

**Univerzita Karlova v Praze**  
**1. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Anorexia nervosa – vybrané genetické determinanty a endofenotypy**

**Mgr. Deborah Kaminská**

**2013**

**Doktorské studijní programy v biomedicíně**  
*Univerzita Karlova v Praze a Akademie věd České republiky*

*Obor:* Lékařská psychologie a psychopatologie

*Předseda oborové rady:* Prof. MUDr. Jiří Raboch, DrSc

*Školící pracoviště:* Psychiatrická klinika 1. lékařské fakulty  
Univerzity Karlovy v Praze

*Školitel:* Prof. MUDr. Hana Papežová, CSc

*Oponenti:* Doc. MUDr. Alice Baxová, CSc  
Prof. MUDr. Karel Pacák, DrSc

Disertační práce bude nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněna k nahlížení veřejnosti v tištěné podobě na Oddělení pro vědeckou činnost a zahraniční styky Děkanátu 1. lékařské fakulty.

## Souhrn

Anorexia nervosa (AN) a bulimia nervosa (BN) jsou choroby se značnými individuálními odchylkami. Genetické pozadí hraje důležitou roli v náchylnosti ke vzniku a závažnosti onemocnění. Pro vyhodnocení vztahu mezi genetickými faktory a subtypy onemocnění jsme použili genotypizaci a zároveň analýzu vývoje vybraných klinických parametrů. Sledovali jsme skupinu 75 pacientů s AN (1. studie), 127 pacientů s AN a BN (2. studie), diagnostikovaných podle DSM-4 a MKN-10 a přispěli do souboru GWAS, který čítá 2907 pacientek s AN. Výsledky 1. studie podporují asociaci polymorfizmu -1438G/A v serotoninovém receptoru 5-HT<sub>2A</sub> s onemocněním AN a přináší srovnání s jinými studiemi pomocí metaanalýzy. U dalších polymorfizmů odpovědných za neurotransmisi serotoninu (serotoninový transportér 5-HTT: polymorfizmus LPR a VNTR). Tato studie nastínila odlišný trend asociace LPR s onemocněním AN u české populace než ostatní publikované studie. U 5-HTT VNTR polymorfizmu nebyla pozorována žádná asociace. 2. studie se zabývala vlivem hemoxygenázy-1 (zásadní protektivní faktor při metabolickém stresu) na poruchy příjmu potravy v interakci s environmentálními vlivy. Zkoumali jsme rizika pro AN a BN založená na genetických lokusech, odpovědných za zvýšenou náchylnost k onemocnění i přidaný efekt environmentálních rizikových stresových faktorů.

**Klíčová slova:** Anorexia a bulimia nervosa – genotypizace – endofenotypy – environmentální stresové faktory - serotonin – hemoxygenáza-1 – asociační studie

## **Summary**

Anorexia Nervosa (AN) and Bulimia Nervosa (BN) are diseases with considerable individual variation. Genetic background plays an important role in disease susceptibility and severity. To evaluate the relationship between certain genetic loci and diseases subtypes we genotyped and analysed evolution of selected clinical parameters. We investigated a group of 75 patients with AN (1. study), 127 DSM-4 and ICD-10 diagnosed patients with AN and BN (2. study), and contributed to sample of 2907 AN patient. Results from the 1st study support association of polymorphism - 1438G/A in serotonin receptor 5-HT<sub>2A</sub> with AN and compare the results from other studies with metaanalysis. In next, polymorphism responsible for the serotonin neurotransmission (serotonin transporter 5-HTT, polymorphisms LPR and VNTR) the study shows different association trend of LPR with AN in Czech population compared to other studies. 5-HTT VNTR polymorphism had no observed association. 2. study investigated the role of hemeoxygenase 1 (plays a pivotal role in metabolic stress protecting cells) in eating disorders, in interaction with enviromental stress. We investigated the usefulness of an aggregate measure of the risks of AN and BN that is based on genetic susceptibility loci and the added effect of environmental stress risk factors.

## **Key words**

Anorexia and Bulimia Nervosa – Genotypization – Endofenotypes – Enviromental Stress Factors - Serotonin – Heme oxygenase-1 – Association studies

## Obsah:

<b>SOUHRN .....</b>	<b>3</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>4</b>
<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>6</b>
<b>1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY PORUCH PŘÍJMU POTRAVY .....</b>	<b>7</b>
1.1. Poruchy příjmu potravy .....	7
1.2. Základní charakteristika .....	7
1.3. Studium genetických determinant poruch příjmu potravy .....	7
<b>2. CÍLE A HYPOTÉZY.....</b>	<b>10</b>
<b>3. METODIKA .....</b>	<b>11</b>
4.1. Nemocní a kontrolní skupina .....	11
4.2. Dotazníky .....	11
4.3. Metody molekulárně-genetické .....	12
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>13</b>
4.1. Publikace 1: Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies. ....	14
4.2. Publikace 2: Stress perception and (GT) <sub>n</sub> repeat polymorphism in HO-1 gene are both risk factors in eating disorder development. ....	17
4.3. Publikace 3: Genetické aspekty poruch příjmu potravy. ....	20
<b>5. DISKUSE .....</b>	<b>21</b>
<b>6. ZÁVĚRY .....</b>	<b>23</b>
<b>8. POUŽITÁ LITERATURA (ZKRÁCENÝ SEZNAM) .....</b>	<b>25</b>
<b>9. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA .....</b>	<b>30</b>
9.1. Publikace, které jsou podkladem dizertace .....	30
1.2. Další publikace .....	30

## Seznam použitých zkratk

**AN**, anorexia nervosa

**BN**, bulimia nervosa

**EDTA**, ethylene diamine tetraacetic acid, kyselina ethylendiamintetraacetová

**BMI**, body mass index, podíl tělesné hmotnosti (kg) a druhé mocniny výšky (m<sup>2</sup>)

**DNA**, deoxyribonukleová kyselina

**PCR**, polymerase chain reaction, polymerázová řetězová reakce

**RFLP**, restriction fragment length polymorphism, polymorfismus délky restričních fragmentů, metoda DNA analýzy

**SD**, standard deviation score, skóre směrodatné odchylky

**5-HT**, 5-hydroxytryptamin, serotonin

**5-HTT**, serotoninový transportér

**5-HT2A**, serotoninový receptor 2A

**PPP**, poruchy příjmu potravy,

**LPR**, linked polymorphic region,

**VNTR**, variable number of tandem repeats,

**OR**, odds ratio

**SNP** – single nucleotide polymorphism, záměna jednoho nukleotidu

**GWAS** – genome wide association study, celogenomová asociační studie

**BDNF** – brain derived neurotrophic factor – neurotrofní faktor mozku

**HO-1** – hemoxygenáza-1

**bp** – base pair, páry bazí v DNA

# 1. ÚVOD DO PROBLEMATIKY PORUCH PŘÍJMU POTRAVY

## 1.1. Poruchy příjmu potravy

Mentální anorexie (AN) a bulimia nervosa (BN) i psychogenní přejídání (BED) jsou závažné poruchy ze spektra poruch příjmu potravy (PPP) s abnormálním jídelním chováním, hladověním a/nebo přejídáním, purgativními, kompenzačními mechanismy a poruchou vnímání vlastního těla (DSM-IV i ICD-10). Příčiny jejich vzniku jsou multifaktoriální. Při dlouhodobém průběhu (v průměru 6 let) se postupně rozvíjejí vážné následky somatické, psychiatrické i sociální, které vyžadují komplexní znalosti i léčbu.

## 1.2. Základní charakteristika

Anorexia nervosa (AN) reprezentuje nejzávažnější psychiatrické onemocnění ze spektra poruch příjmu potravy, je charakterizována patologickým jídelním chováním s neschopností udržet normální, zdravou tělesnou hmotnost. AN se převážně vyskytuje u žen a je charakterizována restrikcí příjmu potravy (u restriktivní formy) a purgativním chováním (u formy purgativní), obsedantním strachem z nadváhy, patologickým vnímáním vlastního těla (body image) a dalšími mnohočetnými somatickými, hormonálními, psychologickými a sociálními komplikacemi (Fairburn and Harrison, 2003). Váha je udržována nejméně 15 % pod očekávanou (buď ztracenou nebo nikdy nedosaženou) hmotností, nebo Queteletův body-mass index je 17,5 nebo méně. Prepubertální pacienti nedosahují očekávaného nárůstu hmotnosti v období růstu. Ztrátu hmotnosti si navozuje pacient sám dietami, vyhýbáním se "kalorickému jídlu, které vede k tloušťnutí" a/nebo jedním či více dalšími purgativními mechanismy: navozovaným zvracením, excesivním cvičením, užíváním látek potlačujících chuť k jídlu a/nebo projímadly a diuretiky. Změněné vnímání vlastního těla u nemocných s AN reprezentuje specifickou psychopatologii: s narůstající podvýživou, přetrvává pocit pacienta, že je příliš silný. Typická je i velmi nízká cílová hmotnost. AN také vede k endokrinní poruše hypotalamo-hypofyzární-nadledvinové osy, charakterizované amenoreou u žen, často "maskovanou" hormonální substituční terapií a u mužů ztrátou sexuálního zájmu a potence. Zvýšené hladiny růstového hormonu, kortisolu a snížení hladin tyroidálních hormonů a abnormality v sekreci inzulínu jsou také typické. Zpoždění nebo zastavení pubertálních změn (růst, rozvoj prsou a genitálií) je patrné u pacientů prepubertálních (ICD-10,2004, DSM-IV-TM 2000).

## 1.3. Studium genetických determinant poruch příjmu potravy

Genetický výzkum obvykle začíná hledáním zvýšeného výskytu určitého znaku onemocnění v rodinách. Nejinak tomu bylo i v hledání genetických determinant (predispozic) u poruch příjmu potravy (dále PPP). Již v sedmdesátých letech Theander (1970) publikoval studii, kde 6,6 % sourozenců u 94 sledovaných pacientek s AN trpělo tímž onemocněním. O 10 let později Crisp et al. (1980) zjistil pravděpodobný výskyt AN u matky v anamnéze u 14 % pacientek s diagnózou PPP. V 90. letech Strober et al. (1990) upozornil, že v jeho souboru trpělo AN 6,2 % matek sledovaných pacientek s AN a 2 % jejich sester. Dle Hsu (1990) se v rodinách pacientek s AN a BN vyskytují poruchy příjmu potravy pětikrát častěji, než v běžné populaci. Studie rodin mohou ovšem nejvýše ukázat, že daný znak se vyskytuje častěji u příbuzných než v kontrolní populaci. To ale není důkazem genetického

původu. Podobnost příbuzných může mít i negenetické příčiny – vlivy prostředí - např. infekce, dieta, kulturní zvyky, stresové faktory, apod.

