

# Analiza mikrobioty jelitowej u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu

Analysis of intestinal microbiota of children with autism spectrum disorders

**mgr Paulina Maria Żebrowska-Różańska**

Promotor: dr hab. Łukasz Łaczmański, prof. PAN  
Promotor pomocniczy: dr n. med. Paweł Karpiński



Niniejsza praca doktorska wykonana została  
w Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki,  
Instytut Immunologii i Terapii Doświadczalnej im. Ludwika Hirszfelda  
Polskiej Akademii Nauk we Wrocławiu

2023



# Spis treści

<b>Streszczenie</b>	<b>9</b>
<b>Abstract</b>	<b>11</b>
<b>Wykaz skrótów</b>	<b>13</b>
<b>Oświadczenie bioetyczne</b>	<b>16</b>
<b>1 Wstęp</b>	<b>17</b>
1.1 Zaburzenia ze spektrum autyzmu: definicja, epidemiologia i etiologia . . . . .	17
1.2 Badania dotyczące mikrobiomu jelitowego w kontekście ASD .	25
1.3 Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe . . . . .	32
<b>2 Cel pracy</b>	<b>39</b>
<b>3 Materiały i metody</b>	<b>40</b>
3.1 Materiały . . . . .	40
3.1.1 Uczestnicy badania . . . . .	40
3.1.2 Materiał badawczy . . . . .	41
3.2 Metody . . . . .	42
3.2.1 Ekstrakcja kwasów nukleinowych mikroorganizmów z próbek kału . . . . .	42
3.2.2 Sekwencjonowanie DNA . . . . .	46
3.2.3 Analiza bioinformatyczna . . . . .	51
3.2.3.1 Analiza danych z sekwencjonowania DNA . .	52

3.2.3.2	Różnorodność alfa . . . . .	55
3.2.3.3	Różnorodność beta . . . . .	59
3.2.3.4	Analiza różnic w obfitości . . . . .	60
3.2.3.5	Przewidywanie funkcji metabolicznych mikro- biomu . . . . .	65
3.2.4	Analiza krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych . .	65
3.2.5	Analiza danych ankietowych . . . . .	67
3.2.5.1	Nawyki żywieniowe . . . . .	67
3.2.5.2	Ocena diety uczestników badania . . . . .	68
3.2.5.2.1	Analiza danych żywieniowych . . . . .	68
3.2.5.2.2	Analiza danych żywieniowych w kontekście rodzin . . . . .	72
3.2.5.3	Ocena dolegliwości ze strony układu pokar- mowego . . . . .	72
3.2.5.3.1	Wypróżnienia, ból brzucha, gazy, wzdęcia . .	73
3.2.5.3.2	Wypróżnienia i skala uformowania stolca . . .	74
3.2.5.4	Wypróżnienia i kolor stolca . . . . .	76
3.2.5.4.1	Wskaźnik dolegliwości jelitowych . . . . .	77
<b>4</b>	<b>Wyniki</b>	<b>78</b>
4.1	Charakterystyka uczestników badania . . . . .	78
4.2	Wyniki analizy mikrobiomu jelitowego . . . . .	85
4.2.1	Różnorodność alfa . . . . .	85
4.2.2	Różnorodność beta . . . . .	87
4.2.3	Analiza różnic w obfitości . . . . .	88
4.3	Wyniki analizy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych . .	95
4.4	Wyniki analizy diety uczestników . . . . .	98
4.5	Wyniki analizy dolegliwości ze strony układu pokarmowego . .	105
4.5.0.1	Wypróżnienia, ból brzucha, gazy, wzdęcia . .	105
4.5.0.2	Wypróżnienia i skala uformowania stolca . . .	107
4.5.0.3	Wypróżnienia i kolor stolca . . . . .	108
4.5.0.4	Wskaźnik dolegliwości jelitowych . . . . .	110

<b>SPIS TREŚCI</b>	<b>5</b>
<hr/>	
<b>5 Dyskusja</b>	<b>112</b>
<b>6 Wnioski</b>	<b>133</b>
<b>Spis rysunków</b>	<b>138</b>
<b>Spis tabel</b>	<b>139</b>
<b>Dodatek</b>	<b>182</b>
Lista publikacji . . . . .	186



# Podziękowania

Pragnę wyrazić swoją głęboką wdzięczność dla wszystkich, którzy przyczynili się do realizacji niniejszej pracy doktorskiej.

