

Svoluji k zapůjčení své diplomové práce ke studijním účelům a prosím, aby byla vedena přesná evidence vypůjčovateli. Převzaté údaje je vypůjčovatel povinen řádně ocitovat.

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Imunologie



Bc. Tereza Kovářová

Úloha střevní mikrobioty a účast imunitních mechanismů u pacientek s mentální anorexií

The role of intestinal microbiota and the involvement of immune mechanisms in patients with
anorexia nervosa

Typ závěrečné práce:

Diplomová práce

Vedoucí práce: RNDr. Petra Procházková, Ph.D.

Praha, 2023

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 8. 8. 2023

Podpis

.....

Poděkování

Tímto bych ráda poděkovala vedoucí mé diplomové práce RNDr. Petře Procházkové, Ph.D. za všestrannou pomoc, množství cenných rad, podnětů, doporučení, připomínek a zároveň za velkou trpělivost a obdivuhodnou ochotu při konzultacích poskytnutých ke zpracování této práce. Dále bych ráda poděkovala také RNDr. Radce Roubalové, Ph.D. a Mgr. Janet Ježkové za rady, trpělivost a vytváření příjemného prostředí, stejně tak jako i dalším kolegům v Laboratoři buněčné a molekulární imunologie na Akademii věd.

Abstrakt

Změny ve složení a diverzitě střevní mikrobioty byly kromě gastroenterologických onemocnění popsány také u mnoha neurologických a psychiatrických onemocnění, včetně poruch příjmu potravy. Mým záměrem v této práci je objasnit, zda se změny ve složení střevní mikrobioty mohou podílet na vývoji mentální anorexie a zda existuje korelace mezi těmito změnami a možnými imunopatologickými reakcemi u pacientek s mentální anorexií.

Do studie bylo zahrnuto 30 akutních pacientek (trvání onemocnění do 3 let), 30 pacientek s chronickým průběhem nemoci (trvání delší než 7 let) a 30 zdravých kontrol. Výzkum zahrnoval analýzu střevního mikrobiomu pomocí vysoce výkonného sekvenování (HTS) a stanovení sérových hladin autoprotilátek proti vybraným neuropeptidům regulujících příjem potravy (metodou ELISA). Dále byly pomocí metody ELISA detekovány sérové hladiny ukazatelů mikrobiálního prostupu střevní bariérou, poškození střevních buněk a zánětu. Přístrojem Luminex byly změřeny hladiny pro- a protizánětlivých cytokinů. V průběhu studie jsme také zavedli experimentální myši ABA (activity-based anorexia) model, který může významně přispět k hlubšímu zkoumání mechanismů mentální anorexie.

Výsledky sekvenace střevního mikrobiomu ukázaly signifikantní rozdíly v rámci alfa i beta diverzity mezi zdravými ženami a pacientkami s mentální anorexií. Zároveň byly zaznamenány změny v hladinách kalprotektinu a sekreční molekuly CD14, které byly překvapivě vyšší u kontrol oproti pacientkám. V případě cytokinů byly detekovány zvýšené hladiny IL-6 a IL-1 β u pacientek ve srovnání s kontrolami. Analýza autoprotilátek proti neuropeptidům vykazovala rozdíly u Orexinu A a α -MSH, kdy se IgG protilátky namířené proti α -MSH vyskytovaly více v séru pacientek, v případě IgG protilátek proti Orexinu A tomu bylo naopak.

Zda se tyto imunologické odchylky a rozdíly na úrovni mikrobiomu mohou účastnit patologie mentální anorexie, zůstává otázkou. Tato práce by pak jakožto vědecké vymezení problematiky měla vnést přínos do klinického prostředí a pomoci s objasněním mechanismů právě na úrovni osa střevo-mozek-imunitní systém.

Klíčová slova: mentální anorexie, poruchy příjmu potravy, střevní mikrobiom, neuroimunologie

Abstract

In addition to gastroenterological diseases, changes in the composition and diversity of the gut microbiota have been also described in several neurological and psychiatric diseases, including eating disorders. My intention in this work is to clarify whether changes in the composition of the intestinal microbiota may be involved in the development of anorexia nervosa (AN) and whether there is a correlation between these changes and possible immunopathological reactions in patients with anorexia nervosa.

The study included 30 acute patients (disease duration up to 3 years), 30 patients with a chronic course of the disease (duration longer than 7 years), and 30 healthy controls. The research included analysis of the gut microbiome using high-throughput sequencing (HTS) and determination of serum levels of autoantibodies against selected neuropeptides regulating food intake (by ELISA). Furthermore, serum levels of biomarkers of microbial translocation through the intestinal barrier, intestinal cell damage, and inflammation were detected by ELISA. The levels of pro- and anti-inflammatory cytokines were measured using Luminex instrument. We also introduced an experimental ABA (activity-based anorexia) mouse model, which may contribute significantly to further investigating mechanisms of anorexia nervosa.

The results of gut microbiome sequencing showed significant differences in both alpha and beta diversity between healthy women and patients with AN. Changes were also recorded in the calprotectin levels and the secretory molecule CD14, which were higher in controls than in patients. In the case of cytokines, elevated levels of IL-6 and IL-1 β were detected in patients compared to healthy controls. Analysis of autoantibodies against neuropeptides showed differences for Orexin A and α -MSH, when IgG antibodies directed against α -MSH occurred more in the serum of patients, IgG antibodies against Orexin A showed elevated levels in the serum of healthy women.

Whether these immunological and microbiome-level differences may be involved in the pathology of anorexia nervosa is still unclear. As a scientific definition of the issue, this work should contribute to the clinical environment, and help elucidate mechanisms at the gut-brain-immune system axis level.

Keywords: anorexia nervosa, eating disorders, intestinal microbiome, neuroimmunology, microbiota-gut-brain axis

Obsah

1 Úvod	1
2 Literární přehled	2
2.1 Regulace příjmu potravy	2
2.1.1 Imunitní mechanismy v regulaci příjmu potravy	3
2.2 Mentální anorexie jako porucha příjmu potravy	5
2.2.1 Klinické příznaky AN	5
2.2.2 Etiologie AN	7
2.2.3 Epidemiologie AN	8
2.2.4 Diagnostika AN	9
2.2.5 Léčba AN	10
2.3 Imunitní systém pacientek s mentální anorexií	11
2.4 Komunikace mezi imunitním a nervovým systémem	12
2.5 Mikrobiom	13
2.5.2 Osa mikrobiom-střevo-mozek	16
2.5.3 Dysbióza	17
2.5.4 Detekce mikrobiální translokace	18
3 Cíle práce	19
4 Metodika a návrh experimentů	20
4.1 Výběr pacientek a dotazníkové šetření	20
4.2 Zisk a zpracování vzorků pacientek a kontrol	20
4.3 Izolace DNA ze vzorků stolic	21
4.4 Průkaz specifity bakteriálních primerů pro kvantitativní PCR	21
4.5 Kvantitativní RT-PCR	22
4.6 Vysoce výkonné sekvenování (HTS)	23
4.7 Analýza sekvenačních dat	24
4.8 Detekce autoprotilátek proti peptidům regulujících příjem potravy	24
4.9 Stanovení hladin cytokinů	26
4.10 Detekce poškození střevních buněk, markerů bakteriální propustnosti či zánětu	27
4.11 Statistická analýza dat	28
4.12 Myší model	29
4.12.1 Design experimentu	29
4.11.3 Ověření kvality vzorků	32
4.11.4 Kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR)	32

5 Výsledky.....	34
5.1 Definování skupin pacientek a kontrol.....	34
5.2 Vyšetření krevních vzorků	37
5.2.1 Autoprotilátky proti neuropeptidům	38
5.2.2 Produkce cytokinů.....	42
5.2.3 Stanovení markerů poškození střevní stěny, bakteriálního prostupu střevní stěnou, a zánětu	44
5.3 Analýza vzorků stolice	45
5.3.1 Analýza mikrobiomu.....	46
5.3.2 Počty bakteriálních druhů	51
5.4 Myší model	53
5.4.1 Aktivita myšího ABA modelu	53
5.4.2 Exprese genů v myším hypotalamu.....	57
5.4.3 Stanovení hladin mRNA genů v myším <i>colon descendens</i>	61
6 Diskuse.....	62
7 Závěr	72
8 Seznam použité literatury	75
9 Přílohy.....	87
9.1 Dotazníkové šetření EDE-Q.....	87

Seznam zkratek

ABA	anorexie indukovaná aktivitou (activity-based anorexia)
ActB	beta-aktin (beta-actin)
AN	mentální anorexie (anorexia nervosa)
BMI	index tělesné hmotnosti (body mass index)
CART	kokainem a amfetaminem regulovaný transkript (cocaine- and amphetamine-regulated transcript)
CasC3	protein CasC3 (cancer susceptibility candidate 3)
CNS	centrální nervová soustava (central nervous system)
CRH	hormon uvolňující kortikotropin, kortikoliberin (corticotropin-releasing hormone)
DSM-5	Diagnostický a statistický manuál duševních chorob (Diagnostic and Statistical Manual of mental Disorders)
EDE-Q	Dotazník pro vyšetření poruch příjmu potravy (Eating Disorder Examination Questionnaire)
FMT	transplantace střevní mikrobioty (fecal microbiota transplantation)
gp130	glykoprotein 130 (glycoprotein 130)
Hprt	hypoxantin fosforibosyltransferáza (hypoxanthine phosphoribosyltransferase)
HTS	vysoce výkonné sekvenování (high-throughput sequencing)
IFN- α	interferon alfa (interferon alpha)
IFN- β	interferon beta (interferon beta)
IFN- γ	interferon gama (interferon gamma)
I-FABP	protein vázající mastné kyseliny (fatty acid-binding protein)
IgA	imunoglobulin A (immunoglobulin A)
IgG	imunoglobulin G (immunoglobulin G)

IgM	imunoglobulin M (immunoglobulin M)
IL-1	interleukin 1 (interleukin 1)
IL-6	interleukin 6 (interleukin 6)
IL-6R	receptor interleukinu 6 (interleukin 6 receptor)
IL-10	interleukin 10 (interleukin 10)
IL-18	interleukin 18 (interleukin 18)
JAK	Janusova kináza (Janus kinase)
JIP	jednotka intenzivní péče (intensive care unit)
LBP	lipopolysacharidy-vázající protein (lipopolysaccharides-binding protein)
MCH	melanin koncentrující hormon (melanin-concentrating hormone)
α -MSH	alfa-melanocyty stimulující hormon (alpha-melanocytes-stimulating hormone)
Muc2	mucin 2 (mucin 2)
Muc13	mucin 13 (mucin 13)
NEI	neuropeptid glutamová kyselina izoleucin (neuropeptide glutamic acid isoleucine)
NF κ B	nukleární faktor kapa B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)
Nos1	syntáza oxidu dusnatého 1 (nitric oxide sythase 1)
NPY	neuropeptid tyrozin (neuropeptide tyrosine)
OCCL	okludin (occludin)
OCD	obsedantně-kompulzivní porucha (obsessive-compulsive disorder) ⁱ
OD	optická densita (optical density)
PYY	peptid tyrozin tyrozin (peptide tyrosine tyrosine)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce (quantitative polymerase chain reaction)

S100A8/A9	kalprotektin (calprotectin, heterodimer of the two calcium-binding proteins S100A8 and S100A9)
SAA	sérový amyloid A (serum amyloid A)
sCD14	sekreční molekula CD14 (soluble CD14 molecule)
SCOFF	screeningový test pro detekci poruch příjmu potravy (sick, control, one, fat, food)
SCFA	mastné kyseliny s krátkým řetězcem (short-chain fatty acid)
SD	spektrofotometrická detekční hodnota (spectrophotometric detection)
SEAN	těžká a přetrvávající mentální anorexie / chronická (severe and enduring anorexia nervosa)
SNPs	jednonukleotidové polymorfismy (single nucleotide polymorphisms)
SSBN	specifické pozadí séra (serum-specific background noise)
STAT	signalizační dráha, aktivátor transkripce (signal transducers and activators of transcription)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa (tumor necrosis factor alpha)
TRH	tyreotropin-uvolňující hormon (thyrotropin-releasing hormone)
WHO	Světová zdravotnická organizace (World Health Organization)
ZO	zonulin (zonulin, haptoglobin 2 precursor)

1 Úvod

Poruchy příjmu potravy, včetně mentální anorexie, zažívají ve 21. století v populaci rapidní nárůst. Pacientky s mentální anorexií (anorexia nervosa – AN) vykazují kriticky sníženou hmotnost a zároveň zvýšenou fyzickou aktivitu. Projevují strach z přibírání na váze, trpí zhoršeným vnímáním sebe samotné a mohou se u nich vyskytovat také další psychiatrické komorbidity, jako jsou deprese, úzkosti, poruchy osobnosti, OCD (obsedantně-kompulzivní porucha) nebo závislosti. Příčina onemocnění není zatím zcela známa, nicméně výzkumy poukazují na možný patologický vliv střevního mikrobiomu, poruchy hypotalamu, ale také hereditárních faktorů.

Střevní mikrobiota produkuje několik neuroaktivních látek, které mohou komunikovat s centrálním nervovým systémem prostřednictvím osy mikrobiota-střevo-mozek, a tak ovlivnit naše chování, náladu a vyústit v takzvaný “sickness behavior“, tedy ve sníženou chuť k jídlu, snížené libido a skleslou náladu. Střevní mikrobiom navíc představuje zdroj antigenů pro imunitní systém. Antigeny mohou napodobovat hostitelské neuropeptidy, které ovlivňují příjem potravy, a spouštět produkci protilátek, které pak zkříženě reagují s těmito neuropeptidy a způsobují patologické mechanismy.

Otázkou zůstává, zda interakce mezi střevní mikrobiotou a centrálním nervovým systémem zodpovídají za patologické stavy a účastní se vývoje mentální anorexie, nebo zda se jedná o následek tohoto onemocnění.

2 Literární přehled

2.1 Regulace příjmu potravy

Příjem potravy je regulován komplexním systémem zahrnujícím centrální nervovou soustavou (CNS), periferní tkáně, endokrinní a trávicí soustavu. Cílem regulace příjmu potravy je udržovat homeostázu energetického stavu organismu, aby se zajistilo optimální fungování buněk a tkání (1–3).

Příjem potravy je ovlivněn mnoha faktory, jako jsou fyziologické potřeby těla, které se odvíjí od pohlaví a fyzické námahy, metabolismu a také od psychologických faktorů (4,5). Ty zahrnují například vztah k jídlu, vnímání těla nebo návyky ve stravování (6). Regulace příjmu potravy se pak dále liší podle typu potravy, kterou můžeme rozdělit na sacharidy, tuky a bílkoviny. Každý z těchto typů má rozdílný vliv na hladinu hormonů a neurotransmiterů, což může ovlivnit pocit sytosti a chuti k jídlu (7). Výzkumy poukazují i na fakt, že příjem potravy může být ovlivněn genetickými faktory, kdy jsou některé geny spojovány s náchylností k nadváze až obezitě (8). K hlavním regulátorům příjmu potravy se řadí neuropeptidy (α -MSH, NPY, AgRP), neurotransmitery (dopamin, noradrenalin, serotonin) a hormony (leptin, ghrelin, inzulin, cholecystokinin, peptid YY) (9–11). Tyto faktory mohou působit orexigenně a stimulovat chuť k jídlu (NPY, ghrelin, dopamin), nebo naopak působí anorexigenně a chuť k jídlu potlačují (leptin, inzulin PYY, α -MSH, cholecystokinin, serotonin) (11,12).

Celý proces funguje tak, že v reakci na přijatou potravu endokrinní systém vyplaví do periferie hormony, jako je inzulin, leptin, ghrelin a cholecystokinin (13). Informace o zvýšené hladině těchto hormonů v periférii je vyslána do hypotalamu, centra regulace příjmu potravy. Hypotalamus detekuje signál, integruje jej s dalšími podněty, jako je nálada a sociální kontext a v závislosti na těchto signálech může zvýšit nebo snížit chuť k jídlu. Hypotalamus poté produkuje několik hormonů a neurotransmiterů, díky kterým může proces jídelního chování dále regulovat (14).

Když jsou hladiny leptinu v krvi vysoké, je hypotalamus suprimován a chuť k jídlu potlačuje. Naopak pokud jsou hladiny leptinu nízké, hypotalamus se stává citlivější na ghrelin a chuť k jídlu se zvyšuje (15). Hypotalamus reaguje také na další faktory, jako jsou neuropeptid Y (NPY) nebo inzulin. NPY aktivuje v hypotalamu receptory NPY1 a NPY5, čímž stimuluje chuť

k jídlu, snižuje krevní tlak a zvyšuje tak ukládání energetických zásob v tuku. Jedná se o jeden z nejsilnějších stimulantů, a pokud je tedy tato dráha narušena, může to vést k anorexii (10). Naopak v případě, že je inzulin uvolňován do periferie ve vyšším množství, hypotalamus začne produkovat melanokortiny (např. α -MSH), které působí anorexigenně a potlačují chuť k jídlu (16,17). V neposlední řadě reaguje hypotalamus na signál z trávicího traktu, který produkuje peptid YY (PYY), ten se ze střevních buněk uvolňuje během jídla a signalizuje, že jsme plní a měli bychom přestat jíst. Hypotalamus v reakci na tento mechanismus zvýší hladiny cholecystokininu, který potlačuje chuť k jídlu, a zároveň zvýší uvolňování proopiomelanokortinu, což je prekurzor α -MSH, který dále podporuje anorexigenní chování (16,18).

V rámci neurotransmiterů plní protichůdné mechanismy dopamin a serotonin. Dopamin se podílí na odměňování a motivaci a během jídla se uvolňuje ve velkém množství, přičemž jídlo v tomto představuje odměnu, která nás motivuje k dalšímu příjmu potravy (19). Serotonin je naopak inhibiční neurotransmitter, chuť k jídlu potlačuje a zvyšuje pocit sytosti (20,21).

U pacientek s mentální anorexií jsou pozorovány změny v hladinách neuropeptidů, které celý tento mechanismus příjmu potravy regulují. Například hladiny ghrelinu, který zvyšuje chuť k jídlu, jsou u pacientek často sniženy (22). Na druhé straně hladiny PYY a leptinu, které snižují chuť k jídlu, mohou být zvýšené (9). Dysbalance byly pozorovány také u dalších dvou protichůdně pracujících neuropeptidů. Anorexigenně působící α -MSH se u pacientek objevuje ve zvýšeném množství, naopak jeho agonista NPY se nachází v nedostatku (23). Nerovnováha těchto regulátorů by mohla hrát klíčovou roli v objasnění patogeneze mentální anorexie, nicméně je třeba mít na paměti, že se jedná o komplexní změny na úrovni několika orgánových soustav (24,25).

2.1.1 Imunitní mechanismy v regulaci příjmu potravy

V regulaci příjmu potravy mohou hrát roli také imunitní mechanismy. Stejně jako v rámci imunitního systému, i v tomto ohledu regulační schopnost přebírají cytokiny. Ty se uvolňují v reakci na stres, zánět, při infekci nebo právě po jídle (26–28).

Známými regulátory jsou prozánětlivé cytokiny interleukin 1 beta ($IL-1\beta$) nebo tumor nekrotizující faktor alfa ($TNF-\alpha$) (29). Jak $IL-1\beta$, tak $TNF-\alpha$ jsou schopny snižovat chuť k jídlu na

úkor zvyšování produkce tepla. Jedná se nejspíš o evoluční „trade-off“ mechanismus, kdy v případě infekce je třeba zvýšit termogenezi, spustit horečku jako jeden ze systémových projevů zánětu, a naopak snížit chuť k jídlu, aby organismus veškerou energii věnoval vypořádání se s infekcí a nikoli na trávení (30). Infekce v tomto případě tedy může mít negativní vliv na vývoj anorexigenního chování. Tento fakt dokazuje také vztah IL-1 β a prozánětlivého faktoru NF κ B (nukleární faktor kapa B). Během infekce může být hladina IL-1 β běžně vyšší. Na zvýšené množství tohoto cytokinu reagují tanycyty, speciální ependymální buňky třetí kůry mozkové, aktivací transkripce faktoru NF κ B, který dále podporuje prozánětlivé prostředí. Tanycyty jsou zároveň schopny ovlivňovat produkci hypotalamických neuropeptidů, a tím dále podporovat anorexigenní chování (31).

Výzkumy ukázaly, že metabolické procesy ovlivňuje také interleukin 6 (IL-6). Tento cytokin se váže na receptory IL-6R a gp130, což spouští signalizační dráhu JAK-STAT. Tato dráha má vliv na různé funkce organismu, včetně regulace hladu a metabolismu energie. Zároveň IL-6 ovlivňuje expresi neuropeptidů regulujících příjem potravy (32). Zvýšená hladina IL-6 může vést ke snížení hladiny leptinu, a to následně ke zvýšenému příjmu potravy (33).

Dalším imunitním mediátorem zapojeným v regulaci příjmu potravy je interleukin 18 (IL-18), který má vliv na metabolismus glukózy a lipidů. IL-18 stimuluje lipolýzu v bílé tukové tkáni, což zvyšuje uvolňování mastných kyselin do oběhu. Zároveň zvyšuje schopnost spalovat tuky v játrech a svalové tkáni, může tedy pozitivně ovlivnit glukoneogenezi v játrech a stimulovat glukózový transport v tukových a svalových buňkách, vedoucí k nižší hladině glukózy v krvi. Nízká hladina glukózy v krvi signalizuje hlad, je produkován ghrelin, který dále stimuluje hypotalamus, a je tak pozitivně regulována chuť k jídlu (34,35).

V souvislosti s regulací příjmu potravy bylo prokázáno, že také interleukin 10 (IL-10) může mít úlohu při potlačování hladu a ovlivňování metabolismu. Studie poukázaly na zvýšené sérové hladiny IL-10 u pacientek s poruchami příjmu potravy. Imunosupresivní status IL-10 tak může do budoucna představovat terapeutický potenciál (36).

Studie zkoumající vztah mezi regulací příjmu potravy a interleukinem 12 (IL-12) naznačují, že IL-12 může mít kaloricky restriktivní účinky. IL-12 také zvyšuje produkci oxidu dusnatého (NO). Ve studii Hong *et al.* bylo zjištěno, že myši s delecí genového faktoru STAT4, který společně s IL-12 podporuje prozánětlivou odpověď indukci exprese interferonu gama (IFN- γ), vykazovaly

zvýšené množství neurálního enzymu Nos1 (37). Ten je zodpovědný za katalýzu přeměny L-argininu na oxid dusnatý a mimo jiné bylo zjištěno, že právě Nos1 snižuje příjem potravy a zároveň zvyšuje energetický výdej a aktivitu (38).

2.2 Mentální anorexie jako porucha příjmu potravy

Poruchy příjmu potravy jsou definovány jako závažná duševní onemocnění, kdy dochází k narušení procesu regulace příjmu potravy. Tyto poruchy ovlivňují jednotlivce fyzicky, emočně i sociálně a mohou vést k závažným komplikacím, někdy až k úmrtí jedince. Mezi poruchy příjmu potravy se řadí mentální anorexie, bulimie, záchvatovité přejídání, poruchy stravování nespécifického typu, bigorexie, ortorexie, drunkorexie, syndrom nočního přejídání a mnohé další (39).

Mentální anorexie, anorexia nervosa (AN), je závažná psychiatrická porucha charakterizovaná výrazným omezením příjmu potravy, které vede k extrémní ztrátě hmotnosti a dalším zdravotním problémům. Často má vliv na celkový zdravotní stav a může tak vést k život ohrožujícím komplikacím (40,41).

2.2.1 Klinické příznaky AN

Mentální anorexie je charakterizována nejen abnormálními návyky ohledně jídelního chování a váhy, ale také mnoha dalšími klinickými symptomy. Některé z těchto příznaků jsou fyzické, zatímco jiné jsou na úrovni psychologické (42).

Chování, které může být spojeno s mentální anorexií, zahrnuje výrazné omezení příjmu potravy nebo vynechání jídel. Pacientky mají dokonce velmi často obsedantní myšlenky o jídle. Během stravování poté mohou vykazovat rituály, jako jsou důkladné žvýkání nebo rozdělování potravy. Zároveň u nich panují velmi přísná pravidla o tom, co a kdy mohou jíst, případně se některým potravinám z důvodu intenzivní obavy z přibírání na váze vyhýbají úplně. Tento abnormální strach poté někdy doprovází přehnané cvičení, vyvolání zvracení po jídle i užívání projímadel. Pacientky s anorexií se také obvykle potýkají s posunutým vnímáním vlastního těla, straní se sociálními interakcemi, mají nízké sebevědomí a zároveň trpí perfekcionismem, kdy mají tendenci se kritizovat i za drobné chyby (43).

Výsledkem posunutého vnímání jídla je řada komplikací na úrovni celého organismu. Nejčastější fyzické příznaky mentální anorexie představují extrémní úbytek váhy během krátkého období, nízkou hladinu energie, poruchy trávení, zhoršený stav kostí, poruchy menstruačního cyklu a srdeční obtíže (44–46).

Jeden z hlavních problémů spojených s mentální anorexií je nedostatek živin, které jsou nezbytné pro správné fungování orgánů, včetně trávicího traktu. Anorexie může vést ke zpomalenému trávení, žaludečním obtížím, zácpě, nadýmání, pocitu plnosti. Mohou se také objevit problémy se vstřebáváním vitamínů a minerálů označované jako malabsorpce (47). K nejčastějším onemocněním gastrointestinálního traktu, se kterými se pacientky potýkají, řadíme gastroparézu¹, chronickou zácpu, zánět slinivky břišní a gastroezofageální refluxní chorobu, kdy se žaludeční kyselina vrací zpět do jícnu způsobující pálení žáhy a další komplikace (44).

Nedostatek minerálů a vitaminů, zejména vápníku a vitaminu D, ovlivňuje také zhoršený stav kostí (48,49). Následkem je jejich oslabení až osteoporóza. U žen je řídnutí kostí zhoršováno také tím, že během sníženého přísunu potravy dochází k hormonálním změnám, především snížení hladiny estrogenu (50). Nedostatečný příjem potravy, a s tím i spojený nedostatek energie, může vést k úbytku svalové hmoty, jehož následkem opět může být zhoršení stavu kostí. Uvádí se, že až 85 % pacientek má nějaký stupeň oslabení kostí (51).

Významné obtíže zažívají pacientky s mentální anorexií také v oblasti gynekologické. Menstruační problémy jsou častým jevem; uvádí se, že až 90 % pacientek trpí poruchou menstruačního cyklu. Tyto vedlejší komplikace souvisí s nízkou hmotností a mimo jiné také se sníženou hladinou hormonů v těle, zejména estrogenů (45). Obvykle dochází ke zpoždění menstruačního cyklu, nepravidelné menstruaci nebo úplné zástavě, tzv. stavu *amenorea*. Tento jev je způsoben porušením funkce hypotalamo-hypofyzární-ovariální osy, která skrze hladiny estrogenů reguluje reprodukční funkce žen (52).

K nejzávažnějším komplikacím mentální anorexie se řadí dopady na kardiovaskulární systém. Jedná se o nejčastější příčinu úmrtí z fyziologického hlediska u těchto pacientek. Při dlouhodobé podvýživě dochází k poklesu svalové hmoty, včetně srdeční svaloviny, což může způsobit arytmie, nízký krevní tlak, a dokonce i srdeční selhání. Mimo jiné mohou

¹ gastroparéza = zpomalení průchodu jídla žaludkem

pacientky trpět také nerovnováhou elektrolytů, což je pro srdeční činnost další negativní podnět. Dostupné studie také ukazují na zvýšené riziko vzniku aterosklerózy a koronárních srdečních chorob u pacientek s mentální anorexií (46).

Vzhledem k psychiatrické povaze mentální anorexie se zde mohou vyskytovat i další psychiatrické komorbidity (53). K nejvíce diagnostikovanému onemocnění společně s AN se řadí deprese, která je někdy považována za příčinu nebo následek mentální anorexie (54). Jedná se o 75-80 % všech pacientů, kterým je tato komorbidita diagnostikována a souvisí s nejčastější příčinou úmrtí u těchto pacientů, sebevraždou (55). Pacientky se potýkají také s úzkostnými až paranoidními stavy, výjimkou nejsou ani problémy se závislostmi, zejména na lécích, alkoholu nebo drogách. Některé studie dokonce naznačují spojitost mezi geny spojenými se závislostí a anorexií (56). Zároveň řada studií poukázala na polymorfismy v SNP oblastech (jednonukleotidové polymorfismy), které jsou společné pro řadu psychiatrických chorob (57). Nicméně přesné genetické faktory, které přispívají k rozvoji anorexie, nejsou zcela jasné.

2.2.2 Etiologie AN

Příčiny rozvoje mentální anorexie nejsou zcela objasněné, nicméně se zdá, že se jedná o komplexní mechanismus zahrnující genetické, biologické, psychologické a sociální faktory (58). Neexistuje jednoznačný důkaz, který by naznačoval, že je způsobena jedním specifickým faktorem. Mezi nejčastější příčiny se řadí nízké sebevědomí, úzkost, deprese, stres a sociální tlak na definovaný ideál krásy (59). V případě změn na fyziologické úrovni by za patologií mentální anorexie mohla stát porucha v mozku, zejména pak v oblasti hypotalamu, odkud je regulován příjem potravy (60,61). Dále pak změny ve složení střevní mikrobioty, nebo hormonální nerovnováha, kde by mohla hrát roli snížená hladina leptinu, který pozitivně ovlivňuje jídelní chování (45,62). Sociokulturní faktory mohou zahrnovat tlak médií, vliv vrstevníků nebo špatné stravovací návyky v rodině (63,64).

2.2.3 Epidemiologie AN

Podle epidemiologických studií postihuje mentální anorexie až 1 % populace, ačkoli tyto výsledky mohou být ovlivněny způsobem, jakým je stanovena diagnóza a jak jsou pacienti identifikováni. Odborníci tak odhadují, že prevalence v populaci je vyšší (65). Dle zprávy Světové zdravotnické organizace (WHO) z roku 2016 mentální anorexií trpí 1,4 % žen a 0,2 % mužů. Tato porucha příjmu potravy postihuje především ženy v poměru 9:1, a to zejména během dospívání a v raném adolescentním věku. Nicméně, toto onemocnění se může vyskytnout i u mužů, dětí a starších dospělých (66). Ve srovnání s ženami mají muži tendenci vykazovat odlišné projevy onemocnění, kdy mohou být méně zaměřeni na hmotnost nebo tvar svého těla a více se soustředí na zvětšení svalové hmoty. Často jsou to sportovci, kteří ve svých odvětvích potřebují regulovat váhu, např. sportovci provozující bojové sporty, žokejové, skokani na lyžích, tanečníci či krasobruslaři (67). Epidemiologická data ukazují, že výskyt mentální anorexie rapidně stoupl během posledních desetiletí, což může být způsobeno větší informovaností o této poruše, lepší diagnostikou, ale také technologickým pokrokem (63,64). Mezi lety 2000 a 2018 se četnost této poruchy zvýšila o 70 % u žen ve věku 15-19 let a o 60 % u mužů ve stejném věku (68). Zajímavý je fakt, že prevalence mentální anorexie je daleko vyšší v západních kulturách, zejména pak ve velmi vyspělých zemích, jako představují USA, Kanada, Nový Zéland, Velká Británie, oblast Skandinávie nebo Nizozemsko (69). V Asii je prevalence nižší, ale počty diagnostikovaných stoupají v Japonsku a Hong-Kongu (70,71). V Africe a Jižní Americe je tato choroba méně běžná, ale existují pouze omezené informace o nemoci v těchto oblastech (72).

V České republice je prevalence mentální anorexie mezi 0,5-1 % u mladých žen a dospívajících dívek, u mladých dospělých je výskyt 1-3 % (Ústav zdravotnických informací a statistiky ČR). Incidence se pohybuje ve vyspělých zemích v rozmezí 4,4-8 případů na 100 000 obyvatel ročně. Mortalita celosvětově představuje 8-20 % případů a je nejvyšší v rámci všech psychiatrických chorob (73).

2.2.4 Diagnostika AN

Diagnostika mentální anorexie je prováděna na několika úrovních, kdy se hodnotí fyziologické, psychiatrické a behaviorální příznaky. Odborníci využívají zpravidla DSM-5 (Diagnostický a statistický manuál duševních poruch), kdy pro vymezení problematiky mentální anorexie hodnotí tato kritéria (39):

1. Odmítání udržovat tělesnou hmotnost na nejméně 85 % očekávané hmotnosti, nebo pokles hmotnosti na méně než 85 % očekávané hmotnosti během krátké doby.
2. Intenzivní strach z nabírání na váze nebo z tloušťky, i když je jedinec podvyživený.
3. Porucha tělesného vnímání, například nadsazené vnímání objemu nebo tvaru postavy.

Řada psychiatrů se opírá také o další diagnostické protokoly. Kritéria SCOFF fungují jako screeningový nástroj, který se využívá k rychlému vyhodnocení rizika poruch příjmu potravy. Obsahuje pět otázek týkajících se rizikového chování spojeného s poruchami příjmu potravy. Odpovědi ANO znamenají zvýšené riziko rozvoje mentální anorexie i dalších poruch příjmu potravy (74). Kritéria Eating Disorder Examination Questionnaire (EDE-Q) představují klinický dotazník, který se využívá k zhodnocení závažnosti mentální anorexie. Zahrnuje měření aspektů stravovacího chování, tělesného vnímání, závislosti na váze a psychologických problémů spojených s anorexií (75).

Kromě behaviorálních projevů může být mentální anorexie doprovázena dalšími symptomy, jako jsou nedostatek energie, únava, trávicí obtíže (průjmy nebo zácpa, zvracení), *amenorea* (ztráta menstruačního cyklu), narušené hormonální hladiny a oslabený imunitní systém. V praxi se pro diagnostiku využívá také hodnota BMI (Body Mass Index) menší než 18,5 kg/m², nicméně toto kritérium může být zavádějící, protože BMI nezohledňuje rozdíly v tělesné stavbě a složení těla (76).