Některé asociační studie poukazují na existenci „susceptibility loci“ na chromozomu 10 pro BN a chromozomu 1 pro AN (Bergen et al., 2003; Bulik a Tozzi, 2004). Celogenomové asociační studie vedou k odhalení nových kandidátních genů. Záleží však na složení studovaných skupin, jsou-li výsledky replikovány (Kas et al., 2008; Root et al., 2011).

### 1.3.1. Role serotoninu

Při studiu PPP se stále více zaměřuje pozornost na roli serotoninu. Serotoninergní systém ovlivňuje nálady, vnímání, cirkadiální a neuroendokrinní rytmy včetně příjmu potravy a spánku. V kontextu příjmu potravy serotonin zprostředkovává pocit sytosti a částečně reguluje příjem sacharidů (Kocourková et al., 1997). BN je spojována s deficitem serotoninergní aktivity v CNS, následného oslabení pocitu sytosti a záchvaty přejídání. Tímto zjednodušeným mechanismem lze částečně vysvětlit pozitivní výsledky léčby SSRI (serotonin reuptake inhibitors) u tohoto onemocnění. AN je naopak spojena se zvýšenou senzitivou nebo zvýšenou koncentrací serotoninu, následným omezením příjmu jídla a poklesu tělesné hmotnosti (Gordwood et al., 2003; Murphy et al., 2008; Kaye et al., 2008)..

Serotonin je syntetizován z tryptofanu. Dlouhodobé hladovění může vést ke snížení množství potravy přijatého tryptofanu. Tryptofanová deplece redukuje serotoninovou syntézu a dostupnost serotoninu v mozku. Aktivita serotoninu je ukončena jeho zpětným vychytáváním (reuptake) serotoninovým transportním proteinem. Polymorfismus LPR (length polymorphic region) v genu pro serotoninový transporter se nachází v regulační oblasti genu pro serotoninový transportér. Je charakterizován variantními repetitivními elementy a funkční studie jednotlivých variant dokumentují vliv na expresi serotoninového transportéru. (Heils et al., 1996). Repetitivní sekvence genu (LPR, VNTR) 5-HTT působí jako represory promotorové aktivity a alelické varianty vykazují různou míru exprese serotoninového transportéru. Tím se mohou modulovat komplexní znaky a chování (Heils et al., 1996) i u poruch příjmu potravy. Serotoninový transportér 5-HTT vykazuje LPR polymorfismus s S či L (short/long) genotypem v promotorové oblasti genu serotoninového transportéru. Čtyři studie zaměřené na rozšíření S alely promotorové oblasti genu pro serotoninový transportér u pacientů s AN (Di Bella et al., 2000; Sundaramurthy et al., 2000) odhalily vyšší výskyt S alely u pacientů než u kontrol ve všech čtyřech případech. Statisticky signifikantní spojitost mezi S alelou a AN odhalila ovšem pouze jedna studie. S alela promotorové oblasti genu pro serotoninový transportér snižuje transkripční aktivitu a vede k nižší expresi serotoninového transportéru (Heils et al., 1996). Touto cestou se očekává ovlivnění efektu SSRI u PPP. Objasnění individuálně odlišné vnímavosti a odpovědi na léčbu, která je způsobena genetickými faktory predisponujícími jedince k odlišnostem v metabolismu léčiva, mohou v budoucnosti umožnit lepší využití medikamentů včetně SSRI. Genetický polymorfismus serotoninového transportéru může ovlivnit množství fenotypových projevů včetně anxiety, afektivních poruch a poruch PPP. Polymorfismus LPR (length polymorphic region) v genu pro serotoninový transportér se nachází v regulační oblasti genu pro serotoninový transportér. Je charakterizován variantními repetitivními elementy a funkční studie jednotlivých variant dokumentují vliv na expresi serotoninového transportéru. (Heils et al., 1996).



Dalším ze studovaných článků serotoninergní metabolické dráhy a jedním z prvních kandidátních genů poruch příjmu potravy je serotoninový receptor 5-HT<sub>2A</sub> (Hinney et al., 1997). Velký zájem vzbudila asociace polymorfizmu -1438G/A s rizikem vzniku onemocnění AN, což bylo potvrzeno několika metaanalýzami (Gordwood et al., 2003; Martásková et al., 2009). Kromě významně častějšího výskytu alely A u pacientek s AN ve srovnání s kontrolami, byl polymorfizmus -1438G/A pozorován jako modulátor asociovaný s pozdějším věkem nástupu onemocnění.

### 1.3.2. Hemoxygenáza-1

Hemoxygenáza 1 (HO-1 či HMOX-1) je klíčovým enzymem degradace hemu, katalyzuje oxidativní změnu hemu na biliverdin, Fe<sup>2+</sup> a CO. Následná rychlá přeměna biliverdinu na bilirubin je katalyzována biliverdinreduktázou, která je vždy přítomna v nadbytku. HO-1 je tedy jediným enzymem, který kontroluje výši produkce bilirubinu (Tenhunen et al., 1968; Abraham and Kappas, 2008). Kromě role, kterou tento enzym hraje tím, že katalyzuje degradaci hemu, produkty této reakce (CO, biliverdin, bilirubin) jsou velmi důležité v procesu udržování buněčné homeostázy a regulaci buněčného metabolismu (Shibara et al., 1987). HO-1 je exprimována v řadě metabolicky aktivních tkání a účastní se antioxidačních, antiproliferativních a protizánětlivých procesů s jedním společným cílem, chránit buňku proti oxidativnímu stresu (Abraham and Kappas, 2008; Tenhunen et al., 1969; Grochot-Przeczek et al., 2012; Exner et al., 2004; Exner et al., 2006; Poss and Tonegawa, 1997). V promotéru genu pro HO-1 je polymorfní místo s různým množstvím opakujících se následných sekvencí dvojice nukleotidů GT. *In vitro* studie ukazují snižující se transkripční aktivitu variant s narůstajícím počtem GT opakování (alela L), která je naopak nejvyšší u varianty s krátkým GT opakováním (alela S). Takto je ovlivněna odpověď na oxidativní stres (viz Obr. 1). (Chen et al., 2002; Yamada et al., 2000; Taha, et al., 2010). Existuje několik klasifikací, kdy nejčastějšími alelami jsou alely s počtem opakování 23 a 30 (Baan et al., 2004; Schillinger et al., 2004; Yamada et al., 2000).

### 1.3.3. BDNF

Gen pro BDNF kóduje důležitý neurotrofní faktor, který hraje podstatnou úlohu v synaptické plasticitě a vývoji neuronů (Thoenen, 2005). Na myším modelu bylo prokázáno, že histamin zvyšuje obsah BDNF v hypothalamu (Gotoh et al., 2013). Varianta Val66Met v genu pro BDNF byla asociována s AN a BN v osmi různých evropských populacích (Ribases et al., 2005). Tyto nálezy nebyly potvrzeny v japonské populaci (Ando et al., 2012). Mercader se spolupracovníky (2007) popsali, že koncentrace BDNF v krvi je u nemocných s AN a BN asociována s genetickou variabilitou genu pro BDNF. Dvě rozsáhlé studie v britské ženské populaci prokázaly vazbu mezi BDNF polymorfizmem Val66Met a BMI (Shugart et al., 2009).

## **2. CÍLE A HYPOTÉZY**

**2.1.** Cílem práce bylo založit databázi pacientek léčených v Centru pro poruchy příjmu potravy k iniciaci genetických studií, zaměřených na hledání nových endofenotypů, kterému se pracoviště dlouhodobě věnovalo (výzkum bolesti, hyperaktivity, sebepoškozování).

**2.2.** Potvrdit, poprvé v českém písemnictví, význam genetických korelátů u neurotransmiteru serotoninu u pacientek s AN a BN (serotonin se podílí na vnímání hladu, sytosti i zvýšeného prahu bolesti u AN).

**2.3.** Hledat zcela nové genetické vlivy (HO-1 v interakci s vlivem prostředí stresových faktorů, zjišťovaných subjektivní dotazníkovou metodou ve srovnání s objektivizovaným monitorováním stresových faktorů) a postupně monitorovat význam dalších genetických faktorů u různých diagnostických subtypů a průběhů onemocnění (BDNF a kognitivní funkce).

*Testovali jsme hypotézy, že:*

**2.4.** slovanská populace pacientek s AN má podobné genetické pozadí v serotogenní signalizaci jako populace nemocných v dosud publikovaných pracích (Francie, USA, Japonsko a další).

**2.5.** na ovlivnění projevů AN a BN onemocnění se podílí enzym HO-1, která má zásadní protektivní roli při metabolickém stresu a nebyla u tohoto onemocnění nikdy sledována.

**2.6.** HO-1 polymorfismy mohou vést u poruch příjmu potravy k různému vnímání environmentálního stresu a tím ovlivnit vznik i závažnost onemocnění.

**2.7.** existují další kandidátní geny, přispívající ke genetickému riziku onemocnění, které lze odhalit pomocí širokého homogenního souboru při celosvětové mezinárodní spolupráci (GWAS).

### 3. METODIKA

#### 3.1. Nemocní a kontrolní skupina

##### 3.1.1. Charakteristika sledované skupiny nemocných

Do této skupiny bylo zařazeno 75 nemocných s diagnózou AN (diagnóza na základě kritérií DMS-IV a ICD-10, Americká psychiatrická asociace) v 1. studii. Ve 2. studii bylo zařazeno 127 pacientek s AN i BN. Ve 3. studii GWAS jsme připěli do celkového vzorku 2907 pacientek s AN. Všichni nemocní byli zařazeni do skupiny během hospitalizace na Psychiatrické klinice 1. LF UK a VFN v Praze. BMI byl stanoven na počátku hospitalizace. Odběr periferní krve ke genotypizaci byl proveden v době hospitalizace a dotazník byl vyplněn v prvním týdnu hospitalizace. První studie byla provedena u 75 pacientů s AN (s průměrným věkem  $25,4 \pm 6,2$  let). Kontrolní skupina sestávala z 65 zdravých osob (s průměrným věkem  $25,8 \pm 5,1$  let). Druhá studie s rozšířením souboru byla provedena u 127 nemocných a u 78 kontrol s průměrným věkem  $25 \pm 7,1$  let u pacientů a  $26 \pm 5,1$  let u kontrol). Minimální věk pacientek byl 17 let a maximální věk 43 let.

##### 3.1.2. Charakteristika kontrolní skupiny

Náhodně vybrané studentky, středoškolačky a vysokoškolačky různých oborů. Upoutávka pro účast ve studii byla provedena pomocí plakátů rozmístěných ve školách, účast v kontrolní skupině nebyla honorována.