Na samym początku, chciałabym złożyć najserdeczniejsze podziękowania dla wszystkich **Uczestników Badania - Rodziców i Dzieci**, których nieocenione zaangażowanie, hojność czasu i otwarta gotowość do współpracy były kluczowe dla realizacji tego projektu. To dzięki Wam byliśmy w stanie zgromadzić cenne dane, które pomogły w eksploracji tematu niniejszej pracy doktorskiej. Wasza chęć pomocy i zaangażowanie miały ogromne znaczenie i za to jestem niezmiernie wdzięczna.

Chciałabym wyrazić głęboką wdzięczność dla mojego **Promotora, Profesora Łukasza Łacmańskiego**. Jego cenne wskazówki, niezłomne wsparcie i zaufanie, które mi okazał, pozwoliły na realizację tego projektu doktorskiego. To dzięki Jego inspirującym wyzwaniom naukowym, mogłam rozwijać się jako badacz. Jego wyrozumiałość, cierpliwość i pozytywny duch współpracy były bezcenne w trakcie całego procesu tworzenia tej pracy. Za wszystko to jestem bardzo wdzięczna.

Moje podziękowania kieruję również do **Promotora pomocniczego, Doktora Pawła Karpińskiego**, który skierował mnie na ścieżkę naukową i otworzył drzwi do świata badań.

Pragnę podziękować **Pracownikom Zakładu Immunologii Chorób Zakaźnych oraz Laboratorium Genomiki i Bioinformatyki** za życzliwą atmosferę. Szczególne podziękowania kieruję do **mgr inż. Patrycji Bochen**, której pomoc w digitalizacji dzienników dietetycznych i wykonaniu oznaczeń SCFA była nieoceniona. Szczególne wyrazy uznania pragnę skiero-

wać do **mgr Doroty Kujawy**. Jej kompetentne wprowadzenie mnie w techniki sekwencjonowania DNA, a także bezcenna obecność i pomoc podczas prac laboratoryjnych, były nieodzownym wsparciem w realizacji tego projektu. Pragnę podziękować moim **Kolegom i Koleżankom doktorantom**. To dzięki Waszej obecności, wsparciu i zrozumieniu dla wyzwań związanych z doktoratem, proces ten stał się nie tylko naukowym wyzwaniem, ale i okazją do nawiązania wartościowych relacji.

Serdeczne podziękowania kieruję do wszystkich osób, które na różnych etapach tworzenia pracy przyczyniły się do jej powstania, służąc radą, pomocą naukową i techniczną oraz za aktywne przyczynienie się do zebrania ochotników do tego badania.

Chciałbym wyrazić swoją wdzięczność dla **twórców programu DietetykPro** za bezpłatne przyznanie dostępu. Wykorzystanie programu było kluczową pomocą w analizie dietetycznej.

Z ogromnym uznaniem pragnę podziękować mojemu **Mężowi, mgr inż. Tomaszowi Różańskiemu**. Jego nieoceniona pomoc w części analitycznej, wsparcie w analizie statystycznej i bioinformatycznej były kluczowe dla realizacji tej pracy. Bez Jego zaangażowania i wiedzy ta praca nie osiągnęłaby obecnego kształtu.

Na koniec, chciałabym podziękować **moim Rodzicom, Rodzinie mojej i Męża oraz Przyjaciołom**, za ogromne wsparcie w tym intensywnym czasie powstawania pracy doktorskiej. Wasze niewzruszone wsparcie w tym dynamicznym i wymagającym okresie było dla mnie niezmiernie cenne. To właśnie Wasza niezachwiana wiara w realizację tego projektu była dla mnie nieustającą motywacją.



