres [108]. Naopak může i autonomní nervový systém stimulovat enterochromafinní buňky střeva k produkci serotoninu [106].

Osa hypotalamus-hypofýza-nadledviny hraje ústřední úlohu v regulaci stresu a nálady, která se aktivuje při produkci hormonu stimulujícího kortikotropin

hypotalamem. Tím je stimulován přední lalok hypofýzy k produkci adrenokortikotropního hormonu, který při cirkulaci krevním systémem stimuluje kůru nadledvin k produkci glukokortikoidních hormonů zejména kortizolu. Glukokortikoidy jsou konečným efektozem osy HPA, které řídí homeostázu a reakci na stres celého těla. V nestresujících situacích je hormon stimulující kortikotropin vylučován cirkadiánním rytmem a v případě akutního stresu je jeho produkce navýšena. Klíčovou složkou regulace osy HPA je negativní zpětná inhibice, kdy kortizol inhibuje produkci hormonu stimulujícího kortikotropin a adrenokortikotropního hormonu. Při chronickém stresu může být tato regulace narušena, což může mít za následek hyperaktivitu osy HPA, která je často spojena s depresí a úzkostí [109, 110].

Mikrobiálně produkovaná GABA představuje klíčový neuromodulátor v rámci osy střevo-mozek. Její účinky se realizují prostřednictvím GABAergních receptorů ve spojení s bloudivým nervem a osou HPA, avšak přesné mechanismy účinků střevní GABA nejsou ještě plně prostudovány. V hypotalamu je GABA produkována GABAergními NPY/AgRP neurony a působí tlumivě na POMC/CART neurony, které signalizují sytost [111]. GABA jakožto hlavní inhibiční neurotransmitter dokáže tlumit neuronální signalizaci, čímž způsobuje snížení úzkostných stavů a hladin glukokortikoidních hormonů [112]. Současne se uvažuje, že střevní dysbióza a tím narušený GABAergní systém by mohly být zásadním prvkem ve vývoji deprese a dalších psychiatrických a neurodegenerativních onemocnění [113, 114]. Signalizace prostřednictvím GABA receptorů se zapojuje i do regulace imunitního systému (vrozeného i adaptivního), kdy jsou regulovány zánětlivé i protizánětlivé reakce [115]. Prekurzorem a regulační protiváhou GABA je L-glutamát. Jeho účast v ose střevo-mozek je zprostředkována přes glutamátové receptory. V horní části GIT hrají glutamátové receptory roli při sekreci žaludečních šťáv a vnímání chuti, kdy ve své volné formě vyvolává jedinečnou chuť umami. L-glutamát komunikuje s mozkem prostřednictvím vagových vláken přímo přes své receptory nebo nepřímým prostřednictvím serotoninu, kdy dochází ke stimulaci produkce oxidu dusnatého, který může stimulovat enterochromaffiní buňky k produkci serotoninu [116]. Vliv glutamátu na psychiatrická onemocnění je v současné době předmětem studií. Uvažuje se, že by nadměrný přísun glutamátu ve stravě (např. nadužívání glutamátu sodného) mohl vést k hyperglutamatergní neurotransmisí, která by mohla být spojena s rozvojem deprese a dalších onemocnění [117].

Neurologické funkce a chování mohou být ovlivněny imunitním systémem, který je modulován střevní mikrobiotou [118, 119]. Konzervované mikrobiální struktury, jako je lipopolysacharid a flagelin, mají schopnost aktivovat buňky vrozené imunity prostřednictvím Toll-like receptorů. Po aktivaci produkují střevní imunitní buňky prozánětlivé cytokiny, které mohou působit lokálně nebo projít do mozku. Přes hematoencefalickou bariéru procházejí cytokiny difuzí nebo prostřednictvím specifických transportérů. V mozku mohou cytokiny působit na receptory na mikroglíích, stimulovat další produkci cytokinů a modulovat neuronální funkce. Lokálně ve střevě mohou cytokiny působit na cytokinové receptory aferentních vagových vláken [120]. Zároveň může být produkce cytokinů stimulována serotoninem, který stimulací bloudivého nervu vysílá signály do CNS. Homeostáza střevního mikrobiomu je klíčovým prvkem při regulaci zánětlivých a infekčních onemocnění, neboť je-li střevní mikrobiota nevyvážená, mohou být do mozku vysílány „nezdravé“ signály a vést k podpoře probíhajících zánětlivých procesů [121].



Obrázek 2: Komunikační cesty mezi střevem a mozkem. Osa střevo-mozek je zprostředkována několika přímými a nepřímými cestami: neuroaktivní cesta – prostřednictvím metabolitů produkovaných střevní mikrobiotou (SCFAs, GABA a další); imunitní cesta – zprostředkována imunitními buňkami a jejich produkty (cytokiny); nervová cesta – zprostředkována enterickým nervovým systémem a bloudivým nervem (*nervus vagus*), který může být aktivován přes různé receptory metabolitů střevní mikrobioty (např. serotonin); endokrinní cesta – zahrnuje především osu hypotalamus-hypofýza-nadledviny a její aktivaci jsou produkovány kortikosteroidy (např. kortizol). Obrázek byl upraven v programu BioRender a převzat z publikace Ullah a kolektivu [117].

Zdá se, že narušení osy střevo-mozek může přispívat k rozvoji mnoha vážných onemocnění. Velká pozornost je věnována střevnímu mikrobiomu ve spojení s neurodegenerativními onemocněními, u nichž počet nemocných stále stoupá a současné způsoby léčby nejsou příliš úspěšné [122]. Parkinsonovou chorobou trpí přibližně 1 % populace a až u 80 % nemocných se vyskytují gastrointestinální problémy (nejčastěji zácpa), přičemž tyto problémy se mohou vyskytnout mnoho let před vypuknutím nemoci. U pacientů s Parkinsonem bylo zjištěno, že jejich střevní mikrobiota má nižší zástoupení bakterií produkujících SCFAs (především butyrát). Zároveň se vyznačuje akumulací proteinu α -synukleinu v mozku. Jeho agregáty však byly nalezeny i v ENS, což podporuje hypotézu o vlivu střevního mikrobiomu a osy střevo-mozek na vývoj tohoto onemocnění [123, 124]. Již výše bylo naznačeno, že osa střevo-mozek může mít vliv na úzkostné a depresivní stavy, které jsou nejčastějšími duševními poruchami. Depresi často doprovází onemocnění syndrom dráždivého tračníku, což může mít za následek fakt, že u pacientů s depresí byla zjištěna snížená diverzita a bohatost střevní mikrobioty. Současně se ukazuje, že je deprese doprovázena chronickým zánětem nízkého stupně, a právě množství střevních mikrorganismů indukujících produkci prozánětlivých cytokinů je u pacientů s depresí zvýšené. Rovněž může mít střevní dysbióza vliv na produkci serotoninu a dysfunkci serotonergního systému [125–127].

Osa střevo-mozek není v současné době ještě příliš prozkoumána a pochopení mechanismu, jakým funguje, je velice komplikované. Nicméně aktuální poznatky ukazují, jak důležitou roli tato osa hraje. Do budoucna je možné, že obnovení rovnováhy střevní mikrobioty by mohlo být terapeutickým cílem při léčbě různých onemocnění. Již nyní jsou pokusy některá onemocnění léčit (nebo alespoň zmírnit příznaky) pomocí fekální mikrobiální transplantace (FMT), kdy je pacientům transplantován mikrobiom od zdravých dárců [128].

2.3 Mentální anorexie

Mentální anorexie je psychiatrické onemocnění řadící se dle mezinárodní statistické klasifikace nemocí a přidružených zdravotních problémů vydanou Světovou zdravotnickou organizací do kategorie poruch příjmu potravy a stravovacího chování (kód 6B80). Charakteristickým znakem mentální anorexie je nízký kalorický příjem a nízká tělesná hmotnost [129]. Drtivou většinou pacientů s mentální anorexií tvoří ženy převážně v období adolescence (16–20 let) a rané dospělosti (20–30 let) [130]. Současně bylo zjištěno, že jde o onemocnění typičtější pro bělochy než pro afroameričany [131].

Přestože v posledních dekádách byl počet pacientů s mentální anorexií stabilní, byl po pandemii COVID-19 zaznamenán vysoký nárůst pacientů s AN a to především u pacientů mladších 16 let [132, 133].

Predispozice k mentální anorexií zahrnují biologické, psychologické a sociální faktory. Ačkoliv není prokázané, že by se na onemocnění podílely geny, Watson a kolektiv identifikovali 8 rizikových lokusů, které jsou významně spojeny s AN [134]. Současně bylo zjištěno, že jedinci s prvostupňovými příbuznými s AN jsou vystaveni zvýšenému riziku rozvoje onemocnění. Tato skutečnost pravděpodobně souvisí s tím, že někteří lidé mohou mít genetickou tendenci k obsedantně-kompulzivním osobnostním rysům, zvýšené citlivosti a perfekcionismu. Zároveň bylo zjištěno, že jednovaječná dvojčata mají větší pravděpodobnost rozvoje onemocnění u obou, než je tomu v případě dvojvaječných dvojčat [135]. Mezi spouštěcí faktory patří časté diety, které mohou mít vliv na změny nálad, mozkové funkce a mohou být následovány snížením chuti k jídlu. Zvýšené riziko rozvoje AN hrozí u náhlých stresových událostí jako je například smrt milovaného člověka [131].

Ačkoliv je mezi lidmi AN spojována především s nízkou tělesnou hmotností, tak u jedinců s AN lze pozorovat mnoho různých projevů. Anorektičtí pacienti trpí zkresleným vnímáním vlastního těla a svoji tělesnou velikost běžně nadhodnocují, a naopak ostatní vnímají jako hubenější. K dosažení vysněné hubenosti omezují pacienti s AN svůj kalorický příjem i jen na několik stovek kalorií (dle WHO by měl být kalorický příjem ženy cca 2000 kcal/den), avšak zřídka přestanou jíst úplně [136, 137]. Svoji podváhu obvykle popírají stejně jako možné zdravotní následky a léčbu [138]. Běžně se pacienti s AN potýkají i s poruchami osobnostmi, depresivními poruchami, sebevražednými a sebepoškozujícími sklony a úzkostnými poruchami, které jsou přítomné u více než 60 % pacientů [131, 135]. V neposlední řadě je typickým příznakem mentální anorexie nadměrné kompulzivní cvičení, které lze popsat jako extrémně motivované a nepružné cvičební vzorce, které jedinec s AN zásadně neporušuje, a to i přes vědomí jeho negativních účinků. Ukazuje se, že nadměrné cvičení je jedním z prvních znaků začínající mentální anorexie a představuje jakousi vstupní bránu pro další kompenzační chování [139, 140].

Kvůli omezenému kalorickému příjmu se pacientky s AN potýkají s mnoha problémy. Krom psychických problémů zmíněných výše může omezení stravy bránit

dosažení optimální hustoty kostních minerálů, což v souvislosti s tím, že se AN vyskytuje často během dospívání, může vést k dlouhodobým poruchám kosterní soustavy způsobující klinické zlomeniny a celoživotně zvýšené riziko zlomenin [141]. Okolo 80 % pacientů se v průběhu onemocnění potýká s nějakou formou kardiovaskulárních komplikací (vratných i nevratných), jako je atrofie myokardu, prolaps mitrální chlopně nebo sinusová bradykardie, a současně mají 2–3x vyšší riziko úmrtí na tyto komplikace [142]. V neposlední řadě může být důsledkem omezené stravy narušení rozmanitosti a složení střevní mikrobioty. Důležitost zdravého střevního mikrobiomu byla ukázána v předchozích kapitolách, a tudíž je očividné, že se jedinci s AN mohou potýkat s problémy v důsledku střevní dysbiózy, která může být spojena se zhoršenou imunitní obranou nebo psychickými problémy. Na druhou stranu pacienti s AN kvůli omezování příjmu kalorií často konzumují zeleninu a ovoce, které jsou pro střevní mikrobiotu podstatné, avšak i tato konzumace je často omezená. Ve střevě pacientů s AN byly zjištěny například snížené hladiny bakterií produkující butyrát a naopak zvýšený rod *Alistipes* [143].

2.3.1 Diagnostika mentální anorexie

Nízká tělesná hmotnost u člověka nutně nemusí znamenat, že trpí mentální anorexií, neboť může mít i jiná onemocnění, která vedou k úbytku hmotnosti. Správná diagnóza je klíčová a existují dva diagnostické manuály, dle kterých se onemocnění stanovuje – diagnostický a statistický manuál duševních poruch 5. vydání (DSM-5) vydané americkou psychiatrickou asociací a mezinárodní klasifikace nemocí 11. vydání (MKN-11) vydané WHO [144].

Dle MKN-11 je prvním diagnostickým kritériem pro AN významně nízká tělesná hmotnost vzhledem k výšce, věku, vývojovému stádiu a váhové historii jedince. Pro hodnocení hmotnosti využívá hodnotu indexu tělesné hmotnosti (BMI), kdy prahová hodnota pro zdravého dospělého jedince je dle WHO 18,5 kg/m². Pokud je úbytek hmotnosti více než 20 % celkové hmotnosti během 6 měsíců, může to nahradit nízkou tělesnou hmotnost jako základní znak, jsou-li splněna další diagnostická kritéria a není-li nízká hmotnost lépe vysvětlena jinými zdravotními komplikacemi. Dalším kritériem je přetrvávající vzorec restriktivního stravování nebo jiné chování, které má za účel dosažení nebo udržení abnormálně nízké tělesné hmotnosti. Toto chování může být spojené s extrémním strachem z přibírání na váze, nadměrným cvičením, užíváním léků zvyšujících energetický výdej nebo s očištným chováním (zvracení, užívání projímadel,

klystýrů a další). Dále je hodnoceno, zda je nízká tělesná hmotnost pro daného jedince primární pro sebehodnocení nebo je tělesná hmotnost či tvar dané osoby vnímán zkresleně. Zaujetí svojí váhou a tvarem těla se může projevovat například opakovaným vážením, měřením nebo neustálým sledováním kalorických hodnot potravin [129, 145]. Dle MKN-11 je mentální anorexie rozlišována podle závažnosti na AN s výrazně nízkou tělesnou hmotností (BMI 14,0–18,5 kg/m²), AN s nebezpečně nízkou tělesnou hmotností (BMI < 14,0 kg/m²) a AN v rekonvalescenci s normální tělesnou hmotností (BMI > 18,5 kg/m²) [144].

DSM-5 se často využívá ve výzkumu. Prvním kritériem je i v tomto diagnostickém manuálu nízká tělesná hmotnost s ohledem na věk, pohlaví a vývojové stádium, avšak není zde žádná restriční hranice BMI, dle které by se hodnotilo. Dále se také hodnotí omezení příjmu energie a strach z přibírání na váze, který nemusí být verbalizován, je-li pozorovatelné chování, které brání nárůstu tělesné hmotnosti. Současně se hodnotí způsob, jakým člověk vnímá svoji vlastní tělesnou hmotnost a tvar těla a zda-li jsou toto jeho hlavní kritéria při sebehodnocení. Ačkoliv není tělesná hmotnost hodnocena na základě BMI, slouží hodnota tohoto indexu k určení závažnosti onemocnění – mírná (BMI ≥17,0 kg/m²), středně těžká (BMI 16–16,99 kg/m²), těžká (BMI 15–15,99 kg/m²) a extrémní (BMI <15 kg/m²). Splňují-li pacienti veškerá kritéria AN, ale i přes významný úbytek hmotnosti je jejich BMI v normálním rozmezí, je stanovena diagnóza atypické AN [146].

Ačkoliv je index tělesné hmotnosti nedílnou součástí diagnostických manuálů nejde o ideální ukazatel. Hodnota BMI zohledňuje pouze výšku a hmotnost člověka, ale nevypovídá o množství svalové hmoty ani o tom, kde se tuk v těle ukládá, což je důležitý faktor při hodnocení zdravotních rizik spojených s nadbytkem tělesného tuku. Z toho důvodu je vhodnější použití Z-skóre BMI, které vztahuje BMI i k bioelektrické impedanci [144, 147].

2.3.2 Léčba mentální anorexie

Léčba AN je dlouhodobý a komplexní proces, který vyžaduje spolupráci lékařů, psychologů, nutričních terapeutů a rodiny. Léčba u pacientů má míru úplného zotavení z 30–60 %, z čehož vyšší úspěšnost je u dospělých pacientů. Úplné zotavení trvá okolo 5-6 let a v průběhu bývají různé výkyvy. Okolo 20 % pacientů se z AN nevyлéčí a dostávají se do chronické fáze. U zbytku pacientů dochází k částečnému zotavení

a některé příznaky u nich přetrvávají (například nadměrná potřeba kontroly). Bohužel až u 50 % pacientů dojde k návratu onemocnění již v prvním roce léčby. Úmrtnost AN je nejvyšší ze všech psychiatrických onemocnění a přibližně 5 % pacientů zemře do 4 let od stanovení diagnózy, z čehož každé páté úmrtí je sebevražda [148–151].

Nutriční rehabilitace nastavuje pacientovi správnou výživu a kalorie, napomáhají dosažení zdravé tělesné hmotnosti díky zvýšení svalové hmoty a zdravých tukových zásob. Bylo zjištěno, že pacienti, kteří dosáhli zdravé hmotnosti již během hospitalizace měli nižší míru relapsu po propuštění domů [131]. Během léčby je ideální hmotnostní přírůstek 1–1,5 kg/týden. Nejčastějším vedlejším účinkem je realimentační syndrom, při kterém dochází k nerovnováze v koncentraci tekutin a elektrolytů. Realimentační syndrom je důsledkem toho, že ve stavu hladovění tělo ztrácí své zásoby sacharidů a po opětovném zavedení sacharidů do stravy dochází k zvýšení sekrece inzulinu a rychlému vstupu glukózy do buněk, se kterou může do buněk vstupovat i fosfát, draslík a hořčík a vést k hypofosfatémii, hypokalémii a hypomagnezémii, což mohou být život ohrožující stavy [131, 152].

Důležitou nedílnou součástí léčby také psychologická pomoc, která může mít podoby individuální, rodinné nebo skupinové terapie, přičemž terapie mohou pacienti podstupovat ambulantně nebo v rámci hospitalizace. Existuje několik využívaných terapeutických přístupů, přičemž jedním z nejpoužívanějších je kognitivně-behaviorální terapie, která se soustředí na narušené vzorce myšlení, chování a emoční reakce spojené s jídlem, tělem a sebehodnocením, což jsou dle této terapie klíčové faktory psychopatologie AN [153]. V rámci rodinné terapie je využívána především u adolescentů Maudsleyho metoda, která aktivně do léčby zapojuje také rodinu pacienta. Ta přebírá kontrolu nad stravováním pacienta a s postupným přibíráním na váze je kontrola předávána pacientovi. Současně pacient obdrží na počátku léčby sešit, ve kterém jedinec zpracovává různé úkoly [154, 155].

Jelikož mentální anorexii mnohdy doprovází depresivní, úzkostné a obsedantně kompulzivní poruchy, bývá pacientům předepisováno užívání psychofarmak, především antidepresiv. Antidepresiva mohou pacientům s AN pomoci vypořádat se s komorbidními poruchami, avšak existují jen omezené důkazy o tom, zda mohou pacientovi pomoci zvýšit tělesnou hmotnost a udržet ji. Dále jsou někdy předepisována anxiolytika, která potlačují úzkost, kterou mohou pacienti trpět například před jídlem. Nicméně

farmakologická léčba by neměla být primární léčbou AN, ale může doplňovat nutriční rehabilitaci a psychoterapii [156].

2.4 Myší model mentální anorexie

Pro pochopení základní neurobiologických procesů různých onemocnění jsou často využívány zvířecí modely, jelikož mechanismy bývají často napříč druhy konzervované nebo alespoň mohou poskytnout koncepční vhled do daného téma. Nejčastěji používaným zvířetem pro experimentální modely je laboratorní myš (*Mus musculus*), přičemž 99 % myších genů má přímé ortology u člověka a kolem 95 % genů kódujících proteiny je shodná [157]. Myších modelů mentální anorexie existuje několik a dají se kombinovat i dohromady.

Nejčastěji používaným behaviorálním modelem je model mentální anorexie založený na aktivitě (ABA), který byl poprvé popsán v 60. letech 20. století a stal se klíčovým nástrojem v preklinickém výzkumu poruch příjmu potravy. Tento experimentální myší model kombinuje restrikcí potravy a současně neomezený přístup k běhacímu kolečku. Tato kombinace vede k paradoxnímu chování, kdy myši i přes zvýšenou fyzickou aktivitu ještě více omezují potravu. V současné době většina studií využívající ABA model zahrnuje i fázi aklimatizace na běhací kolečko [158]. ABA model může být vylepšen transplantací mikrobioty pacientů s AN. Zajímavostí je, že bylo-li běhací kolečko nahrazeno kruhovou uličkou nebyla ABA rozvinuta. Jakousi alternativou k ABA modelu je model restrikce kalorického příjmu, kdy je myším snížen kalorický příjem až na 40 % jejich standardního denního příjmu a následně se hodnotí kognitivní funkce pomocí bludiště s odměnami [159].

Mentální anorexie je také studována pomocí stresových modelů. Jedním takovým je model chronického sociálního stresu z porážky, při kterém je chronický stres vyvoláván tím, že jsou submisivní myši napadány dominantními myšmi. Tento model se používá především ke studiu osy hypotalamus-hypofýza-nadledviny a serotoninového systému [160].

Farmakologické modely využívají k navození mentální anorexie specifické látky, které ovlivňují centrální nebo periferní regulaci příjmu potravy. Příkladem může být studie Sheng a kolektivu (2018), kteří využívali mykotoxin T-2 k navození anorexie u myší. Tento toxin způsobil zvýšení serotoninu v plazmě, což vedlo k výraznému snížení

příjmu potravy. Tento fakt byl potvrzen podáváním samotného serotoninu, které opět vedlo ke snížení příjmu potravy [161].

Pro experimentální modely mohou být kromě klasických myší použity myši bezmikrobní (GF). Počáteční kolonie GF myší je vytvořena tak, že jsou mláďata standartních myší opatrně porozena císařským řezem a poté ručně odchována v aseptickém izolátoru. Následující generace již vznikají křížením GF myší a mláďata mohou být porozena přirozeně a odchovány v izolátoru. Alternativně mohou GF myši vzniknout přenosem embrya do pseudobřezí bezmikrobní matky [162]. Využití GF myší, které byly kolonizovány mikrobiotou anorektických pacientek a zdravých jedinců, prokázalo, že změny v chování při příjmu potravy a v expresi hypothalamických neuropeptidů jsou spojeny se změnami ve střevní mikrobiotě. Tyto poznatky potvrzují význam střevní mikrobioty jako důležitého faktoru ovlivňující neurobiologické a behaviorální mechanismy spojené s AN [163].

3 Cíle práce

- 1) GC-MS analýza SCFAs a LC-MS/MS analýza vybraných neurotransmiterů a kynureninu ve stolici a krevním séru zdravých kontrol, akutních a chronických pacientek s mentální anorexií
- 2) zavedení myšího modelu mentální anorexie založeném na aktivitě s využitím fekální mikrobiální transplantace od zdravých kontrol, akutních a chronických pacientek s AN
- 3) izolace DNA z myších bobků ABA modelu pro následnou sekvenaci střevního mikrobiomu myší po mikrobiální transplantaci (sekvenace není součástí této diplomové práce)
- 4) detekce exprese vybraných hypotalamických genů pomocí qPCR u myší s mikrobiotou transplantovanou od zdravých kontrol, akutních a chronických pacientek s AN
- 5) LC-MS/MS analýza SCFAs ve stolici myší z ABA experimentů

4 Materiál a metody

4.1 Použité chemikálie a biologický materiál

1,2-dichlorethan 99,8% (Sigma-Aldrich. Co., USA)

35% HCl (Lach-Ner, Česká republika)

3-nitrofenylhydrazin hydrochlorid 98% (Sigma-Aldrich. Co., USA)

75% ethanol – připraven z 100% ethanolu pro molekulární biologii (Sigma-Aldrich. Co., USA) a vody PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Česká republika)

80% sterilní glycerol (MP Biomedicals, USA)

95% ethanol – připraven z 100% ethanolu pro molekulární biologii (Sigma-Aldrich. Co., USA) a Milli-Q vody (Smart2Pure™ Water Purification System, Thermo Scientific™, USA)

acetonitril (LC-MS grade, CHROMASOLV™ Honeywell Research Chemicals, USA)

DNA/RNA Shield (Zymo Research, USA)

dNTP – 100 mM dTTP, dGTP, dATP, dCTP (Thermo Fisher Scientific, USA)

ethanol pro molekulární biologii (Sigma-Aldrich. Co., USA)

gb SG PCR Master Mix (Generi Biotech, Česká republika)

chloroform (Sigma-Aldrich. Co., USA)

isopropanol (Sigma-Aldrich. Co., USA)

kit Invitrogen™ SuperScript™ IV reveršní transkriptáza (Thermo Fisher Scientific, USA)

reversní transkriptasa SuperScript™ IV

5× SSIV pufr

0,1M DTT

kit TURBO™ DNase (Thermo Fisher Scientific, USA)

10× TURBO™ DNasový pufr

TURBO™ DNasa

DNasa inaktivační reagentie

kit ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep (Zymo Research, USA)

ZymoBIOMICS™ lyzační roztok

ZymoBIOMICS™ DNA vazebný pufr

ZymoBIOMOMICS™ DNA omývací pufr 1
 ZymoBIOMOMICS™ DNA omývací pufr 2
 ZymoBIOMOMICS™ voda bez DNasy/RNasy
 ZymoBIOMOMICS™ HRC přípravný roztok
 kyselina 2-methylvalerová 98+% (Thermo Fisher Scientific, USA)
 kyselina butanová 99+% (Thermo Fisher Scientific, USA)
 kyselina heptanová (Sigma-Aldrich. Co., USA)
 kyselina hexanová (Sigma-Aldrich. Co., USA)
 kyselina isovalerová 99% (Thermo Fisher Scientific, USA)
 kyselina izobutanová 99+% (Thermo Fisher Scientific, USA)
 kyselina mravenčí (Sigma-Aldrich. Co., USA)
 kyselina octová 99% (VWR Chemicals BDH®, USA)
 kyselina propionová 99% (Thermo Fisher Scientific, USA)
 kyselina valerová (Sigma-Aldrich. Co., USA)
 kyselina octová-d4 99,9% (Sigma-Aldrich. Co., USA)
 kyselina propionová-d5 98,8% (CDN Isotopes, Kanada)
 kyselina butanová-d7 98,8% (ZeptoMetrix, Norsko)
 kyselina isobutanová-d7 >95% (Toronto Research Chemicals, Kanada)
 kyselina valerová-d9 99% (ZeptoMetrix, Norsko)
 kyselina isovalerová-d9 98% (Toronto Research Chemicals, Kanada)
 kyselina hexanová-d11 98,9% (ZeptoMetrix, Norsko)
 lidská a myší stolice
 methanol (LC-MS grade, CHROMASOLV™ Honeywell Research Chemicals, USA)
 Milli-Q voda (Smart2Pure™ Water Purification System, Thermo Scientific™, USA)
 oligodT 0,1 mM (Generi Biotech, Česká republika)
 PCR Ultra H₂O (Top-Bio, Česká republika)
 Primery Drd1 F/R, Drd2 F/R, Adra1a F/R, Adra1b F/R, Gabra1 F/R, Gabra2 F/R, Gabra5 F/R, Gabbr1 F/R, Gabbr2 F/R, 5HT2C F/R, GAD1 F/R, GAD2 F/R, GABAT F/R, SSADH F/R, Hprrt F/R, Act b F/R (Generi Biotech, Česká republika)
 pyridin (Sigma-Aldrich. Co., USA)

rekombinantní inhibitor ribonukleazy RNaseOUT™ (Thermo Fisher Scientific, USA)

stabilizovaný diethylether (VWR Chemicals BDH®, USA)

4.2 Použité přístroje a programy

96jamková PCR destička FrameStar® (Azenta Life Sciences, USA)

analytická váha Mettler AE240 (Mettler-Toledo, Švýcarsko)

automatické pipety (Eppendorf, Německo)

automatické pipety na těkavé látky MICROMAN® E (GILSON, USA)

centrifuga Hettich Mikro 120 (Andreas Hettich GmbH, Německo)

centrifuga Jouan BR 4i (Thermo Fischer Scientific, USA) s rotory:

úhlový AB50.10 6, 5× 50 ml

úhlový AB2.10, 24× 1,5 ml

výkyvný S40, 3× 20 ml

výkyvný S20, 2× 2 mikrotitrační destičky

centrifuga Jouan MR 22i s úhlovým rotorem AM 2.23, 12× 1,5–2 ml (Thermo Fischer Scientific, USA)

CFX96 Touch Real-Time Detection System (Bio-Rad, USA)

CLASSIC vortex mixer (VELP Scientifica, Itálie)

filtry na 50ml falkonu pluriStrainer (pluriSelect, Germany)

velikosti pórů: 1000, 500 a 200 μm

GraphPad Prism 8.0.1. (GraphPad Software, LLC, USA)

homogenizační zkumavka IKA Tube ST-50M sterile (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Německo)

homogenizační zkumavky 2ml Lysing Matrix D s 1,4 mm zirkon-křemičitými kuličkami (MP Biomedicals, USA)

homogenizátor FastPrep-24™ (M. G. P., Česká republika)

homogenizátor ULTRA TURRAX® Tube Drive (IKA-Werke GmbH & Co.KG, Německo)

kryozkumavky cryoKING (BioLogix, Čínská lidová republika)

laminární box (Schoeller, Česká republika)

Microsoft Excel (Microsoft Corporation, USA)

mikroobjemový spektrofotometr NanoDrop 2000C (Thermo Fischer Scientific, USA)

minicentrifuga MiniSpin plus (Eppendorf SE, Germany)

parafilm (Bemis Company, Inc., USA)

plynový chromatograf Varian 450-GC (Varian, Inc., USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Varian 240-MS (Varian, Inc., USA) s kolonou DB-WAXETR (Agilent J&W, USA)

program Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, USA)

přenosná váha OHS-YA302 (OHAUS Corporation, USA)

termoblok MB-102 (Bioer Technology Co., Ltd., Čínská lidová republika)

termocyklér Biometra TAdvanced (Analytik Jena, Německo)

vortex micro-shaker type 326m (Premeo, Německo)

vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260 (Agilent, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent 6470 LC/TQ (Agilent USA) s kolonou Kinetex Polar C18 (2,6 µm, 3 mm × 100 mm) s předkolonou (Phenomenex, USA),

Wheel Manager Data Acquisition software

4.3 Použité metody

4.3.1 Skupina pacientek a zdravých kontrol

Pacientky, které se účastnily této studie, podepsaly informovaný souhlas a celá studie probíhala v souladu s Helsinskou deklarací a byla schválena etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze.