#### 3.2. Dotazníky

##### 3.2.1. Dotazník EDE-Q; (Fairburn a Beglin, 1994; viz příloha 1)

obsahuje 41 položek k posuzování klíčových vlastností a psychopatologie PPP. EDE-Q se skládá ze čtyř podškál: 1. Restrikce, 2. Zaujetí hmotností, 3. Zaujetí tělesnými tvary, 4. Obavy z jídla. Celkové skóre se vypočítá jako součet průměrů všech úrovní (škála 1 až 4).

##### 3.2.2. Social Readjustment Rating Scale (SRRS) - the Holmes and Rahe Stress Scale

Dotazník byl vyvinut psychologem T. J. Holmesem a R. Rahe (1967). Sestavili seznam závažných životních situací (stresových), které mají vliv na duševní zdraví jedince a seřadili je podle závažnosti. Vycházeli ze zdravotní dokumentace více než 5,000 somatických pacientů, u kterých zjišťovali, jak se u nich mohly stresové události podílet na vzniku onemocnění. Pozitivní korelace mezi jejich životními událostmi a onemocněním byla 0.118. Původní dotazník byl postupně upravován a validizován (stupnice závažnosti jednotlivých událostí se může měnit s časem i transkulturně; Holmes and Rahe, 1967; Rahe et al., 1970; Rahe et al., 1972; Rahe and Artur, 1978; <http://encyclopedia.thefreedictionary.com/Social+Readjustment+111Rating+Scale>).

My jsme použili dotazník se 49 položkami. Dotazník byl přeložen z anglického jazyka dvěma nezávislými překladateli. Třetí nezávislý překladatel zajistil zpětný překlad českého textu zpět do anglického jazyka. Doktorandka se překladu ani jeho zpětné verifikace neúčastnila. Srovnání textu výchozího a textu získaného zpětným překladem nevedlo k výrazným změnám. Kalkulace celkového skóre spočívá v originálních pracech v součtu všech "jednotek životních událostí". Skóre nad 300 znamená výrazné individuální riziko pro vznik onemocnění, skóre mezi 150 a 299 znamená mírné riziko onemocnění a pod 150 je riziko nízké. Pro účely 2. studie bylo zpracování dotazníku modifikováno.

### **3.3. Metody molekulárně-genetické**

#### **3.3.1. Izolace genomové DNA**

Izolace genomové DNA z leukocytů periferní krve byla provedena standardní metodou vysolování. Koncentrace a kvalita izolované DNA byla stanovena na spektrofotometru NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific).

#### **3.3.2. Analýza polymorfizmu -1438 G/A v promotoru genu pro serotoninový receptor HT2A**

Polymorfismus -1438 G/A, jež se nachází v regulační oblasti genu pro serotoninový receptor 5HT2A byl analyzován pomocí PCR reakce a následné restrikční analýzy. Primery pro PCR reakci a restrikční endonukleáza byly použity podle Ricca et al, 2004. Jedná se o dvojici primerů 1438G/A forward: 5'-AAGCTGCAAGGTAGCAACAGC-3' a 1438G/A revers: 5'-AACCAACTTATTTCTACCAC-3'. PCR produkt byl následně štěpen přidáním restrikční endonukleázy MspI. Štěpené produkty byly separovány elektroforeticky na 2,5% agarózovém gelu (BioRad). V případě výskytu alely A zůstane fragment nenaštipaný (468 bp), zatímco přítomnost G alely generuje fragmenty o velikosti 244 a 224 bp.

#### **3.3.3. Analýza polymorfizmů LPR a VNTR genu pro serotoninový transportér 5-HTT**

Pro genotypizaci varianty LPR byla použita modifikovaná metodika (Betancour 2002) s primery LPR forward: 5'-GGCGTTGCCGCTCTGAATG-3' a LPR revers: 5'-GAGGGACTGAGCTGGACAACCAC-3'. PCR reakcí byly amplifikovány dlouhá (L, 528 bp) a krátká (S, 484bp) alela. Amplifikovaný PCR produkt byl separován elektroforeticky na 3% agarózovém gelu na L a S alely a vizualizován pomocí fluorescenční barvy GelRed (Biotium, Inc.). Polymorfismus VNTR (variable nukleotid tandem repeats) byl analyzován za stejných podmínek s výjimkou teploty annealingu, která činila 63 °C a sekvence primerů (Betancour, 2002, modifikováno):

VNTR Forward: 5'-GCTGTGGACCTGGGCAATGT-3'

VNTR Revers: 5'-AGTGAAGACTGAAAAGACATAATC-3'.

#### **3.3.4. Analýza polymorfizmu v genu HO1**

Genomová DNA byla běžným způsobem izolována z leukocytů periferní krve. Oblast promótoru genu HMOX1 obsahující (GT)*n* repetice byla amplifikována pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s použitím fluorescenčně značeného sense primeru (HMOX1\_S 5-AGAGCCTGCAGCTTCTCAGA-3) a antisense primeru (HMOX1\_AS 5-ACAAAGTCTGGCCATAGGAC-3) (Kra let al., 2011). Délky produktů PCR byly analyzovány na DNA sekvenátorech Li-cor 4200 (LI-COR Biosciences, USA) a ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA).

#### **3.3.5. Polymorfismus G196A (rs6265) v genu pro BDNF (brain-derived neurotrophic factor)**

Genotypizace varianty rs6265 byla převzata podle Chou et al. (2004) za použití primerů: BDNF forward: 5'AGAGGCTTGACATCATTGGCT-3 BDNF revers: 5'-GACTACTGAGCATCACCTGG-3'. PCR produkt byl následně štěpen přidáním endonukleázy Nla (Biolabs). Štěpené produkty byly separovány elektroforeticky na 2,5% agarózovém gelu (BioRad). Nenaštěpená divoká type alela G obsahuje 136 bp, naštěpená alela A 98 a 38 bp.

#### 4. VÝSLEDKY

**Předmětem disertační práce jsou dvě publikace v časopise s impakt faktorem a kapitola v knize:**

**Martásková D**, Šlachtová L, Kemlink D, Záhoráková D, Papežová H: Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies. *Folia Biologica* 55, 192-197, 2009 (*IF* = 0,924)

Šlachtová L, **Kaminská D**, Chval M, Králík L, Martásek P, Papežová H: Stress perception and (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphism in HO-1 gene are both risk factors in eating disorder development. *Folia Biologica*, *in press*, (*IF* 2012 = 1,219)

**Martásková D**, Papežová H: Genetické aspekty poruch příjmu potravy *In*: Papežová (Ed.). *Spektrum poruch příjmu potravy*, Grada 2010, 56-61.

**Odkazují současně i na problematiku, jejíž řešení bylo umožněno založením DNA banky nemocných s poruchami příjmu potravin a zdravých dobrovolníků, na zahrnutí českého souboru nemocných do významné celosvětové genetické studie a dále na probíhající výzkum role BDNF v patogenezi PPP.**

Boraska V, Franklin CS, Floyd JAB, et al. A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, *in admission (revised resubmission*, *IF* 2012 = 14,897)

Papežová a kol. The role of genotypes of BDNF in anorexia and bulimia nervosa subtypes phenotypization. (*Publikace v přípravě, plánováno zaslání do časopisu Journal of Psychiatric Research*, *IF* = 4,066)

**4.1. Martásková D, Šlachtová L, Kemlink D, Záhoráková D, Papežová H:** Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies. *Folia Biologica* 55, 192-197, 2009 (*IF* = 0,924)

### **Abstrakt**

Anorexia nervosa (AN) je velmi vážné psychiatrické onemocnění charakterizované neschopností udržet normální tělesnou hmotnost. Nejčastěji se vyskytuje u žen a je charakterizována restrikcí příjmu potravy a obsedantním strachem z nadváhy. Patogeneze je multifaktoriální s jasnou genetickou komponentou. Serotoninový transportér a jeho vztah s AN byl již v kontextu s onemocněním studován. Nejčastěji sledovaným polymorfizmy v genu pro receptor serotoninu (5HT2A) je (-1438A/G) a v genu pro serotoninový transportér 5-HTT (LPR a VNTR). Výsledky se v různých populacích liší. Cílem studie bylo zkoumat asociaci zmíněných polymorfismů s onemocněním AN v české populaci.

Provedli jsme genotypizaci u skupiny 75 pacientek s AN (průměrný věk 25.39 let, SD 6.18 let, průměrné BMI 14.65, SD 1.38). Kontrolní skupina sestávala z 65 zdravých osob – žen kavkazského původu (průměrný věk 25.76 let, SD 5.12 let, průměrné BMI 20.69, SD 1:85).

Výsledky genotypizace polymorfizmu 5-HT2A -1438 G/A v serotoninovém receptoru ukázaly asociaci s vyšším výskytem alely A u pacientek s AN. Dřívější polské studie ukázaly podobnou asociaci. Srovnávali jsme tedy českou a polskou skupinu dohromady a významnost asociace alely A stoupla na jasnou hranici významnosti ( $p = 0.0362$ ,  $\chi^2$  statistika, 1 df). Metaanalýza, která zahrnovala všechny dosud publikované výsledky alely A serotoninového receptoru výrazně zvýšila statistickou významnost ( $p = 0.0003$ ,  $\chi^2$  statistika, 1 df). Asociace -1438 G/A 5 HTR2A v korelaci s BMI nabyla hraniční významnosti ( $p = 0.055$ ). V analýze polymorfizmů serotoninového transportéru LPR nebyla sledována žádná asociace s AN ani v rámci fenotypového přístupu v korelaci s BMI. Naopak tyto výsledky ukazují negativní trend asociace ve srovnání s všemi dosud publikovanými studiemi. Zařazení našich výsledků do metaanalýzy způsobilo snížení statistické významnosti i OR a rozšiřuje její 95% confidence interval. Nepozorovali jsme rovněž pozitivní asociaci s onemocněním AN ani u polymorfizmu VNTR 5HTT.

Výsledky této studie potvrzují významnou roli alely A (-1438 A/G 5 HT2A receptor) jako rizikového faktoru u AN. V budoucnu chceme pokračovat s genotypizací dalších genů a zdvojnásobit českou skupinu nemocných.

### **Vlastní výsledky**

Serotoninergní receptory a transportéry patří k nejčastěji studovaným genům v souvislosti s onemocněním PPP. Asociace polymorfizmu serotoninového transportéru 5-HT2A s anorexií nervosa byla pozorována jako jedna z prvních (Hinney et al., 1997), donedávna však s ne zcela konzistentními výsledky. Naše studie zkoumala asociace tří polymorfizmů v kandidátních genech serotoninergní metabolické dráhy a jejich asociaci s onemocněním anorexia nervosa. Prvním byl SNP polymorfizmus -1438G/A v serotoninovém receptoru 5-HT2A; další dva polymorfizmy se lišily velikostí jednotlivých alel v genu pro serotoninový transportér 5-HTT (LPR a VNTR).