# Streszczenie

Celem niniejszej pracy doktorskiej było przeprowadzenie szczegółowej analizy i wykazanie różnic w składzie mikrobioty jelitowej, na podstawie analizy próbek stolca, w trzech badanych grupach: dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ASD,  $n = 71$ ), ich neurotypowego rodzeństwa ( $n = 29$ ) oraz w grupie kontrolnej niespokrewnionych neurotypowych dzieci ( $n = 44$ ), w kontekście analizy diety, zawartości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) oraz doświadczanych dolegliwości jelitowych.

W celu ustalenia składu mikrobioty wykonano wysokoprzepustowe sekwencjonowanie następnej generacji (NGS) amplikonów zmiennych regionów V3 – V4 oraz V7 – V9 genu markerowego *16S rRNA*. Analizę bioinformatyczną wykonano wykorzystując środowisko Qiime2 z dodatkowymi wtyczkami. W celu przeprowadzenia jednoczesnej analizy na podstawie dwóch sekwencjonowanych amplikonów, zastosowano *Sidle*, wersję algorytmu Short Multiple Reads Framework (SMURF). Przeprowadzono badania ankietowe w celu ustalenia ważnych kowariatów, które mogłyby mieć wpływ na mikrobiom jelitowy. Za pomocą badania ankietowego oceniono skalę dolegliwości jelitowych, żywienie w okresie niemowlęcym, a także dietę z 7 dni poprzedzających pobranie próbki stolca do badania mikrobioty. Aby ocenić udział poszczególnych SCFA w próbkach stolca wykonano analizę HPLC.

W badaniu wykazano istotne różnice w składzie mikrobioty jelitowej pomiędzy grupami, wskazując na zwiększenie różnorodności i równomierności w mikrobiocie neurotypowego rodzeństwa względem dzieci z ASD i niespokrewnionej neurotypowej grupy kontrolnej. Zidentyfikowano 53 taksony bakteryjne o obfitościach istotnie różnych pomiędzy badanymi grupami, przy

czym największe różnice między dziećmi z ASD w odniesieniu do neurotypowej niespokrewnionej grupy kontrolnej dotyczyły zwiększonej obfitości taksonu należącego do rodziny Lachnospiraceae, rodzaju *Gelria* i *Desulfovibrio* oraz zmniejszonej obfitości rodzajów *Faecalitalea*, *Parabacteroides* i *Odoribacter*.

Potwierdzono wcześniejsze doniesienia o tym, że dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu częściej doświadczają dolegliwości jelitowych. Wskazano na istotne różnice w nawykach żywieniowych dzieci z ASD, znajdując różnice również w okresie niemowlęcym. Nie znaleziono istotnych różnic w stężeniach SCFA.

Wyniki dostarczają informacji o różnicach w mikrobiocie jelitowej dzieci z ASD w odniesieniu do ich neurotypowego rodzeństwa i niespokrewnionych dzieci neurotypowych w populacji polskiej oraz stanowią dobrą podstawę do dalszej analizy funkcjonalnej mikrobiomów w tym typie zaburzeń neurorozwojowych. Zastosowanie podejścia sekwencjonowania dwóch amplikonów zawierających więcej niż jeden region zmienny do identyfikacji taksonomicznej znacząco poprawia rozdzielczość analizy zwiększając dokładność identyfikacji taksonomicznej, co stanowi istotny postęp w badaniach nad mikrobiomem i istotny wkład w tę dziedzinę badań.

# Abstract

The aim of this doctoral thesis was to conduct a detailed analysis and demonstrate differences in the composition of the gut microbiota, based on the analysis of stool samples, in three study groups: children with autism spectrum disorders (ASD,  $n = 71$ ), their neurotypical siblings ( $n = 29$ ), and a control group of unrelated neurotypical children ( $n = 44$ ), in the context of diet analysis, short-chain fatty acids (SCFA), and gastrointestinal symptoms.