Účastníky studie byly pouze ženy ve věku 18–40 let, které v té době nebyly těhotné, nekojily, neprodělávaly infekční onemocnění, akutní či chronické onemocnění kardiovaskulárního systému, krvetvorby, jater, močových cest a tři měsíce před účastí neužívaly antibiotická nebo antimykotická léčiva. Dále do studie nebyly zařazeny ženy s narušenou duševní schopností, která vylučuje informovaný souhlas. Účastnice, které sloužily jako zdravé kontroly, byly ženy se zdravým přístupem k jídlu a bez psychických obtíží.

Celkem se studie účastnilo 89 žen, které byly rozděleny do tří skupin: 29 akutních pacientek (méně než 3 roky od vypuknutí onemocnění), 30 chronických pacientek (více než 7 let od vypuknutí onemocnění) a 30 zdravých kontrol. Zdravé ženy byly nabírány z řad vysokoškolských studentek, kancelářských pracovník a zaměstnankyň Mikrobiologického ústavu AV ČR, u kterých byl proveden screening skrytých poruch příjmu potravy pomocí dotazníku SCOFF (z anglického Sick, Control, One stone, Fat, Food). Obě skupiny zahrnovaly pacientky ambulantní, hospitalizované i ty z denního stacionáře, které byly vyšetřeny v Centru pro poruchy příjmu potravy Psychiatrické kliniky 1. LF UK a VFN v Praze. Lékaři specializující se na poruchy příjmu potravy potvrdili u pacientek splnění kritérií Diagnostického a statistického manuálu duševních poruch (DSM-5), na jehož základě byla určena závažnost onemocnění (0–5, žádná, mírná, středně těžká, těžká a extrémní). Na základě dotazníku EED19 verze 3 (z anglického Exercise and Eating Disorders) byla hodnocena hyperaktivita, se kterou se pacienti s AN mnohdy potýkají (0–2, žádná, přítomná a značná). U účastnic bylo dále zjišťováno užívání antidepresiv či jiných léků, přítomnost alergií a stresové události v minulosti (žádná, do 3 let, v dospívání, v dospělosti).

U všech účastnic bylo lékaři provedeno měření výšky, obvodu boků a pasu a na bioimpedanční váze TANITA bylo měřeno procento tělesného tuku a hmotnost. Dále byla všem účastnicím brzy ráno na psychiatrické klinice odebrána krev z kubitální žíly. Část

vzorků krve byla odeslána do nemocniční laboratoře na biochemickou analýzu a druhá část vzorků byla zpracována v Mikrobiologickém ústavu AV ČR. V den odběrů krve byl účastnicemi dodán i vzorek stolice, která byla zpracována rovněž v Mikrobiologickém ústavu AV ČR. Před odběrem stolice byli účastníci požádáni, aby nepily alkohol, kávu a čaj a nejedly kakao, čokoládu, ořechy, banány a neužívaly probiotika.

4.3.1.1 Zpracování krve a stolice pacientek s AN a zdravých kontrol

Zpracování vzorku krve spočívalo ve stočení při zrychlení $1600\times g$ po dobu 10 minut (Jouan BR 4i, výkyvný rotor S40, 3×20 ml) a následném rozalíkvótování po 200 μ l do 0,5 ml Eppendorf zkumavek a uložení do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby následných analýz. Při biochemické analýze krve, kterou prováděli pracovníci nemocniční laboratoře, byla stanovována sérová hladina triacylglycerolů, cholinesterasy, albuminu, imunoglobulinů IgA, IgG a IgM, tyreotropního stimulačního hormonu, volného tyroxinu a volného trijódtyroninu.

Ze vzorku stolice bylo odebráno 5 g (na váze OHS-YA302) do sterilní homogenizační zkumavky IKA Tube ST-50M, zbytek byl zabalen do alobalu a uložen do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby následných analýz. Ke stolici v homogenizační zkumavce bylo přidáno 50 ml sterilního 0,9% roztoku chloridu sodného a následně byla tato směs homogenizována 3x po dobu 60 s na homogenizátoru ULTRA TURRAX® Tube Drive. Vzniklý homogenát byl poté přefiltrován do 50ml falkony přes 3 filtry pluriStrainer o různé velikosti póru (1000, 500 a 200 μ m) seřazené v pořadí od největších pórů po nejmenší. Filtrát byl poté stočen při zrychlení $6000\times g$ po dobu 15 minut (centrifuga Jouan BR 4i, úhlový rotor AB50.10, 6×50 ml). Peleta byla resuspendována v 10 ml sterilního 0,9% roztoku chloridu sodného a následně bylo přidáno 1,1 ml 80% sterilního glycerolu. Vzniklá směs byla zamíchána a rozalíkvótována po 400 μ l do kryozkumavek cryoKING, které byly nakonec uloženy do $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího použití.

4.3.2 Analýza neurotransmiterů ve stolici zdravých kontrol a pacientek s AN

Stolice, ze kterých byly neurotransmitery analyzovány, byly získány od pacientek, jejichž výběr a odběr stolice je popsán v kap. 4.3.1. Před samotnou přípravou byly vzorky uchovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Příprava vzorků na měření probíhala podle článku doktorky M. Langmajerové, 2023 s malými modifikacemi [164]. Následující postup je popsán pro 100 mg stolice, avšak bylo-li k dispozici méně stolice, bylo přidáno úměrně méně dalších

komponent. Ke stáčení byla využívána centrifuga Jouan MR 22i s úhlovým rotorem AM 2.23, $12 \times 1,5$ –2 ml.

Jako první bylo naváženo na analytických vahách Mettler AE240 přibližně 100 mg ($\pm 2,6$ mg) stolice do 2,0 ml Safe-lock Eppendorf zkumavky, k navážce bylo následně přidáno 1000 μ l Milli-Q vody. Vzorky byly krátce promíchány na CLASSIC vortex mixer a stočeny při zrychlení $30\,000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl převeden do předem zvážené 2,0 ml Safe-lock Eppendorf zkumavky, která byla následně znovu zvážena. K supernatantu bylo přidáno 1000 μ l acetonitrilu (LC-MS grade) a takto připravené vzorky byly ponechány 30 minut v mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následně byly vzorky stočeny při zrychlení $30\,000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Nakonec byl odebrán 1 ml supernatantu do skleněné vialky s šroubovacím víčkem a uložen do mrazáku při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

K detekci neurotransmiterů v lidské stolici byl využit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent 6470 LC/TQ. Pro separaci byla použita kolona Kinetex Polar C18 ($2,6\text{ }\mu\text{m}$, $3\text{ mm} \times 100\text{ mm}$) s předkolonou, které byly obě zahřáty na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. Gradientová eluce se skládala z fáze A: 0,1% kyselina mravenčí (LC-MS grade) v Milli-Q vodě, a fáze B: 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu (LC-MS grade). Eluční program byl následující: (čas [min], % fáze B): 0/0; 1/0; 5/20; 6/100; 8/100; 8,5/0; 9/0. Průtok mobilní fáze byl 0,6 ml/min a množství vstříkovaného vzorku bylo 2,0 μ l. Pro eliminaci matricového efektu byl každý vzorek nastříknut a následně kvantifikován pomocí automatického přídatku standardu. Iontové přechody a další hmotnostně spektrometrické parametry byly optimalizovány pomocí softwaru MassHunter Workstation Optimizer 10.0 a Source Optimizer 10.0. Teplota plynu byla $210\text{ }^{\circ}\text{C}$ a průtok plynu byl 12 l/min. Stanovované analyty a další parametry analytického měření jsou uvedeny v Tabulce 1 a Tabulce 2 na str. 40.

Tabulka 1: Analyty stanovené ze stolice a krevního séra zdravých kontrol, chronických a akutních pacientek s AN metodou LC-MS/MS a parametry měření. GABA = kyselina γ -aminomáselná.

analyt	m/z prekurzorového iontu	kvantitativní iont	kvalifikační iont	polarita
dopamin	154.1	90.9	136.8	pozitivní
GABA	104.1	45.2	87.1	pozitivní
hydroxy-tryptofan	221.1	204.0	162.0	pozitivní
kynurenin	209.2	94.1	146.0	pozitivní
serotonin	177.1	160.0	115.0	pozitivní
tryptofan	205.1	188.0	146.0	pozitivní

Tabulka 2: Analyty stanovené ze stolice a krevního séra zdravých kontrol, chronických a akutních pacientek s AN metodou LC-MS/MS a parametry měření. GABA = kyselina γ -aminomáselná.

analyt	urychlovací napětí (V)	fragmentor (eV)	kvantifikační kolizní energie (eV)	kvalifikační kolizní energie (eV)	přídavek standardu (ppb)
dopamin	4	72	26	10	50, 250, 1250
GABA	4	50	30	10	5, 25, 125
hydroxy-tryptofan	4	90	10	18	10, 50, 250
kynurenin	4	70	14	26	10, 50, 250
serotonin	4	50	10	34	50, 250, 1250
tryptofan	4	72	10	18	50, 250, 1250

4.3.3 Analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem ve stolici zdravých kontrol a pacientek s AN

Stolice, ve kterých byly mastné kyseliny s krátkým řetězcem analyzovány, byly získány od pacientek, jejichž výběr je popsán v kap. 4.3.1. Před samotnou přípravou byly vzorky uchovány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Příprava vzorků na měření probíhala podle článku doktorky Langmajerové a kolektivu (2023) s malými modifikacemi [164]. Následující postup je popsán pro 200 mg stolice, avšak bylo-li k dispozici méně stolice, bylo přidáno úměrně méně dalších komponent. Ke stáčení byla využívána centrifuga Jouan MR 22i s úhlovým rotorem AM 2.23, $12 \times 1,5\text{--}2\text{ ml}$. K pipetování velmi těkavých látek byly využity pipety MICROMAN[®] E.

Jako první bylo naváženo na analytických vahách Mettler AE240 přibližně 200 mg ($\pm 2,2\text{ mg}$) stolice do 2,0ml Safe-lock Eppendorf zkumavky, k navážce bylo následně přidáno 1000 μl Milli-Q vody. Vzorky byly krátce promíchány na CLASSIC vortex mixer a stočeny při zrychlení $30\,000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Ze vzniklého supernatantu bylo odebráno 500 μl do nové 2,5ml Safe-lock Eppendorf zkumavky, do které bylo předem napipetováno 50 μl 30% HCl, roztok byl poté krátce promíchán na vortexu. Následně bylo přidáno 600 μl stabilizovaného diethyletheru. Takto připravená směs byla míchána na vortexu micro-shaker typ 326m po dobu 3 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a následovala centrifugace při zrychlení $30\,000\times g$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Takto připravené vzorky byly před měřením uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v zakrimpovaných vialkách obalených parafilmem.

Kalibrační vzorky byly připraveny ze směsi stanovovaných mastných kyselin s krátkým řetězcem a stabilizovaného diethyletheru. Koncentrace kalibračních vzorků byly následující: 100; 50; 25; 10; 5; 2,5; 1; 0,5; 0,25 a 0,1 ppm. Před měřením byly vzorky uchovány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ v zakrimpovaných vialkách obalených parafilmem.

K analýze SCFAs v lidské stolici byl využit plynový chromatograf Varian 450-GC ve spojení s hmotnostním spektrometrem Varian 240-MS. Pro separaci byla použita kolona DB-WAXETR (tloušťka vrstvy $0,25\text{ }\mu\text{m}$, $30\text{ m} \times 0,25\text{ mm i.d.}$). Jako nosný plyn bylo použito helium při konstantním průtoku $1,4\text{ ml/min}$. Objem nástřiku byl nastaven na $1\text{ }\mu\text{l}$ a nástřik byl proveden v režimu split/splitless s poměrem dělení 1:50, který byl nastaven jednu minutu po nástřiku. Teplotní program pece byl nastaven takto: počáteční

teplota byla udržována na 50 °C po dobu jedné minuty, poté byla zvýšena na 140 °C rychlostí 20 °C/min, následovalo zvýšení teploty na 150 °C rychlostí 10 °C/min, která byla udržována po dobu jedné minuty. Následně byla teplota zvýšena na 180 °C při rychlosti 15 °C/min a nakonec na 230 °C při rychlosti 20 °C/min a udržována po dobu jedné minuty. Celková doba trvání programu byla 13,5 minuty. Teplota injektoru byla nastavena na 230 °C. Teplota zdroje iontů vznikajících elektronovou ionizací (EI) a teplota přenosové linky byly nastaveny na 250 °C a 280 °C. Byla zvolena prodleva rozpouštědla 3 minuty. Hmotnostní spektra byla shromažďována v režimu celkového iontového proudu (TIC) s hmotnostním rozsahem 30-300 m/z během 3 až 13,5 minuty analýzy. Detekce analytu byla provedena v režimu monitorování vybraných iontů (SIM), přičemž hodnoty m/z byly odvozeny z údajů o hmotnosti Q1, které uvádí Zhu et al. (2022). Kvantifikace analytů byla provedena pomocí kalibračních křivek. Mez detekce pro analyty se pohybovala v rozmezí od 0,1 do 50 µg/g v závislosti na konkrétním analytu. Měření probíhalo celkem 2x, kdy při druhém měření byly vzorky 10× naředěny stabilizovaným diethyletherem. Stanovované analyty a jejich parametry jsou uvedeny v Tabulce 3. Vyhodnocování probíhalo v programu MS Data Review.

Tabulka 3: Analyty stanovené metodou GC-MS ze stolice a krevního séra zdravých kontrol, akutních a chronických pacientek s AN a jejich kvantifikační ionty a retenční časy. Ionizační energie všech analytů byla 75 eV.

analyt	kvantifikační iont (m/z)	retenční čas (min)
kyselina octová	60,0	5,762
kyselina mravenčí	45,0	6,230
kyselina propionová	74,0	6,391
kyselina isomáselná	73,0	6,606
kyselina máselná	60,0	7,119
kyselina isovalerová	60,0	7,522
kyselina valerová	60,0	8,180
kyselina 2-methylvalerová	73,0	8,450
kyselina hexanová	60,0	9,164
kyselina heptanová	73,0	10,046

4.3.4 Analýza neurotransmiterů v krevním séru zdravých kontrol a pacientek s AN

Pro analýzu neurotransmiterů bylo využito krevní sérum pacientek a zdravých kontrol. Následující postup je popsán pro 50 μ l krevního séra, avšak byl-li disponibilní objem menší, bylo přidáno úměrně méně dalších komponent.

Do 1,5ml Safe-Lock Eppendorf zkumavky bylo pipetováno 50 μ l krevního séra, ke kterému bylo poté přidáno 200 μ l extrakčního činidla, kterým byla směs acetonitril : methanolu v poměru 3 : 5. Vzorky byly poté ponechány při -20 °C po dobu 30 minut a následně stočeny při zrychlení 7700 $\times$ g po dobu 10 minut při 4 °C (centrifuga Jouan MR 22i s úhlovým rotorem AM 2.23, 12 $\times$ 1,5–2 ml). Nakonec byl vzniklý supernatant odebrán do 2ml šroubovacích vialek a uložen do -20 °C až do samotného měření

Analýza LC-MS/MS a vyhodnocování probíhala stejně jako v kap. 4.3.2 s tím rozdílem, že pro dopamin byl přídavek standardu 5, 25 a 125 ppb. Stanovované analyty jsou uvedeny v Tabulce 1 a Tabulce 2 na str. 40.

4.3.5 Analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem v krevním séru zdravých kontrol a pacientek s AN

Pro analýzu krátkých mastných kyselin bylo využito krevní sérum pacientek s mentální anorexií a zdravých kontrol. K pipetování velmi těkavých látek byly využity speciální pipety MICROMAN® E.

Do 1,5ml Safe-Lock Eppendorf zkumavek bylo pipetováno 500 μ l krevního séra, ke kterému bylo následně přidáno 50 μ l 30% kyseliny chlorovodíkové. Bylo-li k dispozici séra méně, byl objem séra doplněn Milli-Q vodou do objemu 500 μ l. Vzorky byly poté krátce promíchány na CLASSIC vortex mixer a doplněny o 600 μ l stabilizovaného diethyletheru, který sloužil jako extrakční činidlo. Následovalo promíchání na CLASSIC vortex mixer po dobu 3 minut při 4 °C a stočení při zrychlení 6 000 $\times$ g po dobu 4 minut (centrifuga Hettich Mikro 120). Horní diethyletherová fáze byla odebrána do předem zvážené 2ml krimpovací vialky a extrakce byla ještě dvakrát zopakována. Extrakty byly spojeny dohromady, vialky zváženy, obaleny parafilmem a uchovány při -20 °C před samotným měřením.

Příprava kalibračních vzorků, analýza GC-MS a vyhodnocování probíhala stejně jako v kap. 4.3.3 s tím rozdílem, že kalibrační vzorky byly doplněny ještě o kalibrační body o koncentraci 0,05; 0,025 a 0,01 ppm a mez detekce pro analyty se pohybovala v rozmezí od 0,01 do 25 µg/g v závislosti na konkrétním analytu (stanovované analyty jsou uvedeny v Tabulce 3 na str. 42).

4.3.6 Myší model

V rámci této práce byl použit myší model mentální anorexie založený na aktivitě (ABA) jehož schéma je na Obrázku 3 na str. 45. Každý experiment zahrnoval 20 myších samic kmene Balb/c ve věku přibližně 7 týdnů na začátku experimentu, které byly rozděleny do čtyř skupin po pěti podle stravy a přítomnosti běhacího kolečka takto:

skupina 1: strava *ad libitum*, bez běhacího kolečka

skupina 2: restrikce potravy, bez běhacího kolečka

skupina 3: strava *ad libitum*, běhací kolečko

skupina 4: restrikce potravy, běhací kolečko

Pacienti s mentální anorexií mají snížený příjem stravy a běžně se u nich vyskytuje hyperaktivita, z toho důvodu byl zvolen model ABA, který kombinuje jak sníženou potravu, tak hyperaktivitu. Skupina 2 sloužila jako kontrola vlivu samotné restrikce a skupina 3 jako kontrola vlivu zvýšené aktivity.

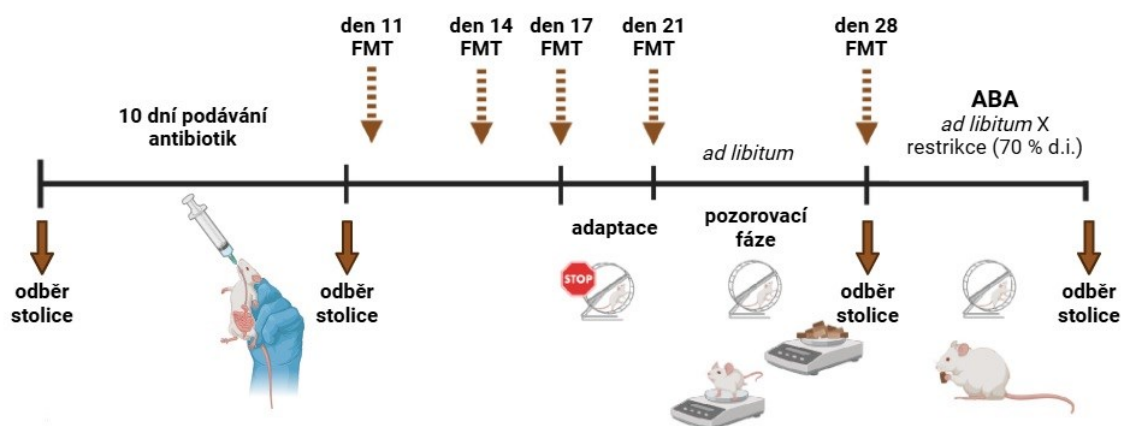
První fází byla 10denní antibiotická kúra, která sloužila k snížení mikrobiální nálože ve střevě myší. Každé myši bylo denně podáváno orální gaváž 200 µl antibiotické směsi (viz Tabulka 4) a její příprava probíhala ze zásobních roztoků (ampicilin 50 mg/ml, vancomycin 50 mg/ml, neomycin sulfát 50 mg/ml, metronidazol 10 mg/ml, amfotericin-B 30 mg/ml), které byly ředěny kohoutkovou vodou.

Tabulka 4: Složení směsi antibiotik pro zavedení modelu ABA. Myším bylo podáváno orální gaváž 200 µl antibiotické směsi po dobu 10 dní.

antibiotika	konečná koncentrace (mg/ml)
ampicilin	1
vancomycin	0,5
neomycin sulfát	0,5
metronidazol	0,5
amfotericin-B	0,05

Dále byla myším transplantována střevní mikrobiota zdravých kontrol, akutních AN pacientek nebo chronických AN pacientek. Mikrobiální směs byla připravena vždy z pěti vzorků střevní mikrobioty pacientek nebo zdravých kontrol. Po třech dávkách FMT následovala fáze adaptace, ve které měly skupiny 2 a 4 již k dispozici bezdrátové běhací kolečko, které bylo ale zablokovávané. Po skončení adaptace byla myším podána čtvrtá dávka FMT a byla zahájena třetí fáze – pozorovací fáze, ve které měly všechny skupiny myši stravu *ad libitum*. Myši byly každý den váženy stejně jako jejich strava, aby bylo zjištěno množství potravy, které každá myš za 24 hodin zkonzumuje. V této fázi byla odblokována běhací kolečka a aktivita myši byla zaznamenána programem Wheel Manager Data Acquisition software. Po pozorovací fázi byla myším podána pátá dávka FMT a byla zahájena poslední fáze – ABA fáze, ve které byla skupinám 2 a 4 snížena potrava na 70 % jejich denního příjmu. Všechny myši byly každý den váženy a byla zjišťována jejich aktivita.

V průběhu experimentu byla myším odebírána stolice, a to celkem čtyřikrát – před a po podání antibiotik, na konci pozorovací fáze a na konci experimentu. Každý experiment byl dělán dvakrát. Při ukončování experimentu byla každá myš usmrcena vykrvením a následně byly odebrány kromě krve také biopsie střeva, mezenterální uzliny, slezina a hypothalamus.



Obrázek 3: Model anorexie založený na aktivitě. Myši byly nejdříve ošetřeny antibiotickou směsí a poté jim byla v pěti dávkách podána střevní mikrobiota – po třetí dávce byl indukován myší model mentální anorexie. Původní obrázek byl vytvořen RNDr. Radkou Roubalovou, Ph. D a upraven v programu BioRender.

4.3.7 Izolace DNA z myší stolice

K izolaci DNA z myších stolic byla použita komerčně dostupná souprava ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep kit a postup izolace byl prováděn dle doporučeného návodu. Byly použity myší stolice odebírané v rámci experimentů (viz. kap. 4.3.6), které byly před izolací DNA uchovány v mrazáku při -80 °C. Celý postup byl prováděn v laminárním boxu, který byl předem vysvícen ultrafialovým zářením po dobu 20 minut, a v jednorázových rukavicích. Během celé izolace byla používána ke stáčení stolní minicentrifuga MiniSpin plus není-li uvedeno jinak.

Dva až tři myší bobky byly převedeny do lyzační zkumavky ZR BashingBead™ (0,1 & 0,5 mm), do které bylo pipetováno 750 µl lyzačního roztoku ZymoBIOMICS™. Poté byly vzorky celkem 3× homogenizovány na homogenizátoru FastPrep-24™ vždy po dobu 1 minuty při rychlosti 6,5 m/s. Mezi jednotlivými koly byla 5minutová pauza. Homogenizované vzorky byly stočeny na minicentrifuze při zrychlení 10 000× g po dobu 1 minuty. Z vzniklého supernatantu bylo 400 µl převedeno na kolonu s filtrem ZymoSpin™ III-F, který byl vložen do sběrné zkumavky, a následovala centrifugace při zrychlení 8 000× g po dobu 60 s. K filtrátu bylo přidáno 1,2 ml DNA vázajícího pufru ZymoBIOMICS™, roztok byl promíchán nasáváním pipetou. Následně bylo 800 µl převedeno na kolonu s filtrem Zymo-Spin™ IICR ve sběrné zkumavce a stočeno při zrychlení 10 000× g po dobu 60 s. Filtrát byl zlikvidován a zbylých 800 µl bylo zpracováno stejným způsobem. Tímto se na kolonu navázala DNA. Použitá kolona Zymo-Spin™ IICR z předchozího postupu byla vložena do nové sběrné zkumavky, naplněna 400 µl DNA promývacího pufru 1 ZymoBIOMICS™ a poté stočena při zrychlení 10 000× g po dobu 60 s. Filtrát byl zlikvidován, do kolony bylo přidáno 700 µl DNA promývacího pufru 2 ZymoBIOMICS™ a poté byla kolona stočena při zrychlení 10 000× g po dobu 60 s. Filtrát byl zlikvidován a následně bylo do kolony přidáno 200 µl promývacího pufru 2 ZymoBIOMICS™. Kolona byla opět stočena při zrychlení 10 000× g po dobu 60 sekund a následně vysušena opětovným stočením. DNA byla následně eluována pomocí 50 µl vody ZymoBIOMICS™ bez DNas/RNas. Po minutové inkubaci byla kolona stočena při zrychlení 10 000× g po dobu 60 s. Eluovaná DNA byla následně přečištěna přes filtr Zymo-Spin™ III-HRC v 1,5 ml Safe-lock Eppendorf zkumavce, jehož příprava spočívala v přidání 600 µl ZymoBIOMICS™ HRC přípravného roztoku a stočení při zrychlení 8000× g po dobu 3 minut. Filtr s eluovanou

DNA byl stočen při zrychlení $16\,000\times g$ po dobu 3 minut (centrifuga Jouan BR 4i, úhlový rotor AB2.14, $24\times 1,5$ ml). Získaná DNA byla uložena na led.

Koncentrace DNA byla měřena na přístroji NanoDrop 2000C. Jako blank bylo použito 1,5 μ l vody ZymoBIOMICS™ bez DNas/RNas. K měření bylo vždy použito 1,5 μ l DNA. Získaná DNA byla použita k amplikonovému sekvenování druhé generace, které bylo předmětem diplomové práce Bc. Kristýny Coufalové.

4.3.8 Detekce genové exprese v hypotalamu myši

Ze všech myši uvedených v kapitole 4.3.6 byl vždy při ukončování experimentu vyjmut hypotalamus pomocí sterilních nástrojů, uložen do látky DNA/RNA Shield a následně uchováván při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do samotné izolace RNA následované reverzní transkripcí do komplementární DNA a kvantitativní polymerasovou řetězovou reakcí. Veškerá práce s RNA probíhala na ledu v laminárním boxu, který byl předem vysvícen UV zářením po dobu 20 minut, a v jednorázových rukavicích. Ke stáčení byla vždy používána centrifuga Jouan BR 4i s úhlovým rotorem AB2.14, $24\times 1,5$ ml, není-li uvedeno jinak.

4.3.8.1 Izolace RNA z myšního hypotalamu

Pro izolaci RNA byl hypotalamus pinzetou opatrně přendán do 2ml homogenizační zkumavky Lysing Matrix D s 1,4 mm zirkon-křemičitými kuličkami, která byla naplněna 1 ml Trizolu, a homogenizován rychlostí 4 m/s po dobu 60 s. Vzniklý homogenát byl přendán do čisté 1,5 ml Safe-lock Eppendorf zkumavky a inkubován 5 minut za laboratorní teploty. Poté bylo přidáno 200 μ l chloroformu a směs byla promíchána otáčením v ruce a ponechána inkubovat po dobu 3 minut za laboratorní teploty. Vzorky byly následně stočeny při zrychlení $18\,400\times g$ 20 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, čímž vznikly tři fáze chloroform-organická-vodní. Vzniklá vodní fáze byla přendána do nové 1,5 ml Safe-lock Eppendorf zkumavky. Následovala precipitace RNA, při které bylo přidáno 500 μ l isopropanolu, vzniklá směs byla promíchána otáčením v ruce a ponechána inkubovat 10 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vzorky byly následně stočeny při zrychlení $18\,400\times g$ 15 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. K peletě byl přidán 1 ml 75% ethanolu (v/v), který sloužil pro promytí RNA. Vzorky byly následně stočeny při zrychlení $7\,500\times g$ po dobu 5 minut při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a promytí bylo ještě jednou zopakováno. Co nejvíce ethanolu bylo poté odpipetováno a peleta byla usušena na vzduchu. Vysušení pelety bylo zhodnoceno okem, kdy začaly-li okraje pelety gelovatět, byla peleta solubilizována 20 μ l vody PCR Ultra H_2O . Peleta byla přendána na

termoblok MB-102, který byl zahřátý na 55 °C, kde se 10 minut resuspendovala a poté byl vzorek uložen na led.

Koncentrace izolované RNA byla měřena na přístroji NanoDrop 2000C, kdy jako blank byla použita voda PCR Ultra H₂O a blanku i RNA bylo k měření použito 1,5 µl. Získaná RNA byla do dalšího použití uložena v mrazáku při teplotě -80 °C.