2.2.5 Léčba AN

Léčba mentální anorexie vyžaduje multidisciplinární přístup, který zahrnuje péči praktického lékaře, psychiatra, psychologa a výživového poradce. Ve vážných případech je nutný také přístup gynekologa, zejména kvůli poruše menstruačního cyklu, nebo gastroenterologa v případě střevních zánětů nebo dalších poruch trávicí soustavy souvisejících s onemocněním AN. Cílem léčby je pak obnovení zdravého přístupu k příjmu potravy, zlepšení celkového zdravotního stavu, náprava psychologických problémů spojených s poruchou příjmu potravy a návrat k normální hmotnosti (77). Léčba může zahrnovat různé metody, včetně kognitivně-behaviorální terapie, rodinné terapie, farmakoterapie a nutriční terapie (78–80).

Prvním krokem v léčbě mentální anorexie je zpravidla zvládnutí akutních život ohrožujících stavů a stabilizace tělesné hmotnosti pacienta. To může zahrnovat hospitalizaci na psychiatrické léčebně, případně metabolické jednotce intenzivní péče (JIP), a podporu životně důležitých funkcí, jako jsou srdeční činnost a rovnováha elektrolytů (81).

Po stabilizaci pacienta je léčba zaměřena na psychologické a behaviorální aspekty onemocnění, kdy je důraz kladen na změnu stravovacích návyků a obnovení zdravého vztahu k jídlu pomocí kognitivně-behaviorální terapie, která pomáhá pacientce odhalit příčiny špatného stravování a změnit vzorce jídelního chování (82). Důležitou součástí lékařského týmu jsou také nutriční specialisté, kteří poskytují informace o výživě a navrhují stravovací plán obsahující potřebné živiny pro obnovu tělesné hmotnosti. V této fázi léčby může být pacient propuštěn do domácího prostředí, kdy je zahájena rodinná terapie, která se jeví jako neúčinnější postup během léčby z důvodu snížení stresu. Pacientky v tomto případě pouze dochází na konzultace k psychiatrovi, psychologovi, případně nutričnímu terapeutovi. Poučení jsou také rodinní příslušníci, a to zejména o možném přístupu k nemocnému (79).

Farmakoterapie je další důležitou součástí léčby, zejména pak u pacientek, které jsou postiženy také dalšími psychiatrickými komorbiditami, jako jsou deprese, úzkostné stavy nebo OCD. Tento druh terapie je založen na podávání antidepresiv, antipsychotik a anxiolytik² (80).

Ačkoli je léčba AN kruciólní pro návrat pacientů do normálního života, důraz by měl být kladen také na prevenci, která zahrnuje podporu zdravého životního stylu a sebevědomí, eliminaci

² anxiolytika = léky tlumící úzkost, psychickou tenzi, strach, trému

sociálního tlaku na dokonalost, úpravu stravovacích návyků, spánkovou hygienu, duševní pohodu a snižování stresu.

2.3 Imunitní systém pacientek s mentální anorexií

Pacientky s AN mohou mít z důvodu nedostatku živin narušenou funkci imunitního systému, což může vést ke zvýšené náchylnosti k infekcím (83). Studie ukázaly, že u těchto pacientek může být narušena proliferace některých imunitních buněk, jako jsou například NK buňky a T-lymfocyty, jejichž počty jsou sniženy. Další studie zjistila, že u pacientek s AN dochází také k nerovnováze mezi Th1 a Th2 odpovědí, kdy se zdá být upřednostňována prozánětlivá Th1 odpověď (84).

Dysbalance byly objeveny i u dalších imunitních populací. Pacientky s AN se potýkají s nižšími počty makrofágů, neutrofilů i dendritických buněk, následkem čehož mohou trpět na častější výskyt infekcí (84). Snižené počty byly zaznamenány také v případě populace T regulačních buněk, kdy řada studií poukazuje na jejich klíčový význam pro udržení tolerance, a tím i možný vyšší výskyt autoimunitních chorob v rámci mentální anorexie (85).

U pacientek s AN byly pozorovány zvýšené hladiny prozánětlivých cytokinů IL-1 β , TNF- α a IL-6, což může naznačovat na přítomnost chronického zánětu. Tyto cytokiny mohou mít negativní dopad na náladu, chování a kognitivní funkce, ale i na produkci hormonů regulujících příjem potravy, jako je například ghrelin (86). Celkově lze tedy říct, že zvýšená hladina prozánětlivých mediátorů může u pacientek s AN hrát důležitou roli v patofyziologii onemocnění, jak na úrovni psychologické, kdy přispívají ke skleslé náladě a depresím, tak na úrovni fyziologické, kdy potlačují chuť k jídlu (30,34,35).

Lidé trpící AN mohou být kvůli dysregulovanému příjmu potravy větším rizikem pro rozvoj idiopatických střevních zánětů (IBD), které zahrnují Crohnovu chorobu a ulcerózní kolitidu. Ve spojitosti s IBD se často mluví také o dysbióze, tedy dysbalanci ve složení střevní mikrobioty. Pacientky trpící mentální anorexií mají narušené složení střevního mikrobiomu a potýkají s větším výskytem komenzálních, potenciálně patogenních, bakterií, které mohou narušovat střevní bariéru. I tento fakt přispívá k rozvoji střevního zánětu. Tyto stavy poté mohou způsobit bolesti břicha, průjem, krvácení a další komplikace (87).

Anorexie představuje riziko také pro rozvoj autoimunitní tyreoiditidy. Existuje řada studií, které se snaží objasnit vztah mezi těmito dvěma onemocněními. První vysvětlení vyplývá z podvýživy těchto pacientek, a tím i nedostatku jódu, který je pro správné fungování štítné žlázy krucální. Další teorie se týká celkové dysfunkce a dysregulace imunitního systému a přítomnosti autoprotilátek proti tyreoperoxidáze, enzymu, který zajišťuje tvorbu hormonů štítné žlázy (88).

2.4 Komunikace mezi imunitním a nervovým systémem

Imunitní a nervový systém jsou dvě hlavní regulační soustavy v těle a spolupracují při mnoha procesech. Jedním z hlavních mechanismů, jakým tyto dvě soustavy komunikují, představují cytokiny, signální molekuly produkované imunitními buňkami a aktivující neurony v centrální nervové soustavě (CNS) (89).

Prozánětlivá triáda cytokinů, známá též jako IL-1, IL-6, TNF α , patří k důležitým regulátorům CNS. Zajímavé je, že právě tyto cytokiny mohou prostoupit hematoencefalytickou bariéru, a tím ovlivnit funkci neuronů v mozku a míše prostřednictvím společných molekulárních signálních drah, kdy zejména IL-6 a IL-6R jsou exprimovány jak na nervových buňkách, tak imunitních buňkách, což umožňuje vzájemnou komunikaci (90). IL-1 a TNF- α mohou stimulovat zvýšení exprese glutamátu, jednoho z klíčových neurotransmiterů v mozku, a tím zvýšit excitabilitu nervových buněk a způsobit následné poškození tkáně zánětem (91). Cytokiny mohou ovlivňovat nervovou soustavu také na úrovni hippocampu, část mozku zodpovědné za emoční odpověď. Pokud je v případě infekce zvýšená exprese těchto tří cytokinů, znamená to pro člověka stav označovaný jako „sickness behavior“, který se běžně projevuje únavou, snížením sociálního kontaktu, snížením chuti k jídlu, snížením libida, případně kognitivními dysfunkcemi (92). Jedná se o evoluční mechanismus, kdy tělo šetří veškerou energii pro boj s infekcí a nesoustřeďuje se tak na další evolučně důležité mechanismy, jako je potřeba získávat energii pro přežití a reprodukci (93). Zvýšené hladiny IL-6 jsou zodpovědné za snížení kognitivních funkcí, IL-1 β je znám indukci horečky a letargie (91).

Další mechanismus, který může vést ke změnám nálad, je smyčka přes interferony (IFN- α , IFN- β). Ty jsou schopny zvýšit produkci monoaminů, jako je serotonin a ovlivňovat tak

negativně náladu. Zvýšená hladina interferonů může zvýšit únavu a snížit energii a narušit tak psychickou pohodu. Tento mechanismus byl popsán zejména u pacientek, které trpěly chronickými zánětlivými onemocněními, např. hepatitidou C, kdy se IFN- α a IFN- β uplatňují v boji proti virové infekci (93).

Dalším mechanismem, kterým komunikuje nervová soustava a imunitní systém, je signalizace prostřednictvím nervových zakončení v imunitních orgánech a tkáních. Nervová vlákna z autonomního nervového systému se větví do thymu, sleziny a lymfatických uzlin, kde interagují s T-lymfocyty, B-lymfocyty a makrofágy (94). Tyto interakce jsou pak důležité pro regulaci imunitní odpovědi a udržení homeostázy v těle. Nervový systém také ovlivňuje imunitní systém pomocí uvolňování neurotransmiterů a hormonů, zejména pak prostřednictvím noradrenalinu a kortizolu (95).

Noradrenalin je produkován sympatickým nervovým systémem a ovlivňuje imunitní systém zejména při reakci na stresové situace, kdy po uvolnění noradrenalinu dochází ke stimulaci produkce prozánětlivých cytokinů a je tak posílena zánětlivá odpověď. Vedle toho kortizol je produkován nadledvinami, především při dlouhodobé expozici stresu, a naopak snižuje produkci prozánětlivých cytokinů a podporuje expresi protizánětlivých cytokinů, což může vést k potlačení imunitní odpovědi a zvýšení rizika infekce a zánětlivých onemocnění (96).

2.5 Mikrobiom

Mikrobiota představuje soubor mikroorganismů obývajících všechny epitelem kryté povrchy lidského těla, jako je trávicí trakt, dýchací trakt, kůže, ústní dutina či genitálie. Tento mikrobiální komplex zastupují především bakterie, dále také viry, archea, plísně, kvasinky i další mikroorganismy, které jsou významné pro udržení našeho zdraví a fungují jako symbiotický systém, který má nezastupitelnou roli při trávení potravy, tvorbě vitamínů, podpoře imunitního systému a dalších procesech. Mikrobiom pak kromě společenství mikrobioty zahrnuje geny těchto mikroorganismů, mikrobiální metabolity a mikrobiální interakce (97).

Obvykle se odhaduje, že mikrobiální komplex v lidském těle představuje až 10^{14} bakterií. Největší mikrobiální diverzita je v trávicím traktu, zejména v tlustém střevě. Uvádí se, že tato oblast obsahuje více než 70 % všech mikrobů v lidském těle a tvoří ji více než 1000 druhů

bakterií. K nejvíce zastoupeným kmenům se pak řadí *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Další kmeny, které se běžně vyskytují v lidském střevě, zahrnují *Proteobacteria*, *Actinobacteria* a *Verrucomicrobia*. Tyto mikroorganismy přirozeně osidlují své niky již během narození a jejich složení i diverzita jsou ovlivňovány různými faktory, jako jsou způsob porodu, genetické predispozice, strava, antibiotická léčba, věk, zeměpisná šířka, ale také stres (98).

Zatímco plod v děloze je téměř sterilní, během porodu dochází k mikrobiálnímu osidlování. Bylo zjištěno, že porod vaginální cestou představuje pro jedince styk zejména s prospěšnými laktobacily, a zároveň u dětí, které se narodily přirozenou cestou, bylo v rámci mikrobiomu objeveno vyšší zastoupení bakterií *Bacteroidetes*, které přispívají k rychlejší kolonizaci střev oproti jedincům, kteří se narodili císařským řezem, a byli tak vystaveni především kožní mikrobiotě matky (99). V poporodní fázi má pro vývoj mikrobiomu a osídlení střevní sliznice význam také kojení. Mateřské mléko obsahuje složky, jako jsou oligosacharidy, mateřské imunoglobuliny, laktoferin a laktalbumin, které příznivě podporují růst prospěšných bifidobakterií a laktobacilů (100).

Správný vývoj a fungování našeho mikrobiálního společenství má vliv také na imunitní systém. Střevní mikrobiom se podílí na utváření i udržení imunitní tolerance na bakteriální antigeny, ale také potravinové alergeny. Důležitou roli v tomto procesu mají střevní dendritické buňky, které jsou klíčové pro aktivaci T lymfocytů. Dendritické buňky jsou ovlivněny mikrobiotou i jejími produkty a mohou tak ovlivnit imunitní odpověď na různé antigeny (101). Laktobacily a bifidobakterie produkují kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Tyto kyseliny mění pH ve střevě, což dále ovlivňuje aktivitu některých druhů bakterií, a tím i imunitních buněk. Střevní mikrobiota také produkuje polysacharidy, které se vážou na receptory na povrchu imunitních buněk a modulují tak jejich aktivitu (102). Například lipopolysacharid přítomný na povrchu některých bakterií stimuluje produkci cytokinů, zejména pak prozánětlivého TNF- α . Vysoká produkce TNF- α pak může vést k chronickému zánětu. Na druhou stranu některé bakterie mohou naopak snižovat produkci prozánětlivých cytokinů. Zejména probiotické bakterie produkují látky, které snižují produkci TNF- α i IL-6 (103).

Střevní mikrobiota má také nezastupitelný podíl v regulaci metabolismu. V průběhu fermentace nepostradatelných sacharidů střevní mikrobiom produkuje mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), přičemž mezi nejznámější patří acetát, butyrát a propionát. Tyto kyseliny slouží jako zdroj energie pro buňky střevního epitelu, stimulují produkci hormonů,

účastní se metabolismu cholesterolu a regulují chuť k jídlu ovlivněním produkce leptinu, inzulínu a ghrelinu (104). Některé bakterie také napomáhají tvorbě vitaminů. *Bifidobacterium bifidum* a *Lactobacillus acidophilus* jsou známí producenti vitaminu K. Další bakterie, jako jsou *Escherichia coli* a *Bacteroides fragilis*, jsou schopny syntetizovat vitamin B12 (kobalamin). Některé druhy mikrobů také pomáhají při tvorbě vitaminu B5 (kyselina panthotenová), B7 (biotin) a B9 (kyselina listová) (105).

2.5.1 Výzkum mikrobiomu

Mikrobiální společenství má nezastupitelný význam pro naše zdraví a není tedy divu, že v posledních letech vzniká stále více projektů a studií, které se zkoumáním mikrobioty zabývají. K nejčastějším metodám, které se v rámci výzkumu v této oblasti využívají, jsou molekulárně genetické metody, zejména sekvenování nové generace. Sekvenování mikrobiálního genomu spočívá v sekvenaci specificky mikrobiálních genů, nejčastěji 16S rRNA nebo v sekvenaci naštěpených úseků DNA celých genomů (tzv. shotgun sekvenování). Výsledky sekvenování poté přináší cenná data o taxonomické analýze, fylogenetické analýze, identifikaci nových druhů a mikrobiálních metabolitů, identifikace polymorfismů a sledování rozdílů v expresi genů (106).

Důležitým přístupem v této oblasti je také chov bezmikrobiálních modelů. Jedná se o zvířecí modely, které jsou chovány ve sterilních podmínkách, díky čemuž je pak umožněno sledovat vlivy mikrobiálního osídlování organismu, včetně jejich případného patologického působení. Zároveň je možné definovat konkrétní organismy a sledovat jejich vliv na molekulární úrovni. Výrazný vliv zaznamenal tento chov také při zkoumání imunitního systému, jeho vývoje a vzniku některých autoimunitních chorob (107,108).

2.5.2 Osa mikrobiom-střevo-mozek

Osa mikrobiom-střevo-mozek představuje vzájemnou interakci mezi střevní mikrobiotou, střevním a nervovým systémem. Tato osa je klíčová pro udržení homeostázy v těle a má vliv na mnoho fyziologických procesů, jako jsou trávení, metabolismus, imunitní odpověď, nálada či kognitivní funkce (109).

Střevní systém bývá někdy nazýván jako “druhý mozek” z důvodu velkého počtu nervových buněk a vláken, které tvoří enterický nervový systém, díky kterému komunikuje trávicí soustava s mozkem. Enterický nervový systém je schopen fungovat nezávisle na CNS a přijímat i zpracovávat informace, regulovat trávení a ovlivňovat nálady bez vědomí mozku (110). Komunikace mezi trávicím traktem a mozkem je zprostředkována také přes nervové dráhy, zejména přes *nervus vagus* (bloudivý nerv), či prostřednictvím a hormonů, které jsou produkovány střevní mikrobiotou (111).

Střevní mikrobiota představuje důležitého producenta serotoninu, dopaminu, kyseliny gama-aminomáselné, noradrenalinu, glutamátu, ale také některých hormonů, jako jsou například kortikosteroidy. Prostřednictvím těchto neuroaktivních látek dochází k přímé signalizaci a ovlivnění nálady, chuti k jídlu a dalších aspektů psychického zdraví (112,113). Nerovnováha v rámci složení střevní mikrobioty může představovat riziko pro rozvoj depresí, úzkostných stavů, chronického zánětu, ale také poruch příjmu potravy (114–116). Střevní mikrobiom zároveň představuje bohatý zdroj antigenů pro náš imunitní systém a podílí se tak na udržení tolerance a regulace imunitní odpovědi. Mikrobiální antigeny mohou ale také strukturně napodobovat některé neuropeptidy a neuroaktivní látky, proti kterým imunitní systém zkříženě reaguje a vytváří tak autoprotilátky (117).

V případě poruchy intaktnosti střevní bariéry dochází ke zvýšené propustnosti a infiltraci mikrobiálních antigenů do periferie, kde mohou být rozpoznány přes Toll-like receptory (TLR) a stimulovat imunitní buňky, kdy zejména u aktivace TLR-2 byl popsán zánět v hypotalamu, centra regulace příjmu potravy (118).

2.5.3 Dysbióza

Výzkum mikrobiomu se v posledních letech dostává do popředí vědeckého zájmu a zároveň má významné vědecké implikace pro lékařskou praxi. Porušení rovnováhy mikroorganismů se označuje jako dysbióza, která se projevuje především změnami ve složení mikrobiomu, konkrétně snížením počtu a diverzity zdravých mikroorganismů a zvýšením počtu patogenních a potenciálně škodlivých mikroorganismů. Dysbiotický stav se může vyskytnout v důsledku různých faktorů, jako je užívání antibiotik, nadměrná konzumace rafinovaných cukrů a tuků, užívání alkoholu, stres, špatné hygienické podmínky, genetické faktory a přítomnost infekce (119). V průběhu let studie poukázaly na fakt, že narušení mikrobiomu může mít roli v patogenezi řady vážných onemocnění, včetně deprese, úzkostných poruch, Crohnovy choroby, celiakie, autismu, diabetu 2. typu a v řadě jiných, mezi které mohou patřit i poruchy příjmu potravy (114–116,120). U pacientek s mentální anorexií byl zjištěn nižší poměr mezi *Bacteroidetes* a *Firmicutes* ve srovnání se zdravými ženami, značící možnou dysbalanci mikrobiomu (121). Některé studie popisují, že pacientky s AN mají ve srovnání se zdravými ženami ve svém střevním mikrobiomu vyšší zastoupení metanogenních bakterií, zejména pak *Methanobrevibacter smithii*. Tyto bakterie se živí produkty vznikajícími při rozpadu polysacharidů a zvyšují tak transformaci živin na kalorie (122). Nedávná studie z roku 2021 uvedla, že pacientky s AN mají ve svém střevním mikrobiomu také vyšší zastoupení bakterií rodu *Alistipes*, *Clostridiales*, *Christensebellaceae* a *Rumminococcaceae* a nižší výskyt rodů *Faecalibacterium*, *Agathobacter*, *Bacteroides*, *Blautia* a *Lachnospira* (121). Změny ve složení střevního mikrobiomu se vážou také k nedostatečné funkci dráhy S-adenosyl-L-metioninového cyklu, kdy je deficit konečného produktu spojován s poruchou syntézy různých neurotransmiterů a řadou psychiatrických poruch (123). Zároveň se pacientky s AN potýkají s nižšími hladinami neuroaktivních látek, jako jsou serotonin, dopamin nebo kyselina gama-aminomáselná, a také acetátu, propionátu a butyrátu (121). Naopak vyšší výskyt byl zaznamenán u bakterií, které rozkládají mucin. Rozpad mucinů může vést k rozvolnění těsných spojů a větší propustnosti střevní bariéry, k tzv. „leaky gut“. Antigeny střevní mikrobioty se poté dostávají do periferie, kde mohou stimulovat imunitní systém směrem k zánětu (124).

2.5.4 Detekce mikrobiální translokace

Kromě mikrobiální dysbiózy bývají u onemocněných střevního traktu detekovány markery poruchy střevní intaktosti, mikrobiální translokace či zánětlivého prostředí (125).

Protein vázající mastné kyseliny (I-FABP) je využíván jako marker pro hodnocení ztráty integrity střevní stěny. Výhodou je jeho tkáňová specifita, neboť je exprimován epiteliálními buňkami tenkého střeva. Už při drobném poranění slizniční vrstvy se uvolňuje a jeho koncentrace v oběhu se zvyšuje (125).

Lipopolysacharidy-vázající protein (LBP) je protein akutní fáze, který je syntetizován jaterními a gastrointestinálními buňkami v reakci na endotoxin. Je schopný se přímo na endotoxin vázat a usnadňuje tak jeho transport k receptoru CD14. Díky tomuto mechanismu se využívá jako marker mikrobiální translokace (126).

K dalším využívaným akutním proteinům fáze se řadí sérový amyloid A (SAA). Koncentrace tohoto proteinu se zvyšují v reakci na zánětlivé prostředí (127). Obdobně pak funguje také kalprotektin (S100A8/S100A9), který je imunogenním proteinem produkovaným neutrofily a makrofágy a důležitým prozánětlivým mediátorem při akutních i chronických zánětlivých stavech (128).

3 Cíle práce

Cílem této diplomové práce bylo objasnit, zda se na rozvoji mentální anorexie mohou podílet imunitní mechanismy ve vztahu ke střevnímu mikrobiomu, a to konkrétně v tomto rozsahu:

1. Porovnání biochemických a antropometrických parametrů mezi zdravými kontrolami a pacientkami.
2. Analýza složení střevní mikrobioty metodou HTS.
3. Stanovení hladin konkrétních bakteriálních druhů metodou RT-qPCR.
4. Určení sérových hladin biomarkerů poškození střevní bariéry, mikrobiálního prostupu střevní stěnou a zánětu metodou ELISA.
5. Měření hladin protilátek proti neuropeptidům regulujících příjem potravy pomocí metody ELISA.
6. Stanovení hladin prozánětlivých cytokinů na přístroji Luminex.
7. Zavedení experimentálního myšního ABA (activity-based anorexia) modelu.
8. Měření exprese vybraných genů v myším hypothalamu a tračníku metodou RT-qPCR.

4 Metodika a návrh experimentů

4.1 Výběr pacientek a dotazníkové šetření

Ve spolupráci s prof. MUDr. Hanou Papežovou, CSc., vedoucí centra pro poruchy příjmu potravy (Psychiatrická klinika 1. LF UK a VFN, Praha) bylo pro studii vybráno celkem 60 pacientek a 30 zdravých žen z běžné populace jako kontrolní skupina. Pacientky byly rozděleny do dvou skupin, na akutní a chronické. Akutní pacientky se potýkaly s mentální anorexií méně než tři roky, chronické pacientky trpěly mentální anorexií více než sedm let. V rámci psychiatrické kliniky, kde byly pacientky hospitalizovány, probíhalo měření několika tělesných parametrů a zároveň dotazníkové šetření zaměřené na poruchy příjmu potravy.

Pacientky byly váženy ihned po hospitalizaci na kliniku, také byla zaznamenána jejich výška, procento tělesného tuku, obvod pasu a obvod boků. V rámci vyšetření podstoupily také dotazníkové šetření EDE-Q, které zahrnuje otázky zaměřené na stravovací chování, tělesné vnímání, závislost na váze a psychologické problémy spojené s mentální anorexií. Pacientky hodnotily otázky mírou 0–6, kdy 0 znamená vůbec/nikdy a 6 znamená výrazně/každý den. Kopie dotazníku je uvedena v příloze. Stejný dotazník vyplňovaly také ženy z kontrolní skupiny. Kontrolám byla stejně jako pacientkám změřena váha, výška, BMI index, procento tělesného tuku a obvod pasu a boků. Všechny ženy byly tázány také na věk 1. menses, způsob porodu, onemocnění (somatické/psychické), medikamenty, kouření, případně další závislosti, frekvenci cvičení, omezení ve stravování, alergie a stresovou anamnézu nebo trauma.

4.2 Získání a zpracování vzorků pacientek a kontrol

V rámci této studie bylo analyzováno několik typů vzorků. Ve spolupráci s Psychiatrickou klinikou 1. LF UK a VFN byly odebrány 30 akutním pacientkám, 30 chronickým pacientkám a 30 zdravým kontrolám vzorky krve a stolice. Vzorky krve byly odebrány do zkumavek typu BD Vacutainer®SSTTM a následně centrifugovány při 2 500 g po dobu 10 minut. Ze získaných sér byly připraveny alikvoty po 250 µl a uschovány při teplotě -80 °C do další analýzy.

Vzorky stolice byly odebrány pacientkami a zdravými ženami do odběrových kelímků (IKA, Německo). Takto odebrané vzorky byly transportovány z Psychiatrické kliniky 1. LF a VFN do Laboratoře buněčné a molekulární imunologie (AV ČR, Praha), kde byly ihned zpracovány. Z primární zkumavky bylo odebráno 5-10 g stolice a uschováno v alobalových pouzdrech při

teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby izolace DNA. Zároveň byla část vzorku také zpracována do formy FMT konzerv a připravena tak pro budoucí experimenty. 5 g vzorku stolice bylo přeneseno do speciálního homogenizačního kelímku typu ST-50 (IKA, Německo). Ke vzorku stolice bylo přidáno 50 ml 0,9% NaCl a následně byl vzorek homogenizován. Homogenizovaný vzorek byl pomocí filtrů (pluriStrainer, Německo) o velikosti membrány 200 μm , 400 μm , 500 μm a 1000 μm přefiltrován do 50 ml zkumavky a následně centrifugován po dobu 15 minut při 8 000 g. Ze vzorku byl odstraněn supernatant a peleta byla resuspendována ve 25 ml 0,9% NaCl. K resuspendovanému vzorku bylo napipetováno 3 ml glycerolu a takto připravený vzorek byl rozdělen do 20 kryo zkumavek po 400 μl a uložen při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.3 Izolace DNA ze vzorků stolic

Vzorky stolice byly před samotnou izolací DNA uschovány v mrazničce při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. K izolaci DNA byla využita komerční souprava ZymoBIOMICS™ DNA Miniprep kit (Zymoresearch, USA) a izolace byla provedena dle doporučeného návodu. Byla stanovena koncentrace naizolované DNA na přístroji NanoDrop 2000C (Thermo Fischer Scientific, USA) a vzorky byly poté uloženy při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.4 Průkaz specifity bakteriálních primerů pro kvantitativní PCR

Pro kvantitativní PCR analýzu bylo nutné potvrdit specifitu používaných bakteriálních primerů. Kontrolní analýza byla provedena na základě klonování bakteriálních amplikonů komerčním kitem TOPO®TA Cloning®. Nejprve byla provedena PCR reakce při použití analyzovaných primerů, kdy došlo k amplifikaci požadovaných DNA fragmentů. Takto nasyntetizovaný produkt je schopný se kovalentně vázat k plazmidovému vektoru pCR4-TOPO®TA, který je součástí používané sady. Komplex plazmidového vektoru s navázaným DNA produktem byl vložen do bakterie *Escherichia coli* (označené E. cloni® 10G Chemically Competent Cells, Lucigen, USA), ve které dochází k množení plazmidů. Na principu "blue-white screening" techniky byly identifikovány pozitivní klony. Buňky transformované vektory obsahující rekombinantní DNA produkují bílé kolonie, buňky transformované nerekombinantními plazmidy, tj, pouze vektorem, rostou do modrých kolonií. Pozitivní klony byly dále kultivovány v médiu při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ přes noc a z narostlé kultury byly dále izolovány plazmidy komerčním kitem PureLink™ Quick Plasmid Miniprep kit (Thermo Fischer Scientific, USA). Získané plazmidy byly

osekvenovány Sangerovým sekvenováním (služba MBÚ) a výsledná sekvence poté byla zhodnocena pomocí algoritmického programu Blast.

4.5 Kvantitativní RT-PCR

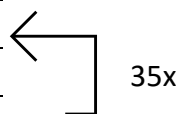
Ke kvantifikaci vybraných bakteriálních druhů (*Akkermansia muciniphila*, *Alistipes spp.*), archea (*Methanobrevibacter smithii*) a celkového určení počtu 16S rRNA kopií byla provedena kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR) přístrojem CFX96 Touch Real-Time Detection System (Bio-Rad, USA). Pro amplifikaci vzorků DNA byl použit komerční PCR Master Mix, který je založen na barvení DNA barvou Syber Green (Invitrogen, USA). K analýze bylo použito 12,5 µl Syber Green Master Mixu (Generi Biotech, ČR), 9,5 µl destilované sterilní vody, 1 µl forward primeru, 1 µl reverse primeru a 1 µl cDNA vzorku o koncentraci 40 ng/µl. Byly využity 10mM specifické primery pro rozdílné mikrobiální organismy (**Tabulka 1**) a RT-qPCR analýza probíhala ve 35 cyklech a byla nastavena pro všechny kvantifikace stejně (**Tabulka 2**). Vyhodnocení dat poté probíhalo v programu Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, USA). Kvantifikace jednotlivých mikroorganismů byla vypočítána ze standardní křivky pro konkrétní druh. Standardní křivka byla stanovena na základě DNA o známých koncentracích. Specifita produktu byla zhodnocena dle křivek tání, které graficky stanovují postupné zvyšování teploty produktu z 55 °C na 95 °C po proběhlé RT-qPCR reakci.

Tabulka 1: Sekvence F (forward) a R (reverse) primerů konkrétních bakterií, archeí a celkového počtu 16S rRNA použitých při kvantifikaci

Druh organismu	Sekvence forward (F) a reverse (R) primerů
<i>Akkermansia muciniphila</i>	F: 5'- CAGCACGTGAAGGTGGGGAC -3' R: 5'- CCTTGCGGTTGGCTTCAGAT -3'
<i>Alistipes spp.</i>	F: 5'- GTGCAGGAAGACGGCTCTAT-3' R: 5'- ATTCCGCCTACCGCAACTAC-3'
<i>Methanobrevibacter smithii</i>	F: 5'- CCGGGTATCTAATCCGGTTC -3' R: 5'- CTCCCAGGGTAGAGGTGAAA -3'
Celkový počet bakterií	F: 5'- CNACGCGAAGAACCTTANC -3' F: 5'- ATACGCGARGAACCTTACC -3' F: 5'- CTAACCGANGAACCTYACC -3' F: 5'- CAACGCGMARAACCTTACC -3' R: 5'- CGACRRCCATGCANACCT -3'

Tabulka 2: Nastavení RT-qPCR reakce

Počáteční denaturace	95 °C	10 min
Fáze denaturace	94 °C	10 sec
Nasedání primerů	58 °C	25 sec
Syntéza DNA	72 °C	35 sec



4.6 Vysoce výkonné sekvenování (HTS)

K analýze celkové DNA (cDNA) vyizolované ze vzorků stolice byla použita metoda vysoce výkonného sekvenování, známé také jako sekvenování nové generace. V rámci DNA byla sekvenována bakteriální oblast V3-V4 genu 16S rRNA a zároveň byly osekvenovány také DNA standardy mikrobiální komunity a standardy izolované z mikrobiální komunity, které slouží k zhodnocení kvality. Standardy pro kontrolu kvality (ZymoResearch, USA) fungují na principu známé koncentrace DNA či kultury konkrétních bakteriálních druhů a zároveň obsahují předem definovanou bakteriální směs. Celkem byly vytvořeny dvě amplikonové knihovny, kdy nejprve byly DNA vzorky amplifikovány za použití PCR HiFi HotStart Ready mixu (Roche, Švýcarsko). K amplifikaci byly použity degenerované primery označené čárovými kódy (341F: 5'-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' a 806R: 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'). PCR reakce byla nastavena na 25 cyklů. Amplifikace proběhla celkem třikrát pro každý vzorek. Výsledné triplikáty byly dále normalizovány v rámci jedné jamky pomocí SequalPrep™ Normalization Plate kitu (ThermoFisher Scientific, USA). Po důsledné normalizaci již mohly být vzorky spojeny do jedné zkumavky a koncentrovány koncentrátorem Vacufuge 5301 (Eppendorf, Německo) v prostředí vakua při teplotě 30 °C po dobu 3 hodin. Amplikonové knihovny byly následně purifikovány pomocí komerční sady DNA Clean & Concentrator (ZymoResearch, USA). Po purifikaci proběhla ligace se sekvenačními adaptéry (TruSeq DNA PCR-free LT Sample Preparation Kit, Illumina, USA) pomocí KAPA HyperPlus soupravy (Roche, Švýcarsko). Následně byly knihovny validovány na výslednou koncentraci za použití KAPA Library Quantification soupravy (Illumina, USA). Takto připravené knihovny byly odeslány do Centrální genomické laboratoře v Brně (CEITEC, ČR), kde proběhla sekvenace na přístroji Illumina MiSeq s použitím MiSeq Reagent v3 sady (Illumina, USA).