High-throughput next-generation sequencing (NGS) of the hypervariable regions V3 – V4 and V7 – V9 of the *16S rRNA* was performed to determine the microbiota composition. Bioinformatic analysis was conducted using the Qiime2 environment with additional plugins. The Sidle version of the Short Multiple Reads Framework (SMURF) algorithm was used to conduct simultaneous analysis based on two sequenced amplicons. Surveys were conducted to determine important covariates that could influence the gut microbiome. The survey assessed the scale of gastrointestinal symptoms, infant feeding, as well as diet in the 7 days preceding the collection of stool samples for microbiota study. HPLC analysis was performed to assess SCFAs in stool samples.

The study demonstrated significant differences in the gut microbiota composition between groups, indicating increased diversity and evenness in the microbiota of neurotypical siblings compared to children with ASD and the unrelated neurotypical control group. A total of 53 bacterial taxa with abundances different between the study groups were identified, with increased abundance of taxa belonging to the family Lachnospiraceae, genus *Gelria* and *Desulfovibrio* in ASD group compared to unrelated controls, and decre-

ased abundance of the genera *Faecalitalea*, *Parabacteroides*, and *Odoribacter*.

We have confirmed the literature reports that children with autism spectrum disorders experience gastrointestinal symptoms more frequently compared to unaffected children. Significant differences in the dietary habits of children with ASD were pointed out, finding differences also during infancy. No significant differences in SCFA were found.

The results provide information about differences in gut microbiota of children with ASD compared to their neurotypical siblings and unrelated neurotypical children in the Polish population and provide a good basis for further functional analysis of microbiomes in this type of neurodevelopmental disorder. The use of a sequencing approach of two amplicons containing more than one hypervariable region for taxonomic identification significantly improves the resolution of the analysis, increasing the accuracy of taxonomic identification, which constitutes a significant advancement in microbiome research and a substantial contribution to this field of research.

# Wykaz skrótów

Skrót	Rozwinięcie angielskie	Rozwinięcie polskie
ASD	Autism Spectrum Disorder	Zaburzenia ze spektrum autyzmu
ICD-10	International Classification of Diseases, 10th Revision	Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób, 10. Rewizja
ICD-11	International Classification of Diseases, 11th Revision	Międzynarodowa Klasyfikacja Chorób, 11. Rewizja
DSM-5	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition	Diagnostyczny i Statystyczny Podręcznik Zaburzeń Psychiczych, 5. Edycja
ADDM	Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network	Sieć monitorowania autyzmu i zaburzeń rozwojowych
IQ	Intelligence Quotient	Iloraz inteligencji
WES	whole-exome sequencing	sekwencjonowanie egzomowe
ASD-P	autism spectrum disorder-predominant	geny z wyższą częstością w przypadku ASD
NDD	neurodevelopmental delay	opóźnienie rozwoju neurologicznego
GER	gene expression regulation	geny regulujące ekspresję genów
NC	neuronal communication	geny komunikacji neuronowej
FWER	family-wise error rate	wskaźnik błędów dla grupy powiązanych testów
FDR	false discovery rate	wskaźnik stwierdzeń fałszywie pozytywnych
SCFA	Short-Chain Fatty Acid	krótkołańcuchowy kwas tłuszczowy
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid	rybosomalny kwasy rybonukleinowe

Kontynuacja na następnej stronie

Tabela 1 – kontynuacja z poprzedniej strony

<b>Skrót</b>	<b>Rozwinięcie angielskie</b>	<b>Rozwinięcie polskie</b>
qPCR	quantitative real-time polymerase chain reaction	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym
IBD	inflammatory bowel disease	nieswoiste zapalenie jelit
PPA	propionic acid	kwas propionowy
5-HT	5-hydroxytryptamine, serotonin	5-hydroksytryptamina, serotonina
SA	sodium acetate	octan sodu
hNSC	human Neural Stem Cells	ludzkie komórki macierzyste układu nerwowego
TNF- $\alpha$	tumor necrosis factor $\alpha$	czynnik martwicy nowotworów $\alpha$
GPR41	G-protein coupled receptor 41	receptor sprzężony z białkami G, nr 41
p-Akt	phosphorylated Akt (Protein kinase B)	fosforylowana Akt (kinaza białkowa B)
PTEN	phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten	białko kodowane przez gen supresorowy PTEN zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 10
AMP	Adenosine monophosphate	Adenozyno-5'-monofosforan
AMPK	5' AMP-activated protein kinase	Kinaza aktywowana 5'AMP
HDAC-1	Histone deacetylase 1	deacetylaza histonowa-1
Trek1	TWIK-Related K <sup>+</sup> Channel	Członek 2 podrodziny K kanałów potasowych
NGS	next-generation sequencing	sekwencjonowanie następnej generacji
IRT	Inhibitor Removal Technology	technologia usuwania inhibitorów
DTT	Dithiothreitol	ditiotreitol
rRNA	Ribosomal RNA	rybosomalny RNA
ASV	Amplicon Sequence Variant	warianty sekwencji amplikonów
PCoA	Principal Coordinates Analysis	analiza głównych współrzędnych
OTU	Operational Taxonomic Unit	jednostka taksonomiczna
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography	wysokosprawna chromatografia cieczowa