**Tabulka 1.** Frekvence genotypů a alel -1468 G>A polymorfizmu gene 5-HT2A u nemocných a kontrol

	Genotypy			Alely	
	A/A	G/A	G/G	A	G
<b>Pacienti</b>	16 (21,3)	39 (52,0)	20 (26,7)	71 (47,3)	79 (52,7)
<b>Kontroly</b>	11 (16,9)	33 (50,8)	21 (32,3)	55 (42,3)	75 (57,7)

**Tabulka 2.** Frekvence genotypů a alel LPR polymorfizmu genu 5-HTT u nemocných a kontrol

	Genotypy			Alely	
	S/S	L/S	L/L	S	L
<b>Pacienti</b>	12 (16,7)	29 (40,3)	31 (43)	53 (36,8)	91 (63,2)
<b>Kontroly</b>	13 (20)	30 (46,1)	22 (33,9)	56 (43,1)	74 (56,9)

**Tabulka 3.** Frekvence genotypů VNTR polymorfizmu genu 5-HTT u nemocných a kontrol

	Genotypy					
	9/9	9/10	9/12	10/10	10/12	12/12
<b>Pacienti</b>	0	3 (4,6)	4 (6,1)	8 (12,1)	28 (42,4)	23 (34,9)
<b>Kontroly</b>	0	0	1 (1,4)	14 (19,7)	32 (45,1)	24 (33,8)

**Tabulka 4.** Frekvence VNTR polymorfizmu genu 5-HTT u nemocných a kontrol

	Alely		
	9	10	12
<b>Pacienti</b>	7 (4,8)	59 (41,0)	78 (54,2)
<b>Kontroly</b>	1 (0,8)	48 (36,9)	81 (62,3)

**Tabulka 5.** Výsledky metaanalýzy asociačních studií analyzují alelu -1438A genu 5-HT2A u nemocných s AN a kontrol. OR je prezentováno 95% intervalu spolehlivosti (<sup>A</sup>Rybakowski et al., 2006; <sup>B</sup>Gorwood et al., 2003).

Populace	Skupina	A alela	G alela	P	OR	95 % CI	
						od	do
Česká	Pacienti	71	79	0.3992	1.2255	0.7636	1.9668
	Kontroly	55	75				
Polská <sup>A</sup>	Pacienti	170	92	0.0847	1.4087	0.9535	2.811
	Kontroly	101	77				
Slovanská (Česká + Polská)	Pacienti	241	171	0.0362	1.3732	1.0202	1.8484
	Kontroly	156	152				
9 předchozích analyzovaných souborů <sup>B</sup>	Pacienti	816	928	0.0043	1.20	1.07	1.35
	Kontroly	1443	1869				
9 předchozích souborů + Slované	Pacienti	1057	1099	0.0003	1.2156	1.0923	1.3528
	Kontroly	1599	2021				

**Tabulka 6.** Kvantitativní asociace s BMI (Waldův test)

SNP	NMISS	BETA	SE	R2	T	P
5-HT2A	119	0.9076	0.4696	0.03094	1.933	0.05569
5-HTTLPR	119	0.4717	0.45	0.009304	1.048	0.2967

**Tabulka 7.** Výsledky metaanalýzy asociačních studií analyzují alely S a L genu 5-HTT u nemocných s AN a kontrol. OR je prezentováno 95% intervalu spolehlivosti (<sup>A</sup>Rybakowski et al., 2006; <sup>B</sup>Gorwood et al., 2003).

Původ (etnikum)	Skupiny	S alela	L alela	P	OR	95% CI	
						Od	do
Češi	Pacienti	53	91	0.2896	0.7696	0.4738	1.2499
	Kontroly	56	74				
Poláci <sup>A</sup>	Pacienti	78	114	0.4170	1.1873	0.7842	1.7975
	Kontroly	68	118				
Slované (Češi+Poláci)	Pacienti	131	205	0.9474	0.9895	0.7223	1.3555
	Kontroly	124	192				
Čtyři dříve analyzované soubory <sup>C</sup>	Pacienti	341	373	0.0009	1.380	1.140	1.680
	Kontroly	374	566				
Kombinace všech souborů	Pacienti	472	578	0.0102	1.243	1.053	1.468
	Kontroly	498	758				



**4.2. Šlachtová L, Kaminská D, Chval M, Králík L, Martásek P, Papežová H:** Stress perception and (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphism in HO-1 gene are both risk factors in eating disorder development. *Folia Biologica, in press, (IF 2012 = 1,219)*

### **Abstrakt:**

Hemoxygenáza 1 hraje důležitou ochrannou roli při metabolickém stresu v zachování buněčné, tkáňové i celkové homeostázy. Tato studie sledovala možnou genovou a enviromentální interakci mezi polymorfizmem (GT)<sub>n</sub> HO-1 a vnímáním stresu u nemocných s PPP a u zdravých kontrol. Vnímání stresu a (GT)<sub>n</sub> polymorfismus jsme sledovali u 127 nemocných s PPP a u 78 zdravých kontrol použitím dotazníku Stress and coping inventory a genotypizace. Na základě dotazníků jsme definovali objektivní a subjektivní stres (celkový, specifický a vážený index stresu). Objektivní stresový index byl získán na základě nezávislého posouzení celoživotní anamnézy i klinické dokumentace během hospitalizace. Podle naší hypotézy 1) veškerá stresová skóre, popisující subjektivní stres byly výrazně vyšší u nemocných ve srovnání s kontrolami (( $p \leq 0,001$ ;  $p \leq 0,002$ ;  $p \leq 0,001$ ); 2) Genotyp L/L GT promótoru byl u pacientů spojen s vyšším celkovým (( $p \leq 0,001$ ), specifickým ( $p \leq 0,010$ ) a váženým stresovým skóre ( $p \leq 0,005$ ) ve srovnání s variantou LS, 3) Pearsonova korelace těchto subjektivních stresových indexů s objektivním neukázala příliš významnou souvislost (0,198; 0,287; 0,224). Předpokládáme, že L alela HO-1 promótorového polymorfizmu reprezentuje rizikový faktor pro stresovou odpověď a spolupodílí se na subjektivním vnímání stresu spolu s L/L genotypem a na vývoji PPP. Snížená exprese HO-1 spojená s L/L genotypem společně s intenzivnějším vnímáním stresu u nemocných může vést ke stresu sekundárnímu se závažnějším průběhem onemocnění a horší prognózou.

### **Vlastní výsledky**

Stres a jeho vnímání hraje velmi důležitou úlohu v patogenezi onemocnění PPP. Téměř šestileté úsilí výběru, evaluace, sběru a vyhodnocování anonymizovaných dat pomocí stresových dotazníků vyústilo v práci zabývající se souhrnem vlivů genů a prostředí (G x E). Soubor čítá 127 pacientů s AN a BN s průměrným věkem  $25 \pm 7$  let a 78 zdravých kontrol v průměrném věku  $26 \pm 5$  let. Vzhledem ke zjišťování vlivů prostředí byl kladen důraz také na srovnatelný socio-ekonomický status obou skupin. Vliv stresu byl zkoumán pomocí stresových dotazníků podle Rahe se zaměřením na mladé jedince (Rahe et al., 2000; Holmes and Rahe, 1967). Výhoda spočívá v použití mezinárodně validovaného dotazníku a jeho implementaci do výzkumu poruch příjmu potravy v rámci České republiky a zároveň v možné srovnatelnosti s daty v zahraničí v budoucnu. Zároveň byla zaručena anonymizace dotazníků, což zvyšuje důvěryhodnost a eliminuje potenciální odchylky nepravdivých odpovědí. Dotazníky představují účinný nástroj při zjišťování prožitých traumat či stresových událostí a napomáhají k fenotypizaci jednotlivých onemocnění. Vytváření klinických podskupin a mapování vlivů prostředí a jejich podíl na rozvoji choroby umožní blíže charakterizovat typ onemocnění u konkrétního pacienta a navrhnout vhodnou terapii (Bulik a Tozzi, 2004).

**Tabulka 8 – Rozdíly v subjektivním vnímání stresu u nemocných a kontrol**

		n	průměr	t	p-value
Celkový stresový index	kontroly	78	10.03	-3.726	0.001
	nemocní	127	13.72		
Specifický stresový index	kontroly	78	3.45	-3.07	0.002
	nemocní	127	4.71		
Vážený stresový index	kontroly	78	359	-3.318	0.001
	nemocní	127	471		

\* df = 203

**Tabulka 9 - Subjektivní vnímání stresu u L/L a L/S genotypů u nemocných**

		n	průměr	t	p-value
Celkový stresový index	L/S	57	11.18	-3.372	0.001
	L/L	59	15.66		
Specifický stresový index	L/S	57	3.86	-2.622	0.010
	L/L	59	5.37		
Vážený stresový index	L/S	57	398	-2.852	0.005
	L/L	59	527		

\* df = 114

**Tabulka 10 - Subjektivní vnímání stresu u L/L a L/S genotypu u smíšeného souboru**

		n	průměr	t	p-value
Celkový stresový index	L/S	87	10.37	-3.372	0.002
	L/L	99	13.62		
Specifický stresový index	L/S	87	3.53	-2.622	0.005
	L/L	99	4.73		
Vážený stresový index	L/S	87	364	-2.852	0.002
	L/L	99	470		