4.7 Analýza sekvenačních dat

Sekvenační data byla bioinformaticky upravena za použití programu SEED 2.0. Nejprve byla zhodnocena kvalita sekvenačního souboru a byly odstraněny všechny sekvence s nízkou kvalitou (qm 30). Následně byly posouzeny sekvence na základě délky bp (páru bází), aby soubor neobsahoval data nebakteriálního původu. Z toho důvodu byly vymazány všechny sekvence, které byly kratší než 200 bp a zároveň delší než 380 bp. V dalším kroku došlo k utřídění sekvencí na principu párování unikátního kódu a unikátní sekvence nukleotidu, která je komplementární k nějakému ze známých použitých primerů. Takto spárované sekvence byly pro lepší přehlednost pojmenovány a na základě sekvenční podobnosti (podobnost >97 %) mezi sebou dále spojeny do skupin, také jinak nazývaných jako operační taxonomické jednotky (OTU). Jednotlivé OTU byly pomocí RPD databáze přiřazeny ke konkrétním bakteriálním druhům a ze získaných dat byla vytvořena tabulka čítající sekvence, OTU a názvy bakteriálních druhů. Ze souboru byly poté odstraněny tzv. singletony, tedy ty OTU, které se vyskytovaly pouze v jedné kopii v jednom vzorku.

4.8 Detekce autoprotilátek proti peptidům regulujících příjem potravy

V rámci této práce byly stanoveny autoprotilátky ve třech izotypech (IgG, IgA, IgM) proti konkrétním peptidům regulujících příjem potravy (α -MSH, MCH, NEI, NPY, Orexin A, Orexin B, PYY). Peptidy byly získány od komerčního dodavatele Bachem AG (Švýcarsko) a byly naředěny dle uživatelského návodu. Naředěné peptidy poté byly uskladněny při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do doby použití.

Pro kontrolu specificky navázaných protilátek proti peptidům byla provedena inhibiční ELISA, a to konkrétně proti peptidu α -MSH (test provedla Mgr. Janet Ježková). Tato inhibiční ELISA byla navržena tak, že před samotným přidáním naředěného séra do ELISA destičky probíhala inkubace séra (60 min) se zvyšující se koncentrací peptidu α -MSH. Dále se postupovalo s preinkubovaným sérem s peptidem jako s ostatními séry. S narůstající koncentrací přidaného peptidu k séru se tak zároveň snižuje optická denzita detekovaného vzorku. Pro kontrolu specifity bylo použito sérum z 5 pozitivních sér na autoprotilátky proti α -MSH.

Stanovení koncentrace autoprotilátek probíhalo in-house metodou ELISA (návrh a optimalizace RNDr. Petra Procházková, Ph.D.). Detekce protilátek byla stanovena v ředěných

pacientských a kontrolních sérech, která byla ředěna ve 2% roztoku rybí želatiny (Sigma-Aldrich, USA) ředěném v PBS. Ředění sérových vzorků se lišilo v závislosti na peptidu, viz **Tabulka 3**.

Tabulka 3: Ředění sér u jednotlivých neuropeptidů

	IgG	IgA	IgM
α-MSH	1:50 - 1:3200	1:50 - 1:800	1:50 - 1:800
MCH	1:50 - 1:800	1:25 - 1:200	1:25 - 1:200
NEI	1:50 - 1:1600	1:25 - 1:400	1:25 - 1:400
NPY	1:50 - 1:200	1:25	1:25 - 1:800
Orexin A	1:50 - 1:800	1:25 - 1:50	1:25
Orexin B	1:50 - 1:200	1:25	1:25
PYY	1:50	1:25 - 1:100	1:25 - 1:100

Rozmezí hodnot určuje pozitivní protilátky v séru a následné doředřování vzorků.

Detekční hodnota pro pozitivní sérum byla stanovena jako absorbance blank (prázdné jamky) + 3 SD (spektrofotometrická detekční hodnota). Zároveň byly zahrnuty i tzv. kontrolní jamky, které nebyly potaženy neuropeptidem, aby zachytily případný šum na pozadí specifický pro sérum (SSBN). Detekce tohoto šumu poté byla odečtena od samotného signálu jamek potažených daným peptidem.

Nejprve byly 96jamkové destičky (Thermo Fischer Scientific, USA, typ Nunc Maxisorp) potaženy 100 μl /jamka vazebným pufrem (0,5 M NaHCO₃, 0,5 M Na₂CO₃, pH 9,6) o koncentraci 2 μg/ml peptidu (α-MSH, Orexin A, Orexin B, NEI, NPY, PYY, MCH). Potažené destičky byly uschovány při 4–8 °C a inkubovány 22–24 hodin. Analýza probíhala v duplikátech, přičemž každá třetí jamka navíc zůstala prázdná (tj. jamka bez přidaného peptidu). Po proběhlé inkubaci byly destičky na automatické promývačce (Autobio, Čína) třikrát promyty promývacím pufrem (PBS, 0,05 % Tween) v objemu 300 μl/jamka. Další vazba peptidu na povrch destiček byla zablokována v objemu 100 μl/jamka roztokem 2% rybí želatiny rozpuštěné v PBS. Fáze blokace probíhala 22–24 hodin při teplotě 4–8°C.

Po blokaci následovalo promytí destiček stejným způsobem. V dalším kroku byla přidána různě naředěná séra v závislosti na použitém peptidu (**Tabulka 3**) v objemu 100 μ l/jamka a následně probíhala inkubace 2 hodiny při pokojové teplotě (21–24 °C). Vzorky séra byly na destičku naneseny v triplikátech.

Destičky byly opět promyty a potaženy kozí peroxidázou-konjugovanými protilátkami namířenými proti lidským izotypům IgG (ředění 1:8000 ve 2% roztoku rybí želatiny), IgA (ředění 1:8000 ve 2% roztoku rybí želatiny) a IgM (ředění 1:4000 ve 2% roztoku rybí želatiny). Protilátky jsou komerčně dostupné (Jackson Immuno Research, USA) a namíření protilátek je výrobcem uvedeno následovně; u IgG je protilátka namířená proti Fc γ fragmentu, u IgA je protilátka namířená proti α řetězci protilátky, u izotypu IgM je namířená proti Fc μ řetězci protilátky. Inkubace s protilátkami probíhala při pokojové teplotě 2 hodiny v temnu.

Destičky byly opakovaně promyty a ke vzorkům bylo přidáno 50 μ l předpřipraveného roztoku TMB (3,3',5,5'tetramethylbenzidin, Sigma-Aldrich, USA) do každé jamky. Následovala 20 minut inkubace ve tmě při pokojové teplotě. Reakce byla zastavena přidáním 50 μ l 2M H₂SO₄ do každé jamky a za použití spektrometru (Multiskan Akcent Plate Reader, MTX Labe Systems, USA) byla změřena optická denzita vzorků při vlnové délce 450 nm a 650 nm.

Během vyhodnocení výsledků byla odečtena hodnota prázdné jamky (tj. jamka bez přidaného peptidu) od jamek potažených peptidem. Nepotažená jamka představuje kontrolu nad tím, zda se nenavazují sekundární protilátky na případná nezablokovaná místa na destičce či na imunokomplexy, které jsou pro lidské sérum typické. Odečtením nepotaženým jamek od potažených se tedy zbavíme tzv. šumu na pozadí, který by mohl znamenat falešně pozitivní výsledky. Na každé destičce byly navíc zahrnuty blanky (tj. prázdné jamky bez přidaného séra). Rozdíl v replikátech jednotlivých vzorků nepřevyšoval hodnotu 0,1 OD.

4.9 Stanovení hladin cytokinů

Ve vzorcích sér byly detekovány hladiny konkrétních cytokinů (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α). Stanovení koncentrace cytokinů bylo určeno za použití sady Human High Sensitivity Cytokine Premixed A (R&D Systems, USA) a přístroje Luminex (LABScan3DTM, OneLambda, Thermo Fischer Scientific, USA). Princip metody spočívá v použití magnetických kuliček s navázanými

protilátkami proti těmto cytokinům (průměr kuličky 5,6 μm). Systémová tekutina obsahující magnetické kuličky protéká přístrojem, první laser od sebe kuličky rozlišuje na základě spektrálního kódu, který je vytvořen daným fluoroforem. Dochází k excitaci fluoroforu, a tím je rozpoznán specifický typ kuličky. Druhý laser je schopen excitovat streptavidin PE a kuličky jsou tak od sebe odlišeny na základě typu protilátky, která je na povrchu kuličky navázaná. Samotná analýza pak byla provedena na vzorcích sér, ředěných v poměru 1:1 ředícím roztokem dostupném v komerční soupravě. Koncentrace cytokinů byla vypočítána ze standardní křivky pro každý cytokin. Standardní křivka byla vytvořena z výsledných hodnot střední intenzity fluorescence (MFI).

4.10 Detekce poškození střevních buněk, markerů bakteriální prostupnosti či zánětu

Protein vázající mastné kyseliny (I-FABP) je využíván jako marker pro hodnocení poškození střevních buněk. Koncentrace I-FABP byly stanoveny metodou ELISA za použití komerční sady Human I-FABP ELISA (Hycult Biotech, Nizozemsko). Jako vzorky byla použita 4x naředěná séra v ředícím roztoku dostupném v sadě, v duplikátech. Analýza probíhala dle komerčního návodu. Výsledné absorbance při 450 a 650 nm byly změřeny spektrometrem Multiskan Ascent Plate Reader, MTX Lab Systems (USA). Koncentrace proteinu I-FABP byly vypočítány ze standardní křivky určené jako polynom.

Lipopolysacharidy-vázající protein (LBP) je protein akutní fáze, který se využívá jako marker mikrobiální translokace. Hladiny LBP byly měřeny metodou ELISA pomocí komerční soupravy Human LBP, DuoSet ELISA (R&D Systems, USA). Analýza probíhala v duplikátech, ve 100x naředěném séru v ředícím roztoku obsaženém v sadě, dle návodu. Vzorky byly změřeny spektrometrem Multiskan Ascent Plate Reader (MTX Lab Systems, USA) při 450 a 650 nm. Hodnoty koncentrací byly stanoveny dle standardní křivky určené jako polynom.

sCD14 je molekula, která se účastní signalizace endotoxinu a obecně se využívá jako marker mikrobiální translokace. Hladiny molekuly sekreční CD14 byly měřeny metodou ELISA pomocí komerční soupravy Human sCD14, DuoSet ELISA (R&D Systems, USA). Vzorky patientským a kontrolních sér byly naředěné 100x v komerčním ředícím roztoku. Postup analýzy probíhal dle návodu. Výsledná absorbance byla naměřena spektrometrem Multiskan Ascent Plate Reader (MTX Lab Systems, USA) při 450 a 650 nm. Koncentrace molekuly sCD14 byla stanovena dle standardní křivky, která byla určena jako polynom.

Sérový amyloid A (SAA) je protein akutní fáze, jehož koncentrace se zvyšuje v odpovědi na zánětlivý proces. Stanovení koncentrace SAA probíhalo metodou ELISA za použití komerční sady Human Serum Amyloid A1 (R&D Systems, USA). Séra byla naředěná 20x v dostupném ředícím roztoku a byla analyzována v duplikátech. Postup experimentu probíhal dle návodu v sadě. Standardní křivka byla zhotovena z výsledných absorbancí při 450 a 650 nm naměřených na spektrometru (Multiskan Ascent Plate Reader, MTX Lab Systems, USA), standardní křivka byla určena jako polynomická.

Kalprotektin (S100A8/S100A9) je důležitým prozánětlivým markerem. Jeho hladiny byly detekovány metodou ELISA za použití sady Human S100A8/S100A9, ELISA DuoSet (R&D Systems, USA). Koncentrace kalprotektinu byly stanovené v séru naředěném 300x. Analýza probíhala dle protokolu, který byl v rámci soupravy k dispozici. V závěru experimentu byly naměřeny absorbance při 450 a 650 nm na přístroji Multiskan Ascent Plate Reader (MTX Lab Systems, USA). Koncentrace proteinu S100A8/S100A9 byly stanoveny z výsledných absorbancí, ze kterých byla vytvořena standardní polynomiální křivka.

4.11 Statistická analýza dat

Všechna data v rámci této práce byla statisticky vyhodnocena pomocí programů GraphPad Prism 8.0.1 a PAST 4.12b. Klinická data (poskytnutá prof. MUDr. Hanou Papežovou, CSc.) a biochemická data (Biochemická laboratoř VFN) byla analyzována dvoucestnou ANOVou (včetně Tukey korekce) s výjimkou stanovení hyperaktivity. Analýza hyperaktivity byla provedena v programu R studio použitím Pearsonova chí-kvadrát testu, kdy hodnoty hyperaktivity byly zadány jako ordinální proměnné. Korelace získaných antropocentrických a biochemických dat a korelace zastoupení *Enterobacteriaceae* s výskytem autoprotilátek proti α -MSH byly vyhodnoceny pomocí Spearmanova korelačního testu. Výsledky detekce autoprotilátek proti peptidům, stanovení sérových proteinů a určení zastoupení jednotlivých bakteriálních druhů a archeí metodou RT-qPCR byly vyhodnoceny pomocí neparametrického Kruskal-Wallis testu v případě porovnání třech skupin, porovnání mezi dvěma skupinami bylo zajištěno neparametrickým Mann-Whitney testem.

Data získaná analýzou střevního mikrobiomu byla stanovena jako alfa diverzita a beta diverzita. Alfa diverzita ustanovuje zastoupení druhů v rámci jednoho vzorku a byla vypočítána

pomocí Chao-1 indexu, Shannon-Weiner indexu a testu, který shrnuje celkový počet bakteriálních druhů. Beta diverzita zobrazuje rozdíly v rámci mikrobiomu mezi jednotlivými skupinami a pro její zhodnocení byl využit neparametrický test vícerozměrového škálování. Samotné rozdíly v beta diverzitě pak porovnává PERMDISP na základě Bray Curtis a Jaccardova testu podobnosti. Pro další porovnání byl použit test PERMANOVA (včetně Bonferoniho korekce), který principiálně opět využívá Bray-Curtis a Jaccardovu matici podobnosti.

Všechna RT-qPCR data provedená na myších vzorcích byla vyhodnocena jednocestnou ANOVou a Tukey post testem. Záznamy myší aktivity jsou shrnuty neparametrickým t-testem a dvoucestnou ANOVou, včetně Sidakova vícenásobného srovnání.

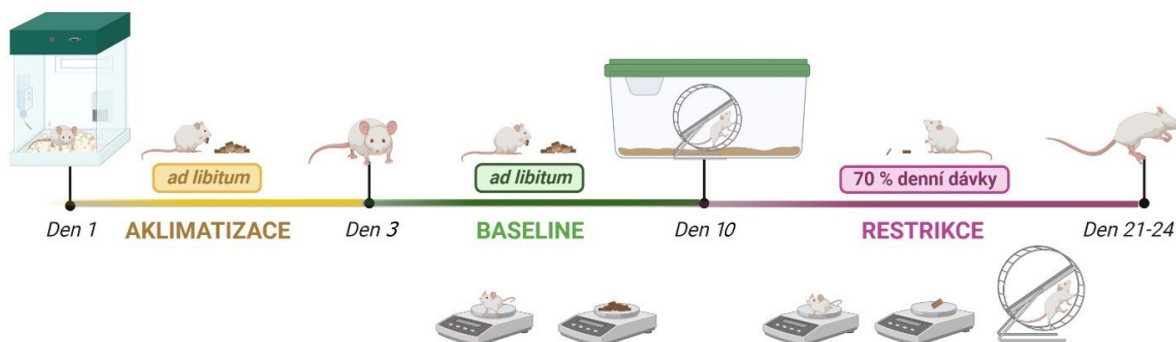
Některá data byla logaritmicou transformací normalizována za účelem dosažení normálního rozdělení hodnot.

4.12 Myší model

Součástí studie bylo zavedení myšího modelu. Jednalo se o imbrední myší samice (stáří 6–8 týdnů) a mladé myší bezmikrobní samice (stáří 7-8 týdnů) kmene BALB/c, u kterých byl indukován aktivitou-vyvolaný model mentální anorexie. Myši kmene BALB/c byly chovány ve zvířetníku Mikrobiologického ústavu (Praha, ČR), bezmikrobní zvířata byla chována na detašovaném pracovišti MBÚ v Novém Hrádku. Celkem bylo do studie zahrnuto 74 konvenčních a 24 bezmikrobních myších kmene BALB/c.

4.12.1 Design experimentu

Mladé myši kmene Balb/c jsou vhodné pro indukci activity-based anorexia (ABA) modelu. Jedná se o model, kdy na základě restrikce množství potravy a současně dostupnosti kolečka na běhání myši upřednostní pohyb před příjmem potravy a zároveň je jejich aktivita ve srovnání s kontrolními jedinci bez restrikce potravy výrazně vyšší. Jde o napodobení stavu mentální anorexie, kdy mají pacientky snížený příjem potravy a zároveň často zvyšují svou fyzickou aktivitu. Mladé myší samice byly vybrány z důvodu, že nejvyšší výskyt mentální anorexie je zaznamenán u žen mezi 12–25 lety. Design pokusu byl navrhnout následovně:



Obr. 1: Design myšího pokusu. Schéma bylo vytvořeno v programu BioRender, zdroj vlastní. Návrh experimentu RNDr. Radka Roubalová, Ph. D.

První část experimentu je fáze aklimatizace, která trvala 3 dny. Během této doby byly myši umístěny do klecí samostatně se zablokovaným běhacím kolečkem a zvykaly si na nové prostředí. Ve fázi aklimatizace dostávaly myši potravu *ad libitum*. Následovala fáze baseline, která trvala 7 dní. Během této fáze byla zjišťována každý den váha myši, množství zkonsumované potravy a myši měly k dispozici odblokovaná běhací kolečka, kterými byla zaznamenávána aktivita pro každou myš zvlášť (**Obr. 1**).

Od 10. dne pokusu započala fáze restrikce. V této fázi experimentu dostávaly některé myši po dobu 10-14 dní pouze 70 % denní dávky potravy (**Obr. 1**). Dávka byla vypočtena pro každou myš zvlášť z mediánu zkonsumované potravy, který byl zaznamenán během baseline fáze. Během restrikce byly myši opět váženy a každý den byla zaznamenána jejich hmotnost. Mimo hmotnosti byla zaznamenávána také aktivita na běhacím kolečku. Experiment byl nastavený tak, aby zahrnoval i kontrolní myši:

- myši, které dostávaly potravu *ad libitum* a neměly běhací kolečka
- myši, které dostávaly potravu *ad libitum* a měly k dispozici běhací kolečka
- myši, které měly restrikci v přísunu potravy, ale neměly k dispozici běhací kolečka
- myši, které měly restrikci v přísunu potravy a zároveň měly k dispozici i běhací kolečka

Po ukončení fáze restrikce byly myši usmrceny a byly získány vzorky séra, hypotalamu a *colon descendens* (**Obr. 1**).

V experimentech byly zahrnuty celkem 3 skupiny myši v závislosti na střevním mikrobiomu. První skupinou byly konvenční myši, do jejichž střevního mikrobiomu nebylo nijak zasaženo,

označované jako noATB. Druhým typem byly myši, kterým byla v průběhu experimentu podávána antibiotika pro snížení mikrobiální diverzity. Tento typ měl za cíl zjistit, jak moc se změní behaviorální aspekty myši po zásahu do střevního mikrobiomu. Myši byly označeny jako ATB myši a 14 dní před fází aklimatizace a každé tři dny v průběhu baseline fáze byly gavážovány 300 μ l směsí antibiotik (5 mg/ml vancomycinu, 50 mg/ml streptomycinu, 1,66 mg/ml colistinu, 5 mg/ml metronidazolu a 0,06 mg/ml amphotericinu). Poslední skupina byly bezmikrobní myši (GF = germ free).

4.11.2 Homogenizace vzorků biopsie a izolace RNA

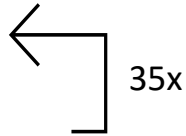
Vzorky hypotalamu a *colon descendens* (sestupný tračník) myši byly uloženy v roztoku DNA/RNA Shield (Zymo research, USA) v mrazničce při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do doby izolace RNA. Vzorky byly poté rozmrazeny a tkáň byla homogenizována za použití homogenizačních zkumavek obsahující lyzační matrix D (MP Biomedicals, Německo). Tkáň byla v homogenizační zkumavce v 1 ml TRIzol Reagent (Ambion Technologies, USA) vložena do homogenizátoru Fast Prep-24 (MP Biomedicals, Německo). Homogenizace proběhla 3 x po dobu 60 s při rychlosti 4 m/s. Po zhomogenizování tkáně bylo ke vzorku přidáno 200 μ l chloroformu (Sigma-Aldrich, USA) a proběhla 2 min. inkubace. Následně byl vzorek centrifugován při 12 000 g po dobu 15 min., při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po centrifugaci byla vodní fáze přenesena do čisté RNase-free zkumavky. Dále byla 10 min. při teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ za použití 500 μ l isopropanolu (Sigma-Aldrich, USA) RNA precipitována. Následovala centrifugace vzorků po dobu 10 min., při 12 000 g a teplotě $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Po stočení vzorků byl odstraněn supernatant a k peletě byl přidán 1 ml 75% ethanolu. Poté byly vzorky opět vloženy do centrifugy a stočeny při 7 500 g, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 5 min. Supernatant byl po stáčení odstraněn a vzorky byly po dobu 5-10 min. volně vysušeny v laminárním boxu. Peleta byla resuspendována ve 20 μ l destilované RNase-free vody a vzorky byly v termobloku inkubovány při teplotě $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 min. pro usnadnění rozpuštění pelety RNA. Po inkubaci byly změřeny koncentrace izolované RNA přístrojem NanoDrop 2000C (Thermo Fischer Scientific, USA) a vzorky byly uloženy v mrazničce při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.11.3 Ověření kvality vzorků

Před samotnou RT-qPCR reakcí byly vzorky ošetřeny DNázou pro odstranění kontaminující genomové DNA za použití TURBO™ DNase (Ambion Technologies, USA). Celý postup byl dodržen dle návodu dostupném v sadě. Poté byly vzorky amplifikovány PCR reakcí (**Tabulka 4**) za použití primerů pro gen *Hprt* (**Tabulka 6**). Ověření kvality vzorků proběhlo za použití kapilární elektroforézy QIAXCEL Advanced (Qiagen, Německo) a Cartridge QiAxcel DNA Screening kit 2400 (Qiagen, Německo) dle doporučeného návodu.

Tabulka 4: Nastavení PCR reakce pro amplifikaci DNA vzorků

Počáteční denaturace	94 °C	3 min
Fáze denaturace	94 °C	30 sec
Nasedání primerů	57 °C	30 sec
Syntéza DNA	72 °C	30 sec

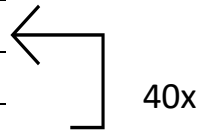


4.11.4 Kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR)

Pro zjištění exprese vybraných genů v hypotalamu a *colon descendens* byla provedena kvantitativní RT-PCR (RT-qPCR) za použití přístroje CFX96 Touch Real-Time Detection System (Bio-Rad, USA). K amplifikaci DNA vzorků byl použit Sg PCR Master Mix (Generi Biotech, ČR). Do reakce bylo přidáno 12,5 µl Master Mixu, 9,5 µl vody, 1 µl forward primeru, 1 µl reverse primeru a 1 µl vzorku naředěného vodou 1:4 v případě hypotalamu a 1:20 v případě *colon*. V rámci experimentu byly využity specifické primery pro rozdílné geny (**Tabulka 6**). RT-qPCR analýza probíhala ve 40 cyklech a byla nastavena pro všechny provedené experimenty stejně (**Tabulka 5**). Analýza dat byla provedena v programu Bio-Rad CFX Manager (Bio-Rad, USA).

Tabulka 5: Nastavení RT-qPCR reakce pro sledování exprese vybraných genů v hypotalamu a *colon descendens*

Počáteční denaturace	94 °C	3 min
Fáze denaturace	94 °C	30 sec
Nasedání primerů	57 °C	30 sec
Syntéza DNA	72 °C	30 sec



Tabulka 6: Sekvence forward (F) a reverse (R) primerů pro zjištění hladin mRNA konkrétních molekul v myším hypotalamu a *colon descendens* pomocí RT-qPCR

Target	Sekvence forward (F) a reverse (R) primerů	Produkt	Umístění
CART (kokainem a amfetaminem regulovaný transkript)	F: 5'-GCTGCTACTGCTACCTTTGC-3' R: 5'-TTCGATCAGCTCCTTCTCGT-3'	118 bp	CNS
CRH (kortikoliberin)	F: 5'-GAAAATGTGGCCCAAGGAG-3' R: 5'-AGCCACCCCTCAAGAATGAA-3'	106 bp	CNS
MCH (melanin-koncentrující hormon)	F: 5'-AGCATCAAATAAGGATGGCA-3' R: 5'-GGCGACAACGGATCTTTCTG-3'	195 bp	CNS
NPY (neuropeptid Y)	F: 5'-CTGCGACACTACATCAATCT-3' R: 5'-CTTCAAGCCTTGTTCTGG-3'	124 bp	CNS
Orexin	F: 5'-ACCGTAACTACCACCGCTTT-3' R: 5'-GGGGGAAGTTTGGATCAGGA-3'	86 bp	CNS
TRH (thyrotropin-uvolňující hormon)	F: 5'-TCTGCAGAGTCTCCACCTTG-3' R: 5'-CGAAGATCAAAGCCAGAGCC-3'	73 bp	CNS
Muc2 (mucin 2)	F: 5'-GATGGCACCTACCTCGTTGT-3' R: 5'-GTCCTGGCACTTGTTGGAAT-3'	246 bp	<i>colon</i>
Muc13 (mucin 13)	F: 5'-GAGGAGAAACAGGAGCATAG-3' R: 5'-GGACATCAAGGGAGAAG-3'	107 bp	<i>colon</i>
OCCL (okludin)	F: 5'-ACTCCTCCAATGGACAAGTG-3' R: 5'-CCCCACCTGTCGTGTAGTCT-3'	249 bp	<i>colon</i>
ZO (zonulin)	F: 5'-CGACCTGAAGGACTGGGTTC-3' R: 5'-TTCCACTTCCCCCTTCCA-3'	111 bp	<i>colon</i>
Hprt - housekeeping gen (hypoxantin fosforibosyltransferáza)	F: 5'-GGTTAAGCAGTACAGCCCA-3' R: 5'-GGCCTGTATCCAACACTTCG-3'	81 bp	CNS/ <i>colon</i>
Act B - housekeeping gen (beta-aktin)	F: 5'-TTGCTGACAGGATGCAGAAG-3' R: 5'-GTA CTGCGCTCAGGAGGAG-3'	86 bp	CNS
CasC3 - housekeeping gen (cancer susceptibility candidate 3)	F: 5'-TTCGAGGTGTGCCTAACCA-3' R: 5'-GCTTAGCTCGACCACTCTGG-3'	96 bp	<i>colon</i>

5 Výsledky

Tato diplomová práce navazuje na proběhlou studii týkající se vlivu imunitních mechanismů a složení střevního mikrobiomu na psychiatrická onemocnění. Experimenty byly prováděny na Akademii věd České republiky v Laboratoři buněčné a molekulární imunologie ve spolupráci s Psychiatrickou klinikou 1. LF UK a VFN a mají za cíl objasnit význam bariérové funkce střeva, mikrobiální diverzity, produkce cytokinů a tvorby autoprotilátek v rozvoji mentální anorexie. Experimentální část byla rozdělena do 3 částí. První část se zabývá imunologickými aspekty mentální anorexie. Ve druhé části byl výzkum zaměřen na střevní mikrobiom. Poslední část zahrnuje experimenty s myším modelem mentální anorexie.

5.1 Definování skupin pacientek a kontrol

Studie čítala celkem 60 pacientek s diagnózou F50.0 (mentální anorexie). Pacientky byly rozděleny do dvou skupin dle trvání onemocnění, přičemž skupina akutních pacientek (n = 30) se potýkala s mentální anorexií méně než tři roky a chronické pacientky (n = 30) trpěly anorexií více než sedm let. Skupinu kontrol tvořilo 30 zdravých žen z běžné populace, které nikdy neměly v anamnéze žádné poruchy příjmu potravy nebo jiné psychiatrické onemocnění. 52 % pacientek postihovaly i další psychiatrické komorbidity, zejména úzkostné, duševní a depresivní poruchy. Značná část pacientek užívala medikamenty na bázi antidepresiv (n = 49), antipsychotik (n = 20) a anxiolytik³ (n = 10). Skupiny pacientek a zdravých kontrol byly vzájemně porovnávány v několika tělesných a biochemických parametrech (**Tabulka 7**).

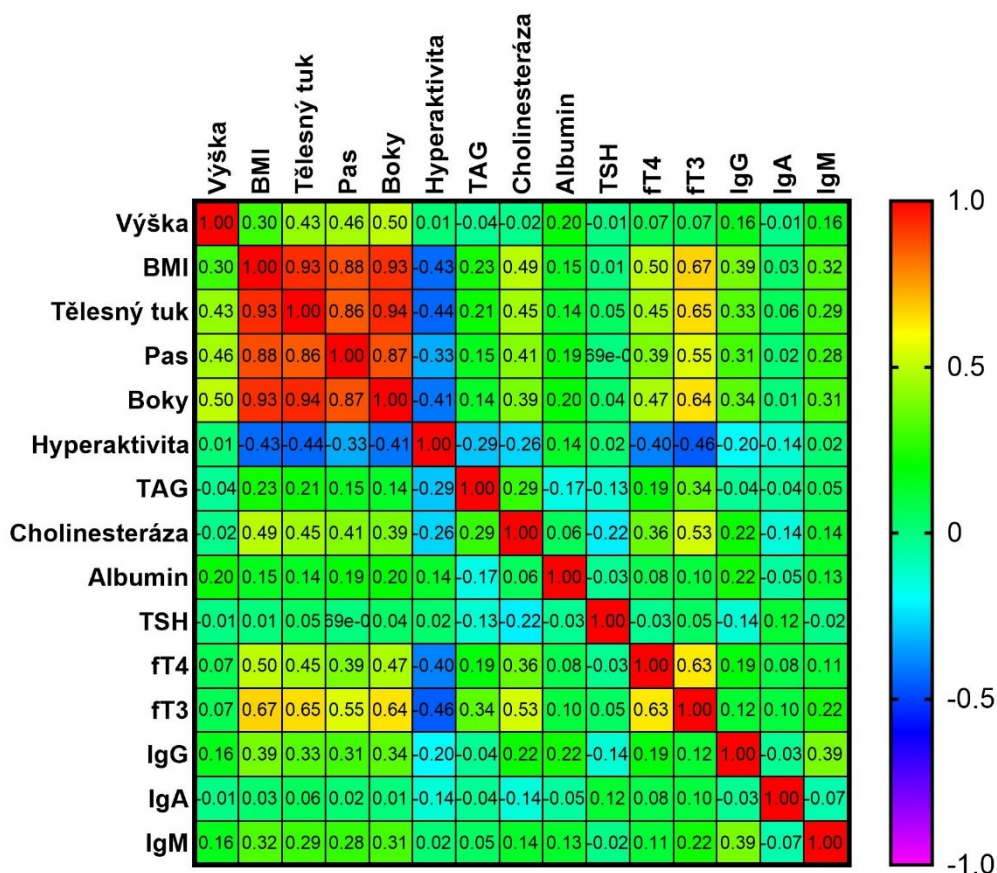
³ anxiolytika = léky potlačující úzkost, psychickou tenzi, strach, trému

Tabulka 7 - Porovnání biochemických a tělesných parametrů zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH).

Parametr	Skupina				p-hodnota			Referenční rozmezí
	KONTROLY	AKUTNÍ AN	CHRONICKÁ AN	K vs. A	K vs. CH	A vs. CH		
Věk (roky)	26 (23.75, 30)	19 (18, 25.25)	28 (23.75, 33.50)	0.0108	NS	0.0004		
Trvání nemoci (měsíce)	-	24 (12, 34)	150 (94, 186)	-	-	<0.0001		
závažnost AN (DSM)	-	3 (2, 4)	4 (3.75, 4)	-	-	0.0087		
Výška (cm)	169.5 (165, 174.3)	166.5 (163, 170.5)	163.5 (160.5, 169.3)	NS	0.0462	NS		
BMI (kg/m ²)	21.81 (21.01, 23.76)	15.42 (14.39, 16.18)	13.69 (12.79, 14.8)	0.0007	<0.0001	NS		
Tělesný tuk (%)	27.35 (25.28, 30.98)	5.65 (3, 8.675)	3 (3, 5.325)	<0.0001	<0.0001	NS		
Obvod pasu (cm)	70 (66, 74)	58 (55.75, 61.25)	57 (54, 60)	<0.0001	<0.0001	NS		
Obvod boků (cm)	95 (90, 100)	78.5, 77, 82.25)	76 (79, 79.5)	<0.0001	<0.0001	NS		
Hyperaktivita	-	-	-	<0.0001	<0.0001	NS		
Albumin (g/l)	46.75 (44.53, 49.1)	46.55 (44.88, 49.45)	46.65 (42.98, 48.03)	NS	NS	NS		
IgG (g/l)	12 (10.13, 13.65)	10.93, 9.413, 12.78)	9.94 (8.18, 11.53)	NS	NS	6.7-15		
IgA (g/l)	2.13 (1.44, 2.54)	1.75 (1.38, 2.208)	1.865 (1.625, 2.373)	NS	NS	0.9-3.7		
IgM (g/l)	1.555 (1.23, 1.973)	1.09 (0.755, 1.53)	1.18 (0.9, 1.593)	NS	NS	0-200		
Cholinesteráza (ukat/l)	116 (105.3, 125)	91.5 (85.75, 111.3)	94 (75, 115.3)	<0.0001	<0.0001	NS	85.2-195.4	
TAG (mmol/l)	0.855 (0.63, 1.245)	0.45 (0.56, 1.055)	0.64 (0.4775, 1.158)	NS	NS	NS	0.45-1.7	
TSH (mIU/L)	2.484 (2.05, 3.091)	2.297 (1.694, 2.847)	2.231 (1.519, 3.275)	NS	NS	NS	0.3-3.5	
fT4 (pmol/l)	14.6 (13.8, 15.33)	12.6 (12.18, 13.93)	12.45 (10.88, 13.53)	NS	NS	NS	12-22	
fT3 (pmol/l)	5.5 (5.025, 5.875)	3.7 (3.35, 4.9)	4 (3.3, 4.75)	NS	NS	NS	3.4-6.3	

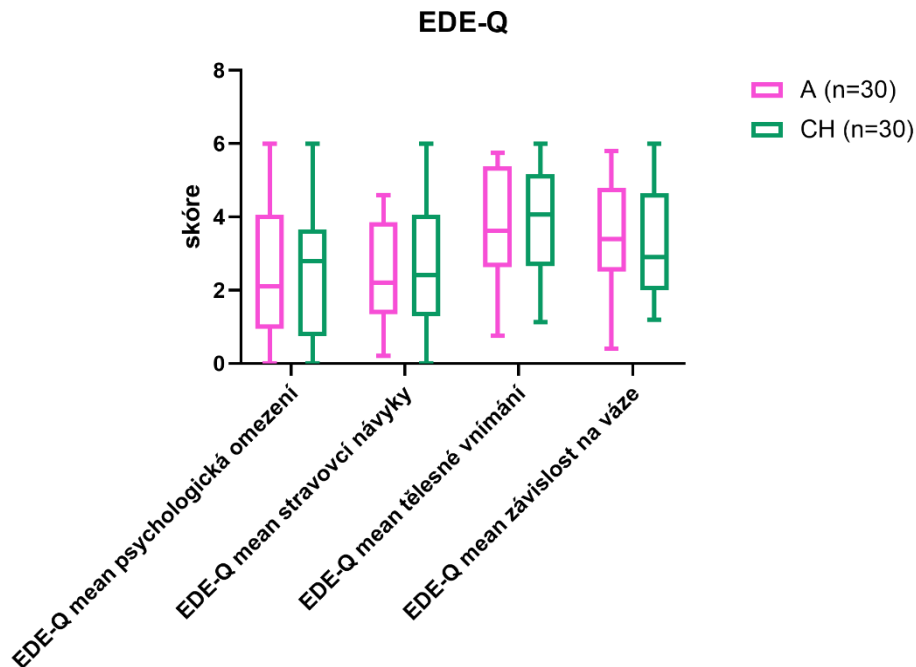
Srovnání tří skupin bylo statisticky vyhodnoceno pomocí dvoucestného ANOVA testu s Tukey korekcí. Srovnání dvou skupin bylo provedeno Mann-Whitney testem. Analýza hyperaktivity byla provedena v programu R studio použitím Pearsonova chí-kvadrát testu, kdy hodnoty hyperaktivity byly zadány jako ordinální proměnné. Signifikantní data jsou tučně. NS = nesignifikantní data. AN = anorexia nervosa/mentální anorexie, K = kontroly, A = akutní AN, CH = chronická AN, TAG = triacylglyceroly, TSH = tyreotropní hormon, fT3 = volný trijodtyronin, fT4 = volný tyroxin. Biochemická data byla naměřena v biochemické laboratoři VFN.