4.3.8.2 Přepis RNA do cDNA

Dalším krokem ve zpracování RNA byl její přepis do cDNA, který spočíval nejprve v přečištění RNA od DNA (tzv. DNasování) a v následném přepisu. Pro DNasování bylo nejprve nutné vodou PCR Ultra H₂O naředit vzorky RNA, jejichž koncentrace přesahovala 1000 ng/µl, na cca 700 ng/µl. Následně byla připravena směs, která pro každý vzorek obsahovala 2,5 µl DNasového pufru 10x TURBO a 1 µl TURBO DNasy. Poté bylo do 0,1ml zkumavek pipetována voda PCR Ultra H₂O, připravená směs a RNA. Objem pipetované RNA odpovídal koncentraci 6 µg/µl a objem vody byl dopočítán do celkového objemu reakční směsi 25 µl. Takto připravená reakční směs byla vložena do termocykléru Biometra TAdvanced na dobu 30 minut při 37 °C, poté byly vzorky zchlazeny na ledovém bločku a byly k nim přidány 2 µl inaktivačního roztoku DNasy. Reakční směs byla inkubována za laboratorní teploty 5 minut a následně stočena v centrifuze MiniSpin Plus při zrychlení 10 000× g 1,5 minuty. Vzniklý supernatant byl přendán do nové 0,1ml zkumavky a koncentrace DNasované RNA byla změřena na přístroji NanoDrop 2000C (blank PCR Ultra H₂O). Pokud nebyly vzorky ihned dále zpracovávány, byly uloženy do -80 °C.

Pro přepis DNasované RNA do cDNA byla nejprve připravena směs oligodT a dNTP, kdy pro jeden vzorek byl objem obou látek 1 µl. Poté bylo do 0,1ml zkumavek v tomto pořadí pipetováno voda PCR Ultra H₂O, směs a DNasovaná RNA. Objem pipetované DNasované RNA odpovídal koncentraci 1,5 µg/µl a objem vody byl dopočítán do celkového objemu reakční směsi 13 µl. Takto připravená reakční směs byla vložena do termocykléru Biometra TAdvanced na dobu 5 minut při 65 °C, následně byly vzorky schlazeny na ledovém bločku. Poté byla připravena směs, která pro jeden vzorek obsahoval 4 µl pufru 5x SSIV, 1 µl DTT a 1 µl RNase Out. Ke každému vzorku bylo napipetováno 6 µl směsi a následně 1 µl reverzní transkriptasy SuperScript IV. Nakonec byly vzorky vloženy do termocykléru Biometra TAdvanced na 10 minut při 50 °C a 10 minut při 80 °C. Připravená cDNA byla do dalšího použití uchována při -20 °C.

4.3.8.3 Kvantitativní polymerasová řetězová reakce

Komplementární DNA získaná dle postupu v předchozí podkapitole byla použita pro sledování exprese vybraných genů pomocí qPCR. Před samotnou analýzou byla nejprve vytvořena směs, která pro jeden vzorek obsahovala 9,5 μ l vody PCR Ultra H₂O, 1 μ l F primeru, 1 μ l R primeru a 12,5 μ l gb SG PCR Master Mixu. Byly využity 10mM primery pro receptory neurotransmiterů a metabolické dráhy GABA (viz Tabulka 5).

Tabulka 5: Cílové geny a sekvence použitých F/R primerů. Expresse byla sledována v hypotalamu u *Mus musculus*. V závorkách je uveden cílový protein, který gen kóduje.

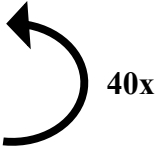
cílový gen	sekvence F a R primerů (5'–3')
Drd1 (dopaminový receptor D1)	F: AGATGACTCCGAAGGCAGCCTT R: GCCATGTAGGTTTTGCCTTGTGC
Drd2 (dopaminový receptor D2)	F: CCTGTCCTTCACCATCTCTTGC R: TAGACCAGCAGGGTGACGATGA
Adra1a (adrenoreceptor α -1a)	F: TGGCTGCCATTCTTCCTCGTGA R: TTCTTGAACCTCTGGCTGGAGC
Adra1b (adrenoreceptor α -1b)	F: GAAAGCAGCCAAAACCTTGGGC R: CACTACCTTGAATACGGCGTCC
Gabra1 (GABA-A receptor podjednotka α 1)	F: CCAAGTCTCCTTCTGGCTCAAC R: AAGCCACCTTCGGGAGGGAATT
Gabra2 (GABA-A receptor podjednotka α 2)	F: CTCTCCCAAGTGTCATTCTGGC R: CGAGCACTGATGCTCAAGGTTG
Gabra5 (GABA-A receptor podjednotka α 5)	F: CAATGGCTCCACCAAGTCTGTG R: CAGGTGGAAGTGAGCAGTCATG
Gabbr1 (GABA-B receptor podjednotka 1)	F: CGTGGGACTTTTCTATGAGACCG R: GAACCAGTTGTCAGCATACCACC
Gabbr2 (GABA-B receptor podjednotka 2)	F: TACACAACCGCCTTGGAGCCA R: CCACAATCACGAGCAGCTTCTG
5HT2C (5-hydroxytryptamin receptor 2C)	F: CGGTTCAATTGCGGACTAAGG R: GGTCAATTGAGCACGCAGGTAGT
GAD1 (glutamát dekarboxylasa 1)	F: ATACAACCTTTGGCTGCATGT R: TTCCGGGACATGAGCAGT
GAD2 (glutamát dekarboxylasa 2)	F: ACTAAAGAAAATGAGAGAAATCATTGG R: AGCATGGCATACTGTTGGA
SSADH (sukcinát semialdehyd dehydrogenasa)	F: AACAGCTGGAAAGGGGTCTC R: CATTAAGTCGTACCATTTCAGGAGT
GABAT (GABA-aminotransferasa)	F: TGCCTCCAGAGAACTTTGTG R: TGATGAGCTGGGACATGC
Hprt – housekeeping gen (hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasa)	F: GGTTAAGCAGTACAGCCCCA R: GGCCTGTATCCAACACTTCG
Act B – housekeeping gen (Aktin beta)	F: TTGCTGACAGGATGCAGAAG R: GTACTTGCGCTCAGGAGGAG

K měření byla využita 96-jamková PCR destička FrameStar®. Do každé jamky bylo nejprve pipetováno 21 µl připravené směsi a následně 4 µl 20× ředěné cDNA nebo 4 µl standardů o známé koncentraci DNA. Jamky sloužící jako kontrola obsahovaly místo cDNA 4 µl vody PCR Ultra H₂O. Každý vzorek cDNA/standardu byl měřen v duplikátech. PCR destička byla nakonec překryta fólií a stočena při zrychlení 130× g 1,5 minuty (centrifuga Jouan BR 4i, S20, 2× 2 mikrotitrační destičky).

Měření probíhalo na přístroji CFX96 Touch Real-Time Detection System. Analýza probíhala v 40 cyklech (viz Tabulka 6) a pro všechny primery byla totožná. Následné vyhodnocení dat probíhalo v programu Bio-Rad CFX Manager Microsoft Excel a GraphPad Prism 8.0.1.

Tabulka 6: Nastavení qPCR pro sledování exprese vybraných genů v hypotalamu u *Mus musculus*.

fáze	teplota	doba trvání
počáteční denaturace	94 °C	10 min
denaturace	94 °C	10 s
našednutí primerů	60 °C	25 s
prodlužování řetězce	72 °C	35 s
křivka tání	55 °C → 95 °C	35 s → 0,5 s



4.3.9 Analýzy mastných kyselin s krátkým řetězcem v myší stolici

Pro analýzu SCFAs byla využita myší stolice z experimentů popsanych v kap. 4.3.6. Myší stolice z jedné skupiny a jednoho odběru byly spojeny dohromady a pro danou skupinu a odběr byly připraveny vždy tři vzorky. Před přípravou byla stolice uchovávána v -80 °C. Příprava vzorků probíhala dle publikace Isokääntä a kolektivu [165] s vlastními úpravami. Příprava vzorků pro analýzu zahrnovala extrakci, derivatizaci a ředění. Jako rozpouštědlo pro interní standardy, derivatizační činidla a kalibrační vzorky byla použita směs Milli-Q voda : methanol v poměru 3 : 7.

Extrakce SCFAs spočívala v navážení přibližně 50 mg myší stolice ($\pm$ 2,8 mg) na analytických vahách Mettler AE240 do 2,0ml Safe-lock Eppendorf zmrkavky, do které bylo přidáno 600 µl 95 % ethanolu (v/v), 100 µl Milli-Q vody a 175 µl interního standardu. Interní standard byl připraven ze značených SCFAs (kyselina octová-d₄, propionová-d₅, butanová-d₇, isobutanová-d₇, valerová-d₉, isovalerová-d₉, hexanová-

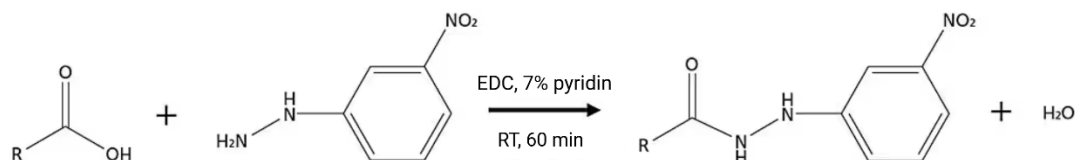
d11) tak, aby v měřeném vzorku byla koncentrace kyseliny octové-d4 500 ng/g a ostatních SCFAs 50 ng/g. Navážky stolic s extrakčními činidly a interním standardem byly v ruce promíchány třepáním a následně míchány na CLASSIC vortex mixer. Poté byly vzorky stočeny v centrifuze Jouan MR 22i (s úhlovým rotorem AM 2.23, 12× 1,5–2 ml) při zrychlení 30 000× g, 4 °C po dobu 10 minut. Vzniklý supernatant byl přenesen do předem zvážených 2,0ml Safe-lock Eppendorf zkumavek a zvážen. Následně byly vzorky derivatizovány pomocí 50mM 3-nitrofenylhydrazinu, 50mM 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimidu, 7% pyridinu (v/v) a derivatizace byla ukončena 0,2% kyselinou mravenčí (v/v).

Pevný 3-nitrofenylhydrazin hydrochlorid byl navážen na analytických vahách Mettler AE240 a k navážce byl přidán přesný objem rozpouštědla tak, aby výsledný roztok byl 50mM. Stejným způsobem byl připraven i roztok 50mM 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimidu. Roztok pyridinu byl připraven smícháním 100% pyridinu s příslušným množstvím rozpouštědla, aby výsledný roztok byl 7% (v/v). Obdobně byl připraven i roztok 0,2% kyseliny mravenčí (v/v).

Derivatizace (viz Obrázek 4 na str. 52) vzorků spočívala v přenesení 50 µl extraktu do 2,0ml skleněné šroubovací vialky, ke které bylo přidáno 50 µl 50mM 3-nitrofenylhydrazinu, 50 µl 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimidu a 50 µl 7% pyridinu (v/v). Následně byly vzorky inkubovány po dobu 60 minut za laboratorní teploty a poté byla derivatizace ukončena přidáním 100 µl 0,2% kyseliny mravenčí. Pro analýzu bylo následně ještě 50 µl derivatizovaného vzorku 10× naředěno rozpouštědlem a přepipetováno do insertu. Takto připravené vzorky byly přeneseny na analýzu pomocí LC-MS/MS.

Kalibrační vzorky byly připraveny ze zásobních mastných kyselin s krátkým řetězcem (kyselina octová, propionová, butanová, isobutanová, valerová, isovalerová, 2-methylvalerová, hexanová a heptanová), ke kterým bylo přidáno příslušné množství rozpouštědla a 20 µl interního standardu, který byl stejný jako při přípravě vzorků. Následně 50 µl každého kalibračního vzorku bylo derivatizováno stejně jako vzorky stolic. Kalibrační vzorky byly připraveny o následujících koncentracích: 8,3; 4,2; 1,7; 0,8; 0,4; 0,2 µg/g, 83; 42; 17; 8,3; 4,2; 1,7; 0,8; 0,4; 0,2; 0,083; 0,042 a 0,017 ng/g. Takto připravené kalibrační vzorky byly přeneseny na analýzu pomocí LC-MS/MS.

Současně byly připravovány také blanky. Blanky pro vzorky byly připraveny obdobně jako vzorky bez navážky stolice a blanky pro kalibrační vzorky, byly připraveny stejně jako kalibrační vzorky s tím rozdílem, že směs neznačených SCFAs byla nahrazena rozpouštědlem.



Obrázek 4: Schéma derivatizace mastných kyselin s krátkým řetězcem pomocí 3-nitrofenylhydrazinu (3-NPH) za přítomnosti aktivačního činidla 1-ethyl-3-(3'-dimethylaminopropyl)carbodiimidu (EDC) a 7% pyridinu. Reakce probíhá za laboratorní teploty (RT) po dobu 60 minut za vzniku hydrazidového derivátu vhodného k detekci pomocí LC-MS/MS. Reakce je ukončena přidávkou 0,2% kyseliny mravenčí. Schéma bylo vytvořeno v programu ChemDraw na základě publikace Wang a kolektivu [166].

K detekci SCFAs v myší stolici byl využit vysokoúčinný kapalinový chromatograf Agilent Infinity 1260 ve spojení s hmotnostním spektrometrem Agilent 6470 LC/TQ. Pro separaci byla použita kolona Kinetex Phenyl-Hexyl 100 Å (2,6 µm; 100 x 2,1 mm), která byla zahřata na 40 °C. Mobilní fáze se skládala z fáze A: 0,1% kyselina mravenčí (LC-MS grade) v Milli-Q vodě, a fáze B: 0,1% kyselina mravenčí v acetonitrilu (LC-MS grade). Gradientová eluce probíhala podle následujícího programu (čas [min]/% fáze B/průtok [ml/min]): 0/15/0,35; 2/15/0,35; 5/25/0,35; 9/45/0,35; 9,10/100/0,40; 10,10/100/0,40; 10,50/15/0,35; 11,50/15/0,35. Celkový průtok mobilní fáze byl 0,35/0,40 ml/min a množství vstříkovaného vzorku bylo 1,0 µl. Ionizace probíhala pomocí elektrospreje při napětí 4500 V. Teplota plynu byla nastavena na 230 °C, jeho průtok byl 6 l/min. Tlak dusíku na nebulizér činil 30 psi. Obalový plyn měl teplotu 400 °C a průtok byl 12 l/min. Iontové přechody a další hmotnostně spektrometrické parametry byly optimalizovány pomocí softwaru MassHunter Workstation Optimizer 10.0 a Source Optimizer 10.0. Stanovované analyty a další parametry analytického měření jsou uvedeny v Tabulce 7 a Tabulce 8 na str. 53.

Tabulka 7: Analyty stanovené ze stolice myši metodou LC-MS/MS a parametry měření. SCFAs byly při přípravě vzorků derivatizovány pomocí 3-nitrofenylhydrazinu (3-NPH).

analyt (X-3-NPH)	m/z prekurzorového iontu	kvantitativní iont	kvalifikační iont	polarita
acetát	197,1	137,0	152,0	negativní
propionát	208,1	137,0	152,0	negativní
isobutyřát	222,1	137,0	46,0	negativní
butyřát	222,1	137,0	46,0	negativní
isovalerát	236,1	137,0	152,0	negativní
valerát	236,1	137,0	152,0	negativní
hexanoát	250,1	137,0	152,0	negativní

Tabulka 8: Analyty stanovené ze stolice myši metodou LC-MS/MS a parametry měření. SCFAs byly při přípravě vzorků derivatizovány pomocí 3-nitrofenylhydrazinu (3-NPH).

analyt	urychlovací napětí (V)	fragmentor (eV)	kvantifikační kolizní energie (eV)	kvalifikační kolizní energie (eV)	retenční čas (min)
acetát	4	120	20	16	2,3
propionát	4	115	20	12	3,7
isobutyřát	4	120	20	44	5,7
butyřát	4	120	20	44	6,0
isovalerát	4	125	20	16	7,7
valerát	4	125	20	16	8,0
hexanoát	4	125	20	16	9,5

5 Výsledky

5.1 Skupina pacientek a zdravých kontrol

U každé pacientky a zdravé kontroly bylo pracovníky nemocnice provedeno antropometrické měření (viz Tabulka 9) a biochemická analýza krve. Stolice, které byly účastnicemi studie dodány, byly použity na analýzu neurotransmiterů a mastných kyselin s krátkým řetězcem.

Tabulka 9: Medián ± odchylka parametrů zdravých kontrol, akutních a chronických pacientek s AN. Hodnoty váhy a % tuku v těle byly získány antropometrickým měřením na bioimpedační váze. K = zdravé kontroly, P akut. = akutní pacientky s AN, P chron. = chronické pacientky s AN. BMI = Body Mass Index.

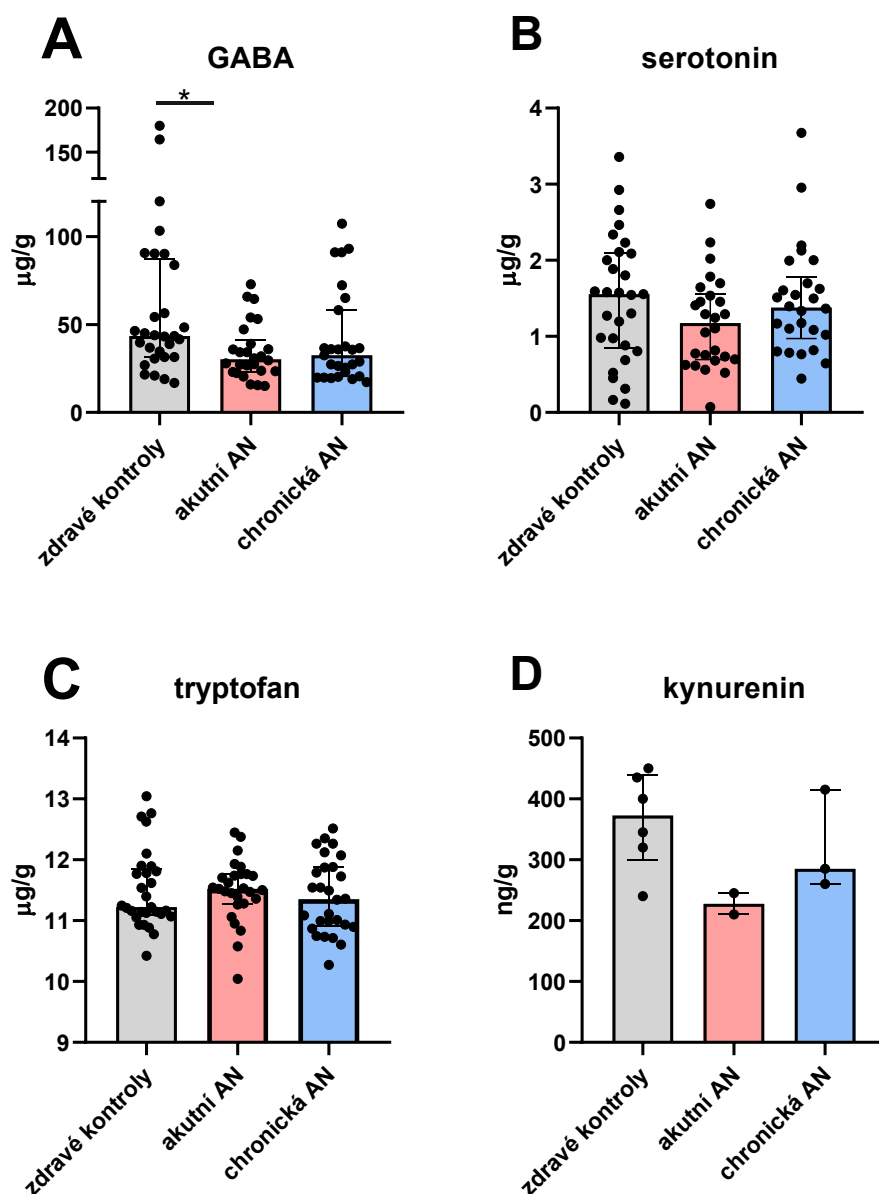
	věk	výška (cm)	váha (kg)	BMI	% tuku v těle	obvod pasu (cm)	obvod boků (cm)
K	26 ± 6	170 ± 7	65 ± 7	21,8 ± 1,96	27,4 ± 4,95	70 ± 6	96 ± 5
P akut.	20 ± 4	168 ± 5	43 ± 4	15,7 ± 1,31	4,4 ± 4,20	61 ± 4	80 ± 4
P chron.	27 ± 6	163 ± 7	38 ± 7	14,3 ± 2,30	3,0 ± 4,51	58 ± 9	76 ± 6

5.2 Analýza neurotransmiterů ve stolici a krevním séru zdravých kontrol a pacientek s AN

Neurotransmitery byly zjišťovány ve stolici a krevním séru zdravých kontrol, chronických a akutních pacientek. Byly analyzovány čtyři vybrané neurotransmitery – GABA, serotonin, tryptofan a dopamin, a kynurenin, nicméně u dopaminu nejsou uvedeny výsledky, jelikož jeho koncentrace byla pod limitem kvantifikace ve vzorcích stolice i krevním séru.

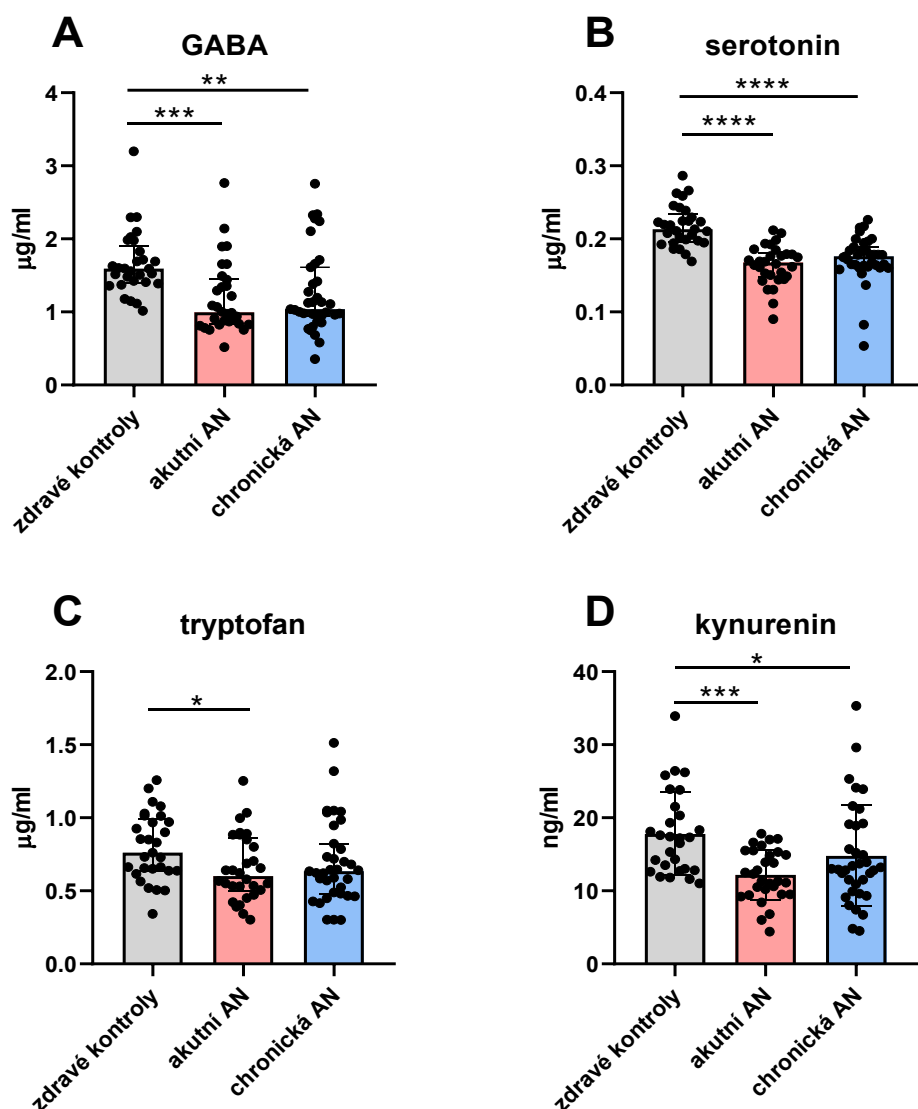
Koncentrace čtyř analytů byla ve stolici pacientek s mentální anorexií nižší oproti zdravým kontrolám, nicméně statisticky většinou nešlo o významné rozdíly. U chronických pacientek byla ve všech případech zjištěna vyšší koncentrace než u akutních pacientek, avšak bez statistického rozdílu. Statisticky významné rozdíly v hodnotách mezi zdravými kontrolami, akutními a chronickými pacientkami byly zjištěny u GABA, u které byla průměrná koncentrace u pacientů s AN 1,1× nižší než u zdravých kontrol. Průměrná koncentrace kynureninu byla sice u pacientek s AN 1,3× nižší než u zdravých kontrol, avšak při jeho analýze bylo nad limitem kvantifikace

pouze 11 vzorků (6 kontrol, 2 akutní, 3 chronické). Výsledky jsou graficky uvedeny na Obrázku 5.



Obrázek 5: Výsledky stanovení hladiny neurotransmiterů ve stolici zdravých kontrol, akutních a chronických pacientek s AN (grafy A–D pro jednotlivé neurotransmitery). Analýza byla provedena metodou LC-MS/MS. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí programů MS Review Data a Microsoft Excel. Statistická významnost byla hodnocena testem jednocestná ANOVA. * = hodnota $p < 0.05$. Pro grafické znázornění byl použit program GraphPad Prism 8.0.1.

V krevním séru byla koncentrace všech detekovaných neurotransmiterů u pacientek nižší nežli u zdravých kontrol. V případě GABA a serotoninu byla zjištěna u pacientek s AN přibližně 1,3× nižší koncentrace než u zdravých kontrol. U tryptofanu byla zjištěna cca 1,2× nižší koncentrace v patientském séru, ale rozdíl byl signifikantní pouze mezi zdravými kontrolami a akutními AN. Největší rozdíl byl zjištěn u kynureninu, kterého oproti zdravým kontrolám akutní pacientky měly přibližně 1,5× méně a chronické pacientky 1,2× méně. Výsledky stanovení neurotransmiterů v krevním séru jsou graficky znázorněné na Obrázku 6.



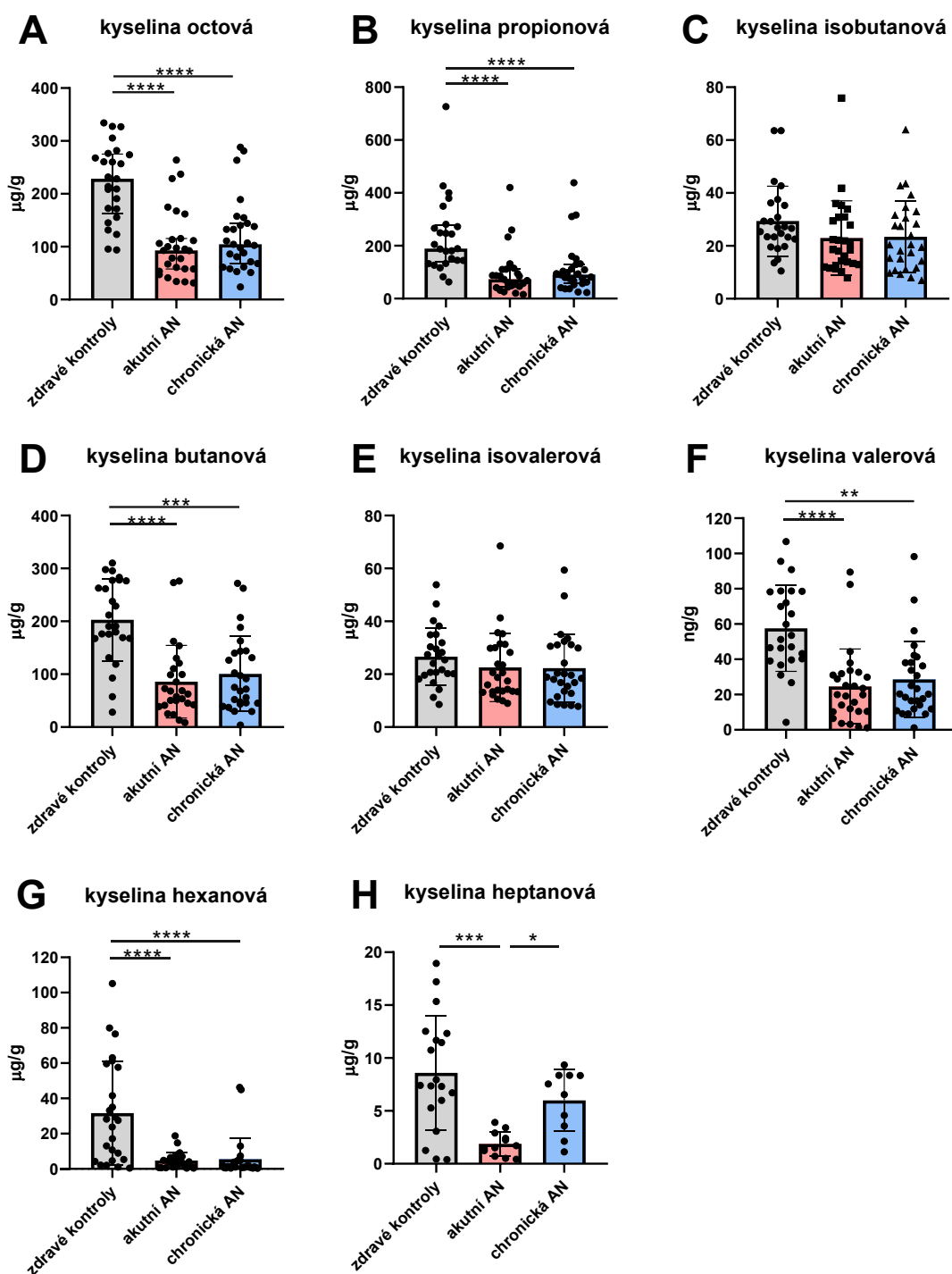
Obrázek 6: Výsledky stanovení hladiny neurotransmiterů v krevním séru zdravých kontrol, akutních a chronických pacientek s AN (grafy A–D pro jednotlivé neurotransmitery). Analýza byla provedena metodou LC-MS/MS. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí programů MS Data Review a Microsoft Excel. Statistická významnost byla vyhodnocena Kruskal-Wallisovým testem. * = hodnota $p < 0,05$; ** = hodnota $p < 0,01$; *** = hodnota $p < 0,001$; **** = hodnota $p < 0,0001$. Pro grafické znázornění byl použit program GraphPad Prism 8.0.1.