Kontynuacja na następnej stronie

Tabela 1 – kontynuacja z poprzedniej strony

<b>Skrót</b>	<b>Rozwinięcie angielskie</b>	<b>Rozwinięcie polskie</b>
rpm	rotation per minute	obrotów na minutę
PCA	Principal Component Analysis	analiza głównych składowych
PC1	Principal Component 1	główna składowa 1
PC2	Principal Component 2	główna składowa 2

# Oświadczenie bioetyczne

Próbki biologiczne wykorzystane w tym badaniu oraz dane ankietowe zostały pozyskane wraz z uzyskaniem pisemnej zgody na udział w badaniu. Projekt uzyskał zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym we Wrocławiu, w opinii nr KB-837/2019 oraz KB-763/2020.



# Rozdział 1

## Wstęp

### 1.1 Zaburzenia ze spektrum autyzmu: definicja, epidemiologia i etiologia

#### Wprowadzenie

Zaburzenia ze spektrum autyzmu (*ang. Autism Spectrum Disorder, ASD*) to złożony stan neurorozwojowy, który wpływa na komunikację społeczną, interakcje i zachowanie jednostki. Termin *spektrum* wskazuje, że nasilenie i objawy ASD mogą się znacznie różnić w zależności od osoby. Sam termin *autyzm* został początkowo wprowadzony w celu opisanego objawu samowycofywania się u pacjentów ze schizofrenią [1].

Początek zaburzenia występuje w okresie rozwojowym, zwykle we wczesnym dzieciństwie, ale objawy mogą ujawnić się w pełni dopiero później, kiedy wymagania społeczne przekraczają ograniczone możliwości osób z zaburzeniami ze spektrum autyzmu. Deficyty są na tyle poważne, że powodują upośledzenie w ważnych obszarach funkcjonowania takich jak relacje osobiste, rodzinne, społeczne, edukacyjne, czy zawodowe. Osoby w spektrum autyzmu wykazują różny zakres funkcjonowania intelektualnego i zdolności językowych.

Zaburzenia ze spektrum autyzmu klasyfikowane były wg ICD-10 (*International Classification of Diseases, 10th Revision*) pod ogólnym terminem

„całościowe zaburzenia rozwojowe” z podziałem na: F84.0 Autyzm dziecięcy, F84.1 Autyzm atypowy, F84.2 Zespół Retta, F84.3 Inne dziecięce zaburzenia dezintegracyjne, F84.4 Zaburzenia hiperkinetyczne z towarzyszącymi upośledzeniami umysłowymi, F84.8 Inne głębokie zaburzenia rozwojowe oraz F84.9 Głębokie zaburzenia rozwoju psychoruchowego [2].

Klasyfikacja ta została zastąpiona przez ICD-11 (obowiązuje w Polsce od 1 stycznia 2022r.), gdzie ASD znajduje się w sekcji „6A02 Zaburzenia ze spektrum autyzmu” i według obowiązującej definicji ASD charakteryzuje się trudnościami inicjowaniu i podtrzymywaniu interakcji społecznych oraz komunikacji, powtarzalnymi i nieelastycznymi wzorcami zachowań, zainteresowaniami lub czynnościami, które są wyraźnie nietypowe lub nadmierne dla wieku danej osoby i wykraczają ponad kontekst socjokulturowy [3].