Jak chronické, tak akutní pacientky se od zdravých kontrol signifikantně lišily v několika tělesných parametrech, které jsou klíčové pro determinaci mentální anorexie. Pacientky mají nižší BMI index, menší obvod pasu a boků a nižší procenta tělesného tuku oproti zdravým ženám, značící podvýživu, která je pro mentální anorexii typická. Vzájemná závislost sledovaných parametrů byla potvrzena také Spearmanovým korelačním testem, kdy BMI index, % tělesného tuku, obvod pasu a boků jsou na sobě závislými proměnnými (**Obr. 2**). U pacientek je přítomna také hyperaktivita, která je na tělesných parametrech týkajících se váhy silně negativně závislá. Rozdíly mezi skupinami kontrol a pacientek můžeme vidět rovněž v rámci biochemických dat, kdy se pacientky potýkají s nižšími hodnotami cholinesterázy a volných fT3 a fT4 oproti kontrolám. Hormony štítné žlázy u pacientek s AN však po multiple comparison testu nebyly signifikantní od zdravých kontrol, což je odrazem pozitivní závislosti těchto hodnot na BMI a dalších tělesných parametrech a negativní na hyperaktivitě. Odchytky mezi akutními a chronickými pacientkami mimo délky trvání nemoci, závažnosti AN a věku pozorovány nebyly (**Tabulka 7**).



Obr. 2: Korelace tělesných a biochemických parametrů. Data byla porovnána neparametrickým Spearmanovým korelačním testem, kdy Spearmanův koeficient (r) udává statistickou závislost mezi dvěma proměnnými.

U pacientek s anorexií bylo prováděno také dotazníkové šetření EDE-Q. Jedná se o dotazník, který určuje závažnost mentální anorexie na základě několika faktorů. V rámci EDE-Q šetření nebyly zaznamenány rozdíly mezi akutními a chronickými pacientkami (**Obr. 3**).



Obr. 3: Dotazníkové šetření EDE-Q u akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Na ose x jsou vyneseny jednotlivé oblasti, na které je dotazník zaměřený. Na ose y je uvedeno skóre. Skóre odpovědí je vyznačeno box and whiskers grafem s vyznačenými minimálními a maximálními hodnotami (0-6).

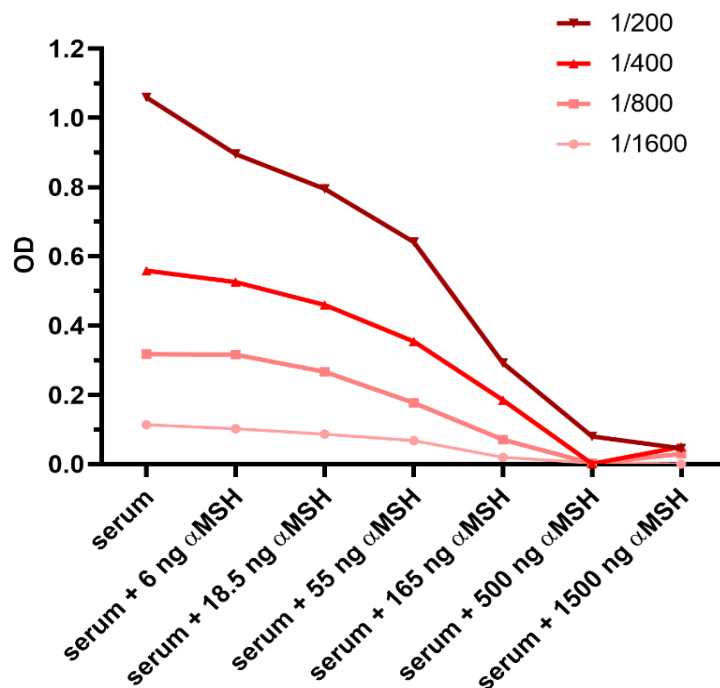
5.2 Vyšetření krevních vzorků

Pro porozumění imunitních mechanismů na rozvoj mentální anorexie byly vyšetřeny vzorky 90 sér (z toho 30 akutních pacientek, 30 pacientek s chronickým průběhem onemocnění a 30 zdravých kontrol). Séra byla získána centrifugací srážlivé krve, která byla pacientkám odebrána ráno na lačno krátce po jejich hospitalizaci na psychiatrickou kliniku. Zdravé ženy se k odběru krve dostavily taktéž ráno na lačno. Všechna patientská data byla porovnávána s daty zdravých kontrol.

5.2.1 Autoprotilátky proti neuropeptidům

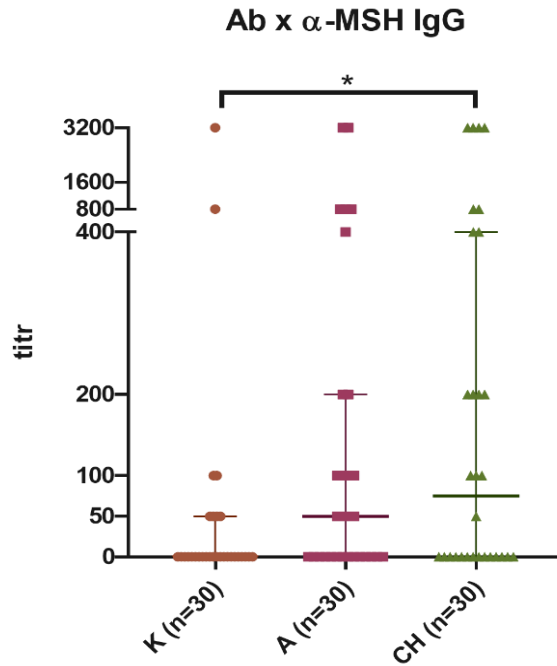
K detekci autoprotilátek proti vybraným neuropeptidům byla použita in-house ELISA. Celkem bylo vyšetřeno 7 různých peptidů regulujících příjem potravy (α -MSH, MCH, NEI, NPY, Orexin A, Orexin B, PYY).

Inhibiční ELISA slouží k ověření specifity protilátek namířených proti danému neuropeptidu. Hodnota optické density (OD) se snižuje se zvyšující se koncentrací neuropeptidu přidaného do séra, což potvrzuje specifitu reakce při vazbě autoprotilátek na peptid. Sérum o různém ředění vykazovalo úbytek OD signálu v závislosti na množství peptidu preinkubovaného se sérem. Při nejvyšších koncentracích peptidu α -MSH přidaného do séra (500 a 1500 ng) bylo dosaženo téměř úplného vysycení séra peptidem, a proto se signál OD snížil k nule (**Obr. 4**). Podobné křivky byly získány při použití dalšího peptidu NEI (data nejsou součástí diplomové práce).



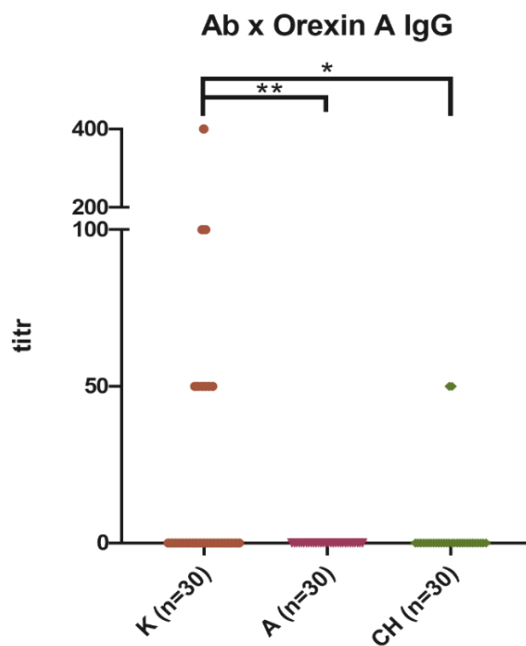
Obr. 4: Inhibiční ELISA potvrzující specifitu vazby autoprotilátek proti neuropeptidu α -MSH (alfa-melanocyty stimulující hormon). Na ose x jsou vyneseny hodnoty koncentrace peptidu přidaného do séra, na ose y jsou hodnoty OD. Barevné křivky znázorňují jednotlivá ředění séra. Analýzu provedla Mgr. Janet Ježková.

V případě anorexigenního peptidu α -MSH byly prokázány signifikantně vyšší hladiny autoprotilátek třídy G u skupiny chronických pacientek v porovnání se zdravými kontrolami (**Obr. 5**). U protilátek IgA a IgM nebyly naměřeny statisticky významné rozdíly mezi skupinami pacientek a kontrol.



Obr. 5: Hladiny titrů IgG protilátek proti α -MSH v sérech zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Výsledky byly srovnávány pomocí neparametrického Kruskal-Wallis testu a Dunnové vícenásobného testu. α -MSH = alfa-melanocyty stimulující hormon; * $p < 0,05$.

Signifikantní rozdíly hladin protilátek IgG byly stanoveny také u neuropeptidu Orexin A. Vyšší přítomnost těchto autoprotiátek byla naměřena v séru kontrol v porovnání se sérem akutních i chronických pacientek (**Obr. 6**). Nicméně, počet pozitivních sér byl velice nízký v testovaném souboru.



Obr. 6: Hladiny titrů protilátek proti Orexinu A v sérech zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Výsledky byly srovnávány pomocí neparametrického Kruskal-Wallis testu a Dunnové vícenásobného testu; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

U ostatních zkoumaných neuropeptidů nebyla naměřena signifikantní data a významné rozdíly ani v jednom z měřených izotypů, výsledky jsou proto zobrazeny jako pozitivní procentuální zastoupení autoprotilátek v sérech všech skupin (**Tabulka 8**).

Tabulka 8: Procento pozitivních vzorků

α-MSH	IgG	IgA	IgM
Kontroly	26,67 %	20,00 %	3,33 %
Akutní AN	53,33 %	23,33 %	3,33 %
Chronická AN	53,33 %	23,33 %	13 %

Orexin A	IgG	IgA	IgM
Kontroly	33,33 %	23,33 %	0,00 %
Akutní AN	0,00 %	16,67 %	13,33 %
Chronická AN	6,67 %	16,67 %	10,00 %

MCH	IgG	IgA	IgM
Kontroly	10,00 %	0,00 %	3,33 %
Akutní AN	10,00 %	0,00 %	3,33 %
Chronická AN	3,33 %	0,00 %	6,67 %

Orexin B	IgG	IgA	IgM
Kontroly	0,00 %	3,33 %	0,00 %
Akutní AN	10,00 %	6,67 %	10,00 %
Chronická AN	3,33 %	3,33 %	16,67 %

NEI	IgG	IgA	IgM
Kontroly	40,00 %	33,33 %	60,00 %
Akutní AN	33,33 %	36,67 %	43,33 %
Chronická AN	53,33 %	30,00 %	36,67 %

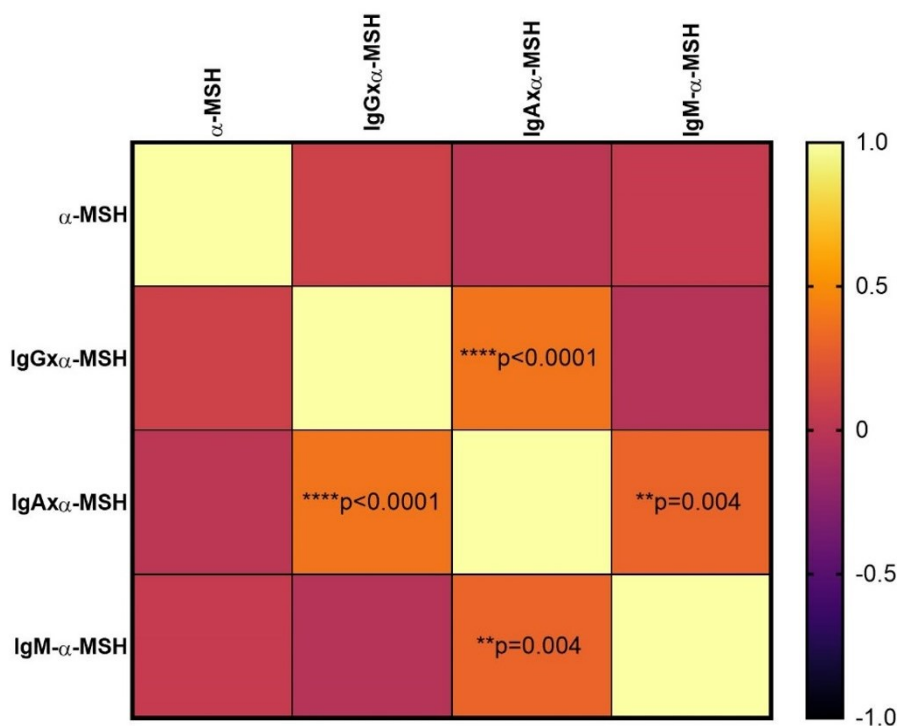
PYY	IgG	IgA	IgM
Kontroly	3,33 %	16,67 %	13,33 %
Akutní AN	16,67 %	16,67 %	13,33 %
Chronická AN	6,67 %	16,67 %	10,00 %

NPY	IgG	IgA	IgM
Kontroly	0,00 %	0,00 %	3,33 %
Akutní AN	6,67 %	0,00 %	3,33 %
Chronická AN	10,00 %	0,00 %	3,33 %

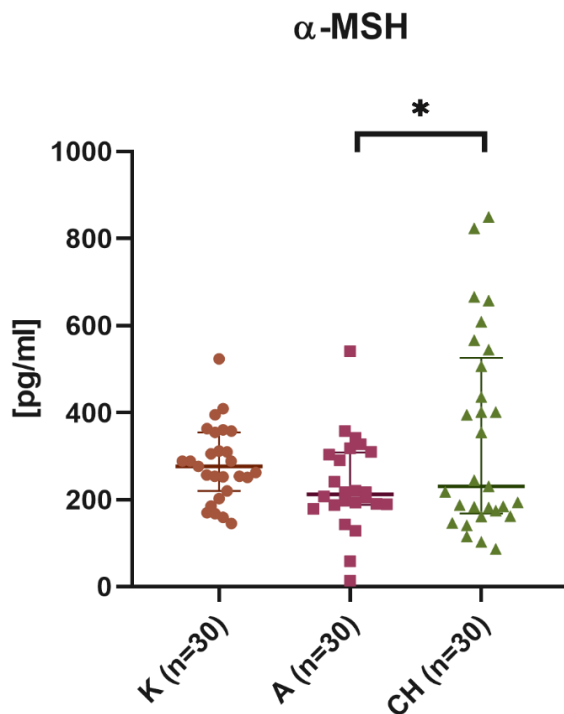
Tabulka ukazuje procentuální počty vzorků, ve kterých byly detekovány autoprotilátky (IgG, IgA, IgM) v séru proti danému neuropeptidu; α -MSH = alfa-melanocyty stimulující hormon, MCH = melanin-koncentrující hormon, NEI = neuropeptid glutamová kyselina izoleucin, NPY = neuropeptid tyrozin, PYY = neuropeptid tyrozin tyrozin

Kromě detekce protilátek proti neuropeptidům byla měřena také koncentrace neuropeptidu α -MSH. Dle naměřených hodnot byly zjištěny signifikantní rozdíly mezi akutními a chronickými pacientkami, kdy pacientky s chronickým typem onemocnění vykazují statisticky vyšší koncentrace tohoto neuropeptidu oproti akutním pacientkám, značící možnou asociaci s délkou trvání onemocnění (**Obr. 8**). Nicméně hladiny autoprotilátek proti α -MSH a hladiny α -MSH spolu nekorelují (**Obr. 7**). Byla nalezena pouze silná závislost výskytu autoprotilátek třídy IgA na výskyt autoprotilátek třídy IgG a IgM (**Obr. 7**).

Spearman r korelace α -MSH a Ab α -MSH



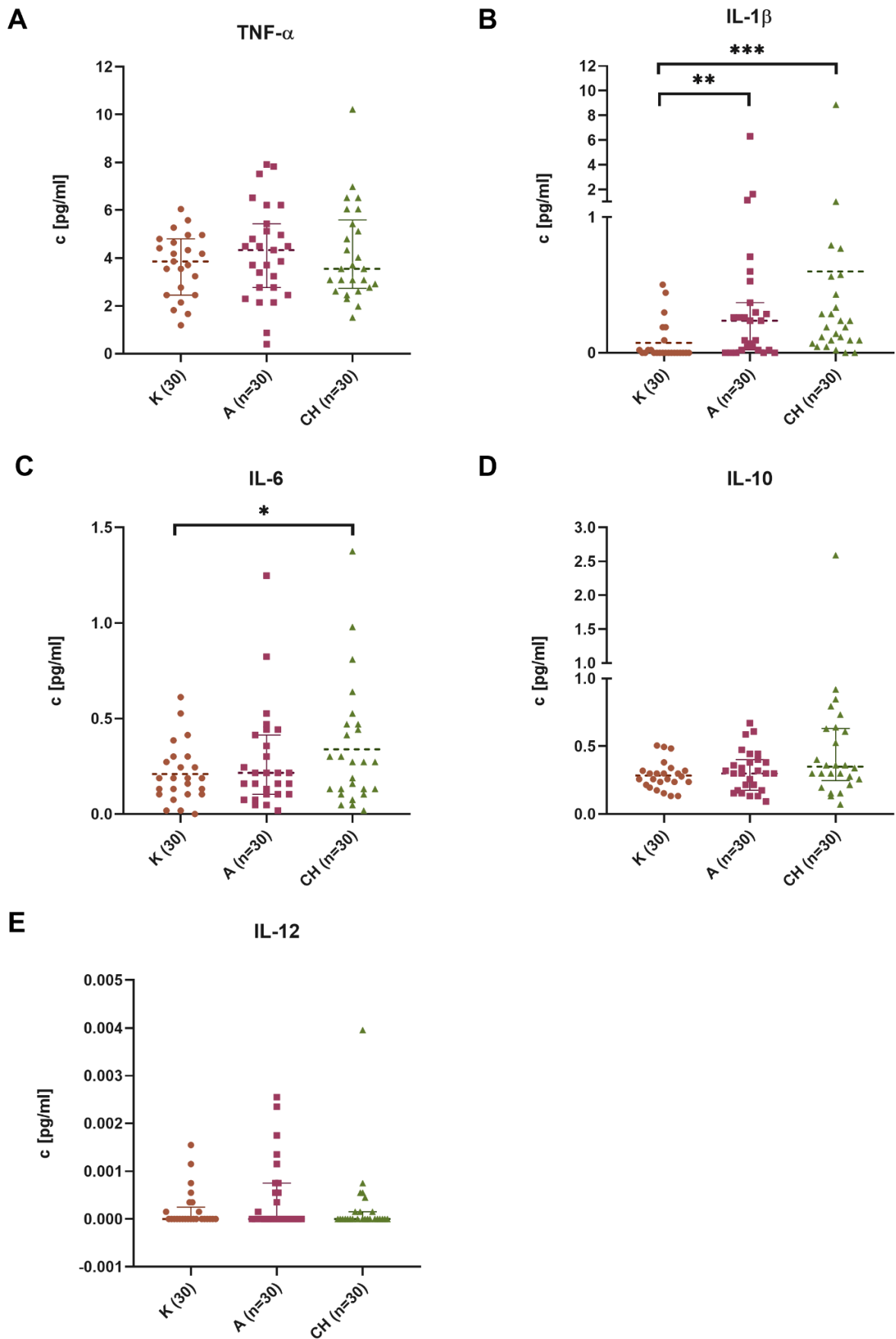
Obr. 7: Korelace mezi hladinami neuropeptidu α -MSH a titry protilátek třídy IgG, IgA a IgM proti neuropeptidu α -MSH. Korelace byla provedena Spearmanovým korelačním testem; α -MSH = alfa-melanocyty stimulující; **p <0,01; ****p <0,0001.



Obr. 8: Sérové koncentrace neuropeptidu α -MSH u kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Normalizovaná data logaritmickou transformací byla porovnána jednocestnou ANOVou s Tukey korekcí; α -MSH = alfa-melanocyty stimulující hormon; *p <0, 05.

5.2.2 Produkce cytokinů

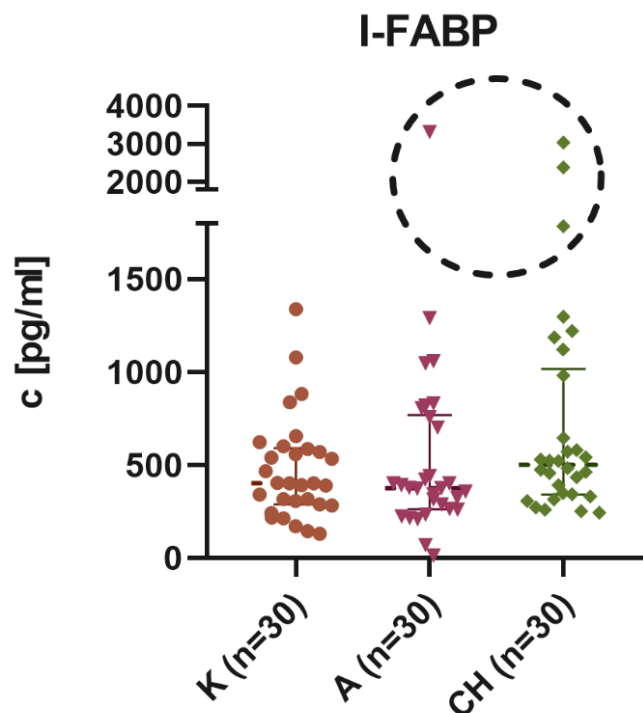
Koncentrace pěti vybraných cytokinů v sérech všech skupin byla měřena na přístroji Luminex. Statisticky významné rozdíly byly zaznamenány zejména u prozánětlivých cytokinů IL-1 β a IL-6. Akutní i chronické pacientky mají v séru signifikantně vyšší koncentrace IL-1 β oproti zdravým ženám, značící zánětlivé prostředí. Pacientky trpící chronickou mentální anorexií mají taktéž signifikantně zvýšené hladiny IL-6 v porovnání se zdravými kontrolami. V rámci TNF- α a IL-10 můžeme vidět srovnatelné hladiny těchto cytokinů mezi všemi třemi zkoumanými skupinami, nevykazující žádné signifikantní rozdíly. Hladiny IL-12 byly v některých případech na nulové hodnotě, lehce vyšší zastoupení tohoto cytokinu měly akutní pacientky oproti těm s chronickým onemocněním i v porovnání se zdravými kontrolami (**Obr. 9**).



Obr. 9: Koncentrace vybraných cytokinů v sérech zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Data byla statisticky vyhodnocena Kruskal-Wallis testem s Dunnové post-testem. A) TNF- α , B) IL-1 β , C) IL-6, D) IL-10, E) IL-12; *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001

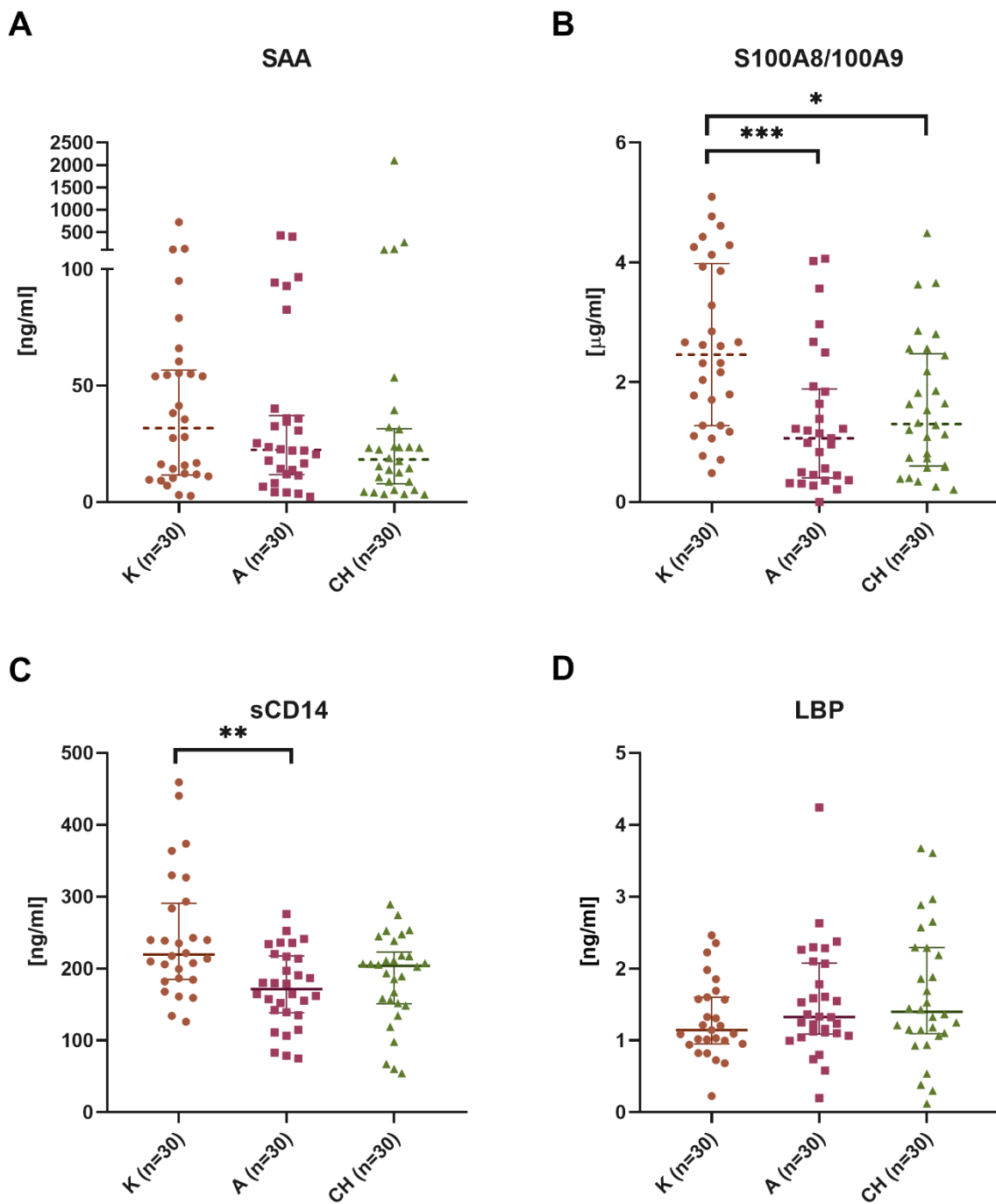
5.2.3 Stanovení markerů poškození střevní stěny, bakteriálního prostupu střevní stěnou, a zánětu

V případě sérového proteinu I-FABP, potenciálního markeru poškození střevních buněk, nebyly detekovány statisticky významné rozdíly mezi skupinami pacientek a kontrol. Koncentrace hladiny I-FABP byla vyhodnocena v sérech jako fyziologická, nicméně 3 pacientky s chronickým průběhem onemocnění a 1 akutní pacientka vykazovaly patologicky zvýšené sérové hladiny tohoto proteinu, značící možné poškození střevního epitelu (**Obr. 10**).



Obr. 10: Koncentrace proteinu I-FABP v sérech zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Pacientky se zvýšenými sérovými hladinami I-FABP jsou vyznačeny přerušovanou čarou. Normalizovaná data logaritmickou transformací byla porovnávána jednocestnou ANOVou, včetně Tukey korekce. I-FABP = protein vázající mastné kyseliny

Koncentrace sérového amyloidu ani LBP se mezi analyzovanými skupinami nelišila. Sérové hladiny kalprotektinu vykazovaly vyšší hladiny u kontrol v porovnání s akutními i chronickými pacientkami. Koncentrace sCD14 byla u akutních pacientek signifikantně nižší než u zdravých kontrol, v rámci chronických pacientek nebyly prokázány statisticky významné rozdíly proti ostatním skupinám (**Obr. 11**).



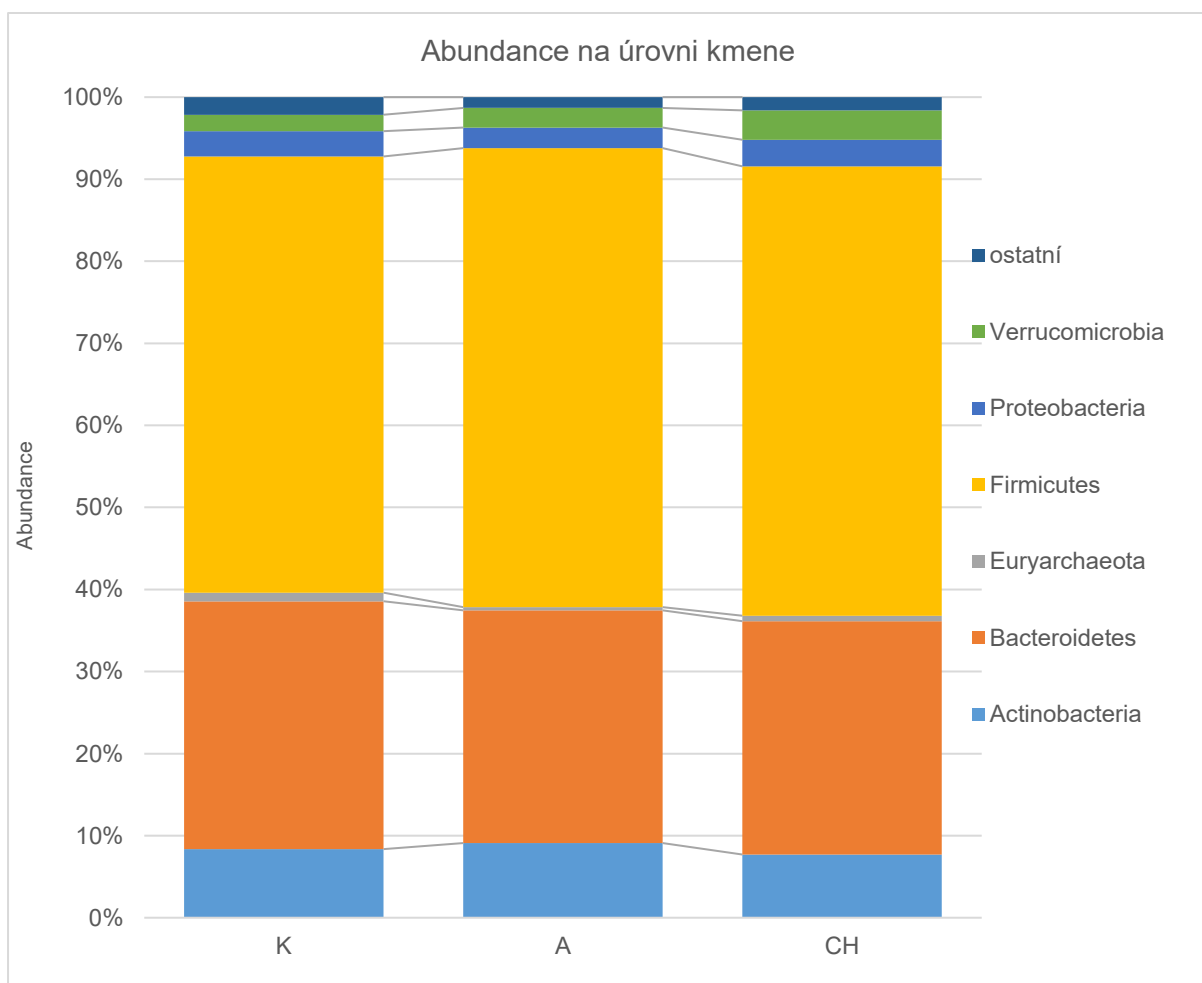
Obr. 11: Koncentrace sérových proteinů u zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Normalizovaná data logaritmickeou transformací byla porovnána jednocestnou ANOVou s Tukey korekcí. A) koncentrace SAA = sérový amyloid A, B) S100A8/S100A9 = kalprotektin, C) sCD14 = sekreční CD14, D) LBP = lipopolysacharidy vázající protein; * $p < 0,5$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

5.3 Analýza vzorků stolice

Na vzorcích stolice byla provedena analýza střevního mikrobiomu, která probíhala na několika úrovních. Zdravým ženám, akutním pacientkám i chronickým pacientkám byl osekvenován střevní mikrobiom, byla provedena analýza celkového složení střevního mikrobiomu se zaměřením na nejpočetnější druhy, a dále byly určeny indexy alfa a beta diverzity. Vybrané výsledky sekvenačních dat byly korelovány s výsledky výskytu jednotlivých autoprotilátek v séru.