5.3 Analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem ve stolici a krevním séru zdravých kontrol a pacientek s AN

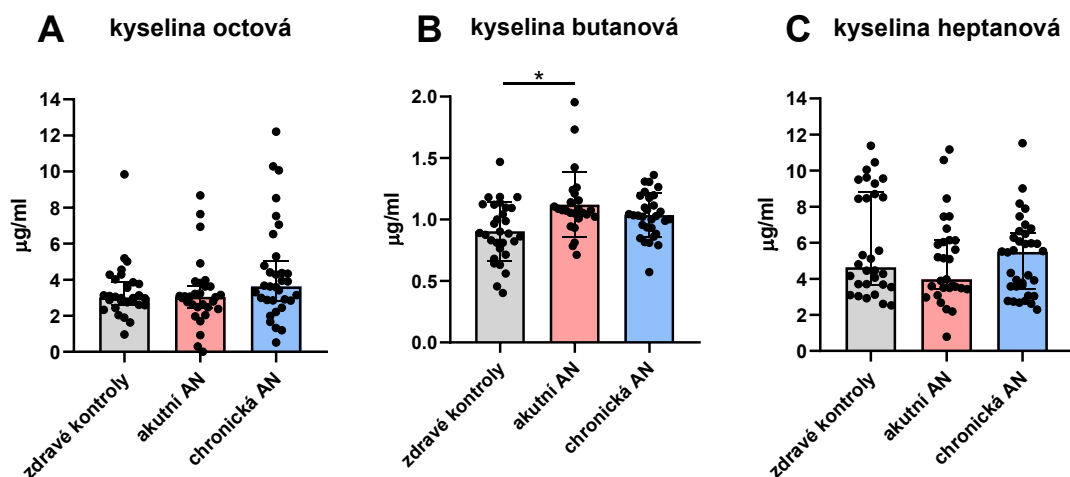
Mastné kyseliny s krátkým řetězcem byly zjišťovány ve stolici zdravých kontrol a pacientek s AN metodou GC-MS. Celkově bylo stanovováno deset mastných kyselin s krátkým řetězcem – kyselina octová, mravenčí, propionová, isobutanová, butanová, isovalerová, valerová, 2-methylvalerová, hexanová a heptanová. Statistická významnost byla zjišťována pomocí testu jednocestná ANOVA a pokud nebyly splněny testy normality, byl použit Kruskal-Wallisův test.

Z výsledků je patrné, že koncentrace jednotlivých kyselin ve stolici je u pacientek s mentální anorexií ve většině případech přibližně poloviční, než je tomu u zdravých kontrol. Výjimku tvořily kyselina isovalerová a isobutanová, jejichž koncentrace byly cca 1,2× nižší než u zdravých kontrol. Mezi chronickými a akutními pacientkami nebyly statisticky významné rozdíly s výjimkou kyseliny heptanové, kde byla u chronických pacientek zjištěna přibližně 3× vyšší koncentrace. Nicméně v případě kyseliny heptanové bylo nad limitem kvantifikace pouze 13 vzorků (6 akutních, 5 chronických). Výsledky analýzy jsou graficky znázorněny na Obrázku 7 na str. 58.

Mastné kyseliny s krátkým řetězcem byly v krevním séru ve většině případech pod limitem kvantifikace. Kyselina octová i heptanová byly v krevním séru pacientek s AN zjištěny v přibližně stejné koncentraci jako u zdravých kontrol. Poslední detekovanou SCFA byla kyselina butanová, jejíž koncentrace byla v patientských sérech průměrně 1,2× vyšší než u zdravých kontrol a v porovnání akutních pacientek a zdravých kontrol byly zjištěny signifikantní rozdíly. Výsledky analýzy jsou graficky znázorněny na Obrázku 8 na str. 59.



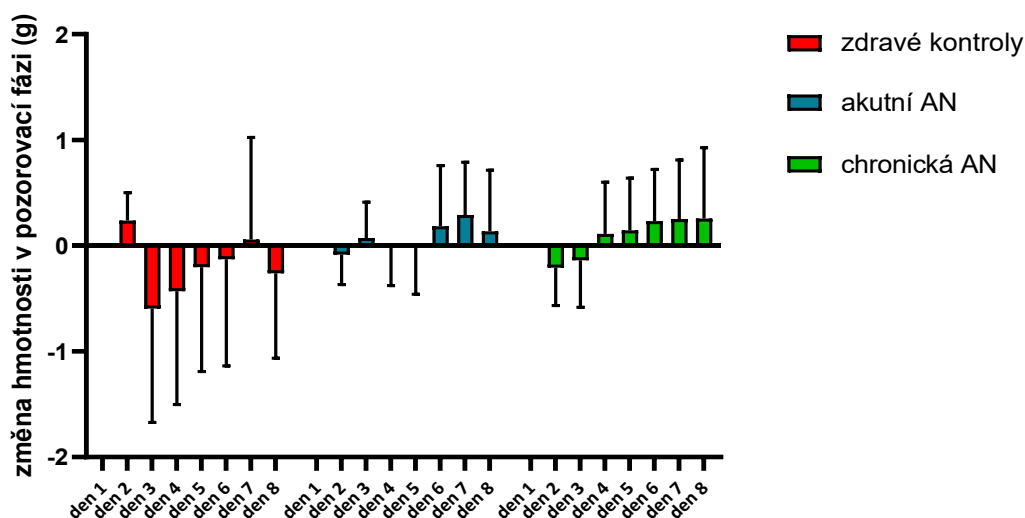
Obrázek 7: Výsledky stanovení hladiny SCFAs ve stolici zdravých kontrol, akutních a chronických pacientek s AN (grafy A–H pro jednotlivé SCFAs). Analýza byla provedena metodou GC-MS. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí programů MS Data Review a Microsoft Excel. * = hodnota $p < 0,05$; ** = hodnota $p < 0,01$; *** = hodnota $p < 0,001$; **** = hodnota $p < 0,0001$. Pro grafické znázornění byl použit program GraphPad Prism 8.0.1.



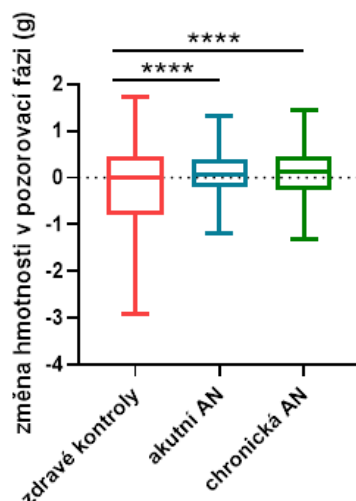
Obrázek 8: Výsledky stanovení hladiny SCFAs v krevním séru zdravých kontrol, akutních a chronických pacientek s AN (grafy A–C pro jednotlivé SCFAs). Analýza byla provedena metodou GC-MS. Výsledky byly vyhodnocovány pomocí programů MS Data Review a Microsoft Excel. Statistická významnost byla vyhodnocena Kruskal-Wallisovým testem. * = hodnota $p < 0,05$. Pro grafické znázornění byl použit program GraphPad Prism 8.0.1.

5.4 Myší model

U myši s transplantovanou střevní mikrobiotou od zdravých kontrol byly v průběhu pozorovací fáze zaznamenány různé výkyvy hmotností. U myši s FMT od akutních a chronických pacientek byl zjištěn významný nárůst hmotnosti. Změny hmotnosti v pozorovací fázi v průběhu jednotlivých dnů jsou graficky znázorněny na Obrázku 9. Souhrnné změny všech myši v pozorovací fázi jsou znázorněny na Obrázku 10 na str. 60.

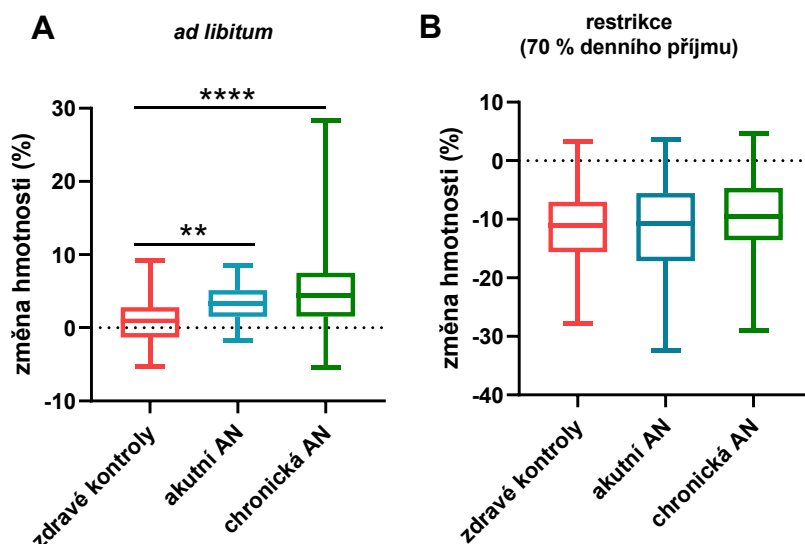


Obrázek 9: Změna hmotnosti v jednotlivých dnech pozorovací u myši s transplantovanou střevní mikrobiotou od zdravých kontrol, akutních pacientek a chronických pacientek. Data pro každou skupinu jsou získána ze dvou experimentů (40 myši). Myši byly každý den váženy a v průběhu pozorovací fáze dostávaly stravu *ad libitum*. Grafy byly vytvořeny pomocí programu GraphPad Prism 8.0.1



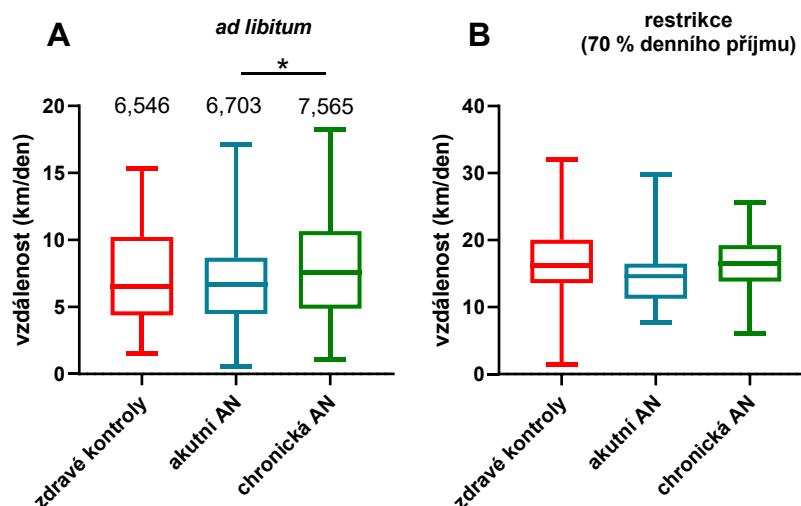
Obrázek 10: Celkové změny hmotností v pozorovací fázi u myší s transplantovanou střevní mikrobiotou (FMT) od zdravých kontrol, akutních pacientek a chronických pacientek. Data pro každou skupinu jsou získána ze dvou experimentů (40 myší). Myši byly každý den váženy a v průběhu pozorovací fáze dostávaly stravu *ad libitum*. Pro statistickou významnost byla použita jednocestná ANOVA. **** = hodnota $p < 0,0001$. Grafy byly sestaveny pomocí programu GraphPad Prism 8.0.1.

V průběhu ABA fáze byl u skupin myší se stravou *ad libitum* zjištěn nižší nárůst hmotnosti u myší s mikrobiotou od zdravých kontrol než v případě myší s FMT od pacientek s AN, z čehož u myší s FMT od chronických pacientek byla změna hmotnosti výraznější (Obrázek 11 – A). Naopak jsou-li myši na restrikci, tak změna hmotnosti se mezi jednotlivými FMT zásadně neliší (Obrázek 11 – B).

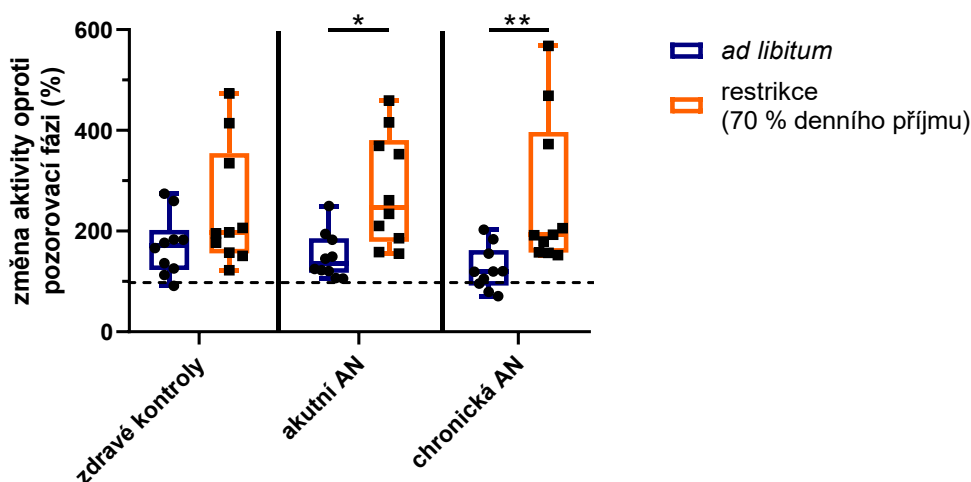


Obrázek 11: Celkové změny hmotností (%) v ABA fázi u myší s transplantovanou střevní mikrobiotou od zdravých kontrol, akutních pacientek a chronických pacientek. Data pro každou skupinu jsou získána ze dvou experimentů (40 myší), které byly každý den váženy. Graf A – změna hmotnosti (%) u myší, které měly stravu *ad libitum*, graf B – změna hmotnosti (%) u myší, které měly stravu snižovanou na 70 % denního příjmu. Pro statistickou významnost byla použita jednocestná ANOVA. ** = hodnota $p < 0,01$; **** = hodnota $p < 0,0001$. Grafy byly sestaveny pomocí programu GraphPad Prism 8.0.1.

V průběhu pozorovací a ABA fáze byla u myších skupin 3 a 4 zaznamenávána aktivita na běhacím kolečku. Ze záznamů z pozorovací fáze bylo zjištěno, že myši s patientskou mikrobiotou byly při stravě *ad libitum* aktivnější než myši s kontrolní mikrobiotou (Obrázek 12 – A). Byly-li myši na restrikci, tyto rozdíly v aktivitě nebyly znatelné (Obrázek 12 – B). Při porovnání aktivity při restrikci s aktivitou při stravě *ad libitum* byly zjištěny statisticky významné rozdíly u myši s transplantovanou mikrobiotou od pacientek, které byly při restrikci významně aktivnější (Obrázek 13).

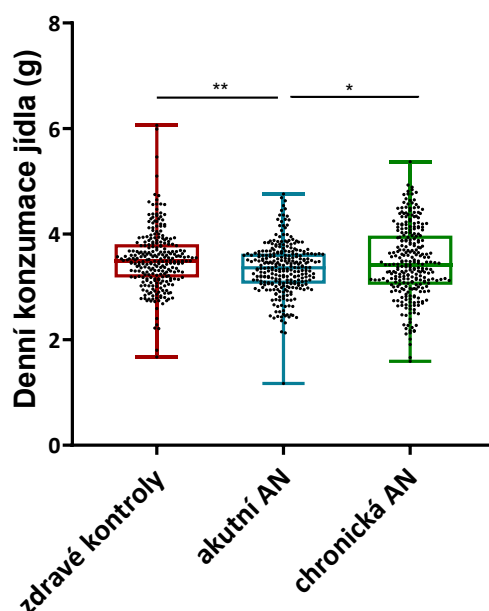


Obrázek 12: Celkově uběhnutá vzdálenost myši v pozorovací (A) a ABA (B) fázi s FMT zdravých kontrol, chronických a akutních pacientek. A – v pozorovací fázi měly myši stravu *ad libitum* a byla zaznamenávána aktivita celkem 20 myši po dobu 6 dnů pro každé FMT. Čísla nad grafy jsou mediány uběhnuté vzdálenosti (km/den). B – v ABA fázi byla zaznamenávána aktivita celkem 10 myši po dobu 7 dnů. Pro statistickou významnost byla použita jednocestná ANOVA. * = hodnota $p < 0,05$. Aktivita byla sledována pomocí programu Wheel Manager Data Acquisition software a grafy byly sestaveny v programu GraphPad Prism 8.0.1.



Obrázek 13: Procentuální změna aktivity v ABA fázi oproti pozorovací fázi. Hodnoty pro každý box byly získány zaznamenáváním aktivity 10 myši. Pro statistickou významnost byla použita dvoucestná ANOVA. * = hodnota $p < 0,05$; ** = hodnota $p < 0,01$. Aktivita byla sledována pomocí programu Wheel Manager Data Acquisition software a grafy byly sestaveny v programu GraphPad Prism 8.0.1.

V průběhu pozorovací fáze, kdy měly všechny myši neomezený přístup k potravě, byla každý den zjišťováno množství potravy, které jednotlivé myši zkonzumují. Z výsledků je patrné, že myši s mikrobiotou akutních pacientek konzumovaly signifikantně méně stravy než myši se zdravou mikrobiotou. Naopak myši s FMT od chronických pacientek měly denní spotřebu jídla vyšší než myši s akutní mikrobiotou. Výsledky jsou graficky znázorněny na Obrázku 14.

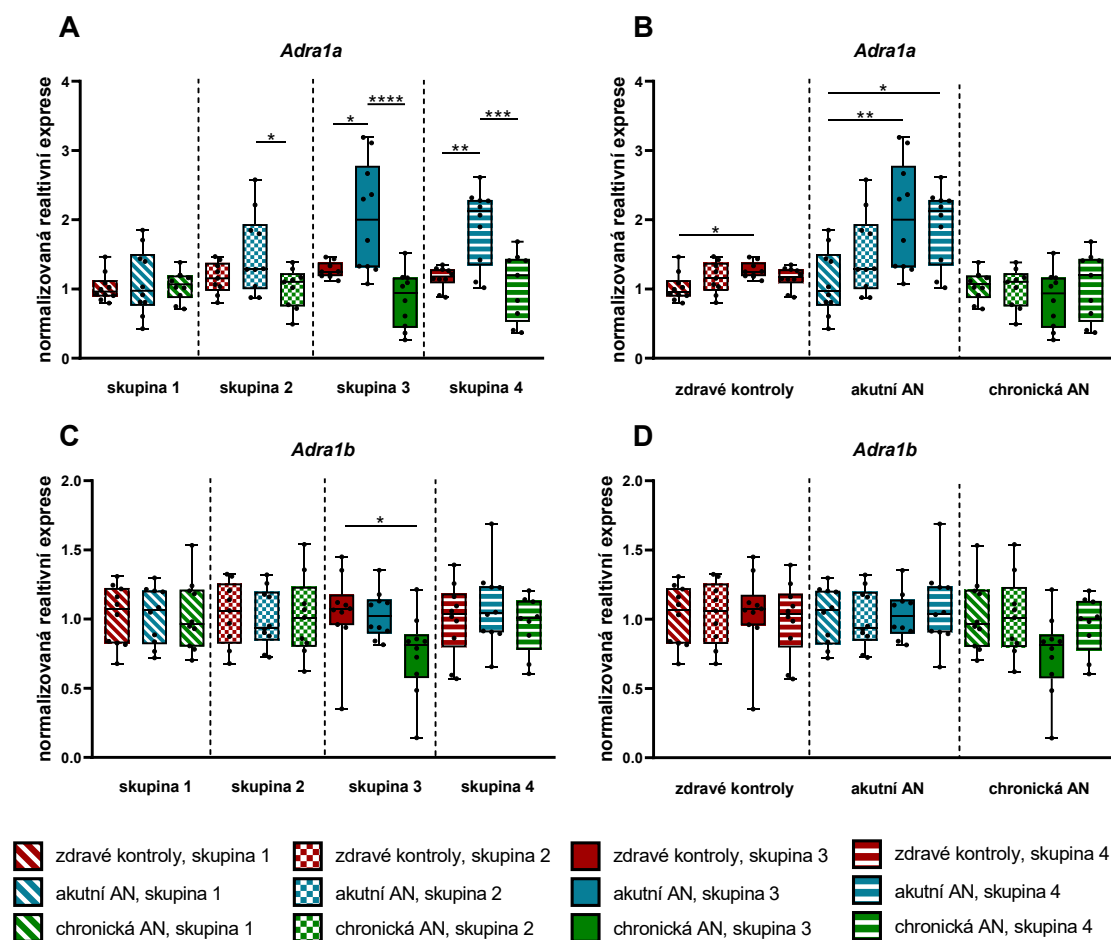


Obrázek 14: Denní konzumace jídla myši v pozorovací fázi s rozdílnou transplantovanou mikrobiotou. V pozorovací fázi měly všechny myši neomezený přístup k potravě (*ad libitum*). Data byla získána každodenním vážením stravy (40 myši pro každé FMT). Pro statistickou významnost byla použita jednocestná ANOVA. * = hodnota $p < 0,05$; ** = hodnota $p < 0,01$. Grafy byly sestaveny v programu GraphPad Prism 8.0.1.

5.5 Změny genové exprese v hypotalamu myší s transplantovanou střevní mikrobiotou

Z myšího hypotalamu, který byl získán na konci každého experimentu, byla izolována RNA a následně přepsána do cDNA, která byla využita pro qPCR. Kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí byla sledována exprese 14 vybraných hypotalamických genů (viz Tabulka 5 na str. 49), jejichž exprese byla normalizována expresí houskeeping genu *Hprt*. Statistická významnost výsledků byla vyhodnocována pomocí testu jednocestná ANOVA a v případě, že výsledky neprošly testem normality, byl zvolen neparamterický Kruskal-Wallisův test.

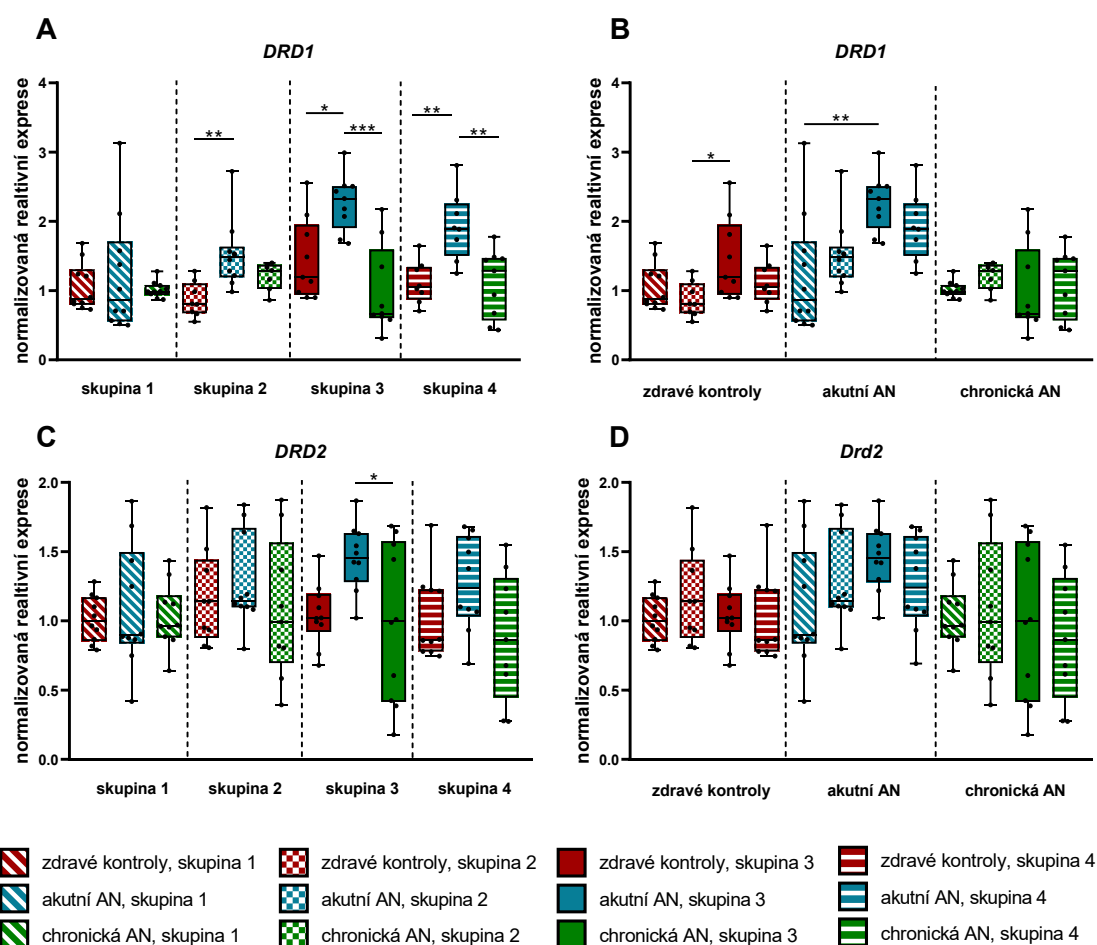
U genu *Adra1a*, který kóduje adrenergní receptor α -1a, byla zjištěna zvýšená exprese u myší s mikrobiotou transplantovanou od akutních pacientek ve srovnání s myšmi s mikrobiotou chronických pacientek, a to jak u myší ze skupiny 2 (bez běhacího kolečka, restrikce), tak u myší ze skupiny 3 (běhací kolečko, *ad libitum*) a 4 (běhací kolečko, restrikce). Současně byla u stejných myší zvýšena exprese i ve srovnání s myšmi, které měly mikrobiotu od zdravých kontrol, avšak už jen u skupiny 3 a 4. Tyto rozdíly jsou znázorněny na Obrázku 15 – A na str. 64. Při srovnání myší se stejným FMT byly statisticky významné rozdíly zjištěny mezi skupinami 1 (bez kolečka, *ad libitum*) a 3 (s kolečkem, *ad libitum*) s mikrobiotou zdravých kontrol. Stejně tak byla signifikantně zvýšená exprese zaznamenána u skupiny 3 a 4 v porovnání se skupinou 1 v rámci FMT akutních pacientek. Porovnání v rámci FMT je znázorněno na Obrázku 15 – B na str. 64. Exprese genu *Adra1b* kódující α -1b adrenergní receptor byla vesměs u všech skupin myší bez signifikantních rozdílů, krom myší skupiny 3 s FMT zdravých kontrol, u nichž byla exprese významně zvýšena ve srovnání s myšmi s chronickou mikrobiotou (viz Obrázek 15 – C, D na str. 64).



Obrázek 15: Normalizované relativní exprese genů *Adra1a* a *Adra1b* v hypothalamu. Relativní exprese byla normalizována expresí housekeeping genu *Hprt*. Data jsou získána kvantitativní PCR z celkem 120 myší, které byly rozděleny do skupin: 1 – *ad libitum*, bez kolečka; 2 – restrikce (70 % denního příjmu), bez kolečka; 3 – *ad libitum*, s kolečkem; 4 – restrikce (70 % denního příjmu), s kolečkem. Myšim byla transplantována mikrobiota zdravých kontrol, akutních nebo chronických pacientek. A – porovnání normalizované exprese genu *Adra1a* v rámci skupiny s různými FMT. B – porovnání normalizované exprese genu *Adra1a* mezi skupinami v rámci stejného FMT. C – porovnání normalizované exprese genu *Adra1b* v rámci skupiny s různými FMT. D – porovnání normalizované exprese genu *Adra1b* mezi skupinami v rámci stejného FMT. Všechny grafy mají společnou legendu dole. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8.0.1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Expresí genu *DRD1*, který kóduje dopaminový receptor D1, byla významně zvýšena u myší s mikrobiotou akutních pacientek v porovnání s FMT zdravých kontrol u skupin 2, 3 a 4. Obdobně byla zvýšena i v porovnání s myšmi s mikrobiotou chronických pacientek, s tím rozdílem, že signifikantní rozdíly byly zjištěny pouze u skupiny 3 a 4. Změny jsou graficky znázorněny na Obrázku 16 – A na str. 65. Při srovnání v rámci stejného FMT byly statisticky významné rozdíly zjištěny u myší s mikrobiotou zdravých kontrol, kde byla exprese u zvýšena u skupiny 3 v porovnání se skupinou 2. U FMT akutních pacientek byla exprese signifikantně zvýšena u skupiny 3 v porovnání se skupinou 1. Výsledky jsou graficky znázorněny na Obrázku 16 – B na str. 65. Expresí genu *DRD2* kódující dopaminový receptor D2, byla bez signifikantních rozdílů, až na

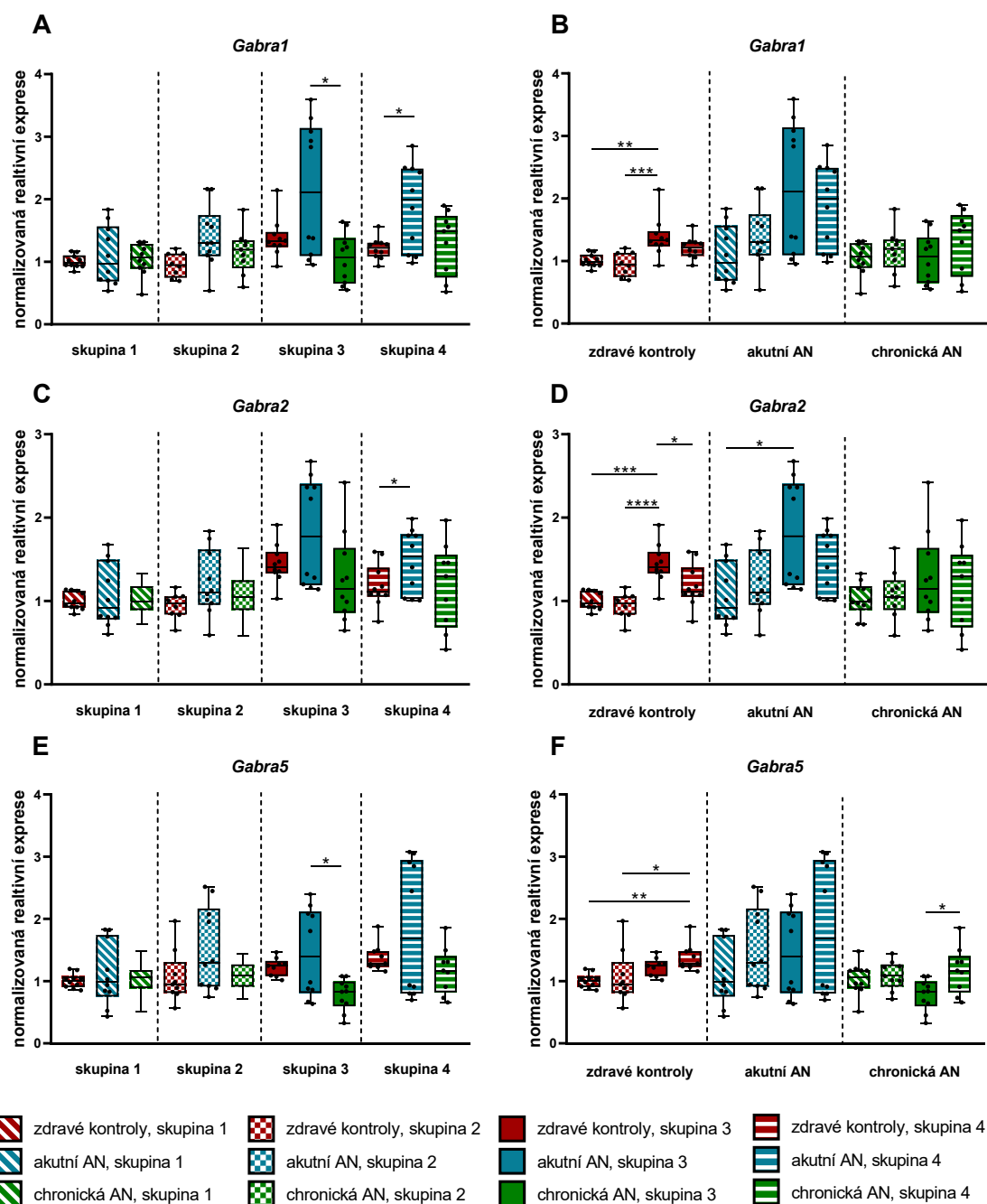
expresi u myší ze skupiny 3 s FMT akutních pacientek, která byla zvýšena v porovnání s myšmi s mikrobiotou chronických pacientek (viz Obrázek 16 – C), nicméně při porovnání skupin v rámci stejného FMT nebyly žádné signifikantní rozdíly (viz Obrázek 16 – D).