\* df = 184

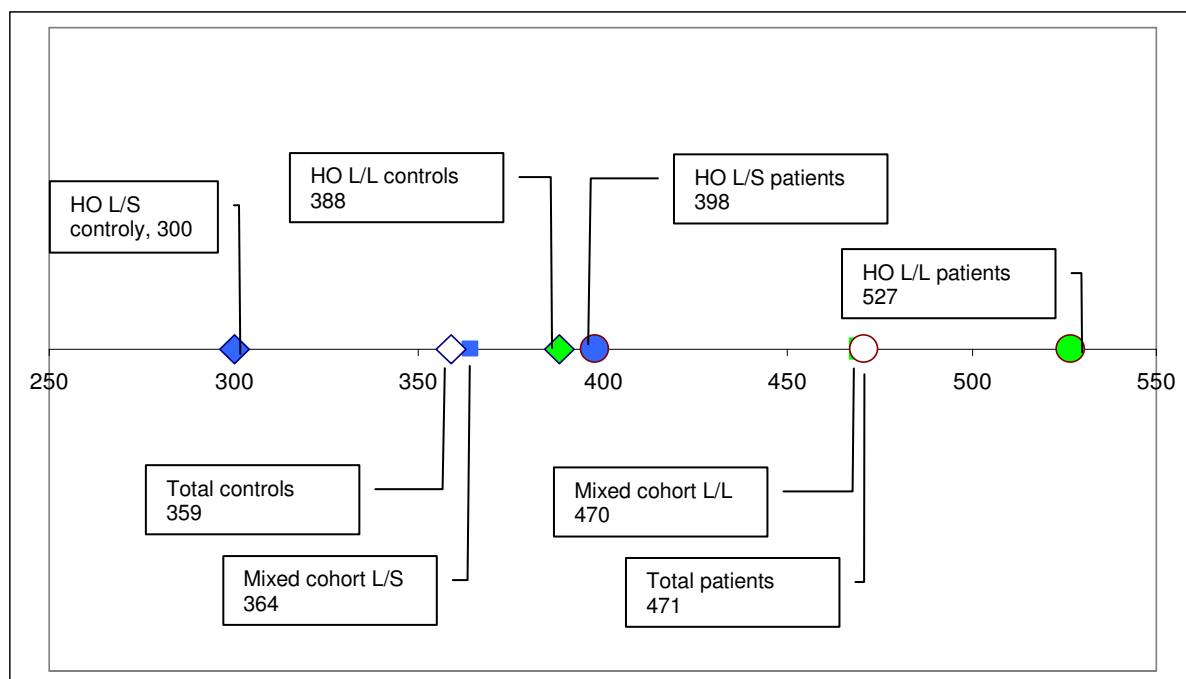
---

HO-1 je enzym ovlivňující velké množství signálních kaskád v buňce a to prostřednictvím svých reakčních produktů biliverdinu, železa a oxidu uhelnatého. HO-1 katalyzuje přeměnu hemu na biliverdin a zároveň indukuje antiproliferativní, antioxidantní a protizánětlivé procesy s výsledným efektem zachování buněčné,

tkáňové i celkové homeostázy. V průběhu onemocnění AN či BN prokazatelně dochází k nedostatku výživových látek a naopak organismus je vystaven dlouhodobé stresové zátěži psychického i fyzického rázu. Polymorfismus v genu hemoxygenázy 1, nacházející se v promotorové oblasti přibližně 250 bp spočívá v různé dlouhé repetici GT nukleotidů s výsledným efektem ovlivnění exprese proteinu. Krátká alela S (obvykle klasifikována < 25 GT opakování) má vyšší úroveň exprese ve srovnání s delší alelou L ( $\geq 25$ ) (Hirai et al., 2003; Yamada et al., 2000; Grochot-Przeczek et al., 2012). Naše studie předpokládala ovlivnění celkového subjektivního stresu (data získaná z dotazníků) asociací s (GT) polymorfismem genu HO-1. Vycházeli jsme z dosavadních studií dokumentujících dopad genotypu HO-1 na metabolická onemocnění včetně obezity, diabetu 2. typu či hormonální regulaci (Abraham et al., 2008; Bakken et al., 1972; Abraham et al., 2007).

Dosažené výsledky ukazují, že genotyp L/L s nejmenší *in vitro* dokumentovanou expresí genu HO-1 koreluje s nejvyšší mírou stresového indexu u pacientek. Dále je patrná vzestupná tendence váženého, celkového i specifického stresového indexu v závislosti na genotypu HO-1 u pacientek i u kontrol. Nejnižší průměrný vážený stresový index měly kontroly s „protektivním“ S genotypem L/S; o něco vyšší index byl pozorován u kontrol s L/L genotypem. Následovaly pacientky s genotypem L/S a nejvyšší skóre bylo pozorováno u pacientek s „málo ochranným“ genotypem L/L (viz graf). Ke zjištění podílu vlivu genotypu na závažnost stresu bylo použito těchto několik stresových indexů pro zjištění interní validity a současné evaluace s dotazníky používanými mezinárodně. Zatímco vážený a celkový index stresu vychází z kumulace stresových situací v průběhu života, specifický stresový index byl navržen cíleně pro pacientky s PPP. Stejně jako ostatní subjektivní stresové indexy vycházel z Raheho dotazníku, byly ale vybrány otázky zaměřené na specifické faktory, které hrají významnou roli v závažnosti i léčbě PPP (rodinné vztahy, sexualita atd.).

**Graf 1.** Objektivní stresový index v závislosti na GT repetici v genu HO-1 u pacientů a u kontrol znázorněn na horizontální ose



Subjektivní stres představuje stres vnímaný samotnými pacientkami, který se dle klinických pozorování a našich výsledků významně liší od stresu objektivního stanoveného lékařem na základě anamnézy či terapeutickými rozhovory. Subjektivní stres byl ve všech třech vyjádřeních (celkový, specifický a vážený) vždy nižší u zdravých kontrol ve srovnání s pacientkami. U pacientek dále ukázala Pearsonova korelace objektivního stresového indexu s celkovým (0,198), specifickým (0,287) a váženým stresovým indexem (0,224), ( $p \leq 0,01$ ) nepříliš těsný vztah subjektivních stresových indexů s objektivními. Zajímavá je nejvyšší míra korelace objektivního a subjektivního hodnocení u specifického indexu, což vyplývá z podstaty jeho zaměření na PPP. Vzhledem k patogenezi PPP a její souvislosti s alterovaným vnímáním se jedná o potvrzení našich hypotéz. I když míra subjektivního stresu nereflakuje objektivní závažnost vystavení stresovým událostem, hraje zřejmě důležitou roli v ovlivnění metabolismu a následné reakci organismu na hormonální a metabolickou dysbalanci vyvolanou stresem. Posun subjektivního vnímání u pacientek s poruchami příjmu potravy je dobře dokumentován zejména u vnímání vlastního těla a zahrnuje i nevědomou složku vnímání sebe sama, což dokládá nedávno provedená studie pacientek s AN (Keizer et al., 2013).

#### **4.3. Martásková D, Papežová H: Genetické aspekty poruch příjmu potravy *In*: Papežová (Ed.). Spektrum poruch příjmu potravy, Grada 2010, 56-61.**

Publikace představuje jednu z úvodních kapitol knihy, která shrnula současné znalosti o genetických vlivech na vznik, průběh a vyústění poruch příjmu potravy. Je určena nejen pro odborníky v oblasti příjmu potravy, ale i další specialisty, kteří se na interdisciplinární léčbě poruch příjmu potravy podílejí. Poukazuje na přítomnost genetických determinant u poruch příjmu potravy podobně jako u dalších psychiatrických diagnóz (deprese, obsedantně kompulsivní porucha, závislost na alkoholu) a udává odhadovaný podíl dědičnosti 56-84 % (Wade et al., 2000). Bylo již zkoumáno 128 různých polymorfizmů a 43 genů v asociačních studiích ve vztahu k jídelnímu chování, motivačním vzorcům i mechanismu odměny. Zdůrazňuje, že cílem dalšího psychiatrického výzkumu je identifikovat rizikové genetické profily k diferencovanějším postupům v komplexní terapii poruch příjmu potravy a preventivním, protektivním opatřením.

## 5. DISKUSE

### Studie 1 (Publikace 4.1.)

Výsledky genotypizace polymorfizmu -1438G/A v serotoninovém receptoru provedené ve skupině 75 pacientek s AN a 65 zdravých kontrol ukázaly výskyt alely A u 47 % pacientů s AN a u 42 % kontrol. Distribuce genotypů kopírovala trend mezinárodních studií s asociací rizikové alely A s onemocněním AN. Tyto výsledky byly zařazeny do širšího kontextu slovanské populace srovnáním s výsledky polské studie, které dosáhly podobného trendu častějšího výskytu alely A u pacientek s AN (65 % u pacientů a 57 % u kontrol). S ohledem na limitovanou velikost námi zkoumaného souboru byla provedena metaanalýza dostupných studií s dosažením významnosti asociace varianty -1438G/A s onemocněním AN  $p \leq 0,0003$ . Polymorfismus serotoninového receptoru 5-HT<sub>2A</sub> je zkoumán také pomocí endofenotypů. Asociace -1438G/A s body BI či věkem nástupu onemocnění byla provedena také zahraničními studii (Kipman et al., 2002). Porovnání vztahu rizikové alely A s BMI v námi zkoumaném souboru pacientek s AN ukázalo hraniční významnost ( $p \leq 0,055$ ).

Údaje námi provedených asociačních studií a následné srovnání v mezinárodním kontextu potvrdily efekt rizikové alely A polymorfizmu -1438G/A u onemocnění anorexia nervosa. Naopak žádná asociace s onemocněním nebyla pozorována u obou zkoumaných polymorfizmů v serotoninovém transportéru LPR či VNTR. Ačkoli výsledky genotypizace varianty LPR v námi zkoumaném souboru pacientek a kontrol nenašly žádnou asociaci, je to v souladu s jinými studii. Navzdory funkčním studiím popisujícím vliv variant LPR a VNTR na transkripci genu, výsledky asociačních studií v genu pro serotoninový transportér nejsou jednoznačné.

Dalším ze zkoumaných genů a jeho variant byl gen pro serotoninový transportér 5-HTT, který je zodpovědný za vychytávání uvolněného serotoninu. 5-HTT se nachází v presynaptické membráně neuronu a je cílovým místem působení SSRI třídy antidepressiv. Gen kódující tento transportér má několik variabilních míst. Polymorfismus LPR (length polymorphic region) je lokalizovaný v promotorové části genu a má krátkou (S – short; 14 repetici) či dlouhou (L – long; 16 opakování) variantu. Funkční dopad výskytu jednotlivých alel na transkripci genu byl prokázán v *in vitro* studiích. Souvislost jednotlivých variant s psychickými onemocněními je srovnávána u pacientů s depresí či poruchami příjmu potravy, opět s různorodými závěry. Výsledky genotypování LPR polymorfizmu v naší studii neprokázaly pozitivní asociaci s onemocněním anorexia nervosa ani v rámci endofenotypového přístupu souvislost s BMI. Naopak tyto výsledky ukazují negativní trend asociace LPR polymorfizmu s onemocněním AN (OR = 0.7696;  $p \leq 0.2896$ ). Metaanalýza s účastí pěti dalších studií (Gordwood et al., 2004; Rybakowski et al., 2006) způsobila snížení statistické významnosti i OR (podílu pravděpodobných výskytu u pacientů a kontrol) z 1.38 na 1.243. Výsledky české studie byly prováděny na souboru s maximální možnou velikostí v době studie. Zajímavé bude sledovat trend asociací při navýšení, např. zdvojnásobení souboru.