5.3.1 Analýza mikrobiomu

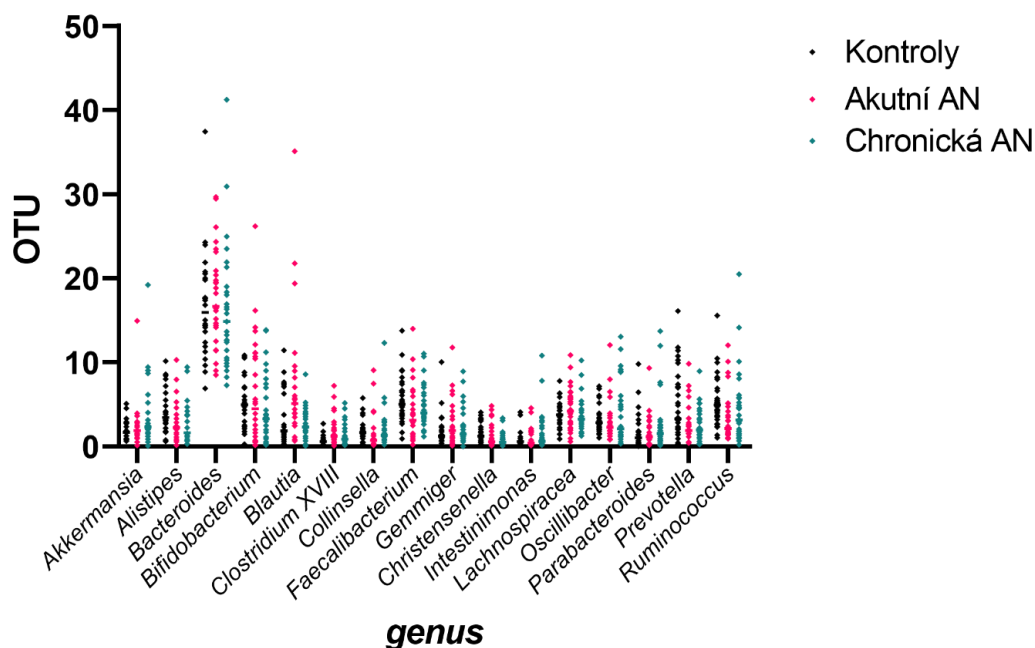
Sekvenování přineslo data na několika úrovních. V rámci následující tabulky můžeme vidět abundance konkrétních bakterií na úrovni kmene (*phylum*). K nejhojněji vyskytujícím se bakteriím patří kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* u všech třech sledovaných skupin. K dalším hojně zastoupeným patří *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* a *Euryarchaeota*. Na této taxonomické úrovni se kontroly od pacientek výrazně neodlišují (**Obr. 12**).



Obr. 12: Abundance nejčtenějších bakterií na úrovni kmene u zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek. Ostatní – kmeny mající zastoupení menší než 1 %.

Grafické znázornění zobrazuje počty operačních taxonomických jednotek (OTU) bakterií na úrovni rodu u jednotlivých patientských i kontrolních vzorků, přičemž každý bod zobrazuje jeden vzorek (**Obr. 13**). Statistická analýza viz **Tabulka 9**. Porovnávány byly pouze rody, jejichž zastoupení bylo minimálně 1 %. Statisticky významné rozdíly byly pozorovány u 16 bakteriálních rodů z 29 porovnávaných (součástí diplomové práce jsou pouze signifikantní data). Skupiny pacientek se od sebe signifikantně liší v rámci 10 bakteriálních druhů, přičemž akutní pacientky mají ve svém střevním mikrobiomu větší procentuální zastoupení rodů *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, chronické pacientky mají signifikantně více zastoupeny rody *Akkermansia*, *Collinsella*, *Faecalibacterium*, *Intestinimonas*, *Oscillibacter*, *Parabacteroides* a *Ruminococcus*. Kontrolní skupina žen se v bakteriálním zastoupení liší od obou skupin pacientek. V případě rodů *Alistipes*, *Faecalibacterium*, *Prevotella* a *Ruminococcus* vidíme vyšší procentuální zastoupení u kontrol, u rodu *Clostridium XVIII* je tomu naopak a nachází se ve větším množství u akutních i chronických pacientek oproti kontrolám. Akutní pacientky se navíc liší od kontrol také v případě rodů *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Blautia*, *Gemmiger* a *Lachnospiracea*, které jsou více zastoupeny u pacientek v porovnání s kontrolami. Pacientky trpící chronickou AN mají větší zastoupení rodů *Akkermansia*, *Intestinimonas*, *Oscillibacter* a *Parabacteroides* oproti kontrolám, rod *Christensenella* se naopak nachází více v mikrobiomu zdravých žen ve srovnání s chronickými pacientkami (**Tabulka 9**).

Počty OTU jednotlivých vzorků



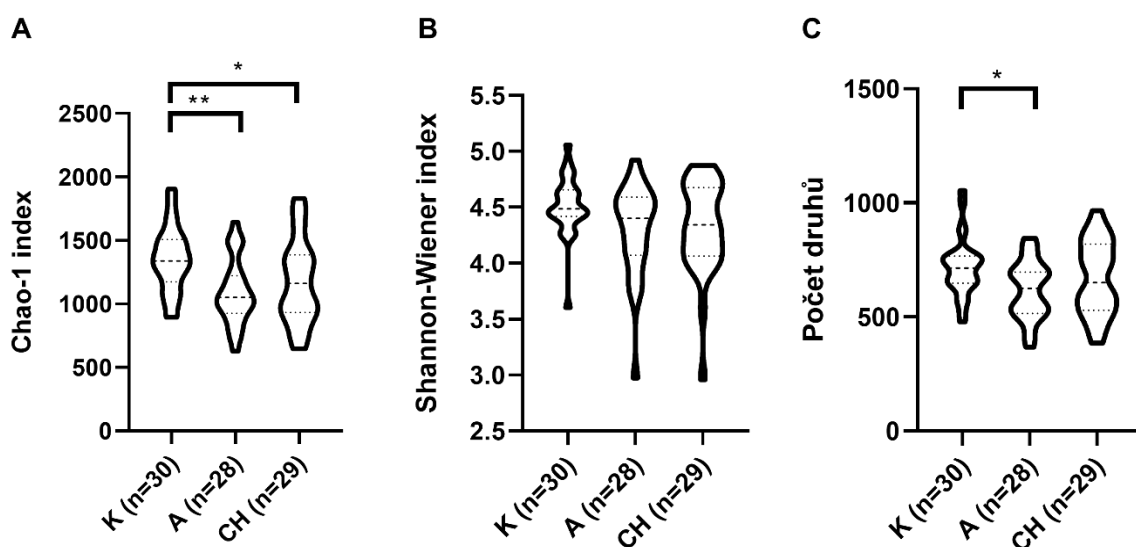
Obr. 13: Počty OTU na úrovni rodu u kontrol (n = 30), akutních pacientek (n = 30) a chronických pacientek (n = 30). *genus* = rod, OTU = operační taxonomické jednotky.

Tabulka 9: Procentuální zastoupení bakteriálních rodů v rámci sledovaných skupin

<i>genus</i>	% zastoupení			p-hodnota		
	Kontroly	Akutní AN	Chronická AN	K vs. A	K vs. CH	A vs. CH
<i>Akkermansia</i>	1,974	2,373	3,446	NS	<0,0001	0,0002
<i>Alistipes</i>	4,353	2,766	2,707	<0,0001	<0,0001	NS
<i>Bacteroides</i>	16,422	17,61	16,329	<0,0001	NS	<0,0001
<i>Bifidobacterium</i>	5,207	6,568	4,582	<0,0001	NS	<0,0001
<i>Blautia</i>	3,191	7,093	2,695	<0,0001	NS	<0,0001
<i>Clostridium XVIII</i>	0,718	1,851	1,456	<0,0001	0,0143	NS
<i>Collinsella</i>	1,9	1,526	2,188	NS	NS	0,038
<i>Faecalibacterium</i>	5,615	3,917	4,842	<0,0001	0,0094	0,0018
<i>Gemmiger</i>	1,801	2,628	2,266	0,0055	NS	NS
<i>Christensenella</i>	1,474	1,329	0,844	NS	0,0457	NS
<i>Intestinimonas</i>	0,826	0,857	1,598	NS	0,0098	0,0159
<i>Lachnospiracea</i>	3,912	4,548	3,959	0,046	NS	NS
<i>Oscillibacter</i>	3,274	3,07	3,977	NS	0,0212	0,0022
<i>Parabacteroides</i>	1,637	1,717	2,668	NS	0,0004	0,0015
<i>Prevotella</i>	4,974	2,765	2,772	<0,0001	<0,0001	NS
<i>Ruminococcus</i>	5,422	3,478	4,487	<0,0001	0,0012	0,0005

K = kontroly, A = akutní pacientky, CH = chronické pacientky, NS = nesignifikantní data, *genus* = rod.

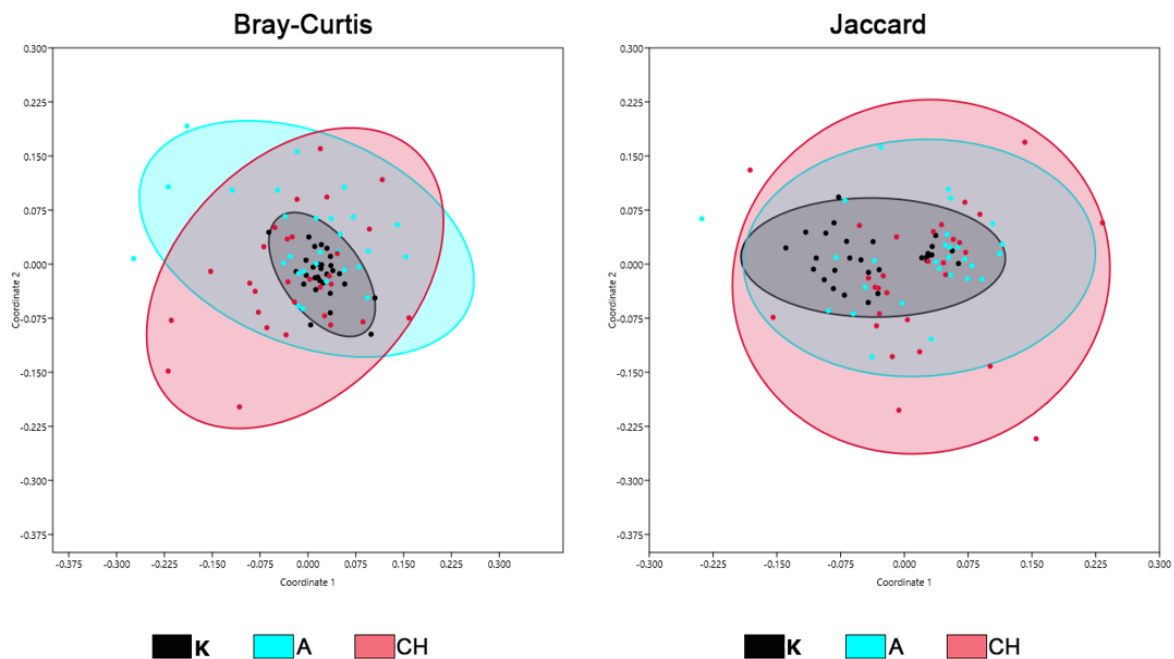
Alfa diverzita, určující druhovou rozmanitost v rámci jednotlivých vzorků, byla statisticky vyhodnocena na několika úrovních. Byl stanoven Chao-1 index, který určuje celkovou druhovou bohatost. Dle tohoto parametru mají zdravé ženy signifikantně vyšší druhovou bohatost svého střevního mikrobiomu v porovnání s akutními i chronickými pacientkami. Shannon-Wiener index určující druhovou diverzitu nepoukazuje na statisticky významné rozdíly mezi zkoumanými skupinami pacientek a kontrol. Celkový počet druhů byl signifikantně vyšší u zdravých kontrol oproti akutním pacientkám, v porovnání s chronickými pacientkami nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl (**Obr. 14**).



Obr. 14: Alfa diverzita střevního mikrobiomu zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Data byla porovnána jednocestnou ANOVou a Tukeyho korekcí. Chao-1 index stanovuje celkovou druhovou bohatost (A), Shannon-Wiener index ustanovuje druhovou diverzitu (B), celkový počet druhů (C); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Ze sekvenáčnických dat byl dále určen index beta diverzity včetně grafického znázornění (**Obr. 15**). Beta diverzita porovnává druhovou rozmanitost v rámci celých skupin, tj. zdravých kontrol, akutních pacientek a chronických pacientek. Beta diverzita byla určena na základě dvou matic, Bray-Curtisovy a Jaccardovy. Bray-Curtis test porovnává skupiny na základě relativní abundance, tj. hojnosti bakteriálních druhů. Jaccardova matice porovnává skupiny prevalence, tj. přítomnosti či nepřítomnosti bakteriálních druhů. Výsledky obou testů ukazují, že intraindividuální bakteriom skupiny zdravých žen si je daleko podobnější, než jak je tomu u akutních i chronických pacientek. Statistické vyjádření těchto dvou matic ukazuje na výrazné signifikantní rozdíly mezi kontrolami a oběma skupinami pacientek (**Tabulka 10**).

Akutní a chronické pacientky se pak od sebe vzájemně odlišují pouze v taxonomickém složení na základě výskytu druhů, jak prokázala analýza Permanova s Bray-Curtisovou maticí (**Tabulka 10**). Rozdíly v diverzitě mikrobiomu mezi akutními a chronickými pacientkami nebyly prokázány.



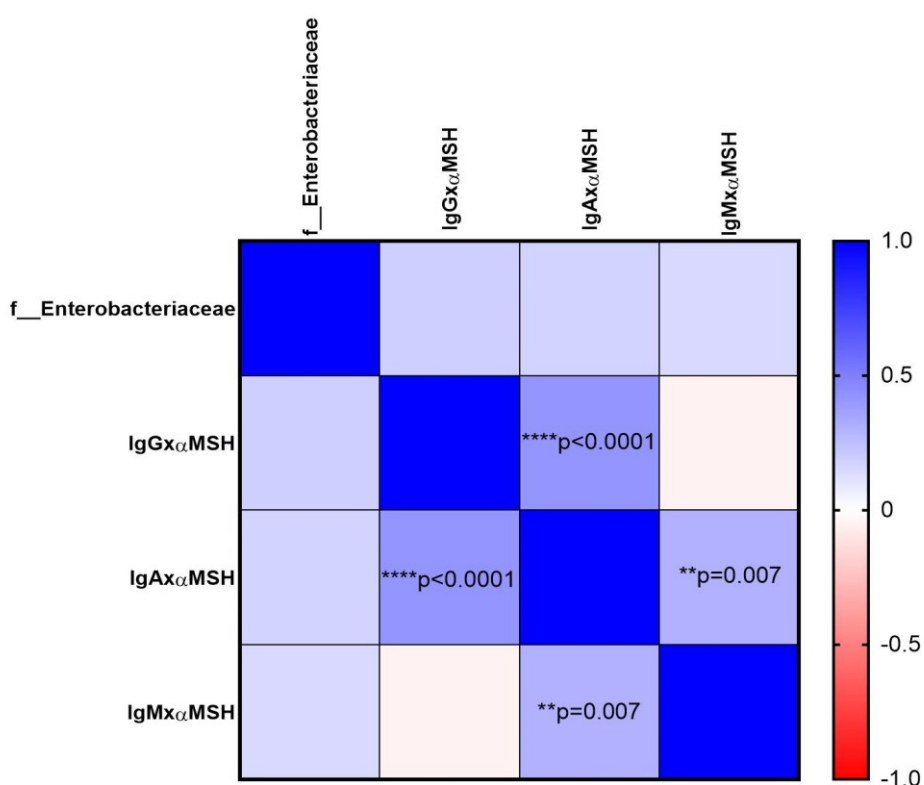
Obr. 15: Grafické znázornění beta diverzity střevního mikrobiomu zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Bray-Curtis matice ustanovuje beta diverzitu na základě relativní abundance druhů, Jaccardova matice porovnává skupiny na základě prevalence. Statistická analýza byla provedena neparametrickým vícerozměrným škálováním, včetně testu PERMANOVA a PERMDISP.

Tabulka 10: Beta diverzita střevního mikrobiomu zdravých kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH)

	df	Bray-Curtis		Jaccard	
		F	p	F	p
PERMANOVA					
K vs. A	2;83	2.594	0.0001	1.67	0.0009
K vs. CH	2;83	2.572	0.0001	1.364	0.0099
A vs. CH	2;83	1.383	0.0401	1.175	0.0957
PERMDISP					
K vs. A	2;83	5.200	0.0001	4.842	0.1928
K vs. CH	2;83	4.364	<0.0001	9.017	0.009
A vs. CH	2;83	1.191	0.9627	1.862	0.424

Statistická analýza byla provedena neparametrickým vícerozměrným škálováním, včetně testu PERMANOVA a PERMDISP. Signifikantní data jsou zvýrazněna tučně. Df – rozptyl mezi hodnotami, F = statistická F hodnota

Kaseinolytická proteáza B produkovaná především čeledí *Enterobacteriaceae* je konformační mimetikum neuropeptidu α -MSH, a může tak indukovat produkci protilátek zkříženě reagujících s lidským neuropeptidem α -MSH. Spearmanův test korelace ukazuje pozitivní vztah závislosti mezi zastoupením bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a výskytem autoproti látek tříd IgG, IgA a IgM namířených proti neuropeptidu α -MSH (**Obr. 16**).

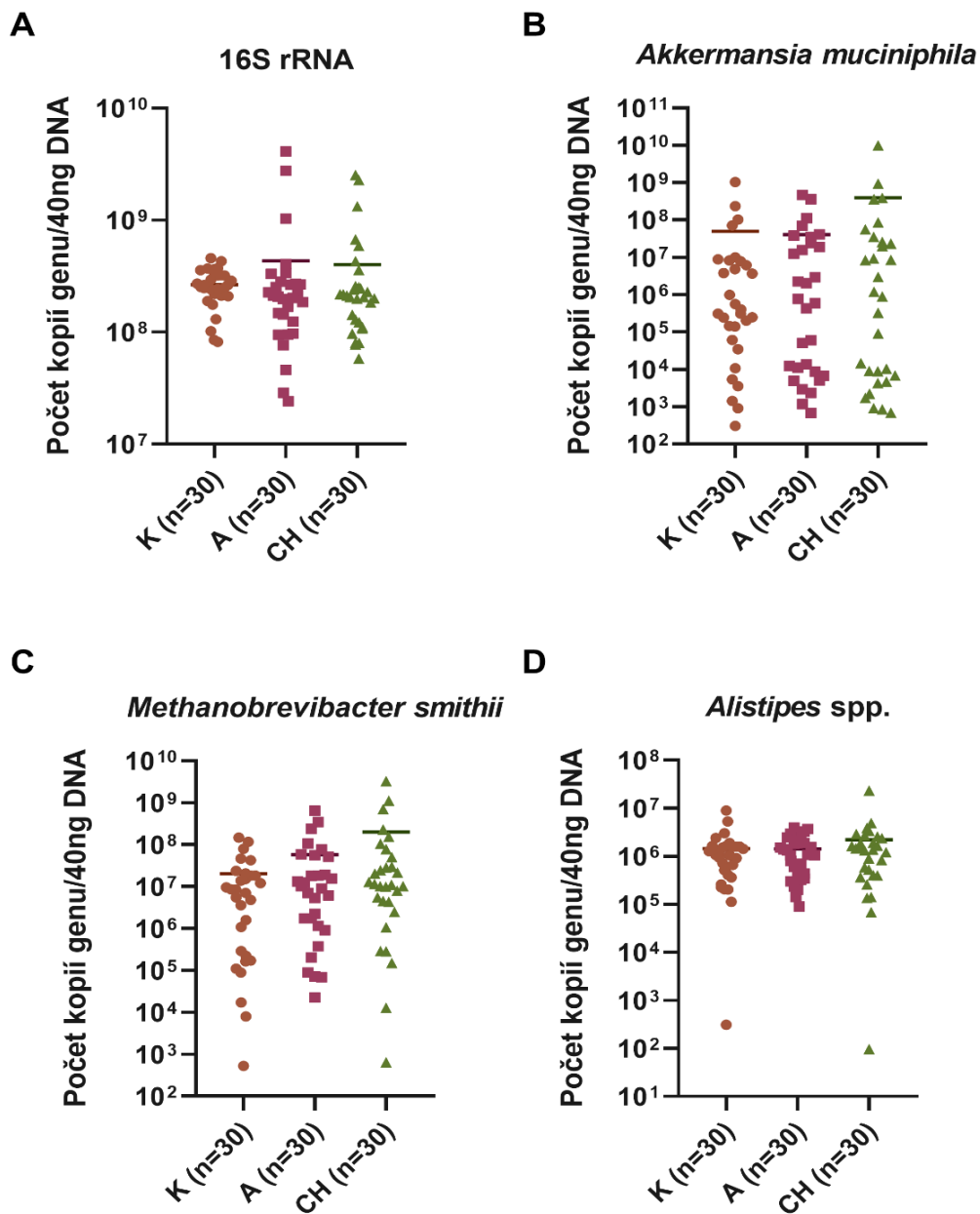


Obr. 16: Korelace zastoupení čeledi *Enterobacteriaceae* a výskytu autoproti látek třídy IgG, IgA, IgM proti α -MSH. K analýze byl využit Spearmanův korelační test. Čím více se Spearmanův koeficient přibližuje hodnotě 1 (v tomto případě čím více jde barvení do modra, tím větší je závislost mezi dvěma proměnnými). α -MSH = alfa-melanocyty stimulující hormon; **p <0,01; ****p <0,0001.

5.3.2 Počty bakteriálních druhů

Výsledky qPCR ukazují kvantitativní počty konkrétních bakteriálních druhů (*Akkermansia muciniphila*, *Methanobrevibacter smithii*, *Alistipes sp.*) a mimo jiné také celkový počet bakterií detekovaných jako 16S rRNA počet kopií. Celkový počet bakterií je nejnižší u zdravých kontrol v rámci všech tří studovaných skupin. Vzorky pacientek se v porovnání s kontrolami v bakteriálním zastoupení signifikantně neodlišují, nicméně u *Methanobrevibacter smithii* můžeme pozorovat navyšující se trend této bakterie korelující s délkou onemocnění. Podobně vyšší zastoupení je také u bakterie *Akkermansia muciniphila*, která se více objevuje u

chronických pacientek v porovnání s akutními pacientkami a kontrolami, čemuž odpovídají i data z HTS sekvenování (Tabulka 9). V rámci počtu kopií *Alistipes* spp. nebyly objeveny významné rozdíly mezi sledovanými skupinami (Obr. 17).



Obr. 17: Celkový počet bakterií a kvantitativní zastoupení konkrétních bakteriálních druhů ve vzorcích stolice u kontrol (K), akutních pacientek (A) a chronických pacientek (CH). Statistická analýza byla provedena neparametrickým Kruskal-Wallis testem a Dunnové post testem. Výsledky počtu kopií u konkrétních druhů (B, C, D) jsou uvedeny jako logaritmické. Počet kopií je uveden při koncentraci vzorku 40 ng/μl. Počet kopií 16S rRNA A) všech bakteriálních druhů B) *Akkermansia muciniphila*, C) *Methanobrevibacter smithii*, D) *Alistipes* spp.

5.4 Myší model

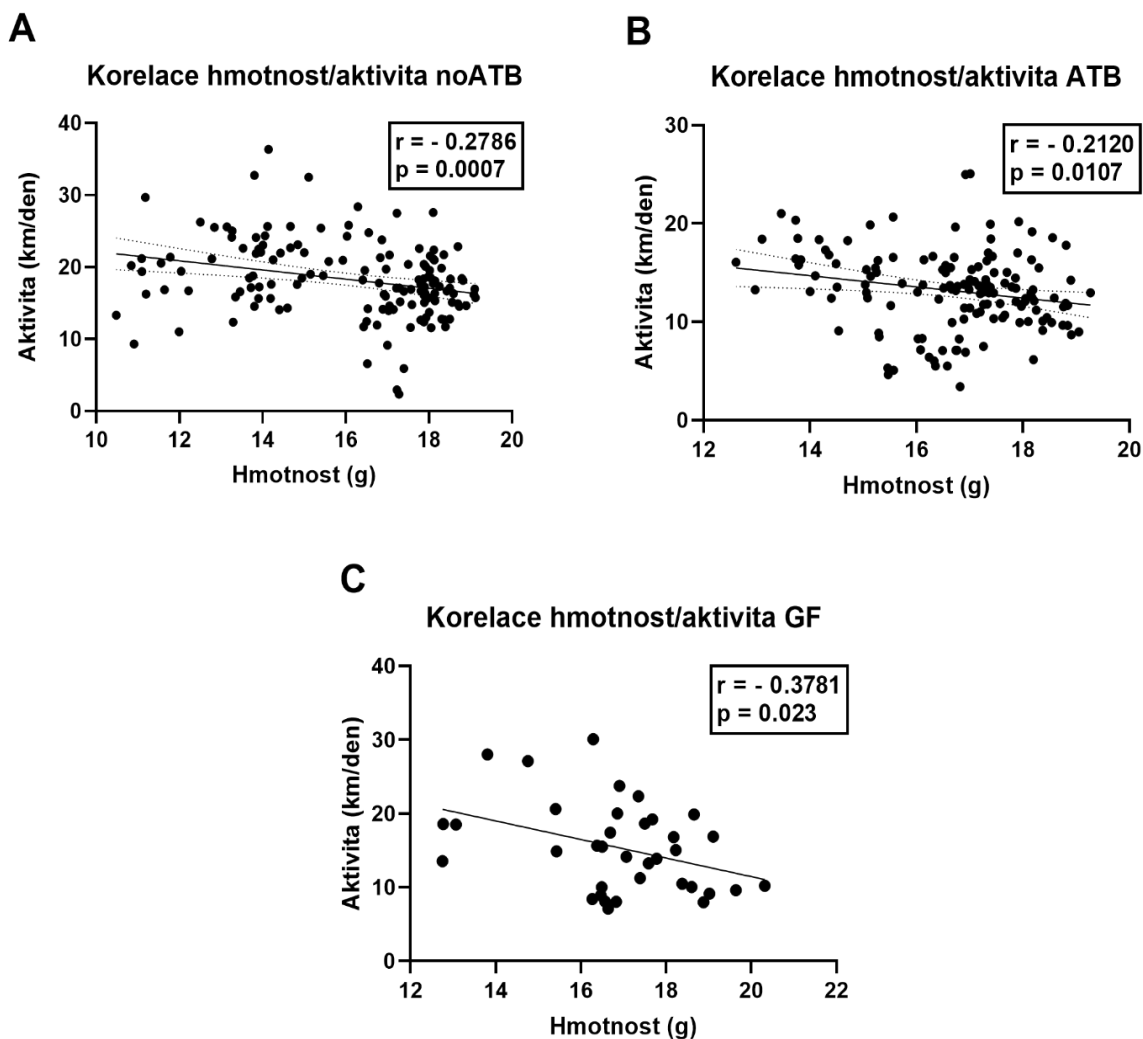
Pro zavedení myšího modelu anorexie byly zvoleny mladé myší samice kmene BALB/c (stáří 6–8 týdnů), u kterých byl indukován tzv. ABA (activity-based anorexia) model. Tento model byl indukován u myší s odlišným střevním mikrobiomem – konvenčních myší s „normálním“ mikrobiomem, u myší, kterým byla podávána antibiotika a u bezmikrobních myší.

Prvním typem byly tzv. noATB myši, kdy se jednalo o 37 mladých samic. Druhým typem byly mladé samice kmene BALB/c, kterým se podávala směs antibiotik. Tento typ se označoval jako ATB myši a do experimentu jich bylo zahrnuto 37. Poslední byly bezmikrobní (GF; germ free) mladé myší samice. Experimenty byly prováděny celkem na 24 bezmikrobních myších.

5.4.1 Aktivita myšího ABA modelu

V rámci experimentů byla zaznamenávána aktivita myší, tj. počet uběhnutých kilometrů na běhacím kolečku každé myši zvlášť. Výsledky shrnují, že aktivita myší závisí na přísunu potravy i na střevním mikrobiomu myší.

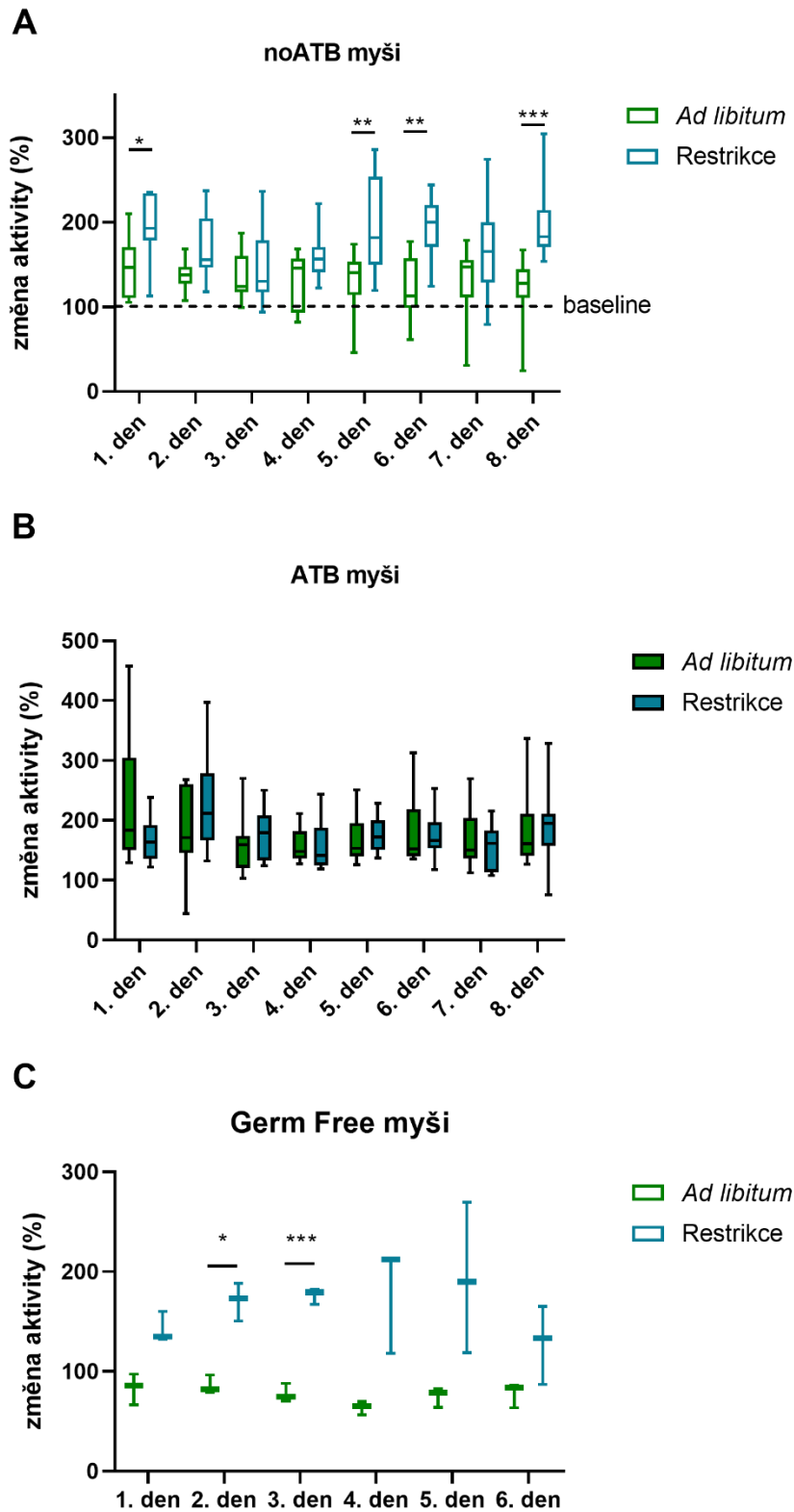
Výsledky poukázaly na negativní korelaci mezi váhou myši a její aktivitou (počtem uběhnutých km za den) u všech typů různě osídlených myší. Pokud myš měla restrikcii přísunu potravy, hubla a její hmotnost byla nízká, vykazovala výrazně vyšší aktivitu než myši, které měly jídlo *ad libitum*, nehubly a vážily více. Nejsilnější korelace byla objevena u noATB myší, nejslabší naopak u bezmikrobních myší (**Obr. 18**).



Obr. 18: Korelace myší hmotnosti a aktivity u různě mikrobiálně osídlených myší. Data byla korelována Pearsonovým korelačním testem, vizualizace byla provedena lineární regresí. A) noATB myši (n = 37), B) ATB myši (n = 37), C) GF = germ-free/bezmikrobní myši (n = 24).