Obrázek 16: Normalizované relativní exprese genů *DRD1* a *DRD2* v hypothalamu. Relativní exprese byla normalizována expresí housekeeping genu *Hprt*. Data jsou získána kvantitativní PCR z celkem 120 myší, které byly rozděleny do skupin: 1 – *ad libitum*, bez kolečka; 2 – restrikce (70 % denního příjmu), bez kolečka; 3 – *ad libitum*, s kolečkem; 4 – restrikce (70 % denního příjmu), s kolečkem. Myšim byla transplantována mikrobiota zdravých kontrol, akutních nebo chronických pacientek. A – porovnání normalizované exprese genu *DRD1* v rámci skupiny s různými FMT. B – porovnání normalizované exprese genu *DRD1* mezi skupinami v rámci stejného FMT. C – porovnání normalizované exprese genu *DRD2* v rámci skupiny s různými FMT. D – porovnání normalizované exprese genu *DRD2* mezi skupinami v rámci stejného FMT. Všechny grafy mají společnou legendu dole. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8.0.1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

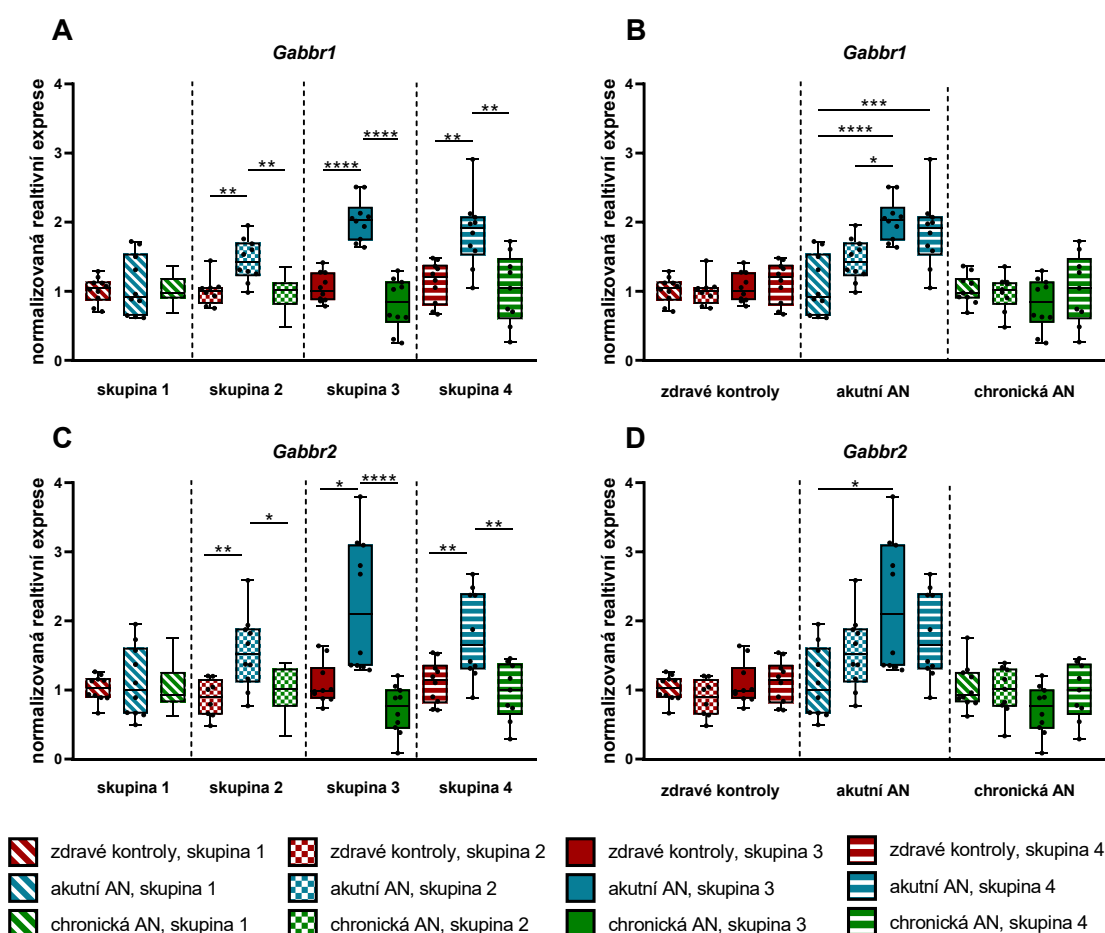
Receptor GABA-A se skládá z několika podjednotek, které jsou kódovány různými geny a jejichž exprese byla taktéž sledována. Podjednotka $\alpha 1$ je kódována genem *Gabra1* a jeho exprese byla významně zvýšena u myší ze skupiny 3 s FMT akutních pacientek v porovnání s myšmi s mikrobiotou chronických pacientek. Stejně tak byla exprese zvýšena i u skupiny 4 s FMT akutních pacientek, avšak v porovnání s myšmi s FMT

zdravých kontrol (viz Obrázek 17 – A na str. 67). V rámci porovnání skupin se stejnou mikrobiotou byly signifikantní rozdíly zjištěny pouze u FMT zdravých kontrol. V tomto případě byla signifikantně zvýšena exprese u skupiny 3 oproti skupině 1 a 2 (viz Obrázek 17 – B na str. 67). U genu *Gabra2* kódující $\alpha 2$ podjednotku receptoru GABA-A, byly při porovnání v rámci skupiny s různými FMT zjištěny významné rozdíly pouze u skupiny 4, konkrétně byla exprese zvýšena u myší s FMT akutních pacientek ve srovnání se zdravou mikrobiotou (viz Obrázek 17 – C na str. 67). Nicméně při srovnání mezi skupinami v rámci jednoho FMT bylo v expresi zjištěno více statisticky významných rozdílů (viz Obrázek 17 – D na str. 67). U myší se zdravou mikrobiotou byla exprese signifikantně zvýšena u myší ze skupiny 3, a to v porovnání se všemi ostatními skupinami. U myší s mikrobiotou akutních pacientek byla exprese výrazně zvýšena pouze u skupiny 3 v porovnání se skupinou 1. Posledním detekovaným genem kódující podjednotku GABA-A receptoru byl gen *Gabra5*, který kóduje $\alpha 5$ podjednotku. Jeho exprese byla opět zvýšena u myší s FMT akutních pacientek, avšak statisticky významný rozdíl byl pouze u skupiny 3 ve srovnání s myši z téže skupiny a mikrobiotou chronických pacientek (viz Obrázek 17 – E na str. 67). Významné rozdíly nicméně byly zjištěny u skupiny 4 s mikrobiotou zdravých kontrol oproti skupinám 1 a 2. V případě tohoto genu vykazovala skupina 4 signifikantní rozdíly oproti skupině 2 i u myší s mikrobiotou chronických pacientek (viz Obrázek 17 – F na str. 67).



Obrázek 17: Normalizované relativní exprese genů *Gabra1*, *Gabra2* a *Gabra5* v hypothalamu. Relativní exprese byla normalizována expresí housekeeping genu *Hprt*. Data jsou získána kvantitativní PCR z celkem 120 myší, které byly rozděleny do skupin: 1 – *ad libitum*, bez kolečka; 2 – restrikce (70 % denního příjmu), bez kolečka; 3 – *ad libitum*, s kolečkem; 4 – restrikce (70 % denního příjmu), s kolečkem. Myším byla transplantována mikrobiota zdravých kontrol, akutních nebo chronických pacientek. A – porovnání normalizované exprese genu *Gabra1* v rámci skupiny s různými FMT. B – porovnání normalizované exprese genu *Gabra1* mezi skupinami v rámci stejného FMT. C – porovnání normalizované exprese genu *Gabra2* v rámci skupiny s různými FMT. D – porovnání normalizované exprese genu *Gabra2* mezi skupinami v rámci stejného FMT. E – porovnání normalizované exprese genu *Gabra5* v rámci skupiny s různými FMT. F – porovnání normalizované exprese genu *Gabra5* mezi skupinami v rámci stejného FMT. Všechny grafy mají společnou legendu dole. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8.0.1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

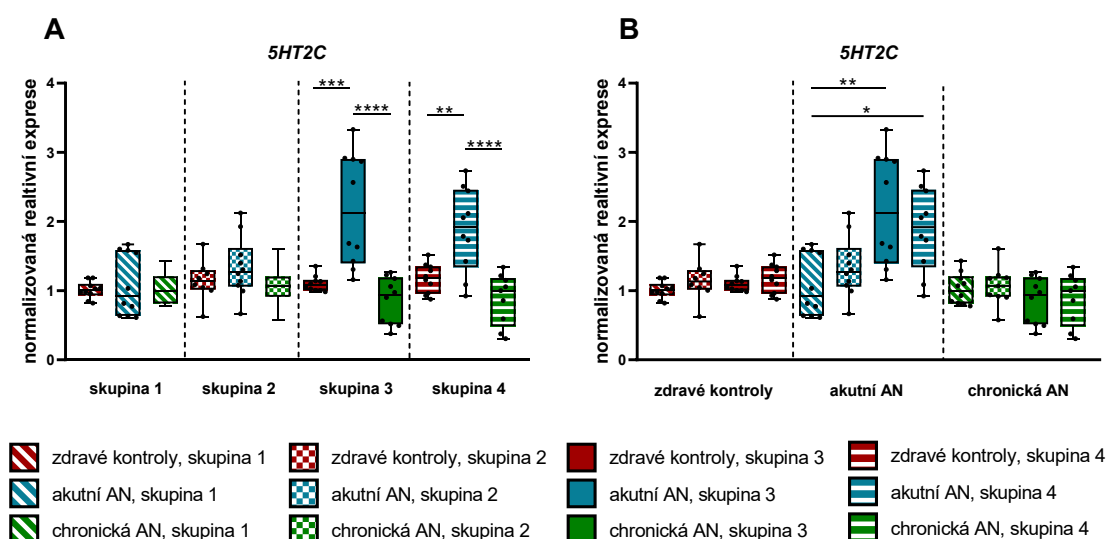
Z receptorů pro neurotransmitter GABA byla sledována i exprese genů podjednotek tvořící GABA-B receptor. Exprese genu *Gabbr1*, který kóduje podjednotku 1, byla signifikantně zvýšena u myši s mikrobiotou akutních pacientek ve srovnání s mikrobiotou zdravých kontrol a chronických pacientek u skupin myši 2, 3 i 4, z čehož u skupiny 3 byly rozdíly statisticky nejvýznamnější (viz Obrázek 18 – A). V rámci FMT akutních pacientek byla exprese u skupiny 3 signifikantně zvýšena oproti skupině 1 a 2. V případě skupiny 4 byla exprese významně zvýšena taktéž oproti skupině 1 (viz Obrázek 18 – B). Podjednotka 2 GABA-B receptoru je kódována genem *Gabbr2*, jehož exprese byla obdobně zvýšena u myši s akutní mikrobiotou oproti mikrobiotě zdravých kontrol a chronických pacientek u skupiny 2, 3 a 4 (viz Obrázek 18 – C). V rámci FMT akutních pacientek však byly signifikantní rozdíly jen mezi skupinou 1 a 3 (viz Obrázek 18 – D).



Obrázek 18: Normalizované relativní exprese genů *Gabbr1* a *Gabbr2* v hypothalamu. Relativní exprese byla normalizována expresí housekeeping genu *Hprt*. Data jsou získána kvantitativní PCR z celkem 120 myši, které byly rozděleny do skupin: 1 – *ad libitum*, bez kolečka; 2 – restrikce (70 % denního příjmu), bez kolečka; 3 – *ad libitum*, s kolečkem; 4 – restrikce (70 % denního příjmu), s kolečkem. Myším byla transplantována mikrobiota zdravých kontrol, akutních nebo chronických pacientek. A – porovnání normalizované exprese genu *Gabbr1* v rámci skupiny s různými FMT. B – porovnání normalizované exprese genu *Gabbr1* mezi skupinami v rámci stejného FMT. C – porovnání normalizované exprese genu *Gabbr2* v rámci skupiny s různými FMT. D – porovnání normalizované exprese genu *Gabbr2* mezi

skupinami v rámci stejného FMT. Všechny grafy mají společnou legendu dole. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8.0.1. Pro statistické vyhodnocení byla použita jednocestná ANOVA nebo Kruskal-Wallisův test. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

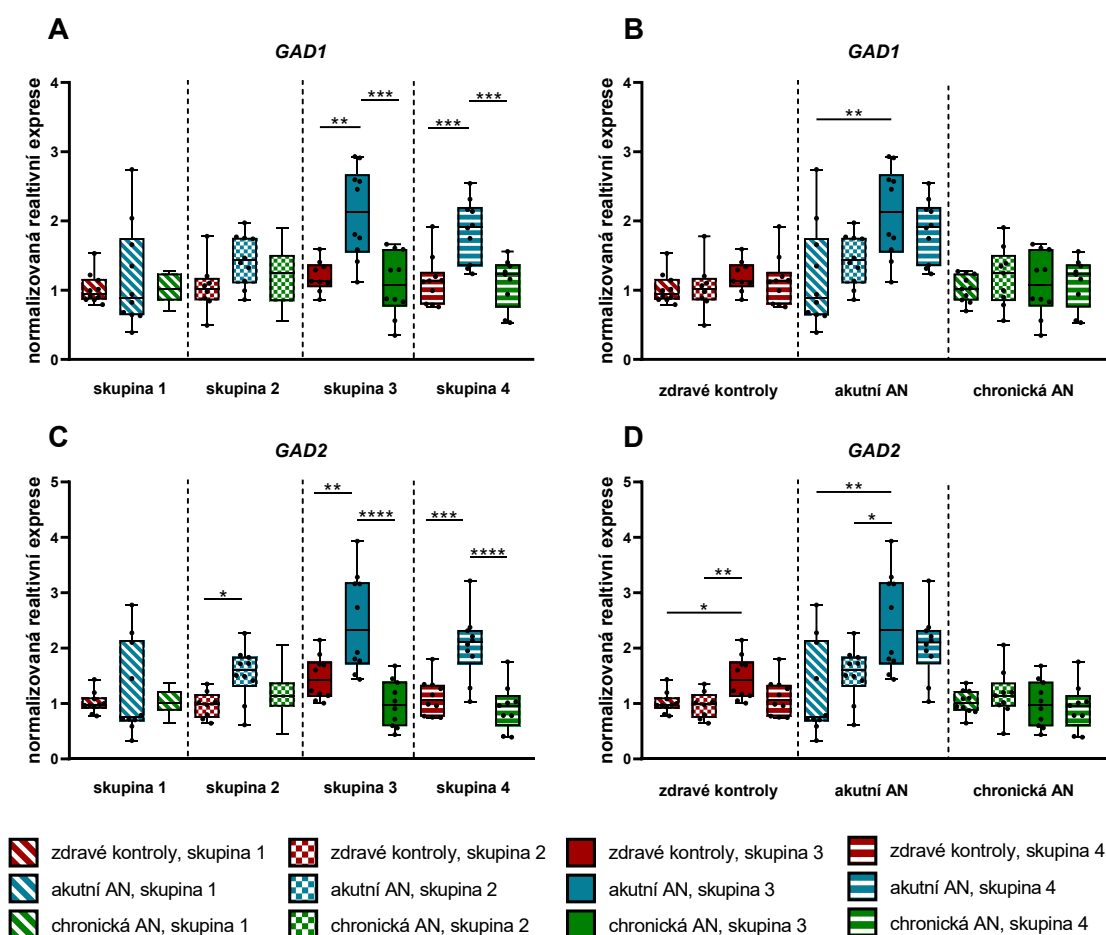
Dále byla sledována exprese genu *5HT2C* kódující serotoninový receptor 2C, kdy obdobně jako v předchozích případech byla exprese signifikantně zvýšena u myší ze skupiny 3 a 4 s mikrobiotou akutních pacientek ve srovnání s FMT zdravých kontrol a chronických pacientek (viz Obrázek 19 – A). Při porovnání skupin myší s akutní mikrobiotou byla v porovnání se skupinou 1 významně zvýšena exprese u skupiny 3 a také 4 (viz Obrázek 19 – B).



Obrázek 19: Normalizované relativní exprese genu *5HT2C* v hypothalamu. Relativní exprese byla normalizována expresí housekeeping genu *Hprt*. Data jsou získána kvantitativní PCR z celkem 120 myší, které byly rozděleny do skupin: 1 – *ad libitum*, bez kolečka; 2 – restrikce (70 % denního příjmu), bez kolečka; 3 – *ad libitum*, s kolečkem; 4 – restrikce (70 % denního příjmu), s kolečkem. Myším byla transplantována mikrobiota zdravých kontrol, akutních nebo chronických pacientek. A – porovnání normalizované exprese genu *5HT2C* v rámci skupiny s různými FMT. B – porovnání normalizované exprese genu *5HT2C* mezi skupinami v rámci stejného FMT. Oba grafy mají společnou legendu dole. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8.0.1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

V rámci GABA dráhy byla sledována exprese genů, které kódují enzym glutamátdekarboxylasu, který převádí glutamát na GABA. U genu *GAD1* byla také zvýšena exprese u myší s FMT akutních pacientek ze skupiny 3 a 4 ve srovnání s myši s mikrobiotou zdravých kontrol a chronických pacientek (viz Obrázek 20 – A na str. 70). Obdobně tomu bylo i u genu *GAD2* s tím rozdílem, že zde byla zvýšena exprese i u skupiny 2 s akutním FMT ale pouze oproti myším se zdravou mikrobiotou (viz Obrázek 20 – C na str. 70). Při srovnání skupin v rámci stejného FMT byla u genu *GAD1* zvýšena exprese u 3 skupiny s mikrobiotou akutních pacientek oproti skupině 1 (viz Obrázek 20 – B na str. 70). Stejně tak tomu bylo i u genu *GAD2*, avšak zde byla exprese

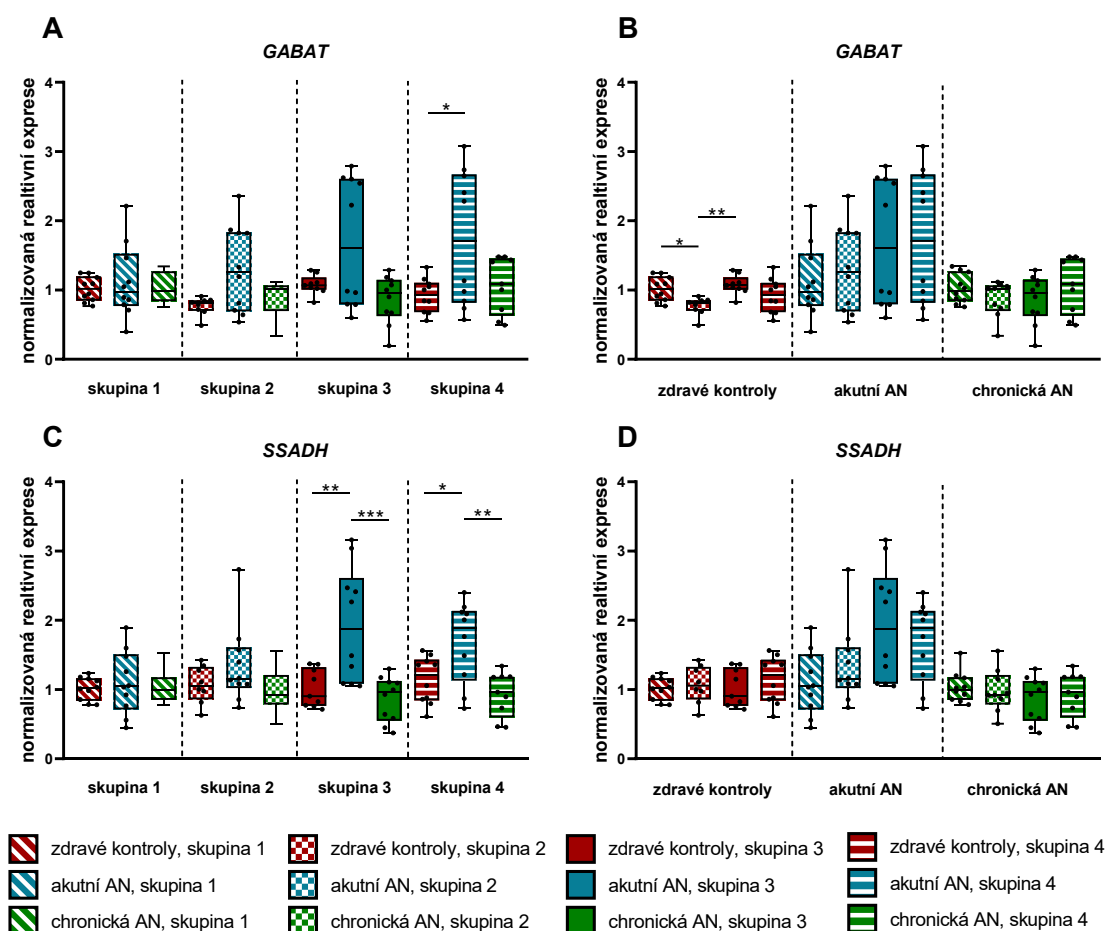
signifikantně zvýšena i oproti skupině 2 a to jak v případě FMT akutních pacientek, tak i u myši s mikrobiotou zdravých kontrol (viz Obrázek 20 – D).



Obrázek 20: Normalizované relativní exprese genů *GAD1* a *GAD2* v hypotalamu. Relativní exprese byla normalizována expresí housekeeping genu *Hprt*. Data jsou získána kvantitativní PCR z celkem 120 myši, které byly rozděleny do skupin: 1 – *ad libitum*, bez kolečka; 2 – restrikce (70 % denního příjmu), bez kolečka; 3 – *ad libitum*, s kolečkem; 4 – restrikce (70 % denního příjmu), s kolečkem. Myšim byla transplantována mikrobiota zdravých kontrol, akutních nebo chronických pacientek. A – porovnání normalizované exprese genu *GAD1* v rámci skupiny s různými FMT. Graf B – porovnání normalizované exprese genu *GAD1* mezi skupinami v rámci stejného FMT. Graf C – porovnání normalizované exprese genu *GAD2* v rámci skupiny s různými FMT. Graf D – porovnání normalizované exprese genu *GAD2* mezi skupinami v rámci stejného FMT. Všechny grafy mají společnou legendu dole. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8.0.1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

Posledními sledovanými geny byly geny kódující enzymy, které se podílejí na degradaci GABA. Gen GABAT kóduje enzym GABA-transaminasu a jeho exprese byla zvýšena taktéž u myši s mikrobiotou od akutních pacientek, avšak signifikantně pouze u skupiny 4 v porovnání s myšmi s mikrobiotou zdravých kontrol (viz Obrázek 21 – A na str. 71). U myši s FMT zdravých kontrol byla exprese genu signifikantně zvýšena u skupiny 3 a 1 ve srovnání se skupinou 2 (viz Obrázek 21 – B na str. 71). Dalšího kroku v degradaci GABA se účastní enzym sukcinát-semialdehyd dehydrogenasa, který je

kódován genem *SSADH*, jehož exprese byla zvýšena u myší s FMT akutních pacientek ve srovnání s FMT zdravých kontrol a chronických pacientek, a to jak u skupiny 3 tak i 4 (viz Obrázek 21 – C). Při porovnání mezi skupinami se stejným FMT nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly (viz Obrázek 21 – D).



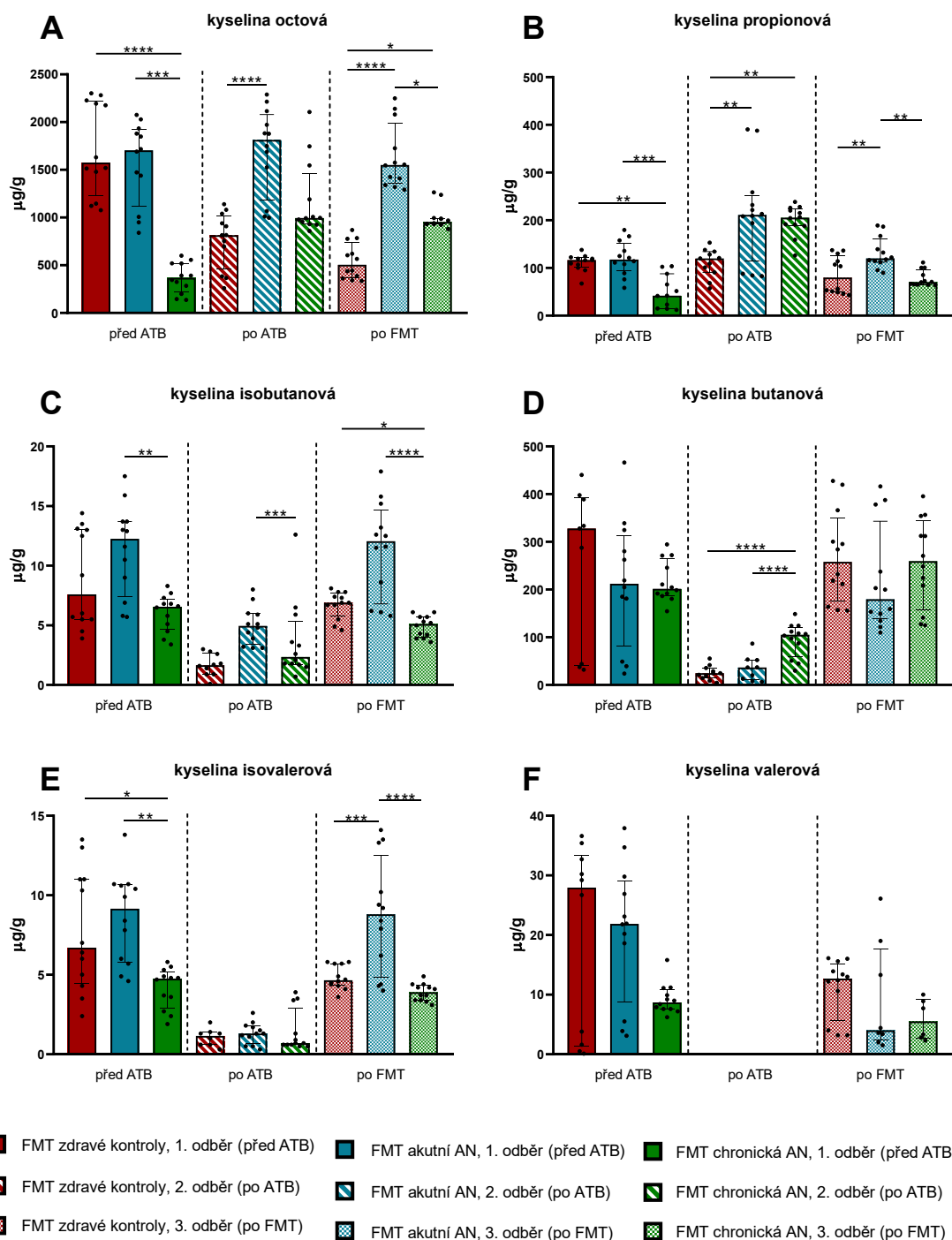
Obrázek 21: Normalizované relativní exprese genů *GABAT* a *SSADH* v hypothalamu. Relativní exprese byla normalizována expresí housekeeping genu *Hprt*. Data jsou získána kvantitativní PCR z celkem 120 myší, které byly rozděleny do skupin: 1 – *ad libitum*, bez kolečka; 2 – restrikce (70 % denního příjmu), bez kolečka; 3 – *ad libitum*, s kolečkem; 4 – restrikce (70 % denního příjmu), s kolečkem. Myším byla transplantována mikrobiota zdravých kontrol, akutních nebo chronických pacientek. A – porovnání normalizované exprese genu *GABAT* v rámci skupiny s různými FMT. B – porovnání normalizované exprese genu *GABAT* mezi skupinami v rámci stejného FMT. C – porovnání normalizované exprese genu *SSADH* v rámci skupiny s různými FMT. D – porovnání normalizované exprese genu *SSADH* mezi skupinami v rámci stejného FMT. Všechny grafy mají společnou legendu dole. Grafy byly vytvořeny v programu GraphPad Prism 8.0.1. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Při porovnání exprese hypothalamických peptidů u myší s odlišnou mikrobiotou je patrné, že nejvýznamnější rozdíly jsou u těch, kterým byla transplantována mikrobiota od pacientek v akutní fázi nemoci. Zároveň jsou tyto rozdíly nejvíce patrné u myší, které mají přístup k běhacímu kolečku.