Další z polymorfizmů VNTR (variable nucleotide tandem repeats) genu 5-HTT je opět klasifikován na základě délkových repetici s 9, 10 a 12 opakováními. Stejně jako u LPR polymorfizmu délka jednotlivých opakování ovlivňuje míru transkripce genu. VNTR polymorfnní oblast se nachází uvnitř 2. intronu genu 5-HTT. V námi zkoumaném souboru nebyl zaznamenán žádný signifikantní rozdíl v distribucích genotypů polymorfizmu VNTR mezi pacienty a kontrolami. Literární odkazy

zabývající se variantou VNTR nejsou tak hojné jako výskyt studií o LPR polymorfizmu. Pro účely metaanalýzy nejsou dostupná data dostačující.

## **Studie 2 (Publikace 4.2)**

Subjektivní stres představuje stres vnímaný samotnými pacientkami, který se dle klinických pozorování a našich výsledků významně liší od stresu objektivního stanoveného lékařem na základě anamnézy či terapeutickými rozhovory. Subjektivní stres byl ve všech třech vyjádřeních (celkový, specifický a vážený) vždy nižší u zdravých kontrol ve srovnání s pacientkami. U pacientek dále ukázala Pearsonova korelace objektivního stresového indexu s celkovým (0,198), specifickým (0,287) a specifickým stresovým indexem (0,224), ( $p \leq 0,01$ ) nepřiliš těsný vztah subjektivních stresových indexů s objektivními. Zajímavá je nejvyšší míra korelace objektivního a subjektivního hodnocení u specifického indexu, což vyplývá z podstaty jeho zaměření na ED. Vzhledem k patogenezi ED a její souvislosti s alterovaným vnímáním se jedná o potvrzení našich hypotéz. I když míra subjektivního stresu nereflektuje objektivní závažnost vystavení stresovým událostem, hraje zřejmě důležitou roli v ovlivnění metabolismu a následné reakci organismu na hormonální a metabolickou dysbalanci vyvolanou stresem. Posun subjektivního vnímání u pacientek s poruchami příjmu potravy je dobře dokumentován zejména u vnímání vlastního těla a zahrnuje i nevědomou složku vnímání sebe sama, což dokládá nedávno provedená studie pacientek s AN (Keizer et al., 2013).

Současné výzkumy podporují úlohu celoživotního těžkého stresu a traumat ve vývoji, průběhu a relapsu PPP (Johnson et al., 2002). Stres přispívá nejen k vývoji PPP jako takové, zejména jejich charakteristických příznaků (symptomy bulimie a úsilí o hubenost), ale také následného stupňování stresu, negativních stresorů v životě a příznaků deprese (Alda et al., 1989; Bodell, et al., 2012). Ukázalo se, že právě tyto negativní stresory, úzkost nebo deprese jsou vysoce dědičnými faktory. Řada studií je proto nyní zaměřena na studium interakcí genového pozadí a prostředí (G x E) (Adams and Button 2008; Wade et al., 2009). Mimo výše uvedené, ke sdílenému vlivu prostředí na chování jedince, existuje řada zděděných znaků z pozměněné funkce genů, které jsou studovány u PPP (např. serotonergní, dopaminergní) (Trace et al., 2013). AN nebo BN jsou provázeny zkresleným pojetím vlastního těla, úzkostí, strachem z přibývání na váze spojenými s omezeními či někdy s nepříznivými životními událostmi. Spojením nutričního deficitu a metabolických důsledků stresu jako takového dochází k vyvolání druhotného stresu. Během reakce na tento stres mohou genetické faktory sehrát roli jak ochrannou, tak také zcela opačnou; záleží na přítomnosti funkčního polymorfismu nebo jinak ovlivněné genové expresi vyplývající z interakcí genového prostředí (Abraham et al., 2007; Nagata et al., 2000; Sachs-Ericsson et al., 2012).

## 6. ZÁVĚRY

Spektrum poruch příjmu potravy (PPP), s nejzávažnější mentální anorexií (AN) a bulimií (BN), představuje kontinuum onemocnění s abnormálním potravním chováním (extrémním hladověním a/nebo přejídáním s kompenzatorním chováním) a s patologickým zaměřením na štíhlost a vnímáním vlastního těla (DSM-IV). Mortalita je nejvyšší z psychiatrických pacientů. Příbuzní probandů mají riziko onemocnění 10x vyšší než příbuzní zdravých kontrol. Předchozí studie dvojčat a rodin ukázaly vliv dědičnosti u AN v 56 %, zbylá variance byla přičítána sdíleným (5 %) a nesdíleným (39 %) vlivům enviromentálním. S extrémně narůstající problematikou obezity se mění i průběh poruch příjmu potravy a posledních 15 let i vzrůstá počet společných molekulárně genetických studií zaměřených na regulaci energetického metabolismu, na neuropeptidy – neurotransmitery peptidového charakteru ovlivňující nervovou činnost a funkci. Některé z nich mají zároveň charakter hormonů, např. v trávicím ústrojí, tukové tkáni (neuropeptid Y, leptin, ghrelin, cholecystokin, adiponectin, resistin) (Dolinkova et al., 2006; Beranová et al., 2009; Smitka et al., 2011; Méquinion et al., 2013) Ukázalo se ale, že genetické studie vyžadují sofistikovanější fenotypizaci, která neodpovídá vždy aktuální klasifikaci. Bulik et al. 2007 definovali endofenotypy jako měřitelné neurofyziologické koreláty, které jsou nezávislé na stavu a objevují se i u rodinných příslušníků více než v populaci (Kendler a Neale, 2010). Takovými faktory mohou být vnímání bolesti i vlastního těla a hyperaktivní a autoagresivní chování. Jejich sledování zlepšuje identifikaci jednotlivých subtypů onemocnění a může predikovat jejich průběh (např. přechod mezi subtypy onemocnění - nejčastěji AN-BN- psychogenní přejídání).

Otázka genetické vnímavosti k PPP není zdaleka dořešena. Na manifestaci PPP se pravděpodobně podílí množství interagujících genetických složek, přičemž každá má mírný potenciál zvyšovat riziko PPP (Mazeo et al., 2009). Poruchy příjmu potravy vykazují navíc stále větší heterogenitu, což zvyšuje potřebu lépe definovat sledované fenotypy. Budoucí genetické studie onemocnění s multifaktoriální příčinou vzniku vyžadují přesnou a velmi důmyslnou fenotypizaci, která nemusí odpovídat současné klasifikaci (Martásková a Papežová, 2005; Mazzeo et al., 2009).

Většina studií byla prováděna v rámci Evropy. Chybí studie se zaměřením na etnické vlivy. A samozřejmě nelze opomenout, že k různorodosti projevu genetické informace výrazně přispívá prostředí prostřednictvím epigenetických vlivů či modulace transkripce a je nemožné zcela oddělit vlivy prostředí a vlivy genetické (Bulik a Tozzi, 2004; Bulik, 2005; Kocourková et al., 1997). Epigenetické studie budou v nejbližší budoucnosti hrát stále významnější úlohu (Archer et al., 2013).

Cílem psychiatrického výzkumu v genetice by měla být možnost identifikovat rizikové genetické profily pro rozvoj různých psychiatrických postižení (De Mooij-van Malsel et al., 2008; Kas et al., 2008; LaPorte et al., 2008; Monteleone a Maj, 2008; Brooks et al., 2012). Tento přístup může, ale také nemusí, být otázkou vzdálené budoucnosti. Genotypizace rovněž nabízí možnost diferenciatní indikace antidepresiv s různým mechanismem účinku a šetrnějšího přístupu k podávání léků především stran možných vedlejších účinků nebo lékových interakcí (Benedetti et al., 2008; De Mooij-van Malsel et al., 2008; Gorwood, 2004; Monteleone a Maj, 2008).

V předchozích studiích jsme se zaměřili především na geny centrálně ovlivňující příjem potravy a stresové a autoagresivní faktory: serotoninové, neurotrofní faktory (BDNF). Studie je systematickým hodnocením genetického environmetálního profilu

nemocných s poruchami příjmu potravy v České republice. Výsledky přinesou cenné informace a porovnání pečlivě vytypovaných endofenotypů může ozřejmit různý průběh choroby s potenciální terapeutickou reflexí. Z výsledků exomového sekvenování několika postižených rodin s poruchami příjmu potravy mohou vzejít nálezy nových genů podílejících se na vzniku PPP a potažmo zúčastněných, dosud nerozkrytých, metabolických drah.

Dlouhodobý sběr fenotypových (dotazníky) a genotypových dat představuje široce pojatý přístup v rámci dobře charakterizovaného souboru a skýtá možnosti následných včetně nově objevených charakterizací endofenotypů. Na základě výsledků genových asociačních studií včetně poslední studie mapující G x E korelaci (Publikace 4.2.), je možné dále zkoumat přímý dopad genové exprese na úrovni biochemické, endokrinologické a fyziologické, měřením aktivit jednotlivých proteinů. Metabolické či fyziologické parametry mohou být dále využity k bližší specifikaci fenotypů – např. v souvislosti s nástupem onemocnění, vnímáním vlastního těla, bolesti atd.

Dlouhodobě chceme posoudit interakce rizikových faktorů prostředí (stresu) a genetických faktorů. Jejich objasnění lze využít ve stanovení protektivních preventivních faktorů především v ohrožené populaci adolescentů. V současné době probíhá studie GWAS u anorexie (Genome-wide association studies), do které tým už také přispěl a bude dále spolupracovat se širokým mezinárodním konsorciem. Celogenomový přístup k analýzám multifaktoriálních onemocnění, jako jsou poruchy příjmu potravy, je, vzhledem ke stále větší dostupnosti těchto technologií, jednou z prioritních analýz. Zároveň klade vysoké nároky na množství a kvalitu vstupních dat a intenzivní konzorciální spolupráci. Zatímco v roce 2008 bylo publikováno 592 studií zaměřených na Genome wide association studies (GWAS) a v roce 2007 jen zhruba polovina, v dalších letech zájem o tuto problematiku zaznamenal prudký nárůst (2010 bylo publikováno téměř 2700 studií a v loňském roce 3245 studií). Přístup spočívá v mapování SNP a CNV pomocí microarray technologií a v následném vyhodnocování s využitím bioinformatiky. Potenciál těchto metod je obrovský a GWAS jsou předstupněm pro navázání studií jednotlivých kandidátních genů, jejich funkce a charakterizaci jejich proteinů (Dmitrzak-Weglarz et al., 2013).



## 7. POUŽITÁ LITERATURA (ZKRÁCENÝ SEZNAM)

- Abraham, N. G., Brunner, E. J., Eriksson, J. W., Robertson, R. P. (2007) Metabolic syndrome: psychosocial, neuroendocrine, and classical risk factors in type 2 diabetes. *Ann. NY Acad. Sci.* 1113, 256-275.
- Abraham, N. G., Kappas, A. (2008) Pharmacological and clinical aspects of heme oxygenase. *Pharmacol. Rev.* 60, 79-127.
- Archer, T., Oscar-Berman, M., Blum, K., Gold, M. (2013) Epigenetic Modulation of Mood Disorders. *J Genet Syndr Gene Ther.* 4, pii: 1000120.
- Alda, M., Dvorakova, M., Zvolisky, P., Papezova, H., Posmurova, M. (1989) Genetic aspects in chronic schizophrenia. Morbidity risks and contributory factors, *Schiz. Res.* 2, 339-344.
- American Psychiatric Association (2000) *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. 4th ed. rev. Washington, DC: American Psychiatric Association 887, 539-550.
- Ando, T., Ishikawa, T., Hotta, M., Naruo, T., Okabe, K., Nakahara, T., Takii, M., Kawai, K., Mera, T., Nakamoto, C., Takei, M., Yamaguchi, C., Nagata, T., Okamoto, Y., Ookuma, K., Koide, M., Yamanaka, T., Murata, S., Tamura, N., Kiriike, N., Ichimaru, Y., Komaki, G. (2012) Japanese Genetic Research Group For Eating Disorders. No association of brain-derived neurotrophic factor Val66Met polymorphism with anorexia nervosa in Japanese. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 159B, 48-52
- Baan, C., Peeters, A., Lemos, F., Uitterlinden, A., Doxiadis, I., Claas, F., Ijzermans, J., Roodnat, J. M., Weimar, W. (2004) Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts. *Am. J. Transplant.* 4, 811-818.
- Benedetti, F., Barbini, B., Bernasconi, A., Fulgosi, M. C., Colombo, C., Dallaspecchia, S., Gavinelli, C., Marino, E., Pirovano, A., Radaelli, D., Smeraldi, E. (2008) Serotonin 5-HT<sub>2A</sub> receptor gene variants influence antidepressant response to repeated total sleep deprivation in bipolar depression. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 32, 1863-1866.
- Bergen, A. W., van den Bree, M. B., Yeager, M., Welch, R., Ganjei, J. K., Haque, K., Bacanu, S., Berrettini, W. H., Grice, D. E., Goldman, D., Bulik, C. M., Klump, K., Fichter, M., Halmi, K., Kaplan, A., Strober, M., Treasure, J., Woodside, B., Kaye, W. H. (2003) Candidate genes for anorexia nervosa in the 1p33-36 linkage region: Serotonin 1D and delta opioid receptor loci exhibit significant association to anorexia nervosa. *Mol. Psychiatry* 8, 397-406.
- Betancur, C., Corbex, M., Spielwoy, C., Philippe, A., Laplanche, J. L., Launay, J. M., Gillberg, C., Mouren-Siméoni, M. C., Hamon, M., Giros, B., Nosten-Bertrand, M., Leboyer, M. (2002). Serotonin transporter gene polymorphisms and hyperserotonemia in autistic disorder. *Mol. Psychiatry* 7, 67-71.
- Bodell, L. P., Hames, J. L., Holm-Denoma, J. M., Smith, A. R., Gordon, K. H., Joiner, T.E. (2012) Does the stress generation hypothesis apply to eating disorders?: An examination of stress generation in eating, depressive, and anxiety symptoms, *J. Affect. Dis.* 142, 139-142.
- Bulik, C. M., Tozzi, F. (2004) Genetics in eating disorders: state of science. *CNS Spektrum* 9, 511-515.
- Bulik, C. M. (2005) Genes and environment in eating disorders What patients, families and practitioners need to know. *Česká a slovenská psychiatrie*, S1, 15.
- Bulik, C. M., Sullivan, P. F., Tozzi, F., Furberg, H., Lichtenstein, P., Pedersen, N. L. (2006) Prevalence, heritability, and prospective risk factors for anorexia nervosa. *Arch. Gen. Psychiatry* 63,305–31.

- Crisp, A. H., Hsu, L. K., Harding, B., Hartshorn, J. (1980) Clinical feature of anorexia nervosa. A study of a consecutive series of 102 female patients. *J. Psychosom. Res.* 24, 179-191.
- De Mooij-van Malsel, A. J. G., Olivier, B., Kas, M. J. H. (2008) Behavioural genetics in mood and anxiety: A next step in finding novel pharmacological targets. *Eur. J. Pharmacol.* 585, 436-440.
- Denschlag, D., Marculescu, R., Unfried, G., Hefler, L. A., Exner, M., Hashemi, A., Riener, E. K., Keck, C., Tempfer, C. B., Wagner, O. (2004) The size of a microsatellite polymorphism of the haem oxygenase 1 gene is associated with idiopathic recurrent miscarriage. *Mol. Hum. Reprod.* 10, 211-214.
- Di Bella, D. D., Catalano, M., Cavallini, M. C., Riboldi, C., Bellodi, L. (2000) Serotonin transporter linked polymorphic region in anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Mol. Psychiatry* 5, 233-234.
- Dmitrzak-Weglarz, M., Moczko, J., Skibinska, M., Slopian, A., Tyszkiewicz, M., Pawlak, J., Zaremba, D., Szczepankiewicz, A., Rajewski, A., Hauser, J. (2013) The study of candidate genes related to the neurodevelopmental hypothesis of anorexia nervosa: Classical association study versus decision tree. *Psychiatry Research* 206, 117-121.
- Dolinková M., Křížová J., Lacinová Z., Doležalová R., Housová J., Krajíčková J., Bošanská L., Papežová H., Haluzík M. (2006) Polymorfismy genů pro adiponectin a rezistin u pacientek s mentální anorexií a obezitou – pilotní studie. *Čas. Lék. čes.* 145, 562-566.
- Exner, M., Minar, E., Wagner, O., Schillinger, M. (2004) The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic. Biol. Med.* 37, 1097-1104.
- Exner, M., Raith, M., Holzer, G., Gmeiner, B., Wagner, O., Kapiotis, S. (2006) Anti-inflammatory mechanisms of the Tibetan herbal preparation Padma 28 in the vessel wall. *Forsch. Komplex. Med.* 13, 13-17.
- Fairburn, C. G., Harrison, P. J. (2003) Eating disorders. *Lancet* 361, 407-416.
- Fairburn, C.G., Beglin, S.J. (1994) Assessment of eating disorders: interview or self-report questionnaire? *Int J Eat Disord.* 16: 363-370.
- Gorwood, P., Kipman, A., Foulon, Ch. (2003) The human genetics of anorexia nervosa, *Eur. J. Pharmacol.* 480, 163– 170.
- Gorwood, P. (2004) Eating disorders, serotonin transporter polymorphisms and potential treatment response. *Am. J. Pharmacogenomics* 4, 9-17.
- Gotoh, K., Masaki, T., Chiba, S., Ando, H., Fujiwara, K., Shimasaki, T., Mitsutomi, K., Katsuragi, I., Kakuma, T., Sakata, T., Yoshimatsu, H. (2013) Brain-derived neurotrophic factor, corticotropin-releasing factor, and hypothalamic neuronal histamine interact to regulate feeding behavior. *J Neurochem.* 125, 588-598.
- Grochot-Przeczek, A., Dulak, J., Jozkowicz, A. (2012) Haem oxygenase-1: non-canonical roles in physiology and pathology. *Clin. Sci.* 122, 93-103.
- Heils, A., Teufel, A., Petri, S., Stöber, G., Riederer, P., Bengel, D., Lesch, K. P. (1996) Allelic variation of human serotonin transporter gene expression, *J. Neurochem.* 66, 2621-2624.
- Hinney, A., Ziegler, A., Nothen, M. M., Remschmidt, H., Hebebrand, J. (1997) 5-HT2A receptor gene polymorphisms, anorexia nervosa, and obesity. *Lancet* 350, 1324-1325.
- Hirai, H., Kubo, H., Yamaya, M., Nakayama, K., Numasaki, M., Kobayashi, S., Suzuki, S., Shibahara, S., Sasaki, H. (2003) Microsatellite polymorphism in heme oxygenase-1 gene

promoter is associated with susceptibility to oxidant-induced apoptosis in lymphoblastoid cell lines. *Blood* 102, 1619-1621.

Holmes, T., Rahe, R. (1967) The social readjustment rating scale. *J. Psychosom. Res.* 11, 213-218.

Holland, A. J., Hall, A., Murray, R., Russell, G. F., Crisp, A. H. (1984) Anorexia nervosa: a study of 34 twin pairs and one set of triplets. *Br. J. Psychiatry* 145, 414-419.

Hsu, L. K. G. (1990) Eating disorders, *Guilford Press*, New York.

Chen, Y. H., Lin, S.J., Lin, M.W., Tsai, H.L., Kuo, S.S., Chen, J.W., Charng, M.J., Wu, T.C., Chen, L.C., Ding, Y.A., Pan, W.H., Jou, Y.S., Chau, L.Y. (2002) Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1 gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum. Genet.* 111, 1-8.

Johnson, J. G., Cohen, P., Kasen, S., Brook, J.S. (2002) Childhood adversities associated with risk for eating disorders or weight problems during adolescence or early adulthood. *Am. J. Psych.* 159, 394-400.

Kas, M. J. H., Kaye, W. H., Mathes W. F., Bulik, C. M. (2008) Interspecies genetics of eating disorder traits. *Am. J. Med. Genet. Part B*, 150B, 318-327.

Kaye, W. (2008) Neurobiology of anorexia nervosa and bulimia nervosa. *Physiol. Behav.* 94, 121-35.

Keizer, A., Smeets, M.A., Dijkerman, H.C., Uzunbajakau, S.A., van Elburg, A., Postma, A. (2013) Too fat to fit through the door: first evidence for disturbed body-scaled action in anorexia nervosa during locomotion. *PLoS One* 8: e64602.

Kendler, K. S., Neale M. C. (2010) Endophenotype: a conceptual analysis. *Molecular Psych.* 15, 789-797.

Kipman, A., Gorwood, P., Mouren-Siméoni, M. C., Ades, J. (1999) Genetic factors in anorexia nervosa. *Eur. Psychiatry* 14, 189-198.

Kocourková, J. et al. (1997) Mentální anorexie a mentální bulimie v dětství a dospívání, *Galén*, 43-61.