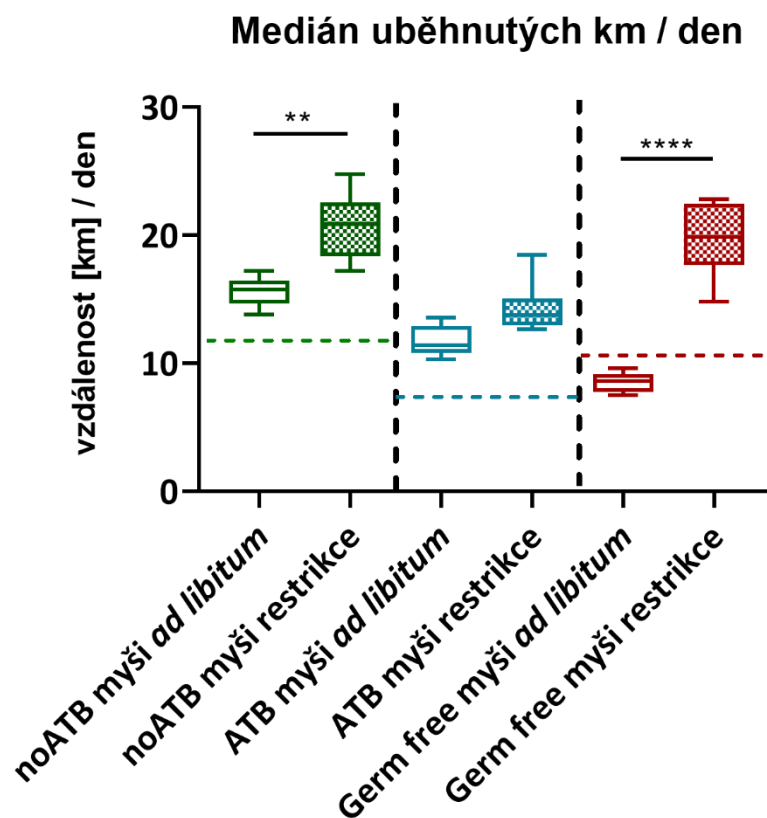
V experimentu byl u každé myši v baseline a restriční fázi zaznamenán počet uběhnutých km za den. Změna v počtu uběhnutých km v restričním období oproti baseline fázi byla vyjádřena jako procentuální změna aktivity každé myši. Změna této aktivity byla určena u všech myší, tj. u myší, které měly restrikcii v přísunu potravy i u těch, které dostávaly potravu *ad libitum*.

Tato změna byla nejvíce výrazná u noATB a bezmikrobních myší. Statisticky významné změny aktivit naopak nebyly objeveny u myší, které měly změněnou střevní mikrobiotu v důsledku podání antibiotik (**Obr. 19**).



Obr. 19: Změna aktivity v restričním období oproti baseline fázi u různě mikrobiálně osídlených myších typů. Data byla statisticky vyhodnocena dvoucestnou ANOVou včetně Sidakova posttestu. A) noATB myši (n = 37), B) ATB myši (n = 37), C) GF = germ-free myši/bezmikrobní (n = 24); *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001

Pro větší přehlednost byl vyhodnocen také medián vzdálenosti uběhnutý v rámci každé skupiny myši za den. Rozdíly v naběhané vzdálenosti jsou mezi skupinami kontrolních myši a myši v restrikcí patrné u všech třech různě mikrobiálně osídlených typů. Největší rozdíl v uběhnuté vzdálenosti mezi myši s potravou *ad libitum* a těmi v restrikcí byla zaznamenána u bezmikrobních myši. Významný rozdíl byl objeven také u konvenčních noATB myši. U ATB myši byla naběhaná vzdálenost také vyšší u myši s restrikcí potravy, ale tato změna nebyla statisticky významná (Obr. 20).



Obr. 20: Medián uběhnutých km/den v dané skupině. Data byla vyhodnocena jednocestnou ANOVou včetně Tukey korekce. Germ free = bezmikrobní myši; ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$

5.4.2 Exprese genů v myším hypotalamu

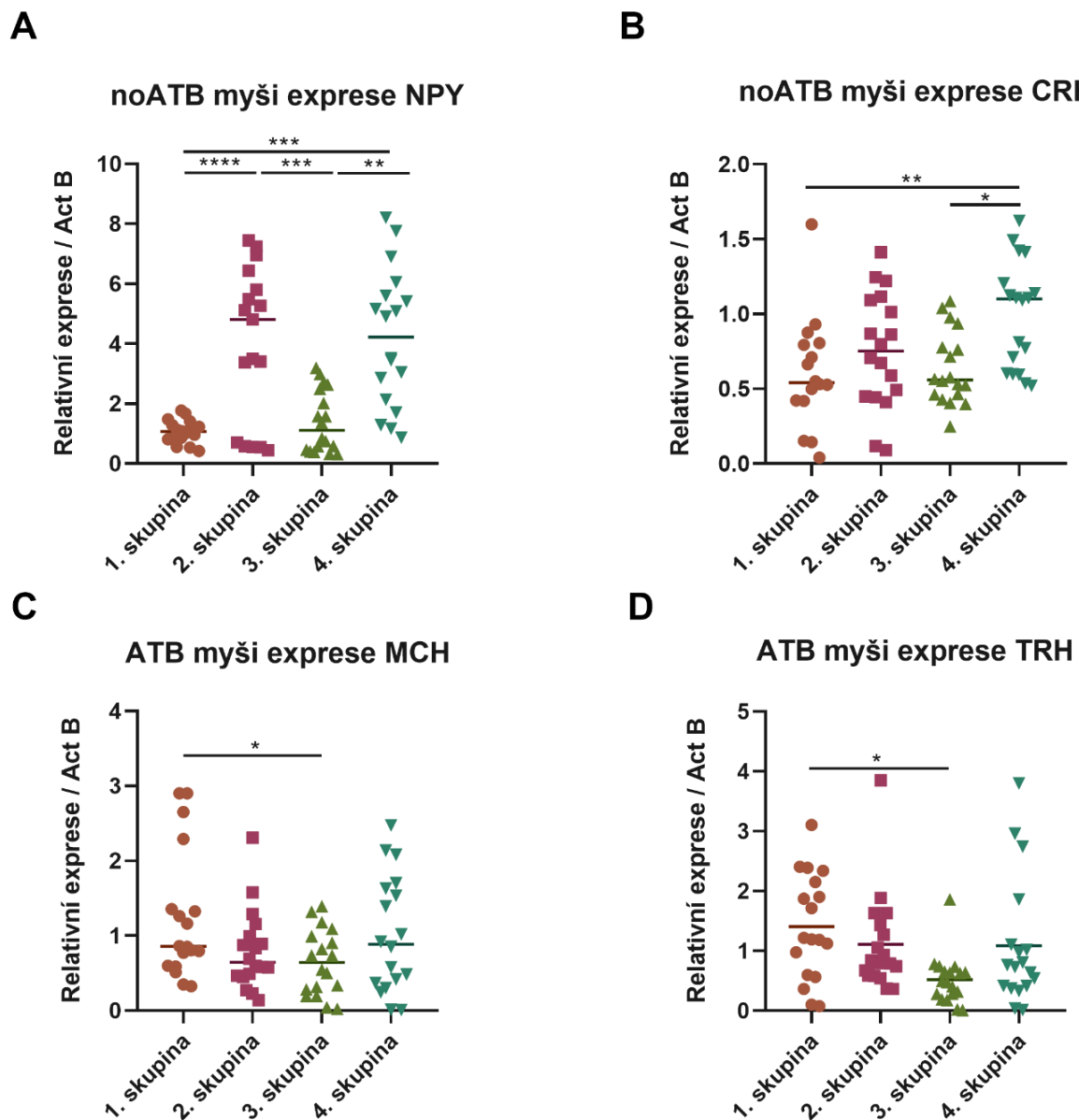
Pro bližší náhled do problematiky mentální anorexie byly využity vzorky hypotalamu myši s odlišným střevním mikrobiomem (noATB myši, ATB myši, bezmikrobní myši). V hypotalamu byla metodou RT-qPCR sledována exprese genů zapojených do regulace příjmu potravy (*CART*, *CRH*, *MCH*, *OREX*, *NPY*, *TRH*). *CRH*, *MCH*, *NPY*, *OREX* zvyšují příjem potravy, *CART* a *TRH* snižují příjem potravy. Exprese vybraných genů byla normalizována vůči expresi housekeeping genů (*Hprt*, *Act B*). V experimentu byly myši rozděleny do 4 skupin v závislosti na přítomnosti běhacího kolečka a restrikce v přísunu potravy (**Tabulka 11**).

Tabulka 11: Rozdělení myši do skupin dle přítomnosti běhacího kolečka a restrikce v přísunu potravy

	běhací kolečko	potravní restrikce
1. skupina	NE	NE
2. skupina	NE	ANO
3. skupina	ANO	NE
4. skupina	ANO	ANO

Výsledky kvantitativní RT-PCR přinesly rozdíly v expresi několika genů (součástí diplomové práce jsou zobrazena pouze signifikantní data). Nejvýraznější rozdíl v rámci všech testovaných genů byl zaznamenán v expresi *NPY* u všech 4 myších skupin. Nejnížší exprese genu *NPY* byla v tomto případě zaznamenána u 1. a 3. skupiny, tedy u skupin myši, které neměly restrikci potravy. Vysoké hladiny mRNA pro tento gen byly naopak naměřeny u skupin, které měly omezený přísun potravy. V případě exprese genu *CRH* byly odhaleny signifikantně významné rozdíly zejména mezi 1. (bez kolečka, bez restrikce) a 4. (s kolečkem, v restrikci) zkoumanou skupinou myši, kdy kontrolní 1. skupina vykazovala nižší expresi genu *CRH*. Zároveň byly objeveny signifikantní rozdíly mezi oběma restrikčními skupinami (s kolečkem a bez kolečka) kdy myši, které měly navíc k dispozici kolečko, vykazovaly vyšší expresi genu *CRH* oproti těm, které ho neměly. U ostatních testovaných genů v rámci noATB myšního typu nebyly objeveny signifikantně odlišné rozdíly. Myši se sníženou bakteriální diverzitou (ATB myši) vykazovaly

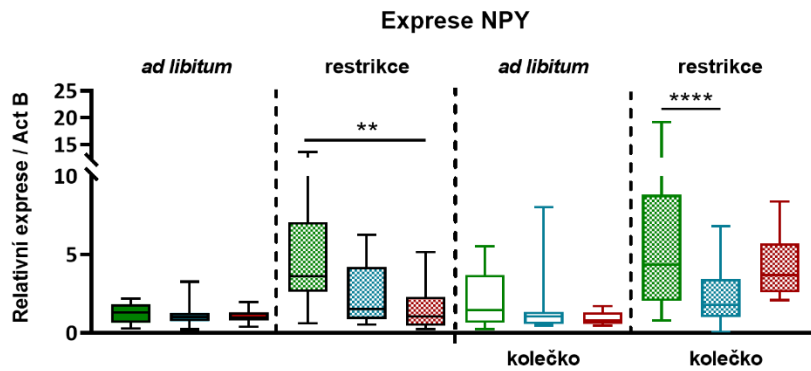
rozdílnou expresi *MCH* a *TRH* zejména mezi 1. skupinou (bez kolečka, bez restrikce) a 3. skupinou (s kolečkem, bez restrikce), kdy exprese obou genů byla vyšší u 1. kontrolní skupiny (Obr. 21).



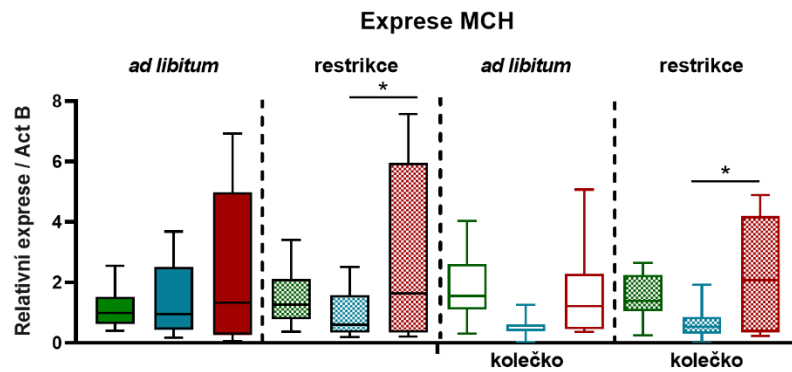
Obr. 21: Hladiny mRNA pro *NPY*, *CRH* u noATB myšního typu a pro *MCH*, *TRH* u ATB myšního typu. Statistická analýza byla provedena jednocestnou ANOVou včetně Tukey korekce. Expresie genů byla normalizována expresí housekeeping genu *Act B* (beta-aktin). Rozdělení myších skupin viz **Tabulka 11**. A) Expresie *NPY*, B) exprese *CRH*, C) exprese *MCH*, D) exprese *TRH*. *NPY* = neuropeptid tyrozin, *CRH* = kortikoliberin, *MCH* = melanin-koncentrující hormon, *TRH* = tyreotropin-uvolňující hormon, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Expres vytipovaných hypotalamických genů byla sledována také u bezmikrobních myší, v tomto případě ale statisticky významné rozdíly mezi skupinami myší zjištěny nebyly. Pokud mezi sebou byly porovnány skupiny noATB, ATB a bezmikrobních (GF = ferm free) myší, byly objeveny rozdíly v případě exprese *NPY*, *MCH*, *Orexinu* a *CRH*, poukazující na závislost na typu bakteriálního osídlení myší. Expres *NPY* se signifikatně lišila v rámci 2. skupiny mezi noATB a GF, a v rámci 4. skupiny u noATB a ATB myší. V obou případech byla zaznamenána vyšší expres v rámci noATB myší. Expres *MCH* byla signifikatně zvýšena u bezmikrobních myší, které byly v restrikci oproti ATB myším, které taktéž měly omezený přísun potravy. Expres *Orexinu* byla výrazně vyšší u kontrolní skupiny myší s běhacím kolečkem oproti ATB i bezmikrobním myším, a to v případě restrikce i potravy *ad libitum*. Relativní expres genu *CRH* byla nižší u ATB myší s běhacím kolečkem oproti kontrolním myším v případě potravy *ad libitum*, a zároveň byla také nižší v porovnání s bezmikrobními myšmi, a to v případě potravy *ad libitum* i restrikce (**Obr. 22**).

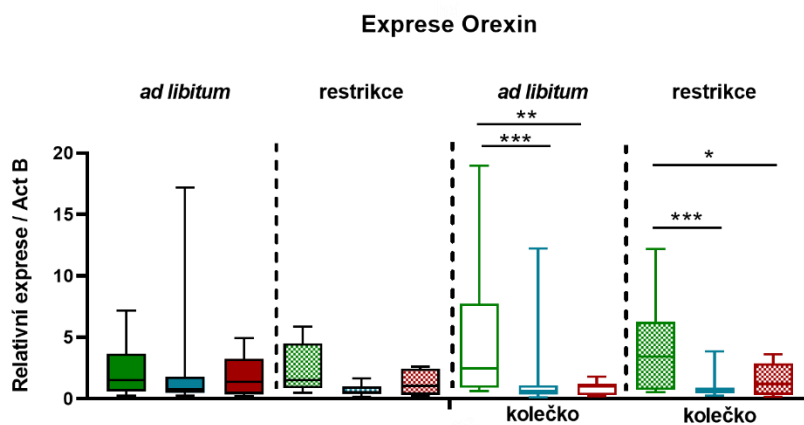
A



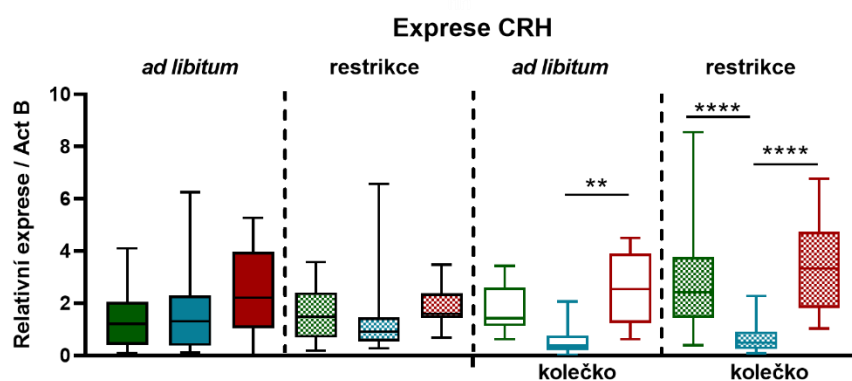
B



C



D



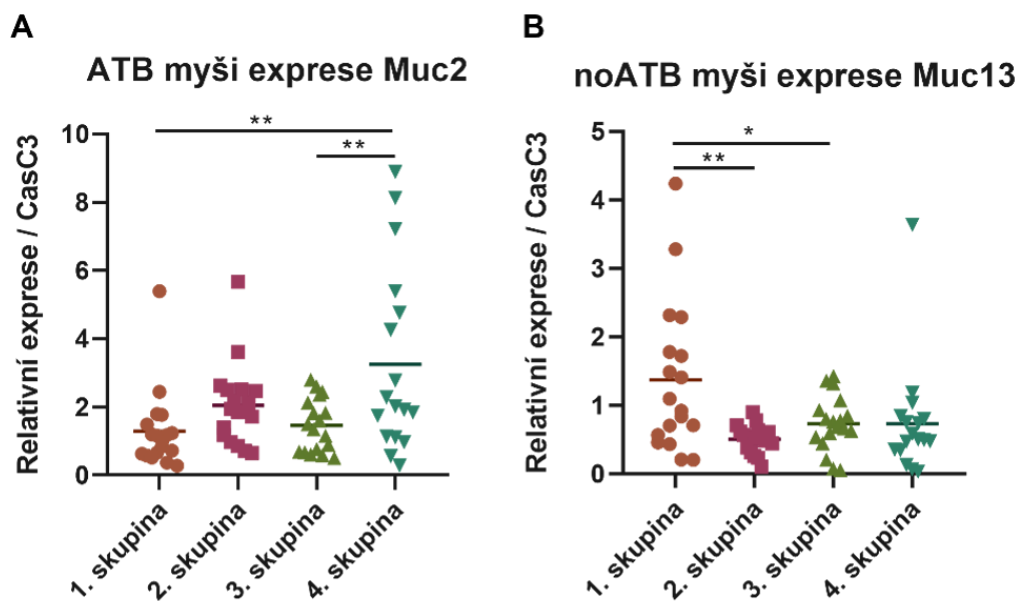
Legenda:



Obr. 22: Porovnání relativní exprese genů *NPY* (A), *MCH* (B), *Orexin* (C), *CRH* (D) mezi různě bakteriálně osídlenými myšimi typy. Expresa byla normalizována vůči genu *Act B* (beta-aktin). Data byla vyhodnocena jednocestnou ANOVou včetně Tukey korekce. *NPY* = neuropeptid tyrozin, *MCH* = melanin-koncentrující hormon, *CRH* = kortikoliberin, GF = germ-free/bezmikrobní, * $p < 0,5$, ** $p < 0,1$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

5.4.3 Stanovení hladin mRNA genů v myším *colon descendens*

V biopsii z *colon descendens* byla pozorována hladina mRNA důležitých z hlediska bariérové funkce střeva (*OCCL*, *ZO*, *Muc2*, *Muc13*). Expresie zmíněných genů byla normalizována expresí houskeeping genu pro tuto oblast (*CasC3*). Skupiny myší byly stejné jako v případě vzorků hypotalamu (**Tabulka 11**). Experimenty zaměřené na genovou expresi v rámci *colon descendens* poukázaly na rozdílnou expresi mucinů. V případě exprese *Muc2* byla zaznamenána signifikantně vyšší exprese u 4. skupiny myší (s kolečkem, na restrikcii) vůči 1. a 3. skupině, tedy těm, které potravní restrikcii neměly. Expresie *Muc13* byla zvýšená u noATB myší v 1. kontrolní skupině v porovnání s 2. a 3. skupinou myší (**Obr. 23**). Hladiny mRNA genů *OCCL* a *ZO* nevykazovaly mezi skupinami myší signifikantní rozdíly (výsledky nejsou součástí diplomové práce).



Obr. 23: Hladiny mRNA pro *Muc2* a *Muc13* normalizované expresí genu *CasC3*. Statistická analýza byla provedena jednocestnou ANOVou včetně Tukey korekce. Rozdělení myších skupin zobrazuje **Tabulka 11**. A) Expresie *Muc2* u ATB myší, B) Expresie *Muc13* u noATB myší, *Muc2* = mucin 2, *Muc13* = mucin 13, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

6 Diskuse

Poruchy příjmu potravy, v tomto případě mentální anorexie, je závažné psychiatrické onemocnění, které se během posledních desetiletí objevuje v populaci stále častěji. Jedná se o onemocnění s největší mírou úmrtnosti v rámci všech psychiatrických chorob a vzhledem k nízkému věku výskytu představuje závažný problém. Ačkoli se stále neví příčina vzniku tohoto onemocnění, recentní výzkumy se mimo psychiatrické faktory stále více zaměřují také na efekt střevního mikrobiomu a vliv imunopatologických mechanismů (129). Poruchy na úrovni střevního mikrobiomu byly popsány u řady chorob, včetně depresí a úzkostných stavů, které v rámci mentální anorexie představují vážné psychiatrické komorbidity, i proto zde existuje předpoklad, že pacientky s mentální anorexií trpí dysbiózou a potenciální role střevního mikrobiomu v patogenezi tohoto onemocnění je proto aktuálním vědeckým zájmem (97).

Za posledních pět let se na vědeckém poli objevilo několik studií popisujících složení střevního mikrobiomu u pacientek s mentální anorexií, a toto diplomová práce navazuje na jednu z nich. V rámci studie Procházková *et al.* z roku 2021 byla provedena analýza střevního mikrobiomu u 59 pacientek s mentální anorexií na začátku jejich hospitalizace na psychiatrické klinice, kde probíhala léčba, a tato data byla porovnána se stavem pacientek po ukončení léčby a se zdravými kontrolami. Výsledky ukázaly, že pacientky se při přijetí na kliniku od zdravých žen výrazně lišily v bakteriální zastoupením ve střevě. Ve zvýšené míře se u pacientek v porovnání s kontrolami vyskytovaly především bakterie *Alistipes*, *Clostridiales*, *Christensenellaceae* a *Ruminococcaceae*, zatímco nižší počty byly zaznamenány u rodů *Bacteriodes*, *Blautia*, *Faecalibacterium*, *Agathobacter* a *Lachnospira*. Zajímavým poznatkem bylo, že u pacientek se po jejich léčbě signifikantně změnilo pouze u jediného rodu, a to při zvýšení počtu bakterií *Megapshaera*, zatímco k signifikantnímu snížení abundance jakéhokoli jiného rodu během hospitalizace nedošlo (121). Ačkoli vědci doposud nepřišli s jasně definovaným zdravě vypadajícím mikrobiomem, můžeme rozlišit prospěšné a patogenní bakterie, a tento fakt by mohl napovědět, že pacientky se mohou potýkat s bakteriomem, který může být pro rozvoj mentální anorexie rizikový ještě dříve, než samotným onemocněním trpí. Jiná studie pocházející z roku 2022 objevila u pacientek s AN (n = 30) obdobné bakteriální zastoupení. Pacientky v této studii měly vedle zdravých kontrol nižší zastoupení bakterií rodu *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Dorea*, *Agathobacter* a *Fusicatenibacter*, zatímco ve

vyšším množství se v jejich střevním mikrobiomu nacházely rody *Blautia*, *Bacteroides*, *Collinsella*, *Ruminococcus*, *Streptococcus* a *Escherichia-Shigella* (130). Výsledky sekvenování v rámci diplomové práce odhalily obdobná data. Ve shodě s dalšími studii měly zdravé ženy vyšší zastoupení bakterie *Faecalibacterium*, významného producenta butyrátu, která je v současné době považována za marker "zdravého" střeva. Podobně jako předešlé studie bylo detekováno také snížené množství prospěšných *Bifidobakterií* u pacientek ve srovnání s kontrolami, v našem případě se jednalo o signifikantní data pouze v případě chronických pacientek, což by mohlo značit na postupné snižování počtu těchto bakterií u pacientek s AN. K významných bakteriím patří také třída *Clostridia*, která tvoří široce heterogenní skupinu schopnou produkovat toxiny a působit vážné klostridiové infekce, jiné jsou naopak schopné produkovat SCFA (mastné kyseliny s krátkým řetězcem) a působit protizánětlivě (131,132). Ve zmíněné publikaci bylo zaznamenáno zvýšené množství třídy *Clostridiales* u pacientek ve srovnání s kontrolami, nicméně nemáme konkrétní informace o jednotlivých rodech (121). U našich pacientek bylo detekováno také zvýšené procentuální zastoupení klostridiových bakterií, konkrétně klastru *Clostridium XVIII*. Tato skupina je schopna akumulovat v tlustém střevě T regulační buňky, a tím podporovat protizánětlivý efekt, zároveň jsou tyto bakterie schopny produkovat SCFA, zejména butyrát, a tím opět přispívat k protizánětlivému charakteru střevního mikrobiomu (133). Jiné studie potvrzují zvýšený výskyt bakterií patřící ke klastru *Clostridium XVIII* u pacientů s poruchami autistického spektra, kde u těchto pacientů způsobují zácpu, která je častým příznakem také pacientek s AN (134).

Řada bakterií má funkci i mimo trávicí trakt a jsou důležitými producenty neuroaktivních látek a mohou se tak podílet na regulaci dějů v rámci CNS. Střevní bakterie patří k nezastupitelným producentům serotoninu, jednoho z klíčových neurotransmiterů, který má vliv na kognitivní funkce, náladu, spánek, ale i bolest (112). Dysregulace serotoninergního systému proto vede k řadě psychiatrických poruch, například k depresím a úzkostem (135). Jednou z výrazných bakterií současnosti, která bývá spojována s psychiatrickými onemocněními, je *Alistipes*, která se účastní metabolismu serotoninu. Serotonin je odvozen od aminokyseliny tryptofanu. *Alistipes* je schopná limitovat tryptofan změnou na indol a snižuje tak dostupnost serotoninu (121). Nižší zastoupení serotoninu bylo popsáno například u depresivních stavů, které jsou častou komorbiditou mentální anorexie (135). Tato bakterie byla objevena ve vyšší míře u pacientek s AN v již výše zmíněných publikacích, a proto byla detekována také v rámci této

práce. Sekvenační data poukázala na rozdílné zastoupení této bakterie, kdy se překvapivě vyskytovala ve větším množství ve stolici zdravých žen oproti pacientkám s AN. To může být vysvětleno tím, že existuje mnoho druhů této bakterie, některé jsou spojovány s vyšším výskytem u řady onemocnění, jiné jsou naopak označovány jako prospěšné (136). qPCR data, která měla přinést hlubší náhled do problematiky, významné rozdíly ve výskytu *Alistipes* mezi kontrolami a pacientkami však nepotvrdila. Limitujícím faktorem v rámci diplomové práce je pak jistě počet pacientek (n = 60) a kontrol (n = 30), a to nejen v případě qPCR, ale také pro sekvenační data. Náběr patientských vzorků stále probíhá a další experimenty budou provedeny.

V klinickém prostředí je stále problém rozlišit akutní a chronické pacientky, pokud pomineme délku trvání onemocnění. Tato práce měla za cíl podílet se na rozlišení těchto skupin pacientek a odhalení možných markerů, které by mohly determinovat riziko pro přechod z akutního do chronického stavu mentální anorexie. Skupiny pacientek se od sebe na úrovni střevního mikrobiomu lišily v zastoupení několika bakteriálních druhů. Akutní pacientky mají ve svém střevním mikrobiomu větší procentuální zastoupení prospěšných rodů *Bacteroides* a *Bifidobacterium*, naopak chronické pacientky mají signifikantně více zastoupeny potenciálně prospěšné rody *Akkermansia* a *Faecalibacterium*, k více zastoupeným u chronické AN se řadí ale také rody *Collinsella*, *Intestinimonas*, *Oscillibacter*, *Parabacteroides* a *Ruminococcus*. Rod *Collinsella* je spojován s vyšším výskytem u pacientů trpících *diabetes mellitus* II. typu, zároveň byl ale popsán jeho příznivý vliv na rannou kolonizaci střev a protekci proti rozvoji obezity (137,138). V případě *Intestinimonas* tato skupina představuje důležitého producenta butyrátu (139). *Oscillibacter* je původcem bakteremie a je spojován s obézními stavy (140). *Parabacteroides* jsou negativně spojovány s idiopatickými střevními záněty a obezitou, na druhé straně jsou schopné produkovat SCFA (141). Některé druhy ruminokoků, konkrétně *R. gavis* je popisován u pacientů s Crohnovou chorobou, kde je zodpovědný za řadu příznaků, jako jsou průjem, krvavá stolice nebo bolest břicha, jsou ale také důležitým rodem v produkci SCFA (142). Společným faktorem výše zmíněných rodů je spojitost s metabolismem a střevním systémem, v tomto případě řada bakterií ale představuje velmi heterogenní skupiny, kdy nemůžeme jednoznačně určit možný rizikový potenciál jednoho rodu pro rozvoj chronické AN.

Projekty zaměřené na alfa a beta diverzitu střevního mikrobiomu u pacientek s mentální anorexií dochází vždy ke stejnému závěru (143,144). Pacientky s AN se potýkají s nižší

druhovou bohatostí vedle zdravých kontrol, což nebylo výjimkou ani v rámci našich experimentů. Alfa diverzita střevního mikrobiomu zdravých kontrol byla signifikantně vyšší v porovnání se skupinami pacientek. Nicméně tento fakt poukazuje spíše na následek onemocnění než jeho příčinu. Nižší druhová bohatost obvykle bývá spojována s průjmovými onemocněními, střevními záněty, stavy malnutrice a zejména špatným stravováním, které je pro mentální anorexii typické. Zajímavé je, že ačkoli pacientky trpí nižší druhovou bohatostí, nebylo zde prokázáno menší množství celkového počtu 16S rRNA kopií a v tomto případě jsme neobjevili signifikantní rozdíly mezi pacientkami a kontrolami. Sekvenační data objasnila, že pacientky mají ve svém střevním mikrobiomu zastoupené spíše komenzální a patogenní bakterie, proto nemusí mít nutně snížené počty 16S rRNA kopií. Pokud se budeme dívat na tyto pacientky jako celek a nebudeme řešit individuální mikrobiom každé pacientky, tak i zde odhalíme určité odlišnosti v porovnání se skupinou zdravých žen. Beta diverzita ukázala, že střevní mikrobiomy pacientek s AN si jsou navzájem daleko méně podobné a jsou si vzdálenější než mikrobiomy zdravých žen, které tvoří ucelenější prvek. V tomto případě se od sebe signifikantně lišily také obě skupiny pacientek, což představuje důležitý poznatek, protože rozdíly mezi akutními a chronickými pacientkami obvykle zkoumány nejsou. I z tohoto výsledku pak můžeme usuzovat, že bakteriální společenstvo pacientek představuje zejména ty druhy, které mohou být rizikovější pro patologii onemocnění, a že během onemocnění nejspíš dochází k dalším změnám ve složení střevního mikrobiomu. Mimo výše zmíněný druh *Alistipes* se ve spojení s AN uvažuje také o roli *Methanobrevibacter smithii*, který byl důležitou součástí řady experimentů (145, 146). Jedná se o archea, zastoupeném hojně v tlustém střevě, který se živí odpadními produkty při rozkladu potravy. U tohoto druhu byly objeveny korelace mezi hodnotami BMI a jeho zastoupením ve střevním traktu. Million *et al.* uvádí, že je výskyt nižší u pacientů trpících obezitou oproti zdravým kontrolám i pacientkám s AN (122). V rámci diplomové práce byly také změřeny počty mRNA kopií pro *M. smithii* a ačkoli nebyla objevena signifikantní data, počty této archea jsou nižší u kontrol v porovnání s pacientkami, zároveň můžeme vidět, že počty se s délkou onemocnění zvyšují. *M. smithii* se v tomto případě nejspíš adaptuje na nízký přísun potravy a optimalizuje transformaci živin při nízkokalorické dietě, jeho výskyt ale nemusí nutně znamenat patologický potenciál pro rozvoj onemocnění.