5.6 Analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem a neurotransmiterů v myší stolici

V myší stolici získané z experimentu popsaného v kapitole 4.3.6 byly analyzovány hladiny vybraných SCFAs (acetát, propionát, isobutyryát, butyryát, isovalerát, valerát a hexanoát) pomocí LC-MS/MS. Statistická významnost byla zjišťována pomocí testu jednocestná ANOVA nebo Kruskal-Wallisův test. Nejprve byla zjišťována změna koncentrace SCFAs v průběhu prvních tří fází experimentu – před podáním ATB (1. odběr), po podání ATB (2. odběr) a nakonec po transplantaci kontrolní nebo patientské mikrobioty (3. odběr). V průběhu 1. a 2. odběru měly všechny myši stejné podmínky, při 3. odběru se již myši lišily dle FMT. Nejvyšší koncentraci na začátku experimentu měly hlavní tři SCFAs acetát, butyryát a propionát.

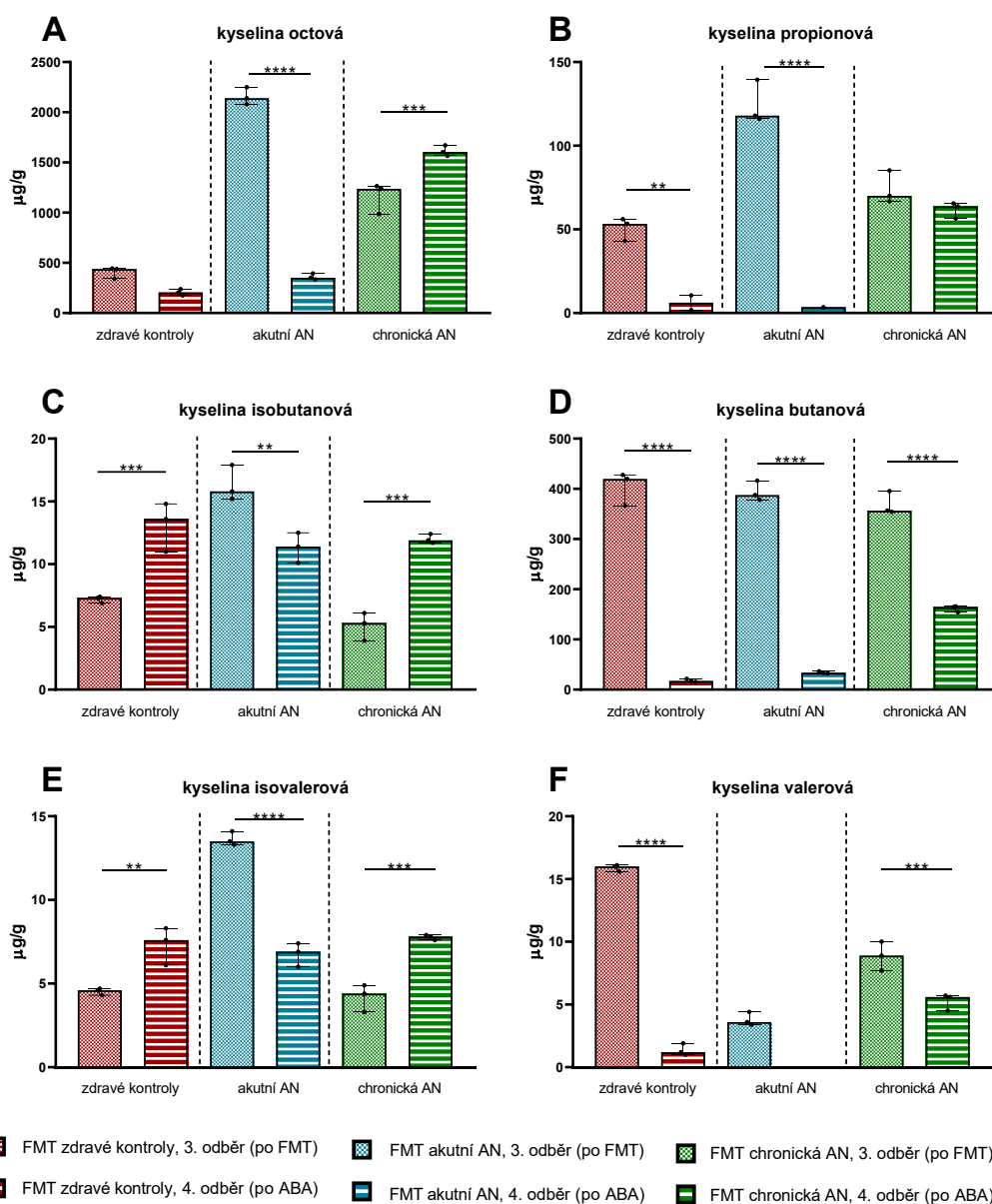
Koncentrace acetátu byla u dvou skupin na začátku experimentu na přibližně stejných hodnotách, avšak u třetího myšího experimentu byla počáteční koncentrace významně nižší. Po podání ATB došlo k různým výkyvům koncentrací (nárůst, pokles i bez změny). Po transplantaci střevní mikrobioty došlo u myši s FMT zdravých kontrol k poklesu koncentrace acetátu oproti 2. odběru. U myši s FMT pod pacientek nedošlo k téměř žádným změnám oproti 2. odběru, avšak u myši s FMT chronických pacientek šlo ve srovnání se stavem na začátku experimentu o významný nárůst (viz Obrázek 22 – A na str. 73). Stejně jako acetát i propionát byl v jednom případě velmi snížen než v případě druhých dvou experimentů, u nichž byl propionát v přibližně stejných hladinách. Po podání antibiotik došlo u dvou myších experimentů k nárůstu koncentrace kyseliny propionové a v případě třetího nedošlo k významné změně. Po transplantaci mikrobioty zdravých kontrol nedošlo výrazným změnám, a naopak u myši, kterým byla transplantována patientská mikrobiota, byl zjištěn pokles koncentrace propionátu (viz Obrázek 22 – B na str. 73). U isobutyryátu byl průběh změn v prvních třech fázích experimentu téměř identický u všech myších experimentů. Po podání antibiotik došlo k výraznému poklesu a po transplantaci mikrobioty došlo k nárůstu na obdobné hladiny jako byly na počátku experimentu (viz Obrázek 22 – C na str. 73). V případě butyryátu a isovalerátu byly zjištěny obdobné změny jako v případě isobutyryátu (viz Obrázek 22 – D, E na str. 73). U valerátu byly koncentrace po podání antibiotik pod limitem kvantifikace a koncentrace po transplantaci byly nižší než-li v případě 1. odběru (viz Obrázek 22 – F na str. 73).



Obrázek 22: Výsledky analýzy SCFAs (A – acetát, B – propionát, C – isobutyryát, D – butyryát, E – isovalerát, F – valerát) ve stolici myši před podáním antibiotik (ATB), po podání ATB a po transplantaci mikrobioty (FMT) zdravých kontrol, akutních nebo chronických pacientek. Analýza byla provedena metodou LC-MS/MS. * = hodnota $p < 0,05$; ** = hodnota $p < 0,01$; * = hodnota $p < 0,001$; **** = hodnota $p < 0,0001$. Pro grafické znázornění byl použit program GraphPad Prism 8.0.1.**

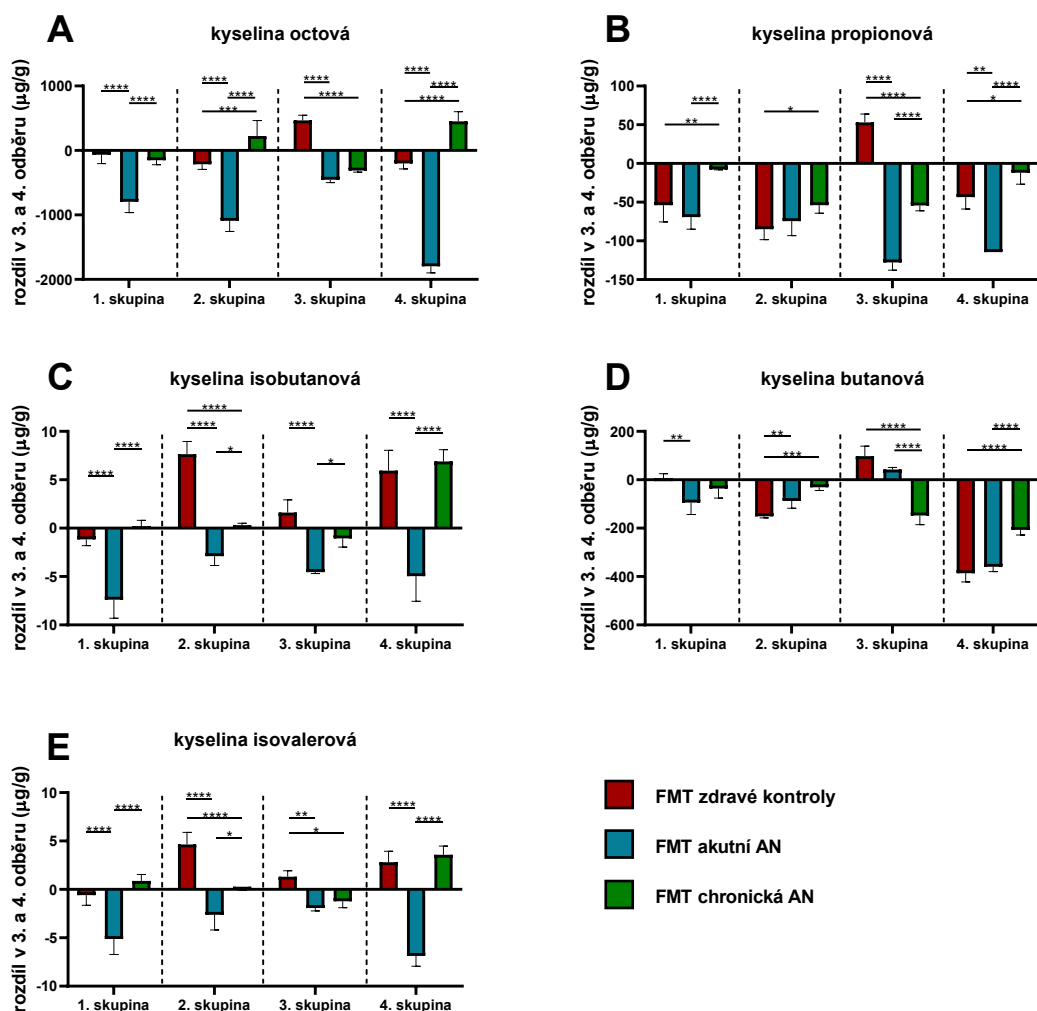
V poslední fázi experimentu byl kombinací restrikce potravy a přístupem k běhacímu kolečku u skupiny 4 indukován model ABA (4. odběr). Výsledky změn jsou pro jednotlivé SCFAs graficky znázorněny na Obrázku 23 – A–F na str. 74. U myši, které

měly transplantovanou mikrobiotu zdravých kontrol, došlo po snížení stravy na 70 % denního příjmu k poklesu koncentrace acetátu, propionátu, butyrátu a valerátu. Naopak koncentrace isobutyátu a isovalerátu po indukci ABA vzrostla. Měly-li myši FMT akutních pacientek došlo k významnému snížení všech SCFAs. V případě valerátu byly hodnoty pod limitem detekce. U myši s mikrobiotou chronických pacientek byly po indukci ABA zjištěny nižší koncentrace butyrátu, valerátu a propionátu, avšak u propionátu byl pokles nesignifikantní. Naopak koncentrace acetátu, isobutyátu a isovalerátu byla po indukci ABA významně vyšší než před indukci.



Obrázek 23: Výsledky analýzy SCFAs (A – acetát, B – propionát, C – isobutyrát, D – butyrát, E – isovalerát, F – valerát) ve stolici myši ze 4. skupiny po transplantaci mikrobioty (FMT) zdravých kontrol, akutních nebo chronických pacientek a po indukci anorexie založené na aktivitě (ABA). Analýza byla provedena metodou LC-MS/MS. * = hodnota $p < 0,05$; ** = hodnota $p < 0,01$; * = hodnota $p < 0,001$; **** = hodnota $p < 0,0001$. Pro grafické znázornění byl použit program GraphPad Prism 8.0.1.**

Stravovací podmínky se myším vždy měnily v poslední fázi experimentu, kdy myši byly rozděleny podle přítomnosti běhacího kolečka a stravy *ad libitum*/restrikce. Z výsledků hladin SCFAs bylo hodnoceno, jaký vliv má daná střevní mikrobiota na produkci SCFAs. Bylo zjištěno, že u kyseliny octové došlo k největší změně (pokles) v koncentraci u myší s mikrobiotou akutních pacientek, a to ve všech skupinách. U myší s mikrobiotou chronických pacientek došlo u skupiny se stravou *ad libitum* k poklesu koncentrace acetátu, a naopak u skupiny na restrikci došlo k vzrůstu koncentrace. U myší s kontrolní mikrobiotou došlo k mírnému poklesu s výjimkou skupiny 3, u které koncentrace acetátu stoupla. Po nastolení podmínek došlo k poklesu koncentrace kyseliny propionové u všech skupin s patientskou mikrobiotou. U myší s FMT zdravých kontrol byl taktéž zjištěn pokles v koncentraci propionátu, avšak ne u skupiny 3, kde byl významný nárůst. U myší s mikrobiotou akutních pacientek byl zjištěn také pokles isobutyrátu. Víceméně žádná změna v koncentraci byla zjištěna u myší s chronickou mikrobiotou ze skupiny 1 a 2. U skupiny 3 došlo k mírnému poklesu a u skupiny 4 došlo naopak k rapidnímu nárůstu koncentrace propionátu. Nárůst propionátu byl také zjištěn u skupiny 2, 3 a 4 s kontrolní mikrobiotou a naopak u skupiny 1 došlo k poklesu. Koncentrace kyseliny butanové klesla po nastolení podmínek u všech myších skupin s chronickou mikrobiotou. U myší s FMT akutních pacientek došlo k poklesu u skupiny 1, 2 a 4 a naopak u třetí skupiny byl zjištěn nárůst. Myši s kontrolní mikrobiotou měly po nastolení podmínek snížené hladiny butyrátu u skupiny 2 a 4 a naopak u skupiny 3 byl zjištěn nárůst. Myši skupiny s FMT zdravých kontrol nevykazovaly větší změny mezi 3. a 4. odběrem. Koncentrace kyseliny isovalerové poklesla u všech skupin myší s FMT akutních pacientek. U myších skupin s mikrobiotou zdravých kontrol byl zjištěn nárůst v koncentraci 2, 3 a 4 a u skupiny jedna došlo k mírnému poklesu. Myši s mikrobiotou chronických pacientek vykazovaly nárůst koncentrace isovalerátu u skupiny 1, 2 a 4 a u skupiny 3 byl zjištěn mírný pokles. Hodnoty valerátu zde nejsou ukázány, neboť mnoho hodnot bylo pod limitem kvantifikace. Všechny výše popsané změny jsou graficky znázorněné na Obrázku 24 – A–D na str. 76.



Obrázek 24: Rozdíl v koncentracích SCFAs v myší stolici z 3. a 4. odběru. Po 3. odběru byly nastoleny myší podmínky takto: 1. skupina – *ad libitum*, bez kolečka, 2. skupina – restrikce, bez kolečka, 3. skupina – *ad libitum*, kolečko, 4. skupina – restrikce, kolečko. Současně byla myším transplantována střevní mikrobiota zdravých kontrol a akutních nebo chronických pacientek. Statistické vyhodnocení probíhalo testem dvoucestná ANOVA. * = hodnota $p < 0,05$; ** = hodnota $p < 0,01$; *** = hodnota $p < 0,001$; **** = hodnota $p < 0,0001$. Pro grafické znázornění byl použit program GraphPad Prism 8.0.1.

6 Diskuze

Tato práce se zabývá vztahem mezi střevní mikrobiotou, jejími metabolity a mentální anorexií pomocí experimentální myšího modelu založeného na aktivitě. Střevní mikrobiota je producentem důležitých metabolitů jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem a neurotransmitery, jejichž vliv se stále častěji stává předmětem studií.

V první části této práce byly analyzovány SCFAs, neurotransmitery a kynurenin ve stolici a krevním séru zdravých kontrol a pacientek s AN, které byly dle délky trvání nemoci rozděleny na akutní (méně než 3 roky od vypuknutí nemoci) a chronické (7 let a více od vypuknutí nemoci). Z analýzy stolic bylo zjištěno, že pacientky s AN mají oproti zdravým kontrolám téměř poloviční množství acetátu, propionátu, butyrátu, valerátu, hexanátu a přibližně $1,3\times$ nižší množství isobutyátu a isovalerátu. Současně bylo zjištěno, že mezi akutními a chronickými pacientkami nebyly významné rozdíly v zastoupení těchto SCFAs. Výsledky hladin hlavních SCFAs – acetátu, propionátu a butyrátu, a rozvětvených kyselin korelují s výsledky, ke kterým došly i jiné vědecké studie [143, 167, 168]. Jelikož složení střevní mikrobioty je závislé na stravě jedince a mentální anorexie je poruchou příjmu potravy, odráží rozdíly v koncentracích SCFAs složení střevní mikrobioty. Mnoho jiných vědeckých studií prokázalo, že pacienti s AN mají sníženou mikrobiální diverzitu a rozdílné složení oproti zdravým jedincům. Příkladem může být rod *Roseburia* a *Faecalibacterium*, kteří jsou významnými producenty butyrátu, a bývají u pacientů s AN zastoupeny méně než u zdravých kontrol [169]. Rozvětvené SCFAs isobutyát a isovalerát jsou produkovány střevními bakteriemi z aminokyselin a jejich snížená hladina může souviset s celkově nízkým příjmem bílkovin. Absence významného rozdílu mezi chronickými a akutními pacientkami může naznačovat, že dysbióza a změny v produkci metabolitů střevní mikrobioty se stabilizují relativně rychle po nástupu onemocnění a přetrvávají i při její chronifikaci. Nicméně je důležité podotknout, že ostatní studie nerozdělují pacienty na akutní a chronické, jak tomu bylo v této diplomové práci. Současně bylo zjištěno, že střevní mikrobiom pacientek s AN vykazuje vysokou interindividuální variabilitu [143]. V krevním séru pacientek a zdravých kontrol byl detekován pouze acetát, butyrát a heptanát, z čehož pouze u butyrátu byl zjištěn signifikantní rozdíl, a to mezi zdravými kontrolami a akutními pacientkami. Zvýšený butyrát v krevním séru může teoreticky ukazovat na vyšší propustnost střeva, která není u pacientů s AN neobvyklá [170]. Ačkoliv je butyrát

primárně využíván jako zdroj energie pro enterocyty, mohl by být ve střevě méně využit, pokud by ve střevní sliznici byla atrofie či zánět. Rovněž mají SCFAs vliv na produkci periferních regulátorů sytosti a hladu jako je glukagonu podobný peptid 1 a peptid YY [171]. Nižší produkce SCFAs by mohla znamenat nižší pocit sytosti, a tudíž rychlejší navození pocitu hladu po jídle. U pacientek s AN je však vnímání hladu a sytosti silně narušeno psychologickými faktory a tento „biologický hlad“ silně potlačují strachem z přibírání.

V rámci analýzy neurotransmiterů ve stolici zdravých kontrol a pacientek s AN byl statisticky významný rozdíl zjištěn pouze u GABA v porovnání akutních pacientek se zdravými kontrolami. Ke sníženým hodnotám GABA dospěla i práce doktorky Procházkové a kolektivu provedená ve stejné laboratoři jako tato diplomová práce [143]. Snížená GABA u pacientů s mentální anorexií bývá spojována s úzkostnými a depresivními stavy a její snížená hladina může odrážet dysbiózu střevní mikrobioty. V práci doktorky Procházkové byla zjištěna i signifikantně snížená koncentrace dopaminu u pacientek s AN, což se liší od výsledků dosažených analýzou v rámci této práce, kde byl dopamin pod limitem detekce, a to jak u zdravých kontrol, tak u pacientek s AN. Koncentrace serotoninu, tryptofanu a kynureninu se mezi skupinami signifikantně nelišily, což koreluje s výsledky předešlé studie. Koncentrace dopaminu pod limitem kvantifikace byla i v krevních sérech pacientek s AN a zdravých kontrol, avšak ostatní stanovované neurotransmitery a kynurenin byly u pacientek s AN signifikantně sníženy oproti zdravým kontrolám. Výjimku tvořil tryptofan, který byl signifikantně snížen pouze u akutních pacientek. Rozdíl v koncentracích neurotransmiterů ve stolici a v krevním séru by mohl být způsoben narušením vstřebávání ze střeva, což by mohlo odrážet stav střeva u pacientů s AN. Ovšem je nutné podotknout, že střevní mikrobiota je pouze minoritním producentem neurotransmiterů a kynureninu a tudíž rozdíl koncentrací v krevním séru nemusí souviset s produkcí ve střevě, ale mohou být odrazem celkové patologie mentální anorexie.

Druhá část této práce využívala pro zkoumání vlivu střevní mikrobioty u mentální anorexie experimentální myši model, který umožňuje sledovat mechanismy podílející se na vývoji onemocnění. Transplantace střevní mikrobioty byla důležitým aspektem této práce a tento přístup je dnes běžně využíván jako experimentální model přenosu mikrobiálně zprostředkovaných fenotypů, avšak je nutné podotknout, že myši organismus

není přirozeným prostředím pro lidskou mikrobiotu. U myšího modelu zavedeného v rámci této diplomové práce bylo pozorováno, že určité fenotypové změny se u myší skutečně odrazily, což ukazuje, že mikrobiální transplantace byla funkčně přenesena. Nicméně některé rozdíly pozorované u lidských dárců se u myší neprojeví, což může odrážet jak biologická omezení modelu, tak odlišnou dietu nebo třeba imunitní odpověď.

Jedním z charakteristických rysů mentální anorexie je nadměrná fyzická aktivita, kterou se pacienti snaží kompenzovat kalorický příjem, který je i tak velmi nízký. V experimentech s myším modelem byla v pozorovací fázi a ABA fázi, kdy část myší měla restrikcí potravy, sledována aktivita na běhacím kolečku. Během pozorovací fáze (strava *ad libitum*) byly myši s patientskou mikrobiotou výrazně aktivnější než myši s mikrobiotou od zdravých jedinců, což může naznačovat, že střevní mikrobiota může ovlivnit motivaci k pohybu nezávisle na energetickém příjmu. Při restrikcí fázi (ABA fáze) se rozdíly mezi skupinami s odlišným FMT vyrovnaly, avšak když byla porovnána aktivita myší v ABA fázi s tou ve fázi pozorovací, myši s restrikcí potravy běhaly výrazně více než myši s neomezeným přístupem k potravě, a to zejména ty s patientskou mikrobiotou. Tyto výsledky naznačují, že mikrobiota patientek s AN stimuluje hyperaktivitu, která je jedním z klíčových behaviorálních znaků mentální anorexie. Ačkoliv nejsou k dispozici publikace, které by přímo potvrzovaly vliv snížené hladiny SCFAs na nadměrnou aktivitu, tak některé studie spojují jejich nízké koncentrace s projevy hyperaktivity. Například výzkum u dětí s poruchou pozornosti spojené s nadměrnou aktivitou ukázal, že pacienti měli snížené koncentrace SCFAs ve stolici [172]. V rámci analýzy SCFAs ve stolici myší bylo zjištěno, že po indukci ABA došlo u myší s mikrobiotou akutních patientek k výraznému poklesu koncentrací hlavních SCFAs. Tato skutečnost naznačuje, že dysbióza spojená s restrikcí může snižovat produkci SCFAs, což může souviset s nárůstem aktivity pozorovaným u myší s patientskou mikrobiotou.

Krom sledování aktivity byla v průběhu pozorovací a ABA fáze zaznamenávána také hmotnost myší. V průběhu pozorovací fáze, kdy měly všechny myši přístup k potravě *ad libitum*, bylo pozorováno, že myši s patientskou mikrobiotou nabíraly na hmotnosti více než myši s FMT od zdravých kontrol. Tato skutečnost je překvapivá, neboť by se dalo očekávat, že mikrobiota patientek s AN bude spíše méně efektivní v podpoře energetické bilance. Výsledky by mohly naznačovat, že mikrobiota patientek je energeticky

úspornější, tedy že podporuje ukládání energie či efektivnější využití dostupných substrátů. Rozdíly v nabírání hmotnosti u jednotlivých FMT se vymazaly, když byla u myši zahájena restrikce stravy. Hypotézu o energeticky úspornější mikrobiotě pacientek s AN podporuje i fakt, že myši s patientskou mikrobiotou jedly při stravě *ad libitum* méně než myši s kontrolní mikrobiotou.

Již dříve byla v laboratoři, kde byla zpracovávána tato diplomová práce, doktorkou Procházkovou a kolektivem pozorována odlišnost v hladinách neuotransmiterů ve stolici pacientek s AN [143]. Zároveň byla v této laboratoři zjištěna odlišná signalizace v hypotalamu myši s konvenční mikrobiotou, dysbiotickou mikrobiotou (antibiotiky léčené myši) a u bezmikrobních myši [173]. Z toho důvodu bylo žádoucí podívat se na ovlivnění signalizace těchto neurotransmiterů v mozku u zavedeného myšního modelu. K sledování exprese vybraných hypotalamických genů byla využita kvantitativní PCR, pomocí níž byla u myši s mikrobiotou akutních pacientek zjištěna zvýšená exprese genů GABA receptorů *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra5*, *Gabbr1* a *Gabbr2*. Současně byla zvýšena i exprese genů pro enzymy syntézy a degradace GABA *GADI*, *GAD2*, *GABAT* a *SSADH*. Koncentrace GABA byla jako jediná signifikantně snížena ve stolici pacientek s akutní AN i v krevním séru. Tato zjištění ukazují, že dráha kyseliny γ -aminomáselné má u mentální anorexie významnou úlohu. Hypotalamus hraje klíčovou roli v regulaci energetické homeostázy a chutí k jídlu, přičemž rovnováha mezi orexigenními NPY/AgRP neurony a anorexigenními POMC/CART neurony je zásadní. GABA, uvolňovaná z NPY/AgRP neuronů, působí inhibičně na POMC/CART neurony, čímž přispívá k podpoře chuti k jídlu [112]. Změny v expresi genů kódujících GABA receptory a enzymy podílející se na syntéze nebo degradaci GABA v hypotalamu by tak mohly významně narušit tuto regulaci.

Zvýšená exprese genu *Gabra1* kódující $\alpha 1$ podjednotku GABA-A receptoru u myši s FMT od akutních pacientek naznačuje potencionální nedostatečnou inhibici pocitu sytosti přes POMC/CART neurony. Podjednotka $\alpha 1$ je nejzastoupenější podjednotkou GABA-A receptoru a hraje klíčovou roli v jeho inhibičních účincích. Zvýšená exprese genů pro GABA-A receptory by tak mohla vysvětlovat, proč myši s akutní mikrobiotou i při stravě *ad libitum* jedí méně než myši s mikrobiotou zdravých jedinců. Obdobně byla u 3. skupiny myši s FMT od akutních pacientek nejvíce zvýšena exprese genu *Gabra2*, který kóduje podjednotku GABA a receptoru $\alpha 2$, která je spojována s anxiolytickými

účinky GABA [174]. Zvýšená exprese jejího genu by mohla souviset s adaptivními mechanismy na stres vyvolaný cvičením a také restrikcí, jelikož signifikantně byla zvýšena i u skupiny 4 (restrikce, kolečko).

Geny *Gabbr1* a *Gabbr2* kódují metabotropní GABA-B receptory spřažené s G-proteiny, které se liší od ionotropních GABA-A receptorů svým pomalejším a déle trvajícím působením. Jedná se o heterodimery skládajících se z dvou podjednotek, které jsou obě nezbytné pro plnou funkčnost receptoru. Aktivace GABA-B receptorů v hypothalamu má různorodé účinky (orexigenní i anorexigenní). Zároveň se ukazuje, že GABA-B receptor je spojen s návykovým chováním [175]. Výsledky některých studií naznačují, že GABA-B receptory hrají roli právě v regulaci chování souvisejícího s příjmem potravy a že jejich dysfunkce by tak mohla být zapojena do patogeneze mentální anorexie. GABA-B receptory interagují i s dalšími neurotransmiterovými systémy, což by též mohlo hrát roli v patogenezi AN [176].

Zajímavým zjištěním byla zvýšená exprese genů pro enzymy syntetizující GABA (*GAD*, *GAD2*) a současně zvýšena exprese genů pro enzymy degradující GABA (*GABAT*, *SSADH*). Zvýšená exprese byla zjištěna především u myši s akutní mikrobiotou ze skupiny 3 ale i 4. Toto zjištění podporuje výsledky, které ukazují, že deregulace GABA signalizace v mozku u pacientů s AN souvisí s deregulovatelnou chutí k jídlu, a to jak s hedonickou (u AN není jídlo bráno jako příjemné) tak homeostatickou (nižší fyzický hlad). Rovněž výsledky ukazují, že deregulace GABA souvisí i s psychiatrickými komorbiditami (úzkost, deprese) a s vyšší náchylností k vývoji anorexie [177]. Zajímavé zjištění popisuje studie Bloss a kolektivu, kteří poukazují na to, že různé genetické varianty v genech pro GABA receptory mohou hrát roli v zotavení z poruch příjmu potravy [178].

U myši s akutní mikrobiotou byla oproti myším s FMT od zdravých jedinců či chronických pacientek zjištěna výrazně zvýšená exprese genu *DRD1*, která kóduje dopaminový receptor D1, jenž se podílí na řízení odměny, motivace a pohybu. Konkrétně byla exprese genu nejvíce zvýšena u skupiny 3 tedy u skupiny, která měla stravu *ad libitum* a současně měla k dispozici běhací kolečko. Některé studie dávají gen *DRD1* do souvislosti s poruchou pozornosti spojenou s hyperaktivitou [179]. Avšak v současné době, nejsou k dispozici výsledky analýzy neurotransmiterů v myších použitých v rámci této diplomové práce a u lidských stolic byl dopamin pod limitem kvantifikace.