Klasyfikacja zaburzeń psychicznych Amerykańskiego Towarzystwa Psychiatrycznego, DSM-5 (ang. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 5th Edition) zawiera również kryteria diagnozowania ASD [4], z których główne to:

1. Utrzymujące się deficyty w komunikacji społecznej i interakcjach społecznych w wielu kontekstach, objawiające się jako:
  - a. Deficyty wzajemności społeczno-emocjonalnej.
  - b. Deficyty w niewerbalnych zachowaniach komunikacyjnych wykorzystywanych do interakcji społecznych.
  - c. Deficyty w rozwijaniu, utrzymywaniu i zrozumieniu relacji.
2. Ograniczone, powtarzające się wzorce zachowań, zainteresowań lub czynności, przejawiające się co najmniej dwoma z następujących objawów:
  - a. Stereotypowe lub powtarzające się ruchy motoryczne, takie jak ustawianie zabawek lub przewracanie przedmiotów, używanie przedmiotów lub mowy np. echolalia (powtarzanie słów lub całych zdań po innych osobach), używanie charakterystycznych i specyficznych zwrotów.

- b. Naleganie na identyczność, nieugięte trzymanie się rutyny lub zrytualizowanych wzorców zachowań werbalnych lub niewerbalnych.
  - c. Wysoce ograniczone, utrwalone zainteresowania, które odbiegają od normy pod względem intensywności lub skupienia.
  - d. Nadreaktywność lub hiporeaktywność na bodźce sensoryczne lub niezwykle zainteresowanie sensorycznymi aspektami otoczenia, takimi jak pozorną obojętność na ból lub temperaturę, adwersyjna reakcja na określone dźwięki lub tekstury, nadmierne wężchanie lub dotykanie przedmiotów, wizualna fascynacja światłami lub ruchem.
3. Objawy muszą być obecne we wczesnym okresie rozwojowym (ale mogą nie ujawnić się w pełni, dopóki wymagania społeczne nie przekroczą ograniczonych możliwości lub nie zostaną zamaskowane przez wyuczone strategie w późniejszym życiu).
  4. Objawy powodują istotne upośledzenie w życiu społecznym, zawodowym lub innych ważnych obszarach bieżącego funkcjonowania.
  5. Zaburzeń tych nie da się wytłumaczyć niepełnosprawnością intelektualną (zaburzeniami rozwoju intelektualnego) ani globalnym opóźnieniem rozwojowym.

## Epidemiologia

Sieć monitorowania autyzmu i zaburzeń rozwojowych (*ang. Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, ADDM*) to aktywny program monitorujący, który działa w 11 stanach USA i szacuje częstość występowania i charakterystykę ASD oraz kontroluje czas identyfikacji ASD u dzieci w wieku 4 i 8 lat. Dzieci spełniają kryterium diagnozy ASD, gdy mają w swoich aktach dokumentację, że kiedykolwiek otrzymały 1) pisemne oświadczenie diagnostyczne ASD od wykwalifikowanego specjalisty, 2) klasyfikację autyzmu w ramach edukacji specjalnej w szkole publicznej, lub 3) kod ASD ICD (kody ICD-9 między 299,00 a 299,99 lub ICD-10 w zakresie F84

z wyjątkiem F84.2, zespół Retta) uzyskane z informacji administracyjnych lub rozliczeniowych. Najnowszy raport z 2023 dotyczący 2020 roku podaje, że jedno na 36 dzieci w wieku 8 lat (czyli dzieci urodzone w 2012 roku) ma zaburzenia ze spektrum autyzmu [5]. Ogólna częstość występowania zaburzeń ze spektrum autyzmu to 27,6 na 1000 dzieci [5]. Stanowi to wzrost w stosunku do poprzedniego raportu z 2020, a dotyczącego danych z 2018 roku, gdzie jedno na 44 dzieci miało diagnozę ASD (23 dzieci na 1000) [6]. Trend wzrostu liczby dzieci diagnozowanych utrzymuje się od początku raportowania tych danych, co można zaobserwować w tabeli 1.1. Ogólny stosunek częstości występowania ASD wśród chłopców w porównaniu do dziewcząt wynosi 3,8, przy ogólnej częstości występowania ASD 43 na 1000 wśród chłopców i 11,4 na 1000 wśród dziewcząt (co po raz pierwszy stanowiło powyżej 1%).