Pacientky s AN v důsledku nízkého příjmu potravy, nižší druhové bohatosti a možnému vyššímu výskytu potenciálně patogenních bakterií ve střevě mohou trpět poruchami střevní

bariéry. V případě poruchy intaktnosti a rozvolnění těsných spojů může docházet k vyšší translokaci bakteriálních antigenů do periferie, kde tyto antigeny mohou být rozpoznány a působit imunogenně. Jednou z možných teorií, proč pacientky s AN často trpí depresemi, je právě stav, kdy v důsledku porušení enterocytů a permeability střeva dojde k rozpoznání bakteriálních antigenů v periferní cirkulaci a nastavení prozánětlivé odpovědi (147). Produkované cytokiny poté směřují do CNS, kde způsobují lokální zánět a negativně ovlivňují náladu (148). V rámci této práce nicméně nebylo potvrzeno, že by pacientky trpěly vyšší propustností střevního epitelu, a tím možnému průniku bakterií do periferie, neboť výsledky měření hladin LBP žádné významné rozdíly mezi skupinami kontrol a pacientek nepřinesly. Dalším stanovovaným proteinem pro detekci možné poruchy integrity střevní stěny byl I-FABP. Hladiny proteinu I-FABP byly detekovány ve zvýšené míře u 1 akutní pacientky a 3 chronických. Molekula I-FABP se uvolňuje při poruše slizniční vrstvy tenkého střeva a je vysoce tkáňově specifická, proto můžeme říci, že výsledky u těchto čtyř pacientek značí poruchu střevní propustnosti. Vzhledem k fyziologickým hodnotám tohoto proteinu v séru kontrol se v případě pacientek nejspíše jednalo o následek onemocnění. Vyšší výskyt I-FABP u chronické AN by zároveň naznačoval, že čím déle pacientky onemocněním trpí, tím větší je riziko pro možnou poruchu střevní intaktnosti. Nicméně tato data nebyla signifikantně potvrzena a počet pacientek byl v tomto ohledu nízký. Molekula sCD14 je další, která se využívá jako marker mikrobiální translokace. Slouží jako koreceptor lipopolysacharidů nacházejících se v rámci vnější membrány gramnegativních bakterií, a je exprimována na aktivovaných monocyttech (149). U pacientek s AN byla očekávána v důsledku jejich špatného stravování porucha střevní bariéry, tím zvýšená mikrobiální translokace a zároveň vyšší hladiny molekuly sCD14. Tato hypotéza nicméně potvrzena nebyla. Hladiny sCD14 byly naměřeny vyšší u zdravých kontrol oproti pacientkám s AN. Důvodem by mohl být fakt, že pacientky s mentální anorexií mají často narušené fungování imunitního systému, tím může docházet i k horší aktivaci monocytů (84). Snížená aktivace monocytů poté může vést ke sníženému uvolňování molekuly sCD14. Zároveň víme, že molekula LBP, která váže lipopolysacharidy a spolupracuje s molekulou sCD14, byla zaznamenána ve větší míře v séru obézních lidí, což by vysvětlovalo, proč se u pacientek s mentální anorexií nevyskytuje v takové míře, a tím ani hladiny sekreční CD14 (149). Možné poruchy střevní permeability byly sledovány také v rámci studie z roku 2020, kde byly u pacientek s mentální anorexií stanoveny hladiny I-FABP a LBP. Ani v tomto případě ale nebyly objeveny zvýšené hladiny těchto proteinů v séru a u pacientek

nic nenasvědčovalo poruše střevní propustnosti. Nicméně studie má poměrně limitující počet pacientek, jak sami autoři nazývají, jednalo se o pilotní experiment. Zároveň proces mikrobiální translokace je složitý a není jednoduché tento mechanismus studovat *ex vivo* (150).

Jak již bylo zmíněno, pacientky s mentální anorexií se často potýkají s poruchami v rámci imunitních mechanismů. I proto zůstává otevřená otázka, zda by za patologií mentální anorexie mohly stát dysregulace v rámci imunitního systému (106, 117). V této práci byly měřeny zejména hladiny vybraných cytokinů, které jsou schopny prostupovat hematoencefalytickou bariéru, reagovat s CNS a ovlivňovat tak příjem potravy. Z naměřených koncentrací cytokinů byla signifikantní data zaznamenána u IL-1 β a IL-6, které se vyskytovaly více v séru pacientek oproti zdravým ženám. Tento experiment koreluje s ostatními studiemi, které popisují nastavení imunitního systému pacientek s AN prozánětlivě (26, 29). V tomto ohledu by bylo zajímavé zjistit také hladiny glutamátu. Výše zmíněné cytokiny jsou totiž schopny u tohoto neurotransmiteru zvyšovat jeho expresi, a tím navýšit excitabilitu nervových buněk, která obvykle vede k zánětu a navození deprese, kterou v rámci této studie trpělo více než 50 % pacientek. Hladiny glutamátu byly v několika studiích měřeny zejména na myších modelech mentální anorexie. Experimenty poukazují na snížené množství glutamátu vedoucí k následné dysfunkci astrocytů, a i to je jeden z možných patologických mechanismů přispívajících k rozvoji AN (151). IL-6 hraje důležitou roli nejen v regulaci příjmu potravy, ale také v souvislosti s fyzickou aktivitou. Během cvičení se produkce tohoto cytokinu zvyšuje, což může mít vliv i na pacientky AN, které často projevují nadměrnou fyzickou aktivitu. IL-6 v důsledku cvičení vykazuje protizánětlivé účinky a pomáhá snižovat zánětlivé reakce v těle, což může být důležité zejména u metabolických onemocnění, kde chronický zánět hraje klíčovou roli (152). Kromě toho může být IL-6 spojován s hladinami leptinu, další molekuly patřící do rodiny IL-6. Leptin stejně jako IL-6 ovlivňuje metabolické procesy v těle (153). Ačkoli v této práci nebyly měřeny hladiny leptinu, další studie uvádějí, že pacientky s AN mají hladiny leptinu snížené, zatímco u osob s obezitou jsou hladiny leptinu zvýšené (154). Tato data by mohla objasnit působení IL-6 v rámci mentální anorexie. Zda se jedná o protizánětlivý mediátor vyplavovaný v důsledku nadměrného cvičení, nebo o faktor přispívající k prozánětlivému charakteru v důsledku onemocnění. V souvislosti s anorexií a cytokiny se mluví o možném využití biologické léčby v rámci tohoto onemocnění. V rozsahu pilotních

studií bylo zjištěno, že léčba na principu inhibice TNF- α zvyšuje u pacientů s AN hmotnost a má příznivý vliv na přibírání. O možném využití se začalo uvažovat v souvislosti s prokázaným prozánětlivým nastavením imunitního systému a zejména zvýšené expresi prozánětlivé triády cytokinů IL-1, IL-6, TNF- α (155). Nám se nicméně v případě TNF- α nepodařilo tato data potvrdit a mezi skupinami jsme neobjevily významné rozdíly. Signifikantní data nebyla naměřena ani v případě IL-12 a IL-10, kde se zdají být hladiny těchto cytokinů mezi skupinami srovnatelné.

Pro podpoření hypotézy o prozánětlivém nastavení imunitního systému pacientek s AN byly detekovány také kalprotektin a sérový amyloid. V případě sérového amyloidu nebyly zaznamenány významné rozdíly mezi skupinami pacientek a kontrol, nicméně hodnoty kalprotektinu přinesly zajímavé poznatky. Hladiny kalprotektinu byly naměřeny vyšší u zdravých žen v porovnání s akutními i chronickými pacientkami. Důvodem pro nižší stanovení tohoto prozánětlivého markeru by mohly být dysbalance imunitního systému, se kterými se tyto pacientky potýkají (26, 84, 156). Kalprotektin je uvolňován z aktivovaných neutrofilů, které se u pacientek dle řady studií nachází v nižším množství, zároveň i aktivace těchto granulocytů může být snížena. Naproti tomu studie Moubayeda uvádí u 50 % pacientek s AN zvýšené množství kalprotektinu, v tomto případě se ale jednalo o kalprotektin stanovený ve stolici, značící možný intestinální zánět (157).

Vzhledem k povaze mentální anorexie je jednou teorií vzniku porucha na úrovni hypotalamu. Odtud je regulován řadou neuropeptidů proces příjmu potravy (16, 158). I proto jsme se rozhodli neuropeptidy studovat, a to konkrétně v rozsahu autoprotilátek proti těmto neuropeptidům. Protílátky byly měřeny ve třech izotypech (IgG, IgA, IgM) a byly stanoveny proti sedmi peptidům (α -MSH, MCH, NEI, NPY, Orexin A, Orexin B, PYY). Zastoupení autoprotilátek v séru bylo u některých neuropeptidů velmi nízké, signifikantní data byla popsána pouze u dvou z nich. Autoprotílátky proti Orexinu A byly detekovány zejména u kontrol oproti akutním i chronickým pacientkám, v tomto ohledu nejspíš přítomnost autoprotilátek může značit fyziologický stav. Steward ve své studii uvádí, že snížené koncentrace Orexinu A, které byly naměřeny u pacientek s AN, stojí za kognitivními dysbalancemi, nicméně o přítomnosti autoprotilátek se nezmiňuje (159). Jedna z českých prací se zaměřila na změnu hladin tohoto neuropeptidu během obnovení stravování, kde také došlo ke snížení koncentrace Orexinu A u pacientek trpících AN (160). Statisticky

významná data byla v rozsahu této práce pozorována také v případě α -MSH. Protilátky namířené proti tomuto neuropeptidu byly detekovány ve zvýšené míře u chronických pacientek ve srovnání s kontrolami. Výskyt autoprotilátek proti α -MSH byl korelován se zastoupením čeledi *Enterobacteriaceae*, kde byla objevena signifikantní závislost mezi těmito proměnnými. Tato čeleď produkuje kaseinolytickou proteázu, která představuje konformační mimetikum neuropeptidu α -MSH. Imunitní systém tedy produkuje protilátky, které následně zkříženě reagují s neuropeptidem namísto bakteriálního produktu. Tento výsledek představuje mechanismus molekulárních mimiker a podporuje přítomnost autoimunitně patologických projevů v rámci AN. Podobné mechanismy byly popsány i v dalších studiích (117, 156).

Studium mechanismů na úrovni hypotalamu je obtížné provádět *in vivo*, proto jsme do našeho výzkumu zařadili myší model ABA (activity-based anorexia). Tento model simuluje mentální anorexii prostřednictvím indukce zvýšené fyzické aktivity u myší, které mají neomezený přístup k běhacímu kolečku, a zároveň je příjem potravy omezen pouze na 70 % denní dávky (161). Zvýšená fyzická aktivita a rychlý úbytek hmotnosti jsou pro pacientky s anorexií typickými projevy nemoci, proto jsme v rámci experimentu zkoumaly vztah mezi hmotností myší a jejich energetickým výdejem. Byla zjištěna negativní korelace. Myši, které byly v potravní restrikci, vážily méně a vykonávaly větší fyzickou aktivitu. Tento výsledek koreloval s pozorovaným stavem u pacientek trpících mentální anorexií, kde dochází k podobnému úbytku hmotnosti a zvýšené fyzické aktivitě (5).

Jak již bylo zmíněno, mentální anorexie způsobená nesprávným stravováním způsobuje dysbalance v mikrobiomu (162). V našem výzkumu jsme se proto soustředili nejen na příjem potravy a aktivitu, ale také na vliv mikrobiálního osídlení. Pro tento účel jsme do studie zařadili tři skupiny myší s různým mikrobiálním osídlením. Nejvýraznější rozdíly byly pozorovány u bezmikrobních jedinců, kde myši, které dostávaly snížený přísun potravy (pouze 70 % denní dávky), vykazovaly vyšší aktivitu na běhacím kolečku ve srovnání s těmi, které měly dostatek potravy. Tento trend byl také pozorován u myší s normálním mikrobiálním osídlením (kontrolní noATB myši). Závislost fyzické aktivity a bakteriálního osídlení byla popsána také u lidí, kdy mírná fyzická aktivita vyvolává pozitivní změny ve složení střevní mikrobioty a snižuje střevní propustnost i zánět (163). Naopak myši, kterým bylo podáno antibiotikum a došlo tím ke změně bakteriálního osídlení, neprokázaly významné rozdíly v aktivitě. Podobné výsledky

byly popsány i ve studii z roku 2021, kde autoři uvádějí, že podání antibiotik nezpůsobilo u myší tak velký úbytek hmotnosti jako u kontrolních myší (164). Z toho vyplývá, že podání antibiotik nemá tak výrazný účinek jako přímá manipulace se střevním mikrobiomem.

Po potvrzení závislosti mentální anorexie na přísunu potravy, aktivitě i vlivu mikrobiálního osídlení byly provedeny analýzy, které měly za cíl objasnit změny na úrovni genů regulujících příjem potravy. Nejvýraznější změny byly popsány právě u skupin myší, které vykonávaly fyzickou aktivitu na běhacím kolečku a zároveň měly restrikcí v přísunu potravy. Důležitým regulátorem se zdá být NPY, jehož exprese byla naměřena u kontrolních noATB myších signifikantně vyšší právě u skupin, které byly v restrikcí. Výrazně vyšší počty mRNA kopií pro tento neuropeptid byly pozorovány také ve spojitosti se zvýšenou aktivitou myší a mimo jiné statisticky významná data byla objevena také u skupiny bezmikrobních myší. Tyto výsledky poté napovídají, že exprese NPY, jednoho z klíčových orexigenních regulátorů, je závislá na mikrobiálním osídlení střeva i na fyzické aktivitě. To ostatně dokazuje i práce Landry *et al.*, kde autoři zjistili, že fyzická aktivita zvyšuje v myším hypotalamu aktivitu právě NPY/Agpr dráhy (165). Dysbalance v rámci NPY byly ale objeveny také v případě pacientek s AN. Tyto pacientky se potýkají s nižšími hladinami NPY a zároveň zde byly popsány také autoprotilátky namířené proti tomuto neuropeptidu (166). Snížené hladiny NPY mohou vést k potlačení chuti k jídlu a vazba autoprotilátek může tento stav dále zhoršovat. Jiná studie poukázala na souvislost mezi hladinami NPY a depresivními projevy onemocnění, které jsou častou komorbiditou AN (23). Podobně bylo zjištěno, že u zvířecího modelu deprese, byla fyzická aktivita spojená s vyššími mRNA hladinami pro tento neuropeptid, a jak již bylo zmíněno, pacientky s AN často vykazují hyperaktivní chování (167). Výsledky naznačují, že NPY může hrát významnou roli v patogenezi anorexie a jeho narušení může přispět k projevům této poruchy příjmu potravy. V případě dalších neuropeptidů byly objeveny významné rozdíly pouze v případě Orexinu a CRH mezi třemi skupinami různě mikrobiálně osídlených myších. Mimo závislosti exprese na složení střevního mikrobiomu byla potvrzena také závislost na fyzické aktivitě a přísunu potravy podobně jako u NPY. Statisticky významné rozdíly v expresi CRH a Orexinu byly pozorovány zejména u myší s běhacím kolečkem a těmi v restrikcí. U bezmikrobních myší byly objeveny vyšší hladiny neuropeptidu CRH, u kontrol byl detekován ve větším množství Orexin. Hladiny neuropeptidů byly naopak nejnižší u myší, kterým byla podána antibiotika, což může být spojeno s jejich nízkou fyzickou aktivitou pozorovanou během experimentu.

Mentální anorexie je spojena s nerovnováhou ve střevním mikrobiomu a možným narušením integrity střevní stěny. Muciny hrají důležitou roli v udržení integrity střevní bariéry a prevenci průniku patogenů do lumen střeva. Poruchy v produkci nebo funkci mucinů pak mohou vést k narušení střevní permeability (168). U konvenčních noATB myší byly zjištěny výrazně vyšší hladiny Muc13 u kontrolních myší než u myší v potravní restrikci a těch, které měly přístup k běhacímu kolečku. To naznačuje fyziologický stav u kontrolních myší a možné změny v udržení integrity střevní stěny u myší s potravní restrikcí. Naopak u ATB myší byly zjištěny nižší hladiny Muc2 u kontrolních myší ve srovnání s myšmi v potravní restrikci. Ačkoli použití antibiotik může narušit střevní mikrobiom a oslabit střevní bariéru, je důležité si uvědomit, že v rámci experimentu byla antibiotika použita pouze krátkodobě, což nemuselo způsobit závažné změny v produkci Muc2 a celkové střevní integritě. Dřívější výzkumy ukázaly, že porucha střevní permeability u pacientek s AN nemusí být přítomna ani po několika letech, a tak antibiotická manipulace v tomto případě může mít ještě menší vliv (150, 169).

7 Závěr

Diplomová práce navazuje na proběhlou studii týkající se analýzy střevního mikrobiomu u pacientek s AN, a měla za cíl objasnit úlohu střevní mikrobioty a účast imunitních mechanismů u pacientek s mentální anorexií.

Detekce autoprotilátek proti neuropeptidům regulujících příjem potravy byla stanovena metodou ELISA. Byly popsány rozdílné hladiny autoprotilátek proti α -MHS mezi zdravými kontrolami a skupinou chronických pacientek, kdy se pacientky potýkaly s vyššími hladinami těchto autoprotilátek. Další signifikantní data byla také popsána u protilátek proti Orexinu A; zde se naopak autoprotilátky vyskytovaly více v séru kontrol vedle akutních i chronických pacientek. Význam těchto autoprotilátek prozatím objasněn nebyl, nicméně dle rozdílného výskytu protilátek mezi pacientkami a kontrolami můžeme říci, že jejich výskyt nemusí nutně znamenat patologický projev, ale mohou se vyskytovat i fyziologicky, jako je tomu u protilátek proti Orexinu A. V rámci imunologických parametrů byly dále stanoveny hladiny konkrétních cytokinů na přístroji Luminex. Tato analýza přinesla statisticky významná data v případě IL-1 β a IL-6. Oba prozánětlivé cytokiny byly naměřeny ve vyšší koncentraci u pacientek v porovnání s kontrolami. Detekce těchto cytokinů poté značí jasně prozánětlivé nastavení imunitního systému u pacientek s AN.

V séru byly stanoveny také markery poruchy střevní intaktности, mikrobiálního transportu a markery poukazující na možný zánět. Porucha enterocytů nebyla výrazně popsána, nicméně u 4 pacientek s mentální anorexií byly zaznamenány zvýšené hodnoty proteinu I-FABP v séru, značící možné poškození střevní propustnosti. Markery mikrobiální translokace poukázaly v případě sekreční CD14 molekuly zvýšené hodnoty u kontrol oproti akutním pacientkám. Prozánětlivé markery byly naměřeny v případě kalprotektinu signifikantně vyšší u kontrol v porovnání s oběma skupinami pacientek. Tento fakt by mohl značit na poruchy imunitního systému u pacientek s AN, kdy zkrátka nemusí dostatečně reagovat a vytvářet tak další prozánětlivé mediátory.

Velká část studie byla zaměřená také na roli střevního mikrobiomu v patogenezi mentální anorexie. Taxonomická analýza neukázala významné rozdíly mezi skupinami pacientek a kontrol na úrovni kmene, k nejvíce zastoupeným patří kmény *Firmicutes* a *Bacteroidetes* u všech sledovaných skupin. Na úrovni rodu byly objeveny rozdíly mezi kontrolami a jednotlivými skupinami pacientek, i mezi oběma skupinami pacientek. Rozdílné bakteriální

osídlení nicméně nepoukazovalo na jeden konkrétní druh, který by mohl stát za patologií nebo rozvojem AN, ale spíše skupinu potenciálně patogenních bakterií, které by mohly být s AN spojené. Analýza na úrovni alfa i beta diverzity poukázala na signifikantní rozdíly, kdy se pacientky potýkají s celkovou nižší druhovou bohatostí v porovnání se zdravými ženami, v případě akutních pacientek je zde i nižší počet druhů. Tento jev je vzhledem k nízkému přísunu potravy zcela očekávaný. Beta diverzita poukázala na větší podobnost střevních mikrobiomů mezi jednotlivými kontrolami, kdy byl tento soubor ucelenější, naopak u akutních i chronických pacientek se tzv. "jádro mikrobiomu" výrazně odlišuje. V případě beta diverzity se od sebe odlišují i obě skupiny pacientek. Ačkoli v dnešní době stále nemáme definovaný tzv. "zdravý mikrobiom", toto zjištění naznačuje, že jsou bakterie, které se u zdravých lidí budou vyskytovat častěji, zároveň i naopak, kdy existují skupiny bakterií, které mohou být spojovány s onemocněním. Zajímavá data byla objevena v případě korelace autoprotilátek proti α -MHS a výskytu čeledi *Enterobacteriaceae*, která je důležitým producentem kaseinolytické proteázy B, představující strukturní mimetikum neuropetidu α -MHS. Popsaná korelace by mohla poukazovat na přítomnost molekulárních mimiker jakožto patologického autoimunitního mechanismu v rámci mentální anorexie.

Zavedení myšího modelu do studie probíhalo dle očekávání. V rámci měření myší aktivity a hmotností myší byla popsána negativní korelace. Myši, které měly restrikcii v přísunu potravy, hubnuly a vážily méně, vykazovaly větší aktivitu na běhacím kolečku. Obdobný model je vidět u pacientek s mentální anorexií, které často v souvislosti se sníženým přísunem potravy zvyšují svou fyzickou aktivitu. Myší model byl optimalizován také dle různého bakteriálního osídlení. Byla indukována ABA, sledována uběhnutá vzdálenost myší a mimo jiné také hladina mRNA vybraných genů regulujících příjem potravy a genů klíčových pro udržení střevní bariéry. Největší rozdíl v uběhnuté vzdálenosti mezi myšmi s potravou *ad libitum* a těmi v restrikcii byl zaznamenán u bezmikrobních myší. Tato informace značí závislost mezi bakteriálním osídlením a fyzickou aktivitou. Změny hypotalamických genů na úrovni mRNA u různě bakteriálně osídlených myší byly patrné zejména mezi skupinami myší, které byly v restrikcii a zároveň měly k dispozici běhací kolečka. V tomto případě bylo potvrzeno, že exprese genů ovlivňujících příjem potravy může být závislá na přísunu potravy i fyzické aktivitě.

Tato práce přinesla do problematiky data na úrovni imunologie a mikrobiologie, kdy prozánětlivé prostředí v důsledku cytokinů, nižší druhová bohatost střevního mikrobiomu i možné změny v rámci střevní intaktности značí spíše následek onemocnění než jeho příčinu.

Důležitá data byla zaznamenána během zavedení myšního modelu. V rámci studie budou v budoucnu figurovat zejména bezmikrobní myši pro přenos střevní mikrobioty od pacientek trpící mentální anorexií, které mají za cíl prohloubit pochopení významu střevní mikrobioty a přinést možnosti, které by pomohly v terapii tohoto onemocnění.

8 Seznam použité literatury

1. Boehm I, Mohr H, King JA, Steding J, Geisler D, Wronski ML, et al. Aberrant neural representation of food stimuli in women with acute anorexia nervosa predicts treatment outcome and is improved in weight restored individuals. *Transl Psychiatry*. 2021 Dec 1;11(1).
2. Holliday A, Blannin A. Appetite, food intake and gut hormone responses to intense aerobic exercise of different duration. *Journal of Endocrinology*. 2017 Dec 1;235(3):193–205.
3. Seitz J, Dahmen B, Keller L, Herpertz-Dahlmann B. Gut feelings: How microbiota might impact the development and course of anorexia nervosa. Vol. 12, *Nutrients*. MDPI AG; 2020. p. 1–14.
4. Jackson A, Sano Y, Parker L, Cox AE, Lanigan J. Intuitive eating and dietary intake. *Eat Behav*. 2022 Apr 1;45.
5. Thackray AE, Stensel DJ. The impact of acute exercise on appetite control: Current insights and future perspectives. *Appetite*. 2023 Jul 1;186.
6. Kebbe M, Altazan AD, Beyl RA, Gilmore LA, Redman LM. Infant Feeding Varies Across Eating Behavior and Feeding Modalities in Mothers With Low Income. *J Nutr Educ Behav*. 2022 Sep 1;54(9):827–34.
7. Plaza-Diaz J, Flores-Rojas K, de la Torre-Aguilar MJ, Gomez-Fernández AR, Martín-Borreguero P, Perez-Navero JL, et al. Dietary patterns, eating behavior, and nutrient intakes of spanish preschool children with autism spectrum disorders. *Nutrients*. 2021 Oct 1;13(10).
8. Rajcsanyi LS, Hoffmann A, Ghosh A, Matrisch-Dinkler B, Zheng Y, Peters T, et al. Genetic variants in genes involved in creatine biosynthesis in patients with severe obesity or anorexia nervosa. *Front Genet*. 2023;14.
9. Becker KR, Mancuso C, Dreier MJ, Asanza E, Breithaupt L, Slattery M, et al. Ghrelin and PYY in low-weight females with avoidant/restrictive food intake disorder compared to anorexia nervosa and healthy controls. *Psychoneuroendocrinology*. 2021 Jul 1;129.
10. Cyr NE, Toorie AM, Steger JS, Sochat MM, Hyner S, Perello M, et al. Mechanisms by which the orexigen NPY regulates anorexigenic-MSH and TRH. *Am J Physiol Endocrinol Metab* [Internet]. 2013;67:640–50. Available from: <http://www.ajpendo.org>E640
11. Ueno H, Miyamoto T, Sanada K, Nakazono K, Tanaka K, Nishimura H, et al. Changes in gene expressions of hypothalamic neuropeptides controlling feeding behaviors in bilateral nephrectomized rats. *Neurosci Lett*. 2019 Oct 15;711.
12. Eerola K, Rinne P, Penttinen AM, Vähätalo L, Savontaus M, Savontaus E. α -MSH overexpression in the nucleus tractus solitarius decreases fat mass and elevates heart rate. *Journal of Endocrinology*. 2014;222(1):123–36.
13. G. Fernandez ACMPCNDFGGRMRMP. Des-Acyl Ghrelin Directly Targets the Arcuate Nucleus in a Ghrelin-Receptor Independent Manner and Impairs the Orexigenic Effect of Ghrelin. *International Journal of Eating Disorders*. 2015 Dec 12;

14. Adriaenssens AE, Biggs EK, Darwish T, Tadross J, Sukthankar T, Girish M, et al. Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide Receptor-Expressing Cells in the Hypothalamus Regulate Food Intake. *Cell Metab.* 2019 Nov 5;30(5):987-996.e6.
15. Youngjung Kim JHLPBJSTHBTWLESM. The association between leptin and weight maintenance outcome in anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders.* 2020 Nov 13;
16. Zhan C, Zhou J, Feng Q, Zhang J en, Lin S, Bao J, et al. Acute and long-term suppression of feeding behavior by POMC neurons in the brainstem and hypothalamus, respectively. *Journal of Neuroscience.* 2013 Feb 20;33(8):3624–32.
17. Baldini G, Phelan KD. The melanocortin pathway and control of appetite-progress and therapeutic implications. Vol. 241, *Journal of Endocrinology.* BioScientifica Ltd.; 2019. p. R1–33.
18. Keringer P, Furedi N, Gaszner B, Miko A, Pakai E, Fekete K, et al. The hyperthermic effect of central cholecystikinin is mediated by the cyclooxygenase-2 pathway. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2022 Jan 1;322(1):E10–23.
19. Södersten P, Bergh C, Leon M, Zandian M. Dopamine and anorexia nervosa. Vol. 60, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* Elsevier Ltd; 2016. p. 26–30.
20. Yokokura M, Terada T, Bunai T, Nakaizumi K, Kato Y, Yoshikawa E, et al. Alterations in serotonin transporter and body image-related cognition in anorexia nervosa. *Neuroimage Clin.* 2019 Jan 1;23.
21. Li Y& LXM. A dopamine-to-serotonin circuit for the treatment of anorexia nervosa. *Nat Neurosci.* 2022 May 5;25:541–2.
22. Pouneh K. Fazeli MMph b, *; EALMMms b; ATFMd b; KTEP c; HLP d; FTFMPABPIMGBaRDBa and AKMd b. Treatment With a Ghrelin Agonist in Outpatient Women With Anorexia Nervosa: A Randomized Clinical Trial. *J Clin Psychiatry.* 2018 Jan 2;
23. Tyszkiewicz-Nwafor M, Jowik K, Dutkiewicz A, Krasinska A, Pytlinska N, Dmitrzak-Weglaz M, et al. Neuropeptide y and peptide yy in association with depressive symptoms and eating behaviours in adolescents across the weight spectrum: From anorexia nervosa to obesity. *Nutrients.* 2021 Feb 1;13(2):1–15.
24. Lucas N, Legrand R, Bôle-Feynot C, Breton J, Coëffier M, Akkermann K, et al. Immunoglobulin G modulation of the melanocortin 4 receptor signaling in obesity and eating disorders. *Transl Psychiatry.* 2019 Dec 1;9(1).
25. Schorr M, Miller KK. The endocrine manifestations of anorexia nervosa: Mechanisms and management. Vol. 13, *Nature Reviews Endocrinology.* Nature Publishing Group; 2017. p. 174–86.
26. Himmerich H, Dalton B, Patsalos O, Schmidt U, Campbell IC. Cytokines and water distribution in anorexia nervosa. *Mediators Inflamm.* 2021;2021.
27. Pacheco-López G, Bermúdez-Rattoni F. Brain-immune interactions and the neural basis of disease-avoidant ingestive behaviour. Vol. 366, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences.* Royal Society; 2011. p. 3389–405.
28. Specht HE, Mannig N, Belheouane M, Andreani NA, Tenbrock K, Biemann R, et al. Lower serum levels of IL-1 β and IL-6 cytokines in adolescents with anorexia nervosa and their association with gut microbiota in a longitudinal study. *Front Psychiatry.* 2022 Aug 18;13.

29. Ragu-Varman D, Macedo-Mendoza M, Labrada-Moncada FE, Reyes-Ortega P, Morales T, Martínez-Torres A, et al. Anorexia increases microglial density and cytokine expression in the hippocampus of young female rats. *Behavioural Brain Research*. 2019 May 2;363:118–25.
30. Liu W, Zhou H, Wang H, Zhang Q, Zhang R, Willard B, et al. IL-1R-IRAKM-Slc25a1 signaling axis reprograms lipogenesis in adipocytes to promote diet-induced obesity in mice. *Nat Commun*. 2022 Dec 1;13(1).
31. Böttcher M, Müller-Fielitz H, Sundaram SM, Gallet S, Neve V, Shionoya K, et al. NF-κB signaling in tanycytes mediates inflammation-induced anorexia. *Mol Metab*. 2020 Sep 1;39.
32. Liu Y, Dantas E, Ferrer M, Liu Y, Comjean A, Hu Y, et al. Tumor Cytokine-Induced Hepatic Gluconeogenesis Contributes to Cancer Cachexia: 1 Insights from Full Body Single Nuclei Sequencing 2 3. Available from: <https://doi.org/10.1101/2023.05.15.540823>
33. Corina Pírsean CNRIS van SCEDPPADIU. The salivary levels of leptin and interleukin-6 as potential inflammatory markers in children obesity. *PLoS One*. 2019 Jan 3;14.
34. Pourhassan M, Babel N, Sieske L, Westhoff TH, Wirth R. Inflammatory cytokines and appetite in older hospitalized patients. *Appetite*. 2021 Nov 1;166.
35. Salazar-León J, Valdez-Hernández AL, García-Jiménez S, Román-Domínguez L, Huanosta-Murillo E, Bonifaz LC, et al. Nlrp1b1 negatively modulates obesity-induced inflammation by promoting IL-18 production. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
36. Ruiz Guerrero F, González Gómez J, Benito Gonzalez P, García García J, Berja Miguel A, Calcedo Giraldo G, et al. Low levels of proinflammatory cytokines in a transdiagnostic sample of young male and female early onset eating disorders without any previous treatment: A case control study. *Psychiatry Res*. 2022 Apr 1;310.
37. Hong MS, Song JY, Yun DH, Cho JJ, Chung JH. Increase of NADPH-diaphorase expression in hypothalamus of Stat4 knockout mice. *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*. 2009 Oct;13(5):337–41.
38. Sutton AK, Pei H, Burnett KH, Myers MG, Myers MG, Rhodes CJ, et al. Control of food intake and energy expenditure by Nos1 neurons of the paraventricular hypothalamus. *Journal of Neuroscience*. 2014 Nov 12;34(46):15306–18.
39. Hay P. Current approach to eating disorders: a clinical update. *Intern Med J*. 2020 Jan 1;50(1):24–9.
40. Ranzenhofer LM, Jablonski M, Davis L, Posner J, Walsh BT, Steinglass JE. Early Course of Symptom Development in Anorexia Nervosa. *Journal of Adolescent Health*. 2022 Nov 1;71(5):587–93.
41. Sirufo MM, Ginaldi L, De Martinis M. Peripheral vascular abnormalities in anorexia nervosa: A psycho-neuro-immune-metabolic connection. Vol. 22, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2021.
42. Sekaninova N, Olexova LB, Visnovcova Z, Ondrejka I, Tonhajzerova I. Role of neuroendocrine, immune, and autonomic nervous system in anorexia nervosa-linked cardiovascular diseases. Vol. 21, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2020. p. 1–18.

43. Halmi KA. The psychobiology of eating behavior in anorexia nervosa. Vol. 62, RESEARCH Psychiatry Research. 1996.
44. Jafar W, Morgan J. Anorexia nervosa and the gastrointestinal tract. *Frontline Gastroenterol.* 2022 Jul;13(4):316–24.
45. Schloesser L, Lotter LD, Offermann J, Borucki K, Biemann R, Seitz J, et al. Sex-dependent clinical presentation, body image, and endocrine status in long-term remitted anorexia nervosa. *European Eating Disorders Review.* 2023;
46. Springall GAC, Caughey M, Zannino D, Kyprianou K, Mynard JP, Rudolph S, et al. Long-term cardiovascular consequences of adolescent anorexia nervosa. *Pediatr Res.* 2023;
47. Buck P, Goebel-Stengel M, Mack I, Zipfel S, Stengel A. Case report: Carbohydrate malabsorption in inpatients with anorexia nervosa. *Front Psychiatry.* 2022 Dec 20;13.
48. Koda R, Miyazaki S, Iino N, Sato Y, Hirano K, Sunami E, et al. Vitamin D deficiency-induced osteomalacia in a patient with anorexia nervosa. *Internal Medicine.* 2021 Jun 1;60(11):1731–6.
49. Föcker M, Timmesfeld N, Bühlmeier J, Zwanziger D, Führer D, Grasemann C, et al. Vitamin d level trajectories of adolescent patients with anorexia nervosa at inpatient admission, during treatment, and at one year follow up: Association with depressive symptoms. *Nutrients.* 2021 Jul 1;13(7).
50. Singhal V, Nimmala S, Slattery M, Eddy KT, Miller KK, Klibanski A, et al. Physiologic Transdermal Estradiol Replacement Mimics Effects of Endogenous Estrogen on Bone Outcomes in Hypoestrogenic Girls with Anorexia Nervosa. *Nutrients.* 2022 Jul 1;14(13).
51. Workman C, Blalock D V., Mehler PS. Bone density status in a large population of patients with anorexia nervosa. *Bone.* 2020 Feb 1;131.
52. Resulaj M, Polineni S, Meenaghan E, Eddy K, Lee H, Fazeli PK. Transdermal Estrogen in Women With Anorexia Nervosa: An Exploratory Pilot Study. *JBMR Plus.* 2020 Jan 1;4(1).
53. Ulfvebrand S, Birgegård A, Norring C, Högdahl L, von Hausswolff-Juhlin Y. Psychiatric comorbidity in women and men with eating disorders results from a large clinical database. *Psychiatry Res.* 2015 Dec 15;230(2):294–9.
54. Harder A, Nguyen TD, Pasmán JA, Mosing MA, Hägg S, Lu Y. Genetics of age-at-onset in major depression. *Transl Psychiatry.* 2022 Dec 1;12(1).
55. Lian Q, Zuo X, Mao Y, Luo S, Zhang S, Tu X, et al. Anorexia nervosa, depression and suicidal thoughts among Chinese adolescents: A national school-based cross-sectional study. *Environ Health Prev Med.* 2017;22(1).
56. Stuart B. Murray JRMSAWOAAALTWJMN& DSQ. Brain-based gene expression of putative risk genes for anorexia nervosa. *Mol Psychiatry.* 2023 May 5;
57. Smoller JW, Kendler KK, Craddock N, Lee PH, Neale BM, Nurnberger JN, et al. Identification of risk loci with shared effects on five major psychiatric disorders: A genome-wide analysis. *The Lancet.* 2013 Apr 1;381(9875):1371–9.
58. Batista M, Antić LŽ, Žaja O, Jakovina T, Begovac I. Predictors of eating disorder risk in anorexia nervosa adolescents. *Acta Clin Croat.* 2018;57(3):399–410.