Na regulaci příjmu potravy má zásadní vliv serotogenní systém a konkrétně receptor 5HT_{2C} je spojován s pocitem sytosti a snížené chuti k jídlu [180]. Gen pro tento receptor byl u myši s mikrobiotou akutních pacientek zvýšen, a to především u obou skupin myši, které měly k dispozici běhací kolečko a lišily se ve stravě. Zvýšená exprese tohoto genu by mohla přispívat k omezování kalorického příjmu, které je pro mentální anorexii charakteristické. V patientské stolici, jak již bylo diskutováno, nebyly mezi zdravými kontrolami a pacientkami signifikantní rozdíly v hladině serotoninu. Nicméně ke snížení především u akutních pacientek došlo, ale bez statistické významnosti. Lehké snížení ve střevě by tedy mohlo být důsledkem určitého adaptivního mechanismu, kdy v důsledku nedostatku serotoninu ve střevě dochází k zvýšené expresi receptorů v mozku. Je důležité vzít v úvahu, že analýza serotoninu probíhala ze stolice (ve střevě se tvoří většina tělesného serotoninu), který hematoencefalickou bariérou neprochází, avšak mozek si dokáže produkovat vlastní serotonin z L-tryptofanu, který již hematoencefalickou bariérou prochází. Jedna z teorií vlivu mikrobioty na serotogenní systém pracuje s biodostupností L-tryptofanu, který by mohl být střevní mikrobiotou spotřebováván a snižovat tak jeho dostupnost pro mozek [181]. V rámci této práce bylo zjištěno, že hladina tryptofanu je v krevním séru akutních pacientek signifikantně snížena, což by mohlo korelovat s touto teorií. Další teorie zahrnuje SCFAs, které mají schopnost regulovat expresi enzymu tryptofanhydroxylasy účastnící se syntézy serotoninu z tryptofanu [75].

Již bylo nastíněno, že v modulaci signalizace prostřednictvím neurotransmiterů hrají roli metabolity produkované střevní mikrobiotou, jako jsou SCFAs, které mohou projít skrz hematoencefalickou bariéru. Ovlivňují signalizaci v trávicím traktu, zejména regulaci sytosti a potencionálně i produkci serotoninu. SCFAs se podílejí na komunikaci prostřednictvím osy střevo-mozek. Rovněž mohou modulovat imunitní odpověď a posilují střevní bariéru. Zároveň ovlivňují neurotransmisi, ze které plynou i různé psychiatrické komorbidity, se kterými se jedinci s mentální anorexií potýkají (například hyperaktivita). Pomocí inhibice histondeacetylasy mohou SCFAs regulovat také genovou expresi řady molekul [75]. Z analýzy SCFAs v myši stolici se ukazuje, že mikrobiota akutních pacientek spolu s aktivitou způsobuje největší snížení hladin SCFAs. Naopak myši s mikrobiotou chronických pacientek po nastolení podmínek (kolečko/bez, restriktce/*ad libitum*) vykazovaly v mnoha sledovaných parametrech výsledky srovnatelné s myši s FMT od zdravých kontrol a tento trend se ukazoval i u exprese

hypotalamických genů. Možným vysvětlením tohoto trendu je adaptace. Mikrobiota pacientek v chronické fázi může být stabilizovanější a vykazovat nižší extrémy, jelikož tělo si může vyvinout určité kompenzační mechanismy. Nicméně jsou-li porovnány výsledky koncentrací SCFAs ve stolici chronických pacientek s výsledky v myší stolici s mikrobiotou chronických pacientek, je evidentní, že koncentrace jsou rozdílné. Je důležité vzít v úvahu, že střevní prostředí myší se liší od lidského, což mohlo vést k neúplnému uchycení transplantované mikrobioty. Navíc chronické pacientky se s nemocí potýkají dlouho a jejich tělo je na toto onemocnění „navykuté“, naopak indukce ABA fáze se dá chápat jako navození akutní fáze, tudíž by bylo zajímavé sledovat, zda by se výsledky lišily, byla-li by ABA fáze držena po delší dobu.

Vliv střevní mikrobioty na různá onemocnění je stále častěji cílem vědeckého výzkumu, avšak mechanismy stále nejsou plně prostudovány. V rámci této studie budou ještě doměřeny koncentrace neurotransmiterů ve stolici myší. Zároveň aby se eliminovala zbytková mikrobiota myší při užití antibiotik, jsou experimenty opakovány s využitím bezmikrobních myší. V neposlední řadě by budoucí studie mohly zahrnout i behaviorální testy cílené na specifické aspekty mentální anorexie jako je deprese, úzkosti a nebo testy preference potravy [182, 183].

Tato diplomová práce poskytlá vhled do vlivu střevní mikrobioty na průběh onemocnění mentální anorexie. Prostřednictvím transplantace střevní mikrobioty do myšího modelu mentální anorexie jsme prokázali, že mikrobiota akutních pacientek indukuje specifické změny v expresi klíčových genů neurotransmiterových systémů v hypotalamu, včetně adrenergního, dopaminergního a GABAergního systému. Tyto změny jsou patrně vyvolány mimo jiné sníženou produkcí SCFAs, které výrazně ovlivňují pocit sytosti a hladu a zároveň neurotransmisi do CNS. Tyto změny naznačují komplexní narušení neurochemické rovnováhy v hypotalamu, které by mohlo přispívat k dysregulaci chuti k jídlu, zvýšené aktivitě a dalším behaviorálními abnormalitám pozorovaným u AN.

7 Souhrn

- 1) Analýzou stolic zdravých kontrol, akutních a chronických patientek s AN byly zjištěny významné rozdíly v hladinách mastných kyselin s krátkým řetězcem, přičemž v patientských stolicích ve srovnání se zdravými kontrolami byla hladina hlavních SCFAs acetátu, propionátu a butyrátu přibližně poloviční. Hladiny vybraných neurotransmiterů a kynureninu byly bez větších statisticky významných rozdílů. Výjimkou byla GABA, která byla u zdravých kontrol signifikantně zvýšena oproti akutním patientkám. V krevním séru byly nad limitem kvantifikace pouze kyseliny octová, butanová a heptanová, jejichž koncentrace byla mezi skupinami patientek a zdravých kontrol přibližně stejná. Výjimku tvořil butyrát, který byl u patientek s akutní AN signifikantně zvýšen oproti zdravým kontrolám. Koncentrace neurotransmiterů a kynureninu byla u všech patientek statisticky významně snížena oproti zdravým kontrolám.
- 2) Byl zaveden myší model mentální anorexie založený na aktivitě, kdy myši byly rozděleny do čtyř skupin dle přítomnosti běhacího kolečka a stravy *ad libitum*/restrikce, z čehož u 4. skupiny byl indukován ABA model (kolečko, restrikce). Skupiny byly vytvořeny proto, aby se odlišil efekt restrikce potravy, aktivity a kombinace obou faktorů. Po antibiotické kúře byla myším v průběhu experimentu pětkrát podána mikrobiota zdravých kontrol, akutních nebo chronických patientek s AN. Díky FMT bylo umožněno sledovat, jaký má vliv zdravá a patientská mikrobiota na myši při stejných podmínkách. U skupin, které měly k dispozici běhací kolečko, byla zaznamenávána aktivita a bylo zjištěno, že myši s patientskou mikrobiotou vykazují při stravě *ad libitum* vyšší aktivitu než ty s mikrobiotou zdravých dárců a současně tyto myši přibíraly více na váze. Byly-li myši na restrikci, aktivita a změna hmotnosti se mezi FMT nelišily. Rovněž bylo zjištěno, že v porovnání aktivity při stravě *ad libitum* a při restrikci, tak ABA myši s patientskou mikrobiotou byly aktivnější. V neposlední řadě bylo zjištěno, že myši s transplantovanou mikrobiotou akutních patientek s AN jedly při stravě *ad libitum* méně než myši s kontrolní mikrobiotou.
- 3) Ze všech odběrů myší stolice byla izolována DNA, která byla použita na tvorbu knihoven pro sekvenaci nové generace.
- 4) Pomocí qPCR byla zjištěná zvýšená exprese hypothalamických genů především u myší skupiny 3 (*ad libitum*, kolečko) a 4 (ABA) s mikrobiotou akutních

pacientek *Adra1a*, *DRD1*, *Gabra1*, *Gabra2*, *Gabra5*, *Gabbr1*, *Gabbr2*, *GAD1*, *GAD2*, *GABAT* a *SSADH*. Expresy u myší s mikrobiotou chronických pacientek se víceméně nelišily od myší s FMT od zdravých kontrol.

- 5) V odebrané myší stolici byly metodou LC-MS/MS stanoveny koncentrace SCFAs. Myši s mikrobiotou akutních pacientek ze skupiny 4 (ABA) vykazovaly po nastolení podmínek nejvyšší změnu (snížení) v koncentraci všech analyzovaných SCFAs, z čehož u kyseliny valerové byla při 4. odběru koncentrace pro limitem kvantifikace. Myši s FMT od chronických pacientek mnohdy vykazovaly obdobné výsledky jako zdravé kontroly.

Seznam použité literatury

- [1] Thursby, E.; Juge, N.: Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **474**:11, 1823–1836 (2017).
- [2] Carabotti, M.; Scirocco, A.; Maselli, M. A.; Severi, C.: The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann. Gastroenterol. Q. Publ. Hell. Soc. Gastroenterol.* **28**:2, 203–209 (2015).
- [3] Farzi, A.; Fröhlich, E. E.; Holzer, P.: Gut Microbiota and the Neuroendocrine System. *Neurotherapeutics.* **15**:1, 5–22 (2018).
- [4] Ghenciulescu, A.; Park, R. J.; Burnet, P. W. J.: The Gut Microbiome in Anorexia Nervosa: Friend or Foe? *Front. Psychiatry.* **11**, (2021).
- [5] Al Bander, Z.; Nitert, M. D.; Mousa, A.; Naderpoor, N.: The Gut Microbiota and Inflammation: An Overview. *Int. J. Environ. Res. Public. Health.* **17**:20, 7618 (2020).
- [6] Ursell, L. K.; Metcalf, J. L.; Parfrey, L. W.; Knight, R.: Defining the human microbiome. *Nutr. Rev.* **70**:1, 38–44 (2012).
- [7] Sokol, H.: [Definition and roles of the gut microbiota]. *Rev. Prat.* **69**:7, 776–782 (2019).
- [8] Gill, S. R.; Pop, M.; DeBoy, R. T.; Eckburg, P. B.; Turnbaugh, P. J.; Samuel, B. S.; Gordon, J. I.; Relman, D. A.; Fraser-Liggett, C. M.; Nelson, K. E.: Metagenomic Analysis of the Human Distal Gut Microbiome. *Science.* **312**:5778, 1355–1359 (2006).
- [9] Sender, R.; Fuchs, S.; Milo, R.: Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLOS Biol.* **14**:8, e1002533 (2016).
- [10] Robertson, R. C.; Manges, A. R.; Finlay, B. B.; Prendergast, A. J.: The Human Microbiome and Child Growth – First 1000 Days and Beyond. *Trends Microbiol.* **27**:2, 131–147 (2019).
- [11] Stanislawski, M. A.; Dabelea, D.; Wagner, B. D.; Iszatt, N.; Dahl, C.; Sontag, M. K.; Knight, R.; Lozupone, C. A.; Eggesbø, M.: Gut Microbiota in the First 2 Years of Life and the Association with Body Mass Index at Age 12 in a Norwegian Birth Cohort. *mBio.* **9**:5, 10.1128/mbio.01751-18 (2018).
- [12] Inchingolo, F.; Inchingolo, A. D.; Palumbo, I.; Trilli, I.; Guglielmo, M.; Mancini, A.; Palermo, A.; Inchingolo, A. M.; Dipalma, G.: The Impact of Cesarean Section Delivery on Intestinal Microbiota: Mechanisms, Consequences, and Perspectives—A Systematic Review. *Int. J. Mol. Sci.* **25**:2, 1055 (2024).
- [13] Pantazi, A. C.; Balasa, A. L.; Mihai, C. M.; Chisnoiu, T.; Lupu, V. V.; Kassim, M. A. K.; Mihai, L.; Frecus, C. E.; Chirila, S. I.; Lupu, A.; Andrusca, A.; Ionescu, C.; Cuzic, V.; Cambrea, S. C.: Development of Gut Microbiota in the First 1000 Days after Birth and Potential Interventions. *Nutrients.* **15**:16, 3647 (2023).
- [14] Davis, E. C.; Castagna, V. P.; Sela, D. A.; Hillard, M. A.; Lindberg, S.; Mantis, N. J.; Seppo, A. E.; Järvinen, K. M.: Gut Microbiome and Breast-feeding: Implications for Early Immune Regulation. *J. Allergy Clin. Immunol.* **150**:3, 523–534 (2022).
- [15] Le Doare, K.; Holder, B.; Bassett, A.; Pannaraj, P. S.: Mother’s Milk: A Purposeful Contribution to the Development of the Infant Microbiota and Immunity. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
- [16] German, J. B.; Freeman, S. L.; Lebrilla, C. B.; Mills, D. A.: Human Milk Oligosaccharides: Evolution, Structures and Bioselectivity as Substrates for Intestinal Bacteria. *Nestle. Nutr. Workshop Ser Pediatr. Program.* **62**, 205–222 (2008).

- [17] Stewart, C. J.; Ajami, N. J.; O'Brien, J. L.; Hutchinson, D. S.; Smith, D. P.; Wong, M. C.; Ross, M. C.; Lloyd, R. E.; Doddapaneni, H.; Metcalf, G. A.; Muzny, D.; Gibbs, R. A.; Vatanen, T.; Huttenhower, C.; Xavier, R. J.; Rewers, M.; Hagopian, W.; Toppari, J.; Ziegler, A.-G.; She, J.-X.; Akolkar, B.; Lernmark, A.; Hyoty, H.; Vehik, K.; Krischer, J. P.; Petrosino, J. F.: Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the TEDDY study. *Nature*. **562**:7728, 583–588 (2018).
- [18] Tanaka, M.; Nakayama, J.: Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol. Int.* **66**:4, 515–522 (2017).
- [19] Cronin, P.; Joyce, S. A.; O'Toole, P. W.; O'Connor, E. M.: Dietary Fibre Modulates the Gut Microbiota. *Nutrients*. **13**:5, 1655 (2021).
- [20] Oliver, A.; Chase, A. B.; Weihe, C.; Orchanian, S. B.; Riedel, S. F.; Hendrickson, C. L.; Lay, M.; Sewall, J. M.; Martiny, J. B. H.; Whiteson, K.: High-Fiber, Whole-Food Dietary Intervention Alters the Human Gut Microbiome but Not Fecal Short-Chain Fatty Acids. *mSystems*. **6**:2, 10.1128/msystems.00115-21 (2021).
- [21] Desai, M. S.; Seekatz, A. M.; Koropatkin, N. M.; Kamada, N.; Hickey, C. A.; Wolter, M.; Pudlo, N. A.; Kitamoto, S.; Terrapon, N.; Muller, A.; Young, V. B.; Henrissat, B.; Wilmes, P.; Stappenbeck, T. S.; Núñez, G.; Martens, E. C.: A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell*. **167**:5, 1339-1353.e21 (2016).
- [22] Waddell, I. S.; Orfila, C.: Dietary fiber in the prevention of obesity and obesity-related chronic diseases: From epidemiological evidence to potential molecular mechanisms. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **63**:27, 8752–8767 (2023).
- [23] World Health Organisation: *WHO updates guidelines on fats and carbohydrates*. Dostupné z URL: <<https://www.who.int/news/item/17-07-2023-who-updates-guidelines-on-fats-and-carbohydrates>> [cit. 10.02.2025]
- [24] Ross, F. C.; Patangia, D.; Grimaud, G.; Lavelle, A.; Dempsey, E. M.; Ross, R. P.; Stanton, C.: The interplay between diet and the gut microbiome: implications for health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **22**:11, 671–686 (2024).
- [25] García-Fernández, E.; Rico-Cabanas, L.; Rosgaard, N.; Estruch, R.; Bach-Faig, A.: Mediterranean Diet and Cardiometabolic Risk: A Review. *Nutrients*. **6**:9, 3474–3500 (2014).
- [26] Bach-Faig, A.; Berry, E. M.; Lairon, D.; Reguant, J.; Trichopoulos, A.; Dernini, S.; Medina, F. X.; Battino, M.; Belahsen, R.; Miranda, G.; Serra-Majem, L.: Mediterranean diet pyramid today. Science and cultural updates. *Public Health Nutr.* **14**:12A, 2274–2284 (2011).
- [27] Merra, G.; Noce, A.; Marrone, G.; Cintoni, M.; Tarsitano, M. G.; Capacci, A.; De Lorenzo, A.: Influence of Mediterranean Diet on Human Gut Microbiota. *Nutrients*. **13**:1, 7 (2020).
- [28] Zhang, G.; Le Souëf, P.: The influence of modern living conditions on the human microbiome and potential therapeutic opportunities for allergy prevention. *World Allergy Organ. J.* **17**:1, 100857 (2024).
- [29] Nakayama, J.; Watanabe, K.; Jiang, J.; Matsuda, K.; Chao, S.-H.; Haryono, P.; La-ongkham, O.; Sarwoko, M.-A.; Sujaya, I. N.; Zhao, L.; Chen, K.-T.; Chen, Y.-P.; Chiu, H.-H.; Hidaka, T.; Huang, N.-X.; Kiyohara, C.; Kurakawa, T.; Sakamoto, N.; Sonomoto, K.; Tashiro, K.; Tsuji, H.; Chen, M.-J.; Leelavatcharamas, V.; Liao, C.-C.; Nitisinprasert, S.; Rahayu, E. S.; Ren, F.-Z.; Tsai, Y.-C.; Lee, Y.-K.: Diversity in gut bacterial community of school-age children in Asia. *Sci. Rep.* **5**:1, 8397 (2015).
- [30] Schnorr, S. L.; Candela, M.; Rampelli, S.; Centanni, M.; Consolandi, C.; Basaglia, G.; Turrioni, S.; Biagi, E.; Peano, C.; Severgnini, M.; Fiori, J.; Gotti, R.; De Bellis, G.; Luiselli, D.; Brigidi, P.;

- Mabulla, A.; Marlowe, F.; Henry, A. G.; Crittenden, A. N.: Gut microbiome of the Hadza hunter-gatherers. *Nat. Commun.* **5**:1, 3654 (2014).
- [31] De Filippo, C.; Cavalieri, D.; Di Paola, M.; Ramazzotti, M.; Poullet, J. B.; Massart, S.; Collini, S.; Pieraccini, G.; Lionetti, P.: Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**:33, 14691–14696 (2010).
- [32] Prasoodanan P. K., V.; Sharma, A. K.; Mahajan, S.; Dhakan, D. B.; Maji, A.; Scaria, J.; Sharma, V. K.: Western and non-western gut microbiomes reveal new roles of Prevotella in carbohydrate metabolism and mouth–gut axis. *Npj Biofilms Microbiomes.* **7**:1, 1–17 (2021).
- [33] Smith, R. P.; Easson, C.; Lyle, S. M.; Kapoor, R.; Donnelly, C. P.; Davidson, E. J.; Parikh, E.; Lopez, J. V.; Tartar, J. L.: Gut microbiome diversity is associated with sleep physiology in humans. *PLoS ONE.* **14**:10, e0222394 (2019).
- [34] Monda, V.; Villano, I.; Messina, A.; Valenzano, A.; Esposito, T.; Moscatelli, F.; Viggiano, A.; Cibelli, G.; Chieffi, S.; Monda, M.; Messina, G.: Exercise Modifies the Gut Microbiota with Positive Health Effects. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2017**, 3831972 (2017).
- [35] Wu, J.; Zhang, B.; Zhou, S.; Huang, Z.; Xu, Y.; Lu, X.; Zheng, X.; Ouyang, D.: Associations between gut microbiota and sleep: a two-sample, bidirectional Mendelian randomization study. *Front. Microbiol.* **14**, (2023).
- [36] Johnson, A. J.; Vangay, P.; Al-Ghalith, G. A.; Hillmann, B. M.; Ward, T. L.; Shields-Cutler, R. R.; Kim, A. D.; Shmagel, A. K.; Syed, A. N.; Walter, J.; Menon, R.; Koecher, K.; Knights, D.: Daily Sampling Reveals Personalized Diet-Microbiome Associations in Humans. *Cell Host Microbe.* **25**:6, 789–802.e5 (2019).
- [37] Hrnčir, T.: Gut Microbiota Dysbiosis: Triggers, Consequences, Diagnostic and Therapeutic Options. *Microorganisms.* **10**:3, 578 (2022).
- [38] Schippa, S.; Conte, M. P.: Dysbiotic Events in Gut Microbiota: Impact on Human Health. *Nutrients.* **6**:12, 5786–5805 (2014).
- [39] Hrnčirova, L.; Machova, V.; Trckova, E.; Krejsek, J.; Hrnčir, T.: Food Preservatives Induce Proteobacteria Dysbiosis in Human-Microbiota Associated Nod2-Deficient Mice. *Microorganisms.* **7**:10, 383 (2019).
- [40] Adak, A.; Khan, M. R.: An insight into gut microbiota and its functionalities. *Cell. Mol. Life Sci.* **76**:3, 473–493 (2019).
- [41] Ruas-Madiedo, P.; Gueimonde, M.; Fernández-García, M.; Reyes-Gavilán, C. G. de los; Margolles, A.: Mucin Degradation by Bifidobacterium Strains Isolated from the Human Intestinal Microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**:6, 1936–1940 (2008).
- [42] Cantarel, B. L.; Lombard, V.; Henrissat, B.: Complex Carbohydrate Utilization by the Healthy Human Microbiome. *PLOS ONE.* **7**:6, e28742 (2012).
- [43] Jandhyala, S. M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Reddy, D. N.: Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol. WJG.* **21**:29, 8787–8803 (2015).
- [44] Chiu, L.; Bazin, T.; Truchetet, M.-E.; Schaefferbeke, T.; Delhaes, L.; Pradeu, T.: Protective Microbiota: From Localized to Long-Reaching Co-Immunity. *Front. Immunol.* **8**, 1678 (2017).
- [45] Wiertsema, S. P.; Bergenhenegouwen, J. van; Garssen, J.; Knippels, L. M. J.: The Interplay between the Gut Microbiome and the Immune System in the Context of Infectious Diseases throughout Life and the Role of Nutrition in Optimizing Treatment Strategies. *Nutrients.* **13**:3, 886 (2021).

- [46] Fan, Y.; Pedersen, O.: Gut microbiota in human metabolic health and disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**:1, 55–71 (2021).
- [47] Smith, E. A.; Macfarlane, G. T.: Dissimilatory Amino Acid Metabolism in Human Colonic Bacteria. *Anaerobe.* **3**:5, 327–337 (1997).
- [48] Besten, G. den; Eunen, K. van; Groen, A. K.; Venema, K.; Reijngoud, D.-J.; Bakker, B. M.: The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* **54**:9, 2325–2340 (2013).
- [49] Koh, A.; Vadder, F. D.; Kovatcheva-Datchary, P.; Bäckhed, F.: From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell.* **165**:6, 1332–1345 (2016).
- [50] Ragsdale, S. W.; Pierce, E.: Acetogenesis and the Wood–Ljungdahl pathway of CO₂ fixation. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Proteins Proteomics.* **1784**:12, 1873–1898 (2008).
- [51] Reichardt, N.; Duncan, S. H.; Young, P.; Belenguer, A.; McWilliam Leitch, C.; Scott, K. P.; Flint, H. J.; Louis, P.: Phylogenetic distribution of three pathways for propionate production within the human gut microbiota. *ISME J.* **8**:6, 1323–1335 (2014).
- [52] Hetzel, M.; Brock, M.; Selmer, T.; Pierik, A. J.; Golding, B. T.; Buckel, W.: Acryloyl-CoA reductase from *Clostridium propionicum*. *Eur. J. Biochem.* **270**:5, 902–910 (2003).
- [53] Millard, P.; Pérochon, J.; Létisse, F.: Functional Analysis of Deoxyhexose Sugar Utilization in *Escherichia coli* Reveals Fermentative Metabolism under Aerobic Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**:16, e00719-21 .
- [54] Scott, K. P.; Martin, J. C.; Campbell, G.; Mayer, C.-D.; Flint, H. J.: Whole-Genome Transcription Profiling Reveals Genes Up-Regulated by Growth on Fucose in the Human Gut Bacterium “*Roseburia inulinivorans*”. *J. Bacteriol.* **188**:12, 4340–4349 (2006).
- [55] Gonzalez-Garcia, R.; McCubbin, T.; Navone, L.; Stowers, C.; Nielsen, L.; Marcellin, E.: Microbial Propionic Acid Production. *Fermentation.* **3**, 21 (2017).
- [56] Walter, K. A.; Nair, R. V.; Cary, J. W.; Bennett, G. N.; Papoutsakis, E. T.: Sequence and arrangement of two genes of the butyrate-synthesis pathway of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Gene.* **134**:1, 107–111 (1993).
- [57] Duncan, S. H.; Barcenilla, A.; Stewart, C. S.; Pryde, S. E.; Flint, H. J.: Acetate Utilization and Butyryl Coenzyme A (CoA):Acetate-CoA Transferase in Butyrate-Producing Bacteria from the Human Large Intestine. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:10, 5186–5190 (2002).
- [58] Yang, S.; Yu, X.; Zuo, Q.: Branched-Chain Fatty Acids and Obesity: A Narrative Review. *Nutr. Rev.* nuaf022 (2025).
- [59] Wang, H.; Gu, Y.; Zhou, W.; Zhao, D.; Qiao, Z.; Zheng, J.; Gao, J.; Chen, X.; Ren, C.; Xu, Y.: Adaptability of a Caproate-Producing Bacterium Contributes to Its Dominance in an Anaerobic Fermentation System. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**:20, e01203-21 .
- [60] Zhu, X.; Tao, Y.; Liang, C.; Li, X.; Wei, N.; Zhang, W.; Zhou, Y.; Yang, Y.; Bo, T.: The synthesis of n-caproate from lactate: a new efficient process for medium-chain carboxylates production. *Sci. Rep.* **5**:1, 14360 (2015).
- [61] Recharla, N.; Geesala, R.; Shi, X.-Z.: Gut Microbial Metabolite Butyrate and Its Therapeutic Role in Inflammatory Bowel Disease: A Literature Review. *Nutrients.* **15**:10, 2275 (2023).
- [62] Cook; Sellin: Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **12**:6, 499–507 (1998).

- [63] Boets, E.; Gomand, S. V.; Deroover, L.; Preston, T.; Vermeulen, K.; De Preter, V.; Hamer, H. M.; Van den Mooter, G.; De Vuyst, L.; Courtin, C. M.; Annaert, P.; Delcour, J. A.; Verbeke, K. A.: Systemic availability and metabolism of colonic-derived short-chain fatty acids in healthy subjects: a stable isotope study. *J. Physiol.* **595**:2, 541–555 (2017).
- [64] Chambers, E. S.; Morrison, D. J.; Frost, G.: Control of appetite and energy intake by SCFA: what are the potential underlying mechanisms? *Proc. Nutr. Soc.* **74**:3, 328–336 (2015).
- [65] Landau, B. R.; Schumann, W. C.; Chandramouli, V.; Magnusson, I.; Kumaran, K.; Wahren, J.: ¹⁴C-labeled propionate metabolism in vivo and estimates of hepatic gluconeogenesis relative to Krebs cycle flux. *Am. J. Physiol.-Endocrinol. Metab.* **265**:4, E636–E647 (1993).
- [66] Cummings, J. H.; Pomare, E. W.; Branch, W. J.; Naylor, C. P.; Macfarlane, G. T.: Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood. *Gut.* **28**:10, 1221–1227 (1987).
- [67] Schönfeld, P.; Wojtczak, L.: Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J. Lipid Res.* **57**:6, 943–954 (2016).
- [68] Moffett, J. R.; Puthillathu, N.; Vengilote, R.; Jaworski, D. M.; Namboodiri, A. M.: Acetate Revisited: A Key Biomolecule at the Nexus of Metabolism, Epigenetics, and Oncogenesis – Part 2: Acetate and ACS2 in Health and Disease. *Front. Physiol.* **11**, (2020).
- [69] Jørgensen, J. R.; Clausen, M. R.; Mortensen, P. B.: Oxidation of short and medium chain C2–C8 fatty acids in Sprague-Dawley rat colonocytes. *Gut.* **40**:3, 400–405 (1997).
- [70] Fischer, J. E.: Metabolism of -Methyl-C5 Fatty Acids by Mitochondria of Rat Liver: Effect of Biotin Nutriture. *Exp. Biol. Med.* **88**:2, 227–230 (1955).
- [71] Louise: Isovaleric acid - Metabolite of the month - biocrates life sciences ag. (2021).
- [72] Pérez-Reytor, D.; Puebla, C.; Karahanian, E.; García, K.: Use of Short-Chain Fatty Acids for the Recovery of the Intestinal Epithelial Barrier Affected by Bacterial Toxins. *Front. Physiol.* **12**, 650313 (2021).
- [73] Ikeda, T.; Nishida, A.; Yamano, M.; Kimura, I.: Short-chain fatty acid receptors and gut microbiota as therapeutic targets in metabolic, immune, and neurological diseases. *Pharmacol. Ther.* **239**, 108273 (2022).
- [74] Tan, J.; McKenzie, C.; Potamitis, M.; Thorburn, A. N.; Mackay, C. R.; Macia, L.: Chapter Three - The Role of Short-Chain Fatty Acids in Health and Disease. *Adv. Immunol.* **121**, 91–119 (2014).
- [75] Silva, Y. P.; Bernardi, A.; Frozza, R. L.: The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. *Front. Endocrinol.* **11**, (2020).
- [76] Hu, M.; Alashkar Alhamwe, B.; Santner-Nanan, B.; Miethe, S.; Harb, H.; Renz, H.; Potaczek, D. P.; Nanan, R. K.: Short-Chain Fatty Acids Augment Differentiation and Function of Human Induced Regulatory T Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **23**:10, 5740 (2022).
- [77] Fock, E.; Parnova, R.: Mechanisms of Blood–Brain Barrier Protection by Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids. *Cells.* **12**:4, 657 (2023).
- [78] Roth, W.; Zadeh, K.; Vekariya, R.; Ge, Y.; Mohamadzadeh, M.: Tryptophan Metabolism and Gut-Brain Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**:6, 2973 (2021).
- [79] PubChem: *Tryptophan*. Dostupné z URL: <<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/6305>> [cit. 19.04.2025].
- [80] Potter, K.; Gayle, E. J.; Deb, S.: Effect of gut microbiome on serotonin metabolism: a personalized treatment approach. *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **397**:5, 2589–2602 (2024).

- [81] Gershon, M. D.: Review article: serotonin receptors and transporters — roles in normal and abnormal gastrointestinal motility. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **20**:s7, 3–14 (2004).
- [82] Hwang, Y. K.; Oh, J. S.: Interaction of the Vagus Nerve and Serotonin in the Gut–Brain Axis. *Int. J. Mol. Sci.* **26**:3, 1160 (2025).
- [83] O’Mahony, S. M.; Clarke, G.; Borre, Y. E.; Dinan, T. G.; Cryan, J. F.: Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* **277**, 32–48 (2015).
- [84] Schwarcz, R.; Bruno, J. P.; Muchowski, P. J.; Wu, H.-Q.: Kynurenines in the mammalian brain: when physiology meets pathology. *Nat. Rev. Neurosci.* **13**:7, 465–477 (2012).
- [85] Kennedy, P. J.; Cryan, J. F.; Dinan, T. G.; Clarke, G.: Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis. *Neuropharmacology.* **112**, 399–412 (2017).
- [86] Dehghani, M.; Kazemi Shariat Panahi, H.; Heng, B.; Guillemin, G. J.: The Gut Microbiota, Kynurenine Pathway, and Immune System Interaction in the Development of Brain Cancer. *Front. Cell Dev. Biol.* **8**, (2020).
- [87] Hou, Y.; Li, J.; Ying, S.: Tryptophan Metabolism and Gut Microbiota: A Novel Regulatory Axis Integrating the Microbiome, Immunity, and Cancer. *Metabolites.* **13**:11, 1166 (2023).
- [88] Zelante, T.; Iannitti, R. G.; Cunha, C.; De Luca, A.; Giovannini, G.; Pieraccini, G.; Zecchi, R.; D’Angelo, C.; Massi-Benedetti, C.; Fallarino, F.; Carvalho, A.; Puccetti, P.; Romani, L.: Tryptophan Catabolites from Microbiota Engage Aryl Hydrocarbon Receptor and Balance Mucosal Reactivity via Interleukin-22. *Immunity.* **39**:2, 372–385 (2013).
- [89] Chen, R. J.; Sharma, S.: GABA Receptor. *StatPearls.* (2025).
- [90] Otaru, N.; Ye, K.; Mujezinovic, D.; Berchtold, L.; Constancias, F.; Cornejo, F. A.; Krzystek, A.; Wouters, T. de; Braegger, C.; Lacroix, C.; Pugin, B.: GABA Production by Human Intestinal *Bacteroides* spp.: Prevalence, Regulation, and Role in Acid Stress Tolerance. *Front. Microbiol.* **12**, (2021).
- [91] Blachier, F.; Boutry, C.; Bos, C.; Tomé, D.: Metabolism and functions of l-glutamate in the epithelial cells of the small and large intestines. *Am. J. Clin. Nutr.* **90**:3, 814S–821S (2009).
- [92] Krantis, A.: GABA in the Mammalian Enteric Nervous System. *Physiology.* **15**:6, 284–290 (2000).
- [93] Qu, S.; Yu, Z.; Zhou, Y.; Wang, S.; Jia, M.; Chen, T.; Zhang, X.: Gut microbiota modulates neurotransmitter and gut-brain signaling. *Microbiol. Res.* **287**, 127858 (2024).
- [94] Mazzoli, R.; Pessione, E.: The Neuro-endocrinological Role of Microbial Glutamate and GABA Signaling. *Front. Microbiol.* **7**, (2016).
- [95] Liu, C. Z.; Feng, X. Y.; Liu, S.; Zhang, X.; Zhu, J.: Dopamine in the Gut. Singapore, Springer Singapore, 2021. ISBN 978-981-336-585-8.
- [96] Serio, R.; Zizzo, M. G.: The multiple roles of dopamine receptor activation in the modulation of gastrointestinal motility and mucosal function. *Auton. Neurosci.* **244**, 103041 (2023).
- [97] Rich, B. E.; Jackson, J. C.; Ora, L. O. de; Long, Z. G.; Uyeda, K. S.; Bess, E. N.: Alternative pathway for dopamine production by acetogenic gut bacteria that -Demethylate 3-Methoxytyramine, a metabolite of catechol -Methyltransferase. *J. Appl. Microbiol.* **133**:3, 1697–1708 (2022).
- [98] Reeds, P. J.; Burrin, D. G.; Stoll, B.; Jahoor, F.: Intestinal Glutamate Metabolism. *J. Nutr.* **130**:4, 978S–982S (2000).

- [99] Engevik, K. A.; Hazzard, A.; Puckett, B.; Hoch, K. M.; Haidacher, S. J.; Haag, A. M.; Spinler, J. K.; Versalovic, J.; Engevik, M. A.; Horvath, T. D.: Phylogenetically diverse bacterial species produce histamine. *Syst. Appl. Microbiol.* **47**:5, 126539 (2024).
- [100] Tarracchini, C.; Lugli, G. A.; Mancabelli, L.; Sinderen, D. van; Turrone, F.; Ventura, M.; Milani, C.: Exploring the vitamin biosynthesis landscape of the human gut microbiota. *mSystems*. **9**:10, e00929-24 (2024).
- [101] Collins, S. L.; Stine, J. G.; Bisanz, J. E.; Okafor, C. D.; Patterson, A. D.: Bile acids and the gut microbiota: metabolic interactions and impacts on disease. *Nat. Rev. Microbiol.* **21**:4, 236–247 (2023).
- [102] Fleming, M. A.; Ehsan, L.; Moore, S. R.; Levin, D. E.: The Enteric Nervous System and Its Emerging Role as a Therapeutic Target. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2020**, 8024171 (2020).
- [103] Bonaz, B.; Bazin, T.; Pellissier, S.: The Vagus Nerve at the Interface of the Microbiota-Gut-Brain Axis. *Front. Neurosci.* **12**, (2018).
- [104] Lal, S.; Kirkup, A. J.; Brunsden, A. M.; Thompson, D. G.; Grundy, D.: Vagal afferent responses to fatty acids of different chain length in the rat. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **281**:4, G907–G915 (2001).
- [105] Luesma, M. J.; López-Marco, L.; Monzón, M.; Santander, S.: Enteric Nervous System and Its Relationship with Neurological Diseases. *J. Clin. Med.* **13**:18, 5579 (2024).
- [106] Yuan, C.; He, Y.; Xie, K.; Feng, L.; Gao, S.; Cai, L.: Review of microbiota gut brain axis and innate immunity in inflammatory and infective diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **13**, (2023).
- [107] O’Riordan, K. J.; Collins, M. K.; Moloney, G. M.; Knox, E. G.; Aburto, M. R.; Fülling, C.; Morley, S. J.; Clarke, G.; Schellekens, H.; Cryan, J. F.: Short chain fatty acids: Microbial metabolites for gut-brain axis signalling. *Mol. Cell. Endocrinol.* **546**, 111572 (2022).
- [108] Rusch, J. A.; Layden, B. T.; Dugas, L. R.: Signalling cognition: the gut microbiota and hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Front. Endocrinol.* **14**, 1130689 (2023).
- [109] Tsigos, C.; Chrousos, G. P.: Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J. Psychosom. Res.* **53**:4, 865–871 (2002).
- [110] Bertollo, A. G.; Santos, C. F.; Bagatini, M. D.; Ignácio, Z. M.: Hypothalamus-pituitary-adrenal and gut-brain axes in biological interaction pathway of the depression. *Front. Neurosci.* **19**, 1541075 (2025).
- [111] Deem, J. D.; Faber, C. L.; Morton, G. J.: AgRP neurons: Regulators of feeding, energy expenditure, and behavior. *FEBS J.* **289**:8, 2362–2381 (2022).
- [112] Hinton, T.; Johnston, G. A. R.: GABA, epigallocatechin gallate, tea, and the gut-brain axis. *Neurochem. Int.* **180**, 105860 (2024).
- [113] Almutairi, S.; Sivadas, A.; Kwakowsky, A.: The Effect of Oral GABA on the Nervous System: Potential for Therapeutic Intervention. *Nutraceuticals*. **4**:2, 241–259 (2024).
- [114] Braga, J. D.; Thongngam, M.; Kumrungsee, T.: Gamma-aminobutyric acid as a potential postbiotic mediator in the gut–brain axis. *Npj Sci. Food*. **8**:1, 16 (2024).
- [115] Belevi, D.; Lambert, J. J.; Wan, M. L. Y.; Monteiro, A. R.; Nutt, D. J.; Swinny, J. D.: From bugs to brain: unravelling the GABA signalling networks in the brain–gut–microbiome axis. *Brain*. **awae413** (2024).
- [116] Kondoh, T.; Mallick, H. N.; Torii, K.: Activation of the gut-brain axis by dietary glutamate and physiologic significance in energy homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* **90**:3, 832–837 (2009).

- [117] Onaolapo, A. Y.; Onaolapo, O. J.: Glutamate and depression: Reflecting a deepening knowledge of the gut and brain effects of a ubiquitous molecule. *World J. Psychiatry*. **11**:7, 297–315 (2021).
- [118] Roubalová, R.; Procházková, P.; Papežová, H.; Smitka, K.; Bilej, M.; Tlaskalová-Hogenová, H.: Anorexia nervosa: Gut microbiota-immune-brain interactions. *Clin. Nutr. Edinb. Scotl.* **39**:3, 676–684 (2020).
- [119] Roubalova, R.; Prochazkova, P.; Dvorak, J.; Hill, M.; Papezova, H.; Kreisinger, J.; Bulant, J.; Lambertova, A.; Holanova, P.; Bilej, M.; Tlaskalova-Hogenova, H.: Altered Serum Immunological and Biochemical Parameters and Microbiota Composition in Patients With AN During Realimentation. *Front. Nutr.* **8**, (2021).
- [120] Mayer, E. A.; Nance, K.; Chen, S.: The Gut–Brain Axis. *Annu. Rev. Med.* **73**:Volume 73, 2022, 439–453 (2022).
- [121] Noble, E. E.; Hsu, T. M.; Kanoski, S. E.: Gut to Brain Dysbiosis: Mechanisms Linking Western Diet Consumption, the Microbiome, and Cognitive Impairment. *Front. Behav. Neurosci.* **11**, (2017).
- [122] Wang, S.; Jiang, Y.; Yang, A.; Meng, F.; Zhang, J.: The Expanding Burden of Neurodegenerative Diseases: An Unmet Medical and Social Need. *Aging Dis.* **0** (2024).
- [123] Ullah, H.; Arbab, S.; Tian, Y.; Liu, C.; Chen, Y.; Qijie, L.; Khan, M. I. U.; Hassan, I. U.; Li, K.: The gut microbiota–brain axis in neurological disorder. *Front. Neurosci.* **17**, (2023).
- [124] Klann, E. M.; Dissanayake, U.; Gurralla, A.; Farrer, M.; Shukla, A. W.; Ramirez-Zamora, A.; Mai, V.; Vedam-Mai, V.: The Gut–Brain Axis and Its Relation to Parkinson’s Disease: A Review. *Front. Aging Neurosci.* **13**, 782082 (2022).
- [125] Akram, N.; Faisal, Z.; Irfan, R.; Shah, Y. A.; Batool, S. A.; Zahid, T.; Zulfikar, A.; Fatima, A.; Jahan, Q.; Tariq, H.; Saeed, F.; Ahmed, A.; Asghar, A.; Ateeq, H.; Afzaal, M.; Khan, M. R.: Exploring the serotonin-probiotics-gut health axis: A review of current evidence and potential mechanisms. *Food Sci. Nutr.* **12**:2, 694–706 (2023).
- [126] Zhu, F.; Tu, H.; Chen, T.: The Microbiota–Gut–Brain Axis in Depression: The Potential Pathophysiological Mechanisms and Microbiota Combined Antidepressant Effect. *Nutrients*. **14**:10, 2081 (2022).
- [127] Liang, S.; Wu, X.; Hu, X.; Wang, T.; Jin, F.: Recognizing Depression from the Microbiota–Gut–Brain Axis. *Int. J. Mol. Sci.* **19**:6, 1592 (2018).
- [128] Vendrik, K. E. W.; Ooijevaar, R. E.; Jong, P. R. C. de; Laman, J. D.; Oosten, B. W. van; Hilten, J. J. van; Ducarmon, Q. R.; Keller, J. J.; Kuijper, E. J.; Contarino, M. F.: Fecal Microbiota Transplantation in Neurological Disorders. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 98 (2020).
- [129] ICD-11 for Mortality and Morbidity Statistics: *6B80 Anorexia Nervosa*. Dostupné z URL: <<https://icd.who.int/browse/2024-01/mms/en#263852475>> [cit. 28.04.2025].
- [130] Moore, C. A.; Bokor, B. R.: Anorexia Nervosa. In: *StatPearls*. USA, Florida, StatPearls Publishing (2025).
- [131] Nagy, H.; Paul, T.; Jain, E.; Loh, H.; Kazmi, S. H.; Dua, R.; Rodriguez, R.; Naqvi, S. A. A.; U., M. C.; Bidika, E.: A Clinical Overview of Anorexia Nervosa and Overcoming Treatment Resistance. *Avicenna J. Med.* **13**:1, 3–14 (2022).
- [132] Eeden, A. E. van; Hoeken, D. van; Hoek, H. W.: Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Curr. Opin. Psychiatry*. **34**:6, 515–524 (2021).

- [133] Fukuya, Y.; Miyamura, K.; Funatogawa, T.; Yamaguchi, T.; Katagiri, N.; Nemoto, T.: Association of COVID-19 Pandemic with Newly Diagnosed Anorexia Nervosa Among Children and Adolescents in Japan. *Medicina (Mex.)*. **61**:3, 445 (2025).
- [134] Watson, H. J.; Yilmaz, Z.; Thornton, L. M.; et al.: Genome-wide association study identifies eight risk loci and implicates metabo-psychiatric origins for anorexia nervosa. *Nat. Genet.* **51**:8, 1207–1214 (2019).
- [135] Moskowitz, L.; Weiselberg, E.: Anorexia Nervosa/Atypical Anorexia Nervosa. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care*. **47**:4, 70–84 (2017).
- [136] Kaye, W.: Neurobiology of anorexia and bulimia nervosa. *Physiol. Behav.* **94**:1, 121–135 (2008).
- [137] Di Giuliano, M.; Cruz, F. de la; Schumann, A.; Zopf, R.; Bär, K.-J.: Behavioral, neuronal, and physiological facets of multidimensional body image in anorexia nervosa: a scoping review. *J. Eat. Disord.* **13**:1, 23 (2025).
- [138] Smith, L. L.: The Central Role of Hypothermia and Hyperactivity in Anorexia Nervosa: A Hypothesis. *Front. Behav. Neurosci.* **15**, (2021).
- [139] Young, S.; Touyz, S.; Meyer, C.; Arcelus, J.; Rhodes, P.; Madden, S.; Pike, K.; Attia, E.; Crosby, R. D.; Hay, P.: Relationships between compulsive exercise, quality of life, psychological distress and motivation to change in adults with anorexia nervosa. *J. Eat. Disord.* **6**:1, 2 (2018).
- [140] Dittmer, N.; Jacobi, C.; Voderholzer, U.: Compulsive exercise in eating disorders: proposal for a definition and a clinical assessment. *J. Eat. Disord.* **6**, 42 (2018).
- [141] Clemente-Suárez, V. J.; Ramírez-Goerke, M. I.; Redondo-Flórez, L.; Beltrán-Velasco, A. I.; Martín-Rodríguez, A.; Ramos-Campo, D. J.; Navarro-Jiménez, E.; Yáñez-Sepúlveda, R.; Tornero-Aguilera, J. F.: The Impact of Anorexia Nervosa and the Basis for Non-Pharmacological Interventions. *Nutrients*. **15**:11, 2594 (2023).
- [142] Tseng, M.-C. M.; Chiou, K.-R.; Shao, J. Y.-H.; Liu, H.-Y.: Incidence and Risk of Cardiovascular Outcomes in Patients With Anorexia Nervosa. *JAMA Netw. Open*. **7**:12, e2451094 (2024).
- [143] Prochazkova, P.; Roubalova, R.; Dvorak, J.; Kreisinger, J.; Hill, M.; Tlaskalova-Hogenova, H.; Tomasova, P.; Pelantova, H.; Cermakova, M.; Kuzma, M.; Bulant, J.; Bilej, M.; Smitka, K.; Lambertova, A.; Holanova, P.; Papezova, H.: The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. *Gut Microbes*. **13**:1, 1902771 .
- [144] Himmerich, H.; Treasure, J.: Anorexia nervosa: diagnostic, therapeutic, and risk biomarkers in clinical practice. *Trends Mol. Med.* **30**:4, 350–360 (2024).
- [145] Claudino, A. M.; Pike, K. M.; Hay, P.; Keeley, J. W.; Evans, S. C.; Rebello, T. J.; Bryant-Waugh, R.; Dai, Y.; Zhao, M.; Matsumoto, C.; Herscovici, C. R.; Mellor-Marsá, B.; Stona, A.-C.; Kogan, C. S.; Andrews, H. F.; Monteleone, P.; Pilon, D. J.; Thiels, C.; Sharan, P.; Al-Adawi, S.; Reed, G. M.: The classification of feeding and eating disorders in the ICD-11: results of a field study comparing proposed ICD-11 guidelines with existing ICD-10 guidelines. *BMC Med.* **17**:1, 93 (2019).
- [146] Mustelin, L.; Silén, Y.; Raevuori, A.; Hoek, H. W.; Kaprio, J.; Keski-Rahkonen, A.: The DSM-5 diagnostic criteria for anorexia nervosa may change its population prevalence and prognostic value. *J. Psychiatr. Res.* **77**, 85–91 (2016).
- [147] Nuttall, F. Q.: Body Mass Index: Obesity, BMI, and Health: A Critical Review. *Nutr. Today*. **50**:3, 117 (2015).
- [148] Auger, N.; Potter, B. J.; Ukah, U. V.; Low, N.; Israël, M.; Steiger, H.; Healy-Profítos, J.; Paradis, G.: Anorexia nervosa and the long-term risk of mortality in women. *World Psychiatry*. **20**:3, 448–449 (2021).

- [149] Guarda, A. S.: Treatment of anorexia nervosa: Insights and obstacles. *Physiol. Behav.* **94**:1, 113–120 (2008).
- [150] Frostad, S.; Bentz, M.: Anorexia nervosa: Outpatient treatment and medical management. *World J. Psychiatry.* **12**:4, 558–579 (2022).
- [151] Khalsa, S. S.; Portnoff, L. C.; McCurdy-McKinnon, D.; Feusner, J. D.: What happens after treatment? A systematic review of relapse, remission, and recovery in anorexia nervosa. *J. Eat. Disord.* **5**, 20 (2017).
- [152] Marzola, E.; Nasser, J. A.; Hashim, S. A.; Shih, P. B.; Kaye, W. H.: Nutritional rehabilitation in anorexia nervosa: review of the literature and implications for treatment. *BMC Psychiatry.* **13**:1, 290 (2013).
- [153] Dalle Grave, R.; El Ghoch, M.; Sartirana, M.; Calugi, S.: Cognitive Behavioral Therapy for Anorexia Nervosa: An Update. *Curr. Psychiatry Rep.* **18**:1, 2 (2015).
- [154] LE GRANGE, D.: The Maudsley family-based treatment for adolescent anorexia nervosa. *World Psychiatry.* **4**:3, 142–146 (2005).
- [155] Wittek, T.; Truttmann, S.; Zeiler, M.; Philipp, J.; Auer-Welsbach, E.; Koubek, D.; Ohmann, S.; Werneck-Rohrer, S.; Sackl-Pammer, P.; Schöfbeck, G.; Mairhofer, D.; Kahlenberg, L.; Schmidt, U.; Karwautz, A. F. K.; Wagner, G.: The Maudsley model of anorexia nervosa treatment for adolescents and young adults (MANTRA): a study protocol for a multi-center cohort study. *J. Eat. Disord.* **9**:1, 33 (2021).
- [156] Gorla, K.; Mathews, M.: Pharmacological Treatment of Eating Disorders. *Psychiatry Edmont.* **2**:6, 43–48 (2005).
- [157] Chinwalla, A. T.; Cook, L. L.; Delehaunty, et al: Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* **420**:6915, 520–562 (2002).
- [158] Schalla, M. A.; Stengel, A.: Activity Based Anorexia as an Animal Model for Anorexia Nervosa—A Systematic Review. *Front. Nutr.* **6**, (2019).
- [159] Scharner, S.; Stengel, A.: Animal Models for Anorexia Nervosa—A Systematic Review. *Front. Hum. Neurosci.* **14**, (2021).
- [160] Connan, F.; Campbell, I. C.; Katzman, M.; Lightman, S. L.; Treasure, J.: A neurodevelopmental model for anorexia nervosa. *Physiol. Behav.* **79**:1, 13–24 (2003).
- [161] Sheng, K.; Lu, X.; Yue, J.; Gu, W.; Gu, C.; Zhang, H.; Wu, W.: Role of neurotransmitters 5-hydroxytryptamine and substance P in anorexia induction following oral exposure to the trichothecene T-2 toxin. *Food Chem. Toxicol.* **123**, 1–8 (2019).
- [162] Luczynski, P.; McVey Neufeld, K.-A.; Oriach, C. S.; Clarke, G.; Dinan, T. G.; Cryan, J. F.: Growing up in a Bubble: Using Germ-Free Animals to Assess the Influence of the Gut Microbiota on Brain and Behavior. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **19**:8, pyw020 (2016).
- [163] Roubalová, R.; Procházková, P.; Papežová, H.: *Mikrobiom a poruchy příjmu potravy, In: Mikrobiom a zdraví.* Tlaskalová-Hogenová, H. (ed.); Eklová, D. (ed.). Praha: Grada Publishing, 2024, p 160–168. ISBN 978-80-271-5192-9.
- [164] Langmajerová, M.; Ježková, J.; Kreisinger, J.; Semerád, J.; Titov, I.; Procházková, P.; Cajthaml, T.; Jiříčka, V.; Vevera, J.; Roubalová, R.: Gut Microbiome in Impulsively Violent Female Convicts. *Neuropsychobiology.* **84**:1, 1–14 (2025).
- [165] Isokääntä, H.; Pinto da Silva, L.; Karu, N.; Kallonen, T.; Aatsinki, A.-K.; Hankemeier, T.; Schimmel, L.; Diaz, E.; Hyötyläinen, T.; Dorrestein, P. C.; Knight, R.; Orešič, M.; Kaddurah-Daouk, R.; Dickens, A. M.; Lamichhane, S.: Comparative Metabolomics and Microbiome

- Analysis of Ethanol versus OMNI-met/gene•GUT Fecal Stabilization. *Anal. Chem.* **96**:22, 8893–8904 (2024).
- [166] Wang, S.; Feng, R.; Kong, L.; Zhou, R.; Hu, F.; Sun, S.-J.; Chen, G.-J.; Tao, F.-B.; Liu, K.-Y.: An UHPLC-QE-Orbitrap-MS Method for Accurate Quantification of Short-Chain Fatty Acids in Serum From an Older Chinese Population. *Chromatographia*. **87**:2, 125–136 (2024).
- [167] Borgo, F.; Riva, A.; Benetti, A.; Casiraghi, M.; Bertelli, S.; Garbossa, S.; Anselmetti, S.; Scarone, S.; Pontiroli, A.; Morace, G.; Borghi, E.: Microbiota in anorexia nervosa: The triangle between bacterial species, metabolites and psychological tests. *PLOS ONE*. **12**, (2017).
- [168] Speranza, E.; Cioffi, I.; Santarpia, L.; Piano, C. del; Caprio, C.; Naccarato, M.; Marra, M.; Filippo, E.; Contaldo, F.; Pisanisi, F.: Fecal Short Chain Fatty Acids and Dietary Intake in Italian Women With Restrictive Anorexia Nervosa: A Pilot Study. *Front. Nutr.* **5**, (2018).
- [169] Fan, Y.; Støving, R. K.; Berreira Ibraim, S.; Hyötyläinen, T.; Thirion, F.; Arora, T.; Lyu, L.; Stankevic, E.; Hansen, T. H.; Déchelotte, P.; Sinioja, T.; Ragnarsdottir, O.; Pons, N.; Galleron, N.; Quinquis, B.; Levenez, F.; Roume, H.; Falony, G.; Vieira-Silva, S.; Raes, J.; Clausen, L.; Telléus, G. K.; Bäckhed, F.; Oresic, M.; Ehrlich, S. D.; Pedersen, O.: The gut microbiota contributes to the pathogenesis of anorexia nervosa in humans and mice. *Nat. Microbiol.* **8**:5, 787–802 (2023).
- [170] Grigioni, S.; Achamrah, N.; Chan, P.; Guérin, C.; Bôle-Feysot, C.; Delay, J.; Colange, G.; Quillard, M.; Coquard, A.; Bubenheim, M.; Jésus, P.; Tavolacci, M.-P.; Déchelotte, P.; Coëffier, M.: Intestinal permeability and appetite regulating peptides-reactive immunoglobulins in severely malnourished women with anorexia nervosa. *Clin. Nutr.* **41**:8, 1752–1758 (2022).
- [171] Han, H.; Yi, B.; Zhong, R.; Wang, M.; Zhang, S.; Ma, J.; Yin, Y.; Yin, J.; Chen, L.; Zhang, H.: From gut microbiota to host appetite: gut microbiota-derived metabolites as key regulators. *Microbiome*. **9**:1, 162 (2021).
- [172] Boonchooduang, N.; Louthrenoo, O.; Likhitweerawong, N.; Thonusin, C.; Chattipakorn, N.; Chattipakorn, S. C.: Fecal Short-Chain Fatty Acids as Potential Biomarkers for Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. *Eur. Psychiatry*. **66**:Suppl 1, S393–S394 (2023).
- [173] Roubalová, R.; Procházková, P.; Kovářová, T.; Ježková, J.; Hrnčíř, T.; Tlaskalová-Hogenová, H.; Papežová, H.: Influence of the gut microbiome on appetite-regulating neuropeptides in the hypothalamus: Insight from conventional, antibiotic-treated, and germ-free mouse models of anorexia nervosa. *Neurobiol. Dis.* **193**, 106460 (2024).
- [174] Soyka, M.; Preuss, U. W.; Hesselbrock, V.; Zill, P.; Koller, G.; Bondy, B.: GABA-A2 receptor subunit gene (GABRA2) polymorphisms and risk for alcohol dependence. *J. Psychiatr. Res.* **42**:3, 184–191 (2008).
- [175] Ribeiro, A. F.; Correia, D.; Torres, A. A.; Boas, G. R. V.; Rueda, A. V. L.; Camarini, R.; Chiavegatto, S.; Boerngen-Lacerda, R.; Brunialti-Godard, A. L.: A transcriptional study in mice with different ethanol-drinking profiles: Possible involvement of the GABAB receptor. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **102**:2, 224–232 (2012).
- [176] Gabriella, I.; Tseng, A.; Sanchez, K. O.; Shah, H.; Stanley, B. G.: Stimulation of GABA Receptors in the Lateral Septum Rapidly Elicits Food Intake and Mediates Natural Feeding. *Brain Sci.* **12**:7, 848 (2022).
- [177] Elwyn, R.; Mitchell, J.; Kohn, M. R.; Driver, C.; Hay, P.; Lagopoulos, J.; Hermens, D. F.: Novel ketamine and zinc treatment for anorexia nervosa and the potential beneficial interactions with the gut microbiome. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **148**, 105122 (2023).
- [178] Bloss, C. S.; Berrettini, W.; Bergen, A. W.; Magistretti, P.; Duvvuri, V.; Strober, M.; Brandt, H.; Crawford, S.; Crow, S.; Fichter, M. M.; Halmi, K. A.; Johnson, C.; Kaplan, A. S.; Keel, P.; Klump, K. L.; Mitchell, J.; Treasure, J.; Woodside, D. B.; Marzola, E.; Schork, N. J.; Kaye, W. H.: Genetic

Association of Recovery from Eating Disorders: The Role of GABA Receptor SNPs. *Neuropsychopharmacology*. **36**:11, 2222–2232 (2011).

- [179] Misener, V. L.; Luca, P.; Azeke, O.; Crosbie, J.; Waldman, I.; Tannock, R.; Roberts, W.; Malone, M.; Schachar, R.; Ickowicz, A.; Kennedy, J. L.; Barr, C. L.: Linkage of the dopamine receptor D1 gene to attention-deficit/hyperactivity disorder. *Mol. Psychiatry*. **9**:5, 500–509 (2004).
- [180] Galen, K. A. van; Horst, K. W. ter; Serlie, M. J.: Serotonin, food intake, and obesity. *Obes. Rev.* **22**:7, e13210 (2021).
- [181] Gheorghe, C. E.; Martin, J. A.; Manriquez, F. V.; Dinan, T. G.; Cryan, J. F.; Clarke, G.: Focus on the essentials: tryptophan metabolism and the microbiome-gut-brain axis. *Curr. Opin. Pharmacol.* **48**, 137–145 (2019).
- [182] Rainwater, A.; Güler, A. D.: Food preference assay in male and female C57BL/6 mice. *J. Neurosci. Methods*. **365**, 109384 (2022).
- [183] Belovicova, K.; Bogi, E.; Csatosova, K.; Dubovicky, M.: Animal tests for anxiety-like and depression-like behavior in rats. *Interdiscip. Toxicol.* **10**:1, 40–43 (2017).