Część dzieci z ASD (66,7%) w wieku 8 lat uwzględnionych w raporcie miało także dane dotyczące zdolności poznawczych. Mediana wieku, w którym dzieci poddawane były testowi poznawczemu to 67 miesięcy, czyli 5 lat i 7 miesięcy. Dziewczynki z ASD rzadziej niż chłopcy miały dane dotyczące zdolności poznawczych (64,4% w porównaniu z 67,3%) i były częściej klasyfikowane z niepełnosprawnością intelektualną (42,1%), niż chłopcy (36,9%). Ogólnie, 37,9% dzieci zostało sklasyfikowanych jako niepełnosprawne intelektualnie ( $IQ \leq 70$ ; IQ, *ang. Intelligence Quotient*, iloraz inteligencji), 23,5% w przedziale granicznym (IQ 71–85), a 38,6% w przedziale średnim lub wyższym ( $IQ > 85$ ).

Blisko połowa dzieci (49%) uzyskała diagnozę do czasu osiągnięcia wieku 36 miesięcy, tj. 3 lat, przy czym dzieci z niepełnosprawnością intelektualną miały większe prawdopodobieństwo otrzymania diagnozy do osiągnięcia tego wieku (61,8%), niż dzieci, które w testach poznawczych nie wykazywały objawów niepełnosprawności intelektualnej (46,0%).

Postępujący wzrost liczby identyfikowanych przypadków może być tłumaczony skuteczniejszymi metodami przesiewowymi, wzrostem świadomości oraz dostępności do diagnostyki, na co dodatkowym dowodem jest obserwacja większej częstości występowania ASD w 2020 roku wśród dzieci pochodzących z rodzin o niższym statusie społeczno-ekonomicznym, co jest odwrotnością wcześniej zaobserwowanych trendów [7].

Tabela 1.1: Rozpowszechnienie zaburzeń ze spektrum autyzmu wg danych z sieci monitorowania autyzmu i zaburzeń rozwojowych w latach 2000-2020 [8].

Rok badania	Roku urodzenia	Rozpowszechnienie na 1000 dzieci	1 na X dzieci
2020	2012	27,6	1 na 36
2018	2010	23,0	1 na 44
2016	2008	18,5	1 na 54
2014	2006	16,8	1 na 59
2012	2004	14,5	1 na 69
2010	2002	14,7	1 na 68
2008	2000	11,3	1 na 88
2006	1998	9,0	1 na 110
2004	1996	8,0	1 na 125
2002	1994	6,6	1 na 150
2000	1992	6,7	1 na 150

## Etiologia

Etiologia zaburzeń ze spektrum autyzmu jest złożona i wieloczynnikowa. Chociaż dokładne przyczyny pozostają niejasne, uważa się, że połączenie czynników genetycznych, epigenetycznych i środowiskowych przyczynia się do rozwoju ASD [9]. Jednak obecnie nie są dostępne żadne biomarkery diagnostyczne, a diagnoza opiera się na obserwacji cech behawioralnych [1]. Kluczowe znaczenie ma zrozumienie, że ASD jest złożonym schorzeniem, a doświadczenie każdej osoby jest unikalne. Do rozwoju ASD prawdopodobnie może przyczyniać się wzajemne oddziaływanie między predyspozycjami genetycznymi a czynnikami środowiskowymi [1].

## Czynniki genetyczne

Liczne badania sugerują silny komponent genetyczny w ASD [9]. Pewne warianty genetyczne, nieprawidłowości chromosomalne i warianty genów są związane ze zwiększonym ryzykiem rozwoju ASD [10]. Jednak żaden pojedynczy gen ani nieprawidłowość genetyczna nie została zidentyfikowana jako

jedyna przyczyna ASD. Uważa się, że prawdopodobnie zaangażowanych jest wiele czynników genetycznych, epigenetycznych i środowiskowych [9].