Kral, A., Kovarnik, T., Kralik, L., Skalicka, H., Horak, J., Mintz, G. S., Uhrova, J., Sonka, M., Wahle, A., Downe, R., Aschermann, M., Martasek, P. and Linhart, A. (2011) Genetic variants in haem oxygenase-1 and endothelial nitric oxide synthase influence the extent and evolution of coronary artery atherosclerosis. *Folia Biologica* 57, 182-190.

LaPorte, J. L., Ren-Patterson, R. F., Murphy, D. L., Kalueff, A. V. (2008) Refining psychiatric genetics: from „mouse psychiatry“ to understanding komplex human disorders. *Behav. Pharmacol.* 19, 377-384.

Libiger J. (2005) Komentář. *Arch. Gen. Psychiatry – CS*. 3, 77-78.

Martásková D., Papežová H. (2005) Anorexie nervosa – genetické faktory, současné znalosti a možné trendy., *Česká a slovenská psychiatrie*, S1, 36-37.

Mazzeo, S. E., Mitchell, K. S., Bulik, C. M., Reichborn-Kjennerud, T., Kendler, K. S., Neale, M. C. (2009) Assessing the heritability of anorexia nervosa symptoms using a marginal maximal likelihood approach. *Psychol. Med.* 39, 463-473.

Méquinion, M., Langlet, F., Zgheib, S., Dickson, S., Dehouck, B., Chauveau, C., Viltart, O. (2013) Ghrelin: central and peripheral implications in anorexia nervosa. *Front. Endocrinol.* 4, 1-27.

- Mercader, J.M., Ribasés, M., Gratacòs, M., González, J.R., Bayés, M., de Cid, R., Badía, A., Fernández-Aranda, F., Estivill, X. (2007) Altered brain-derived neurotrophic factor blood levels and gene variability are associated with anorexia and bulimia. *Genes Brain Behav.* 6, 706-716.
- Monteleone, P., Maj, M. (2008) Genetic susceptibility to eating disorders: associated polymorphisms and pharmacogenetic suggestions. *Pharmacogenomics* 9, 1487-1520.
- Murphy, D. L., Fox, M. A., Timpano, K. R., Moya P. R., Ren-Patterson R., Andrews, A. M., Holmes, A., Lesch K-P., Wendland J. R. (2008) How the serotonin story is being rewritten by new gene-based discoveries principally related to SLC6A4, the serotonin transporter gene, which functions to influence all cellular serotonin systems. *Neuropharmacology* 55, 932-960.
- Nagata, T., Matsuyama, M., Kiriike, N., Iketani, T., Oshima, J. (2000) Stress coping strategy in Japanese patients with eating disorders - Relationship with bulimic and impulsive behaviors. *J. Ner. Ment. Dis.* 188, 280-286.
- Poss, K. D. and Tonegawa, S. (1997) Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 94, 10919-10924.
- Rahe, R. H., Mahan, J. L., Jr. Arthur, R. J. (1970). Prediction of near-future health change from subjects' preceding life changes. *J. Psychosom. Res.* 14(4), 401-6.
- Rahe, R. H. et al. (1972). Psychosocial predictors of illness behavior and failure in stressful training. *J. Health Soc. Behav.* 13(4), 393-97.
- Rahe, R. H., Arthur, R. J. (1978). Life change and illness studies: past history and future directions. *J. Human Stress* 4(1), 3-15.
- Rahe, R., TL, V., RL, T. K, M. (2000) The stress and coping inventory: an educational and research instrument. *Stress Med.* 16, 199-208.
- Ribasés, M., Gratacòs, M., Fernández-Aranda, F., Bellodi, L., Boni, C., Anderlueh, M., Cristina Cavallini, M., Cellini, E., Di Bella, D., Erzegovesi, S., Foulon, C., Gabrovsek, M., Gorwood, P., Hebebrand, J., Hinney, A., Holliday, J., Hu, X., Karwautz, A., Kipman, A., Kolem, R., Nacmias, B., Remschmidt, H., Ricca, V., Sorbi, S., Tomori, M., Wagner, G., Treasure, J., Collier, D.A., Estivill, X. (2005) Association of BDNF with restricting anorexia nervosa and minimum body mass index: a family-based association study of eight European populations. *Eur J Hum Genet.* 13, 428-434.
- Ricca, V., Nacmias, B., Boldrini, M., Cellini, E., di Bernardo, M., Ravaldi, C., Tedde, A., Bagnoli, S., Placidi, G. F., Rotella, C.M., Sorbi, S. (2004) Psychopathological traits and 5-HT<sub>2A</sub> receptor promoter polymorphism (-1438 G/A) in patients suffering from Anorexia Nervosa and Bulimia Nervosa. *Neurosci. Lett.* 365, 92-96.
- Root, T. L., Szatkiewicz, J. P., Jonassaint, C. R., Thornton, L. M., Pinheiro, A. P., Strober, M., Bloss, C., Berrettini, W., Schork, N. J., Kaye, W. H., Bergen, A. W., Magistretti, P., Brandt, H., Crawford, S., Crow, S., Fichter, M. M., Goldman, D., Halmi, K. A., Johnson, C., Kaplan, A. S., Keel, P. K., Klump, K. L., La Via, M., Mitchell, J. E., Rotondo, A., Treasure, J., Woodside, D. B., Bulik, C. M. (2011) Association of candidate genes with phenotypic traits relevant to anorexia nervosa. *Eur. Eat. Disord. Rev.* 19, 487-493.
- Rybakowski, F., Slopian, A., Dmitrzak-Weglarczyk, M., Czerniak, P., Rajewski, A., Hauser, J. (2006) The 5-HT<sub>2A</sub> -1438 A/G and 5-HTTLPR polymorphisms and personality dimensions in adolescent anorexia nervosa: association study. *Neuropsychobiology* 53, 33-39.

- Sachs-Ericsson, N., Keel, P.K., Holland, L., Selby, E.A., Verona, E., Cogle, J.R., Palmer, E. (2012) Parental disorders, childhood abuse, and binge eating in a large community sample. *Int. J. Eat. Dis.* 45, 316-325.
- Shibahara, S., Muller, R.M. and Taguchi, H. (1987) Transcriptional control of rat heme oxygenase by heat shock. *J. Biol. Chem.* 262, 12889-12892.
- Shugart, Y.Y., Chen, L., Day, I.N., Lewis, S.J., Timpson, N.J., Yuan, W., Abdollahi, M.R., Ring, S.M., Ebrahim, S., Golding, J., Lawlor, D.A., Davey-Smith, G. (2009) Two British women studies replicated the association between the Val66Met polymorphism in the brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and BMI. *Eur J Hum Genet.* 17, 1050-1055.
- Schillinger, M., Exner, M., Minar, E., Mlekusch, W., Mullner, M., Mannhalter, C., Bach, F.H., Wagner, O. (2004) Heme oxygenase-1 genotype and restenosis after balloon angioplasty: a novel vascular protective factor. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 43, 950-957.
- Smitka K., Papezova H., Vondra K., Hill M., Hainer V., Nedvidkova J. (2011) A higher response of plasma neuropeptide Y, growth hormone, leptin levels and extracellular glycerol levels in subcutaneous abdominal adipose tissue to Acipimox during exercise in patients with bulimia nervosa: single-blind, randomized, microdialysis study. *Nutrition & Metabolism*, 8:81.
- Strober, M., Lampert, C., Morrell, W., Burroughs, J., Jacobs, C. (1990) A controlled family study of anorexia nervosa: Evidence of familial aggregation and lack of shared transmission with affective disorders. *Int. J. Eat. Disord.* 9, 239-253.
- Sundaramurthy, D., Pieri, L. F., Gape, H., Markham, A. F., Campbell, D. A. (2000) Analysis of the serotonin transporter gene linked polymorphism (5-HTTLPR) in anorexia nervosa. *Am. J. Med. Genet.* 96, 53-55.
- Taha, H., Skrzypek, K., Guevara, I., Nigisch, A., Mustafa, S., Grochot-Przeczek, A., Ferdek, P., Was, H., Kotlinowski, J., Kozakowska, M., Balcerzyk, A., Muchova, L., Vitek, L., Weigel, G., Dulak, J. and Jozkowicz, A. (2010) Role of heme oxygenase-1 in human endothelial cells: lesson from the promoter allelic variants. *Arterioscler. Thromb Vasc.Biol.* 30, 1634-1641.
- Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R. (1968) The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 61, 748-755.
- Tenhunen, R., Marver, H.S. and Schmid, R. (1969) Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J. Biol. Chem.* 244, 6388-6394.
- Theander, S. (1970) Anorexia nervosa: a psychiatric investigation of 94 female patients. *Acta Psych. Scand.* S214, 1-194.
- Thoenen, H. (2005) Neurotrophins and neuronal plasticity. *Science* 270, 593-598.
- Trace, S.E., Baker, J.H., Penas-Lledó, E., Bulik, C.M. (2013) The genetics of eating disorders. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 9, 589-620.
- Wade, T.D., Treloar, S.A., Heath, A.C., Martin, N.G. (2009) An examination of the overlap between genetic and environmental risk factors for intentional weight loss and overeating. *Int. J. Eat. Dis.* 42, 492-497.
- Yamada, N., Yamaya, M., Okinaga, S., Nakayama, K., Sekizawa, K., Shibahara, S., Sasaki, H. (2000) Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am. J. Hum. Genet.* 66, 187-195.

## 8. SEZNAM PUBLIKACÍ DOKTORANDA

### 8.1. Publikace, které jsou součástí disertace

8.1.1. **Martásková D**, Šlachtová L, Kemlink D, Záhoráková D, Papežová H: Polymorphisms in serotonin-related genes in anorexia nervosa. The first study in Czech population and meta-analyses with previously performed studies. *Folia Biologica* 55, 192-197, 2009 (*IF* = 0,924)

8.1.2. Šlachtová L, **Kaminska D**, Chval M, Králík L, Martásek P, Papežová H: Stress perception and (GT)<sub>n</sub> repeat polymorphism in HO-1 gene are both risk factors in eating disorder development. *Folia Biologica*, *in press*, (*IF* 2012 = 1,219)

8.2.1. **Martásková D**, Papežová H: Genetické aspekty poruch příjmu potravy *In*: Papežová a kol. Spektrum poruch příjmu potravy, Grada 2010, 56-61.

### 8.2. Rukopisy v revisi nebo přípravě

8.1.3. Boraska V, Franklin CS, Floyd JAB, et al. A genome-wide association study of anorexia nervosa. *Molecular Psychiatry*, *in admission (revised resubmission, IF* 2012 = 14,897)

8.3.1. Papežová a kol. The role of genotypes of BDNF in anorexia and bulimia nervosa subtypes phenotypization. (*Publikace v přípravě, plánováno zaslání do časopisu Journal of Psychiatric Research, IF* = 4,066)