

PROFILO MICROBIOMICO E METABOLOMICO IN SOGGETTI CON ANORESSIA NERVOSA PRIMA E DOPO RECUPERO DI PESO: UN APPROCCIO MULTI-OMICO

Sebbene l'eziopatogenesi dell'Anoressia Nervosa (AN) non sia ancora del tutto nota, tra i possibili meccanismi patogenetici sono state proposte le alterazioni dei sistemi di regolazione dell'alimentazione. Recentemente, il microbiota intestinale è stato indicato come un importante fattore in grado di contribuire ai meccanismi che regolano l'appetito e il peso corporeo, nonché alcune funzioni del SNC che possono avere un ruolo nella fisiopatologia dell'AN. Pertanto, un'idea emergente è che il microbiota intestinale potrebbe contribuire allo sviluppo di questo disturbo. Inoltre, recenti studi con approccio metabolomico hanno permesso la caratterizzazione di presunti biomarcatori in diverse malattie mentali. Tuttavia, l'applicazione di tale metodica è ancora scarsa nell'ambito dell'AN. Lo scopo di questo studio, pertanto, è stato quello di analizzare i profili del microbioma fecale di donne con AN prima e dopo il recupero del peso e di correlarli con i profili metabolomici fecali, secondo un approccio multi-omico.

Il campione clinico era composto da 24 donne che soddisfacevano i criteri del Manuale Diagnostico e Statistico per i Disturbi Mentali-5a edizione (DSM-5) per l'AN. Il microbioma intestinale delle partecipanti è stato sequenziato sia nella fase acuta con sottopeso (T0) che dopo il ripristino del peso (T1) e confrontato con quello di 20 donne sane (CTRL) in buona salute fisica e mentale, come valutato da visita medica, colloquio clinico di routine e Intervista Neuropsichiatrica Mini-Internazionale. Secondo un approccio multi-omico, i dati del microbioma sono stati correlati con i metaboliti fecali

caratterizzati nelle partecipanti da una procedura metabolomica *untargeted*. Rispetto alle donne sane, i soggetti con AN hanno mostrato una ridotta abbondanza batterica intra-individuale, un aumento del rapporto tra Bacteroidetes e Firmicutes e cambiamenti significativi nelle abbondanze relative di diversi batteri a vari livelli di ordine tassonomico sia nella condizione di sottopeso sia dopo ripristino del peso. L'approccio metabolomico *untargeted* ha consentito la caratterizzazione di 224 metaboliti coinvolti nel metabolismo energetico, lipidico e aminoacidico. Sono stati identificati 14 metaboliti in grado di differenziare nettamente i tre gruppi di soggetti e differenze significative sono emerse tra gruppi nelle concentrazioni fecali di alcuni composti. Inoltre, un algoritmo genetico ha consentito di individuare 49 metaboliti raggruppati in tre gruppi separati: uno con concentrazioni significativamente più basse nei controlli, uno con concentrazioni significativamente più basse nelle persone con AN in fase acuta, uno con concentrazioni significativamente più basse nelle persone con AN dopo il recupero del peso. Le relazioni tra questi 49 metaboliti fecali e i generi di batteri hanno mostrato strutture diverse nei 3 gruppi di studio. In particolare, i soggetti sani hanno mostrato una complessa rete di relazioni tra batteri e metaboliti, come mostrato da diversi nodi di clustering per entrambe le caratteristiche. Le donne con AN al T0, invece, hanno mostrato un contesto molto semplice in base al minor numero di nodi di clustering principali mentre al T1 hanno mostrato una situazione intermedia. Infine, nell'AN in fase acuta il 70% di queste correlazioni ha mostrato un segno negativo suggerendo un consumo prevalente di metaboliti da parte del microbiota intestinale.

Nel presente studio sono stati analizzati i profili del microbioma fecale di donne con AN prima e dopo il recupero ponderale, integrati con l'analisi del metaboloma

fecale. È stata evidenziata l'insorgenza di disbiosi intestinale in soggetti affetti da AN acuta che non si è completamente normalizzata dopo breve tempo dal ripristino di un normale peso corporeo. Inoltre, è stato evidenziato che nei pazienti con AN i batteri intestinali sono significativamente collegati con diversi metaboliti fecali in modo diverso rispetto ai normali controlli, e che alcune di queste relazioni hanno una direzione divergente nella fase acuta rispetto alla fase di ripristino del peso di AN. Questi dati suggeriscono la necessità di ulteriori studi volti a indagare se le correzioni della disbiosi intestinale e del dismetabolismo possano avere risvolti terapeutici nell'AN.

MICROBIOMICS AND METABOLOMICS SIGNATURES IN ANOREXIA NERVOSA PATIENTS BEFORE AND AFTER WEIGHT REGAIN: A MULTI-OMICS APPROACH

Although the etiopathogenesis of Anorexia Nervosa (AN) is not yet completely known, alterations in the feeding regulatory systems have been proposed as possible pathogenetic mechanisms. Recently, the gut microbiota has been indicated as an important contributor to the mechanisms regulating host appetite and body weight as well as brain functions that may have a role in the pathophysiology of AN. Thus, an emerging idea is that the intestinal microbiota could contribute to the development of this disorder. Moreover, although metabolomics studies are recently spreading and have allowed the characterization of putative biomarkers in many mental diseases, they are relatively scanty in AN. Aim of this study was to analyse fecal microbiome profiles of AN women before and after weight restoration and to combine them with fecal metabolomic profiles according to a multi-omics approach.

The clinical sample was composed by 24 women who met the criteria of the Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders-5th edition (DSM-5) for AN as assessed by the Structured Clinical Interview for DSM-5, Clinician Version (SCID-5-CV). The gut microbiome of participants was sequenced in both the underweight phase (T0) and after short-term weight restoration (T1) and compared to that of 20 healthy women (CTRL) regularly menstruating and in good physical and mental health, as assessed by physical examination, routine medical interview and the Mini-International Neuropsychiatric Interview. According to a multi-omics approach,

microbiome data were correlated with relevant fecal metabolites characterized in participants by an untargeted metabolomic procedure.

AN subjects showed a decreased intra-individual bacterial richness, an increased Bacteroidetes-to-Firmicutes abundance ratio and significant changes in the relative abundances of several bacteria at different order levels in both the underweight and weight-restored condition compared to healthy women. The untargeted metabolomic procedure allowed the characterization of 224 metabolites involved in energy, lipid and amino acid metabolism. Fourteen metabolites able to separate the 3 subject groups were identified and statistically significant differences in some fecal compounds emerged among the 3 groups. Moreover, a genetic algorithm identified 49 relevant metabolites clustered in 3 separated groups: one with lower concentrations in healthy controls, one with lower concentrations in underweight patients and one with lower concentrations in weight-restored patients. The relationships among these fecal metabolites and bacteria genera showed different frameworks in the 3 groups. In particular, healthy subjects showed a complex net of relationships between bacteria and metabolites as showed by several clustering nodes for both the features. AN women at T0, instead, showed a very simple context according to the lower number of principal clustering nodes while at T1 they showed an intermediate situation. Finally, in acute AN 70% of those correlations showed a negative sign suggesting a prevalent metabolites consumption by gut microbiota.

In the present study we analyzed fecal microbiome profiles of women with AN before and after weight restoration and combined them with fecal metabolomes. We found the occurrence of gut dysbiosis in acutely ill AN subjects that did not normalize after short-term weight restoration. Moreover, we have provided the evidence that in

AN patients gut bacteria are significantly connected with several fecal metabolites differently with respect to normal controls, and that some of these relationships have a divergent direction in the acute phase with respect to the weight restored phase of AN. These data should prompt further studies aiming to investigate whether correction of gut dysbiosis and dysmetabolism may have therapeutic effects in AN.