59. Bruns GL, Carter MM. Ethnic differences in the effects of media on body image: The effects of priming with ethnically different or similar models. *Eat Behav.* 2015 Apr 1;17:33–6.
60. Simon JJ, Stopyra MA, Mönning E, Sailer S, Lavandier N, Kihm LP, et al. Neuroimaging of hypothalamic mechanisms related to glucose metabolism in anorexia nervosa and obesity. *Journal of Clinical Investigation.* 2020 Aug 3;140(8):4049–103.
61. Florent V, Baroncini M, Jissendi-Tchofo P, Lopes R, Vanhoutte M, Rasika S, et al. Hypothalamic Structural and Functional Imbalances in Anorexia Nervosa. *Neuroendocrinology.* 2020 May 1;110(6):552–62.
62. Trinh S, Kogel V, Voelz C, Schlösser A, Schwenzer C, Kabbert J, et al. Gut microbiota and brain alterations in a translational anorexia nervosa rat model. *J Psychiatr Res.* 2021 Jan 1;133:156–65.
63. Logrieco G, Marchili MR, Roversi M, Villani A. The paradox of tik tok anti-pro-anorexia videos: How social media can promote non-suicidal self-injury and anorexia. *Int J Environ Res Public Health.* 2021 Feb 1;18(3):1–4.
64. Oksanen A, Garcia D, Sirola A, Näsi M, Kaakinen M, Keipi T, et al. Pro-anorexia and anti-pro-anorexia videos on YouTube: Sentiment analysis of user responses. *J Med Internet Res.* 2015 Nov 1;17(11).
65. James I. Hudson MD SCECBJKLMHGPJrMM. By how much will the proposed new DSM-5 criteria increase the prevalence of binge eating disorder? *International Journal of Eating Disorders.* 2010 Dec 10;
66. Smink FRE, Van Hoeken D, Hoek HW. Epidemiology of eating disorders: Incidence, prevalence and mortality rates. *Curr Psychiatry Rep.* 2012 Aug;14(4):406–14.
67. Lichtenstein MB, Johansen KK, Runge E, Hansen MB, Holmberg TT, Tarp K. Behind the athletic body: a clinical interview study of identification of eating disorder symptoms and diagnoses in elite athletes. *BMJ Open Sport Exerc Med.* 2022 Jun 1;8(2).
68. Van Eeden AE, Van Hoeken D, Hoek HW. Incidence, prevalence and mortality of anorexia nervosa and bulimia nervosa. Vol. 34, *Current Opinion in Psychiatry.* Lippincott Williams and Wilkins; 2021. p. 515–24.
69. Keel PK, & KKL. Are eating disorders culture-bound syndromes? Implications for conceptualizing their etiology. *Psychol Bull.* 2003;129:547–69.
70. Sing Lee MBBS KLNBSsKKMssCFP. The changing profile of eating disorders at a tertiary psychiatric clinic in Hong Kong (1987–2007). *International Journal of Eating Disorders.* 2009 Apr 6;
71. Chisuwa N, O’Dea JA. Body image and eating disorders amongst Japanese adolescents. A review of the literature. Vol. 54, *Appetite.* 2010. p. 5–15.
72. Safiri S, Noori M, Nejadghaderi SA, Mousavi SE, Karamzad N, Sullman MJM, et al. Comparison of the burden of anorexia nervosa in the Middle East and North Africa region between 1990 and 2019. *J Eat Disord.* 2022 Dec 1;10(1).
73. Jon Arcelus LMsFrcpPAJMMrcpJWB et al. Mortality Rates in Patients With Anorexia Nervosa and Other Eating Disorders A Meta-analysis of 36 Studies. *Arch Gen Psychiatry.* 2011 Jun;

74. Kutz AM, Marsh AG, Gunderson CG, Maguen S, Masheb RM. Eating Disorder Screening: a Systematic Review and Meta-analysis of Diagnostic Test Characteristics of the SCOFF. Vol. 35, *Journal of General Internal Medicine*. Springer; 2020. p. 885–93.
75. P. Evelyn Kambanis MS ARBMCJMBSPSBLMAPNLBPKTEPKTFPJFKPRJMLPJLMP. Eating Disorder Examination–Questionnaire and Clinical Impairment Assessment norms for intersectional identities using an MTurk sample. *International Journal of Eating Disorders*. 2022 Aug 27;
76. Youl-Ri Kim MD PZABsJTPFFrcp. Atypical anorexia nervosa: Implications of clinical features and BMI cutoffs. *International Journal of Eating Disorders*. 2023 Feb 5;
77. Bargiacchi A, Clarke J, Paulsen A, Leger J. Refeeding in anorexia nervosa. *Eur J Pediatr*. 2019 Mar 12;178(3):413–22.
78. Brockmeyer T, SH, LRA, ZJ, WLW, LA, & FHC. Cognitive remediation therapy in anorexia nervosa—A randomized clinical trial. *Journal of Consulting and Clinical Psychology*. 2021;89:805–15.
79. Fisher CA, Skocic S, Rutherford KA, Hetrick SE. Family therapy approaches for anorexia Nervosa. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2019 May 1;2019(5).
80. Attia E, Steinglass JE, Timothy Walsh B, Wang Y, Wu P, Schreyer C, et al. Olanzapine versus placebo in adult outpatients with anorexia nervosa: A randomized clinical trial. *American Journal of Psychiatry*. 2019 Jun 1;176(6):449–56.
81. Born C, de la Fontaine L, Winter B, Müller N, Schaub A, Früstück C, et al. First results of a refeeding program in a psychiatric intensive care unit for patients with extreme anorexia nervosa. *BMC Psychiatry*. 2015 Mar 24;15(1).
82. Ibrahim A, Ryan S, Viljoen D, Tuisani E, Gardner L, Collins L, et al. Integrated enhanced cognitive behavioural (I-CBTE) therapy significantly improves effectiveness of inpatient treatment of anorexia nervosa in real life settings. *J Eat Disord*. 2022 Dec 1;10(1).
83. Dobner J, Kaser S. Body mass index and the risk of infection - from underweight to obesity. Vol. 24, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier B.V.; 2018. p. 24–8.
84. Gibson D, Mehler PS. Anorexia nervosa and the immune system—a narrative review. Vol. 8, *Journal of Clinical Medicine*. MDPI; 2019.
85. Raevuori A, Haukka J, Vaarala O, Suvisaari JM, Gissler M, Grainger M, et al. The increased risk for autoimmune diseases in patients with eating disorders. *PLoS One*. 2014 Aug 22;9(8).
86. Dalton B, Bartholdy S, Robinson L, Solmi M, Ibrahim MAA, Breen G, et al. A meta-analysis of cytokine concentrations in eating disorders. Vol. 103, *Journal of Psychiatric Research*. Elsevier Ltd; 2018. p. 252–64.
87. Ilzarbe L, Fàbrega M, Quintero R, Bastidas A, Pintor L, García-Campayo J, et al. Inflammatory Bowel Disease and Eating Disorders: A systematized review of comorbidity. Vol. 102, *Journal of Psychosomatic Research*. Elsevier Inc.; 2017. p. 47–53.
88. Adjoa Smalls-Mantey PhD JSMMPMJCHMMBMP. Hypothyroidism due to Hashimoto’s thyroiditis masked by anorexia nervosa. *International Journal of Eating Disorders*. 2015 May 6;
89. Schwartz GJ. Neural-Immune Gut-Brain Communication in the Anorexia of Disease.

90. Valdearcos M, Robblee MM, Benjamin DI, Nomura DK, Xu AW, Koliwad SK. Microglia Dictate the Impact of Saturated Fat Consumption on Hypothalamic Inflammation and Neuronal Function. *Cell Rep.* 2014 Dec 24;9(6):2124–38.
91. Ling Ye YHLZYLLSYZGQJCZ. Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders. *J Neurochem.* 2013 Jun 5;125(6):897–908.
92. Aviello G, Cristiano C, Luckman SM, D’Agostino G. Brain control of appetite during sickness. Vol. 178, *British Journal of Pharmacology*. John Wiley and Sons Inc; 2021. p. 2096–110.
93. Stutte S, Ruf J, Kugler I, Ishikawa-Ankerhold H, Parzefall A, Marconi P, et al. Type I interferon mediated induction of somatostatin leads to suppression of ghrelin and appetite thereby promoting viral immunity in mice. *Brain Behav Immun.* 2021 Jul 1;95:429–43.
94. Colin Reardon X, Murray K, Lomax AE. Neuroimmune Communication in Health and Disease. *Physiol Rev [Internet]*. 2018;98:2287–316. Available from: www.prv.org
95. Brain-immune interactions and implications in psychiatric disorders Interações imunocebrais e implicações nos transtornos psiquiátricos.
96. Zefferino R, Di Gioia S, Conese M. Molecular links between endocrine, nervous and immune system during chronic stress. Vol. 11, *Brain and Behavior*. John Wiley and Sons Ltd; 2021.
97. Roubalova R, Prochazkova P, Papezova H. Linking Anorexia Nervosa with the Gut Microbiota. In: *Eating Disorders*. Springer International Publishing; 2022. p. 1–27.
98. Gail A. Cresci PhD RLCEBR. Gut Microbiome. *Nutrition in Clinical Practice*. 2015 Oct 8;
99. Biasucci G, Rubini M, Riboni S, Morelli L, Bessi E, Retetangos C. Mode of delivery affects the bacterial community in the newborn gut. *Early Hum Dev.* 2010;86(SUPPL. 1):13–5.
100. Henrick BM, Rodriguez L, Lakshmikanth T, Pou C, Henckel E, Arzoomand A, et al. Bifidobacteria-mediated immune system imprinting early in life. *Cell.* 2021 Jul 22;184(15):3884–3898.e11.
101. Luciani C, Hager FT, Cerovic V, Lelouard H. Dendritic cell functions in the inductive and effector sites of intestinal immunity. Vol. 15, *Mucosal Immunology*. Springer Nature; 2022. p. 40–50.
102. Hu Y, Ketabi A, Buchko A, Gänzle MG. Metabolism of isomalto-oligosaccharides by *Lactobacillus reuteri* and bifidobacteria. *Lett Appl Microbiol.* 2013;57(2):108–14.
103. Bamola VD, Dubey D, Samanta P, Kedia S, Ahuja V, Madempudi RS, et al. Role of a probiotic strain in the modulation of gut microbiota and cytokines in inflammatory bowel disease. *Anaerobe.* 2022 Dec 1;78.
104. Silva YP, Bernardi A, Frozza RL. The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication. Vol. 11, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
105. Dave M, Higgins PD, Middha S, Rioux KP. The human gut microbiome: Current knowledge, challenges, and future directions. Vol. 160, *Translational Research*. Mosby Inc.; 2012. p. 246–57.
106. Roubalová R, Procházková P, Papežová H, Smitka K, Bilej M, Tlaskalová-Hogenová H. Anorexia nervosa: Gut microbiota-immune-brain interactions. Vol. 39, *Clinical Nutrition*. Churchill Livingstone; 2020. p. 676–84.

107. Hata T, Miyata N, Takakura S, Yoshihara K, Asano Y, Kimura-Todani T, et al. The Gut Microbiome Derived from Anorexia Nervosa Patients Impairs Weight Gain and Behavioral Performance in Female Mice. *Endocrinology*. 2019 Aug 6;160(10):2441–52.
108. Glenny EM, Fouladi F, Thomas SA, Bulik-Sullivan EC, Tang Q, Djukic Z, et al. Gut microbial communities from patients with anorexia nervosa do not influence body weight in recipient germ-free mice. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1–15.
109. MORAIS LHS a SM. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat Rev Microbiol*. 2021;19:241–55.
110. Carabotti M, Scirocco A, Antonietta Maselli M, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems [Internet]. Vol. 28. 2015. Available from: www.annalsgastro.gr
111. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: The impact of the gut microbiota on brain and behaviour. Vol. 13, *Nature Reviews Neuroscience*. 2012. p. 701–12.
112. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*. 2015 Apr 9;161(2):264–76.
113. Hajjo H, Geva-Zatorsky N. Gut microbiota – host interactions now also brain-immune axis. Vol. 62, *Current Opinion in Neurobiology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 53–9.
114. Capuco Ivan Urits Jamal Hasoon Rebecca Chun Brittany Gerald Jason Wang Hisham Kassem Anh L Ngo Alaa Abd-Elsayed Thomas Simopoulos Alan D Kaye Omar Viswanath AK, Capuco A, Urits I, Hasoon Á T Simopoulos ÁJ, Chun Á Gerald RB, Wang JK, et al. Current Perspectives on Gut Microbiome Dysbiosis and Depression. *Adv Ther* [Internet]. 37. Available from: <https://doi.org/10.6084/>
115. Morita C, Tsuji H, Hata T, Gondo M, Takakura S, Kawai K, et al. Gut Dysbiosis in Patients with Anorexia Nervosa. *PLoS One*. 2015 Dec 1;10(12).
116. Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham HP, Jegou S, Landman C, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. 2017 Jun 1;66(6):1039–48.
117. Smitka K, Prochazkova P, Roubalova R, Dvorak J, Papezova H, Hill M, et al. Current Aspects of the Role of Autoantibodies Directed Against Appetite-Regulating Hormones and the Gut Microbiome in Eating Disorders. Vol. 12, *Frontiers in Endocrinology*. Frontiers Media S.A.; 2021.
118. Mehrabadi S, Motevaseli E, Sadr SS, Moradbeygi K. Hypoxic-conditioned medium from adipose tissue mesenchymal stem cells improved neuroinflammation through alternation of toll like receptor (TLR) 2 and TLR4 expression in model of Alzheimer’s disease rats. *Behavioural Brain Research*. 2020 Feb 3;379.
119. Carding S, Verbeke K, Vipond DT, Corfe BM, Owen LJ. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb Ecol Health Dis*. 2015 Feb 2;26(0).
120. Wang J, Zheng J, Shi W, Du N, Xu X, Zhang Y, et al. Dysbiosis of maternal and neonatal microbiota associated with gestational diabetes mellitus. *Gut*. 2018 Sep 1;67(9):1614–25.

121. Prochazkova P, Roubalova R, Dvorak J, Kreisinger J, Hill M, Tlaskalova-Hogenova H, et al. The intestinal microbiota and metabolites in patients with anorexia nervosa. *Gut Microbes*. 2021;13(1):1–25.
122. Million M, Angelakis E, Maraninchi M, Henry M, Giorgi R, Valero R, et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis*, *Methanobrevibacter smithii* and *Escherichia coli*. *Int J Obes*. 2013 Nov;37(11):1460–6.
123. Ullah H, Khan A, Rengasamy KRR, Di Minno A, Sacchi R, Daglia M. The Efficacy of S-Adenosyl Methionine and Probiotic Supplementation on Depression: A Synergistic Approach. Vol. 14, *Nutrients*. MDPI; 2022.
124. Butler MJ, Perrini AA, Eckel LA. The role of the gut microbiome, immunity, and neuroinflammation in the pathophysiology of eating disorders. *Nutrients*. 2021 Feb 1;13(2):1–19.
125. Seethaler B, Basrai M, Neyrinck AM, Nazare JA, Walter J, Delzenne NM, et al. Biomarkers for assessment of intestinal permeability in clinical practice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2021 Jul 1;321(1):G11–7.
126. Lakatos PL, Kiss LS, Palatka K, Altorjay I, Antal-Szalmas P, Palyu E, et al. Serum lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 are markers of disease activity in patients with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2011 Mar;17(3):767–77.
127. Andreas Eckart 1 TS 2, AK 3, AB 2, TB 3, SZ 3, ON 3, AH 4, ZS 5, BM 6, PS 7. Relationship of Nutritional Status, Inflammation, and Serum Albumin Levels During Acute Illness: A Prospective Study. *The American Journal of Medicine*. 2020 Jul 6;133:713–22.
128. Jerkic SP, Michel F, Donath H, Herrmann E, Schubert R, Rosewich M, et al. Calprotectin as a New Sensitive Marker of Neutrophilic Inflammation in Patients with Bronchiolitis Obliterans. *Mediators Inflamm*. 2020;2020.
129. Fan Y, Støving RK, Berreira Ibraim S, Hyötyläinen T, Thirion F, Arora T, et al. The gut microbiota contributes to the pathogenesis of anorexia nervosa in humans and mice. *Nat Microbiol*. 2023 May 1;8(5):787–802.
130. Yuan R, Yang L, Yao G, Geng S, Ge Q, Bo S, et al. Features of gut microbiota in patients with anorexia nervosa. *Chin Med J (Engl)*. 2022 Aug 20;135(16):1993–2002.
131. Mehdizadeh Gohari I, A. Navarro M, Li J, Shrestha A, Uzal F, A. McClane B. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. Vol. 12, *Virulence*. Bellwether Publishing, Ltd.; 2021. p. 723–53.
132. Montalban-Arques A, Katkeviciute E, Busenhardt P, Bircher A, Wirbel J, Zeller G, et al. Commensal Clostridiales strains mediate effective anti-cancer immune response against solid tumors. *Cell Host Microbe*. 2021 Oct 13;29(10):1573-1588.e7.
133. Torres-Miranda A, Vega-Sagardía M, Garrido D. 1.17 - Probiotics, Microbiome and the Concept of Cross-Feeding. In: *Comprehensive Gut Microbiota*. Elsevier; 2022. p. 199–220.
134. Strati F, Cavalieri D, Albanese D, De Felice C, Donati C, Hayek J, et al. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*. 2017;5(1).

135. Maillet A, Krack P, Nie Lhommé E, Mé Té Reau E, Lè Ne Klinger H, Favre E, et al. The prominent role of serotonergic degeneration in apathy, anxiety and depression in de novo Parkinson's disease. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/139/9/2486/1744724>
136. Parker BJ, Wearsch PA, Veloo ACM, Rodriguez-Palacios A. The Genus *Alistipes*: Gut Bacteria With Emerging Implications to Inflammation, Cancer, and Mental Health. Vol. 11, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media S.A.; 2020.
137. Bryan Tunland. Gut Microbiota, Early Colonization and Factors in its Development that Influence Health. In: *Human Microbiota in Health and Disease*. 2016. p. 1–35.
138. P.M. Ryan, N.M. Delzenne. *Human Microbiota in Health and Disease*. In 2016.
139. Bui TPN, Shetty SA, Lagkouvardos I, Ritari J, Chamlagain B, Douillard FP, et al. Comparative genomics and physiology of the butyrate-producing bacterium *Intestinimonas butyriciproducens*. *Environ Microbiol Rep*. 2016 Dec 1;8(6):1024–37.
140. Lam YY, Ha CWY, Campbell CR, Mitchell AJ, Dinudom A, Oscarsson J, et al. Increased gut permeability and microbiota change associate with mesenteric fat inflammation and metabolic dysfunction in diet-induced obese mice. *PLoS One*. 2012 Mar 23;7(3).
141. Cui Y, Zhang L, Wang X, Yi Y, Shan Y, Liu B, et al. Roles of intestinal Parabacteroides in human health and diseases. Vol. 369, *FEMS Microbiology Letters*. Oxford University Press; 2022.
142. Henke MT, Kenny DJ, Cassilly CD, Vlamakis H, Xavier RJ, Clardy J. *Ruminococcus gnavus*, a member of the human gut microbiome associated with Crohn's disease, produces an inflammatory polysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2019;116(26):12672–7.
143. Di Lodovico L, Mondot S, Doré J, Mack I, Hanachi M, Gorwood P. Anorexia nervosa and gut microbiota: A systematic review and quantitative synthesis of pooled microbiological data. Vol. 106, *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. Elsevier Inc.; 2021.
144. Prochazkova P, Roubalova R, Dvorak J, Tlaskalova-Hogenova H, Cermakova M, Tomasova P, et al. Microbiota, microbial metabolites, and barrier function in a patient with anorexia nervosa after fecal microbiota transplantation. *Microorganisms*. 2019 Sep 1;7(9).
145. Sereme Y, Guindo CO, Filleron A, Corbeau P, Tran TA, Drancourt M, et al. Meconial *Methanobrevibacter smithii* suggests intrauterine methanogen colonization in preterm neonates. *Curr Res Microb Sci*. 2021 Dec 1;2.
146. Drancourt M, Djemai K, Gouriet F, Grine G, Loukil A, Bedotto M, et al. *Methanobrevibacter smithii* Archaemia in Febrile Patients with Bacteremia, including Those with Endocarditis. *Clinical Infectious Diseases*. 2021 Nov 1;73(9):E2571–9.
147. DiSabato DJ, Quan N, Godbout JP. Neuroinflammation: the devil is in the details. *J Neurochem*. 2016 Oct 1;139:136–53.
148. D'Mello C, Swain MG. Immune-to-brain communication pathways in inflammation-associated sickness and depression. In: *Current Topics in Behavioral Neurosciences*. Springer Verlag; 2017. p. 73–94.
149. Laugerette F, Vors C, Alligier M, Pineau G, Drai J, Knibbe C, et al. Postprandial endotoxin transporters *Ibp* and *scd14* differ in obese vs. Overweight and normal weight men during fat-rich meal digestion. *Nutrients*. 2020 Jun 1;12(6):1–12.

150. Kleppe MM, Brønstad I, Lied GA, Danielsen Y, Rekkedal G, Kessler U. Intestinal barrier integrity in anorexia nervosa (a pilot study). *International Journal of Eating Disorders*. 2022 May 1;55(5):703–8.
151. Reyes-Ortega P, Ragu Varman D, Rodríguez VM, Reyes-Haro D. Anorexia induces a microglial associated pro-inflammatory environment and correlates with neurodegeneration in the prefrontal cortex of young female rats. *Behavioural Brain Research*. 2020 Aug 17;392.
152. Bobbo VC, Engel DF, Jara CP, Mendes NF, Haddad-Tovoli R, Prado TP, et al. Interleukin-6 actions in the hypothalamus protects against obesity and is involved in the regulation of neurogenesis. *J Neuroinflammation*. 2021 Dec 1;18(1).
153. Herrera-Covarrubias D, Pérez-León CA, Fernández-Pomares C, Coria-Avila GA, Sánchez-Zavaleta V, Aranda-Abreu GE, et al. EFFECTS of OBESITY in RATS on PROSTATE HISTOLOGY and EXPRESSION of LEPTIN RECEPTOR, PROLACTIN RECEPTOR, IL-6, and NF-κB. *Exp Oncol*. 2021;43(4):317–21.
154. Jara Nedvidkova HPMH & Vratislav S. Interaction Between Serum Leptin Levels and Hypothalamo-Hypophyseal-Thyroid Axis in Patients with Anorexia Nervosa. *Endocr Res*. 2009 Jul 7;26:219–30.
155. Marco Solmi 1 PSRCAF. A case of anorexia nervosa with comorbid Crohn’s disease: beneficial effects of anti-TNF-α therapy? *International Journal of Eating Disorders*. 2013 Sep;43.
156. Escelsior A, Cogorno L, Sukkar SG, Amerio A, Donini LM, Bellomo M, et al. Anti-hypothalamus autoantibodies in anorexia nervosa: a possible new mechanism in neuro-physiological derangement? *Eating and Weight Disorders*. 2022 Oct 1;27(7):2481–96.
157. Moubayed D, Piché-Renaud PP, Provost C, Faure C, Taddeo D, Jamouille O, et al. Faecal calprotectin: Marker of intestinal inflammatory process in anorexia nervosa? A preliminary study. *European Eating Disorders Review*. 2023;
158. Sutton AK, Pei H, Burnett KH, Myers MG, Myers MG, Rhodes CJ, et al. Control of food intake and energy expenditure by Nos1 neurons of the paraventricular hypothalamus. *Journal of Neuroscience*. 2014 Nov 12;34(46):15306–18.
159. Steward T, Mestre-Bach G, Granero R, Sánchez I, Riesco N, Vintró-Alcaraz C, et al. Reduced Plasma Orexin-A Concentrations are Associated with Cognitive Deficits in Anorexia Nervosa. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1).
160. *International Journal of Eating Disorders Regular Article* Changes of orexin A plasma levels in girls with anorexia nervosa during eight weeks of realimentation† Jiri Bronsky MD PJNPHKP-MVMJSMJKMRKMP. Changes of orexin A plasma levels in girls with anorexia nervosa during eight weeks of realimentation†. *International Journal of Eating Disorders*. 2010 Oct 26;
161. Pinos H, Sánchez-Serrano R, Carrillo B, Fernández-García JM, García-Úbeda R, de Paz A, et al. Activity-based anorexia alters hypothalamic POMC and orexin populations in male rats. *Behavioural Brain Research*. 2023 Jan 5;436.
162. Herpertz-Dahlmann B, Seitz J, Baines J. Food matters: how the microbiome and gut–brain interaction might impact the development and course of anorexia nervosa. Vol. 26, *European Child and Adolescent Psychiatry*. Dr. Dietrich Steinkopff Verlag GmbH and Co. KG; 2017. p. 1031–41.

163. Clauss M, Gérard P, Mosca A, Leclerc M. Interplay Between Exercise and Gut Microbiome in the Context of Human Health and Performance. Vol. 8, *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A.; 2021.
164. Tirelle P, Breton J, Kauffmann A, Bahlouli W, L'Huillier C, Salameh E, et al. Gut microbiota depletion affects nutritional and behavioral responses to activity-based anorexia model in a sex-dependent manner. *Clinical Nutrition*. 2021 May 1;40(5):2734–44.
165. Landry T, Shookster D, Chaves A, Free K, Nguyen T, Huang H. Exercise increases NPY/AgRP and TH neuron activity in the hypothalamus of female mice. *Journal of Endocrinology*. 2022 Mar 1;252(3):167–77.
166. Smitka K, Papezova H, Vondra K, Hill M, Hainer V, Nedvidkova J. The role of 'mixed' orexigenic and anorexigenic signals and autoantibodies reacting with appetite-regulating neuropeptides and peptides of the adipose tissue-gut-brain axis: Relevance to food intake and nutritional status in patients with anorexia nervosa and bulimia nervosa. Vol. 2013, *International Journal of Endocrinology*. 2013.
167. Bjørnebekk A, Mathé AA, Brené S. Running has differential effects on NPY, opiates, and cell proliferation in an animal model of depression and controls. *Neuropsychopharmacology*. 2006 Feb;31(2):256–64.
168. Xia B, Zhong R, Wu W, Luo C, Meng Q, Gao Q, et al. Mucin O-glycan-microbiota axis orchestrates gut homeostasis in a diarrheal pig model. *Microbiome*. 2022 Dec 1;10(1).
169. Grigioni S, Achamrah N, Chan P, Guérin C, Bôle-Feysot C, Delay J, et al. Intestinal permeability and appetite regulating peptides-reactive immunoglobulins in severely malnourished women with anorexia nervosa. *Clinical Nutrition*. 2022 Aug 1;41(8):1752–8.

9 Přílohy

9.1 Dotazníkové šetření EDE-Q



Eating Disorder examination questionnaire (EDE-Q 6.0)

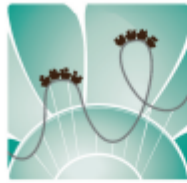
Instructions: The following questions are concerned with the past four weeks (28 days) only.

Please read each question carefully. Please answer all the questions. Thank you.

Questions 1 to 12: Please circle the appropriate number on the right. Remember that the questions only refer to the past four weeks (28 days) only.

	ON HOW MANY OF THE PAST 28 DAYS ...	NO DAYS	1-5 DAYS	6-12 DAYS	13-15 DAYS	16-22 DAYS	23-27 DAYS	EVERY DAY
1	Have you been deliberately trying to limit the amount of food you eat to influence your shape or weight (whether or not you have succeeded)?	0	1	2	3	4	5	6
2	Have you gone for long periods of time (8 waking hours or more) without eating anything at all in order to influence your shape or weight?	0	1	2	3	4	5	6
3	Have you tried to exclude from your diet any foods that you like in order to influence your shape or weight (whether or not you have succeeded)?	0	1	2	3	4	5	6
4	Have you tried to follow definite rules regarding your eating (for example, a calorie limit) in order to influence your shape or weight (whether or not you have succeeded)?	0	1	2	3	4	5	6
5	Have you had a definite desire to have an empty stomach with the aim of influencing your shape or weight?	0	1	2	3	4	5	6
6	Have you had a definite desire to have a totally flat stomach?	0	1	2	3	4	5	6
7	Has thinking about food, eating or calories made it very difficult to concentrate on things you are interested in (for example, working, following a conversation, or reading)?	0	1	2	3	4	5	6
8	Has thinking about shape or weight made it very difficult to concentrate on things you are interested in (for example, working, following a conversation, or reading)?	0	1	2	3	4	5	6
9	Have you had a definite fear of losing control over eating?	0	1	2	3	4	5	6
10	Have you had a definite fear that you might gain weight?	0	1	2	3	4	5	6
11	Have you felt fat?	0	1	2	3	4	5	6
12	Have you had a strong desire to lose weight?	0	1	2	3	4	5	6

PAGE 1/3 PLEASE GO TO THE NEXT PAGE



Eating Disorder examination questionnaire (EDE-Q 6.0)

Questions 13-18: Please fill in the appropriate number in the boxes on the right. Remember that the questions only refer to the past four weeks (28 days).

Over the past four weeks (28 days)....

13	Over the past 28 days, how many times have you eaten what other people would regard as an unusually large amount of food (given the circumstances)?	
14	... On how many of these times did you have a sense of having lost control over your eating (at the time you were eating)?	
15	Over the past 28 days, on how many DAYS have such episodes of overeating occurred (i.e. you have eaten an unusually large amount of food and have had a sense of loss of control at the time)?	
16	Over the past 28 days, how many times have you made yourself sick (vomit) as a means of controlling your shape or weight?	
17	Over the past 28 days, how many times have you taken laxatives as a means of controlling your shape or weight?	
18	Over the past 28 days, how many times have you exercised in a "driven" or "compulsive" way as a means of controlling your weight, shape or amount of fat, or to burn off calories?	

Questions 19 to 21: Please circle the appropriate number. Please note that for these questions the term "**binge eating**" means eating what others would regard as an unusually large amount of food for the circumstances, accompanied by a sense of having lost control over eating.

		NO DAYS	1-5 DAYS	6-12 DAYS	13-15 DAYS	16-22 DAYS	23-27 DAYS	EVERY DAY
19	Over the past 28 days, on how many days have you eaten in secret (ie, furtively)? ... Do not count episodes of binge eating.	0	1	2	3	4	5	6
		NONE OF THE TIMES	A FEW OF THE TIMES	LESS THAN HALF	HALF OF THE TIMES	MORE THAN HALF	MOST OF THE TIME	EVERY TIME
20	On what proportion of the times that you have eaten have you felt guilty (felt that you've done wrong) because of its effect on your shape or weight? ... Do not count episodes of binge eating.	0	1	2	3	4	5	6
			NOT AT ALL	SLIGHTLY	MODERATELY	MARKEDLY		
21	Over the past 28 days, how concerned have you been about other people seeing you eat? ... Do not count episodes of binge eating.	0	1	2	3	4	5	6

PAGE 2/3 PLEASE GO TO THE NEXT PAGE



Eating Disorder examination questionnaire (EDE-Q 6.0)

Questions 22 to 28: Please circle the appropriate number on the right. Remember that the questions only refer to the past four weeks (28 days).

ON HOW MANY OVER THE PAST 28 DAYS ...		NOT AT ALL	SLIGHTLY	MODERATELY	MARKEDLY			
22	Has your weight influenced how you think about (judge) yourself as a person?	0	1	2	3	4	5	6
23	Has your shape influenced how you think about (judge) yourself as a person?	0	1	2	3	4	5	6
24	How much would it have upset you if you had been asked to weigh yourself once a week (no more, or less, often) for the next four weeks?	0	1	2	3	4	5	6
25	How dissatisfied have you been with your weight ?	0	1	2	3	4	5	6
26	How dissatisfied have you been with your shape ?	0	1	2	3	4	5	6
27	How uncomfortable have you felt seeing your body (for example, seeing your shape in the mirror, in a shop window reflection, while undressing or taking a bath or shower)?	0	1	2	3	4	5	6
28	How uncomfortable have you felt about others seeing your shape or figure (for example, in communal changing rooms, when swimming, or wearing tight clothes)?	0	1	2	3	4	5	6

What is your weight at present? (Please give your best estimate.):

What is your height? (Please give your best estimate.):

If female: Over the past three to four months have you missed any menstrual periods?: YES NO

If so, how many?:

Have you been taking the "pill"?: YES NO

PAGE 3/3

THANK YOU