Międzynarodowe badanie, analizujące populacje Danii, Finlandii, Szwecji, Izraela i Zachodniej Australii, z udziałem ponad 2 milionów uczestników, w tym 22 156 ze zdiagnozowanymi zaburzeniami ze spektrum autyzmu, wykazało, że ASD ma szacowaną dziedziczność na poziomie 80% [11]. Oszacowano addytywny wpływ genetyczny, czynników matczynych oraz wspólnych i niedzielonych skutków środowiskowych na ogólne ryzyko ASD. Efekt matczyny oszacowano na 0,4–1,6%, nie wskazując na poparcie udziału tego efektu w etiologii ASD.

Innym dowodem wspierającym udział czynników genetycznych są wyniki metaanalizy badającej bliźnięta z ASD [12]. W tym badaniu dowiedziono, że: (a) ASD jest wynikiem silnych efektów genetycznych, oszacowano dziedziczność na poziomie 64–91%; (b) efekty środowiskowe stają się istotne w miarę malejącego wskaźnika zapadalności (większy efekt środowiska obserwuje się przy założeniu, że ASD dotyczy 1% [35%], niż 5% [0,7%]); (c) wpływy środowiskowe prawdopodobnie są statystycznym artefaktem związanym z nadreprezentacją bliźniąt dwujajowych, u których występowało ASD. Autorzy nie wykluczają jednak udziału czynnika środowiskowego, bądź niegenetycznych w etiologii ASD.

Badania wskazują, że rzadkie warianty dziedziczne i *de novo* są głównymi czynnikami indywidualnego ryzyka wystąpienia zaburzeń ze spektrum autyzmu [13, 14, 15]. W badaniu z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania egzomowego (WES, *ang. whole-exome sequencing*) w przypadku ASD, z udziałem łącznie 35 584 próbek, w tym 11 986 osób z ASD, zidentyfikowano 102 geny zaangażowane w ryzyko wystąpienia zaburzeń ze spektrum autyzmu [10]. Geny te można podzielić ze względu na efekt fenotypowy (53 geny z wyższą częstością w przypadku ASD, ASD-P, *ang. autism spectrum disorder-predominant* oraz 49 genów częściej występujących z wariantami u osób z ciężkim opóźnieniem neurorozwojowym, NDD, *ang. neurodevelopmental delay*), a także rolę funkcjonalną (58 genów GER, *ang. gene expression regulation*, regulacja ekspresji genów, w tym regulatory chromatyny i czynniki transkrypcyjne; 24 geny NC, *ang. neuronal communication*, komunikacji

neuronowej; 9 genów cytoszkieletu i 11 innych), podsumowanie zobrazowano na rysunku 1.1. Większość zidentyfikowanych genów ulega ekspresji w liniach neuronalnych pobudzających i hamujących, na wczesnych etapach rozwoju (płodowego i po urodzeniu). Osoby z ASD, które posiadają destrukcyjne warianty *de novo* genów GER lub NC, wykazują opóźnienie wieku chodzenia oraz obniżony iloraz inteligencji (IQ) w porównaniu z osobami, które nie mają mutacji w tych 102 genach. Przy czym silniejszy negatywny efekt na opóźnienie chodzenia wywołują warianty genów GER niż NC. Zaobserwowano także dwukrotnie zwiększoną częstość występowania wariantów *de novo* prowadzących do utraty funkcji w genach silnie ograniczonych pod względem zmienności genetycznej, u dotkniętych ASD mężczyzn w porównaniu do kobiet z ASD. W sumie, wszystkie *de novo* warianty egzomowe (w kodujących białka sekwencjach DNA) w autosomach (chromosomy, które nie są chromosomami płci) wyjaśniają łącznie 1,92% różnicowania występowania ASD. Oznacza to, że te warianty genetyczne mają niewielki, ale obserwowalny wkład w rozwój i występowanie ASD. Większość różnicowania ASD nie jest wyjaśniana przez te konkretne *de novo* warianty genetyczne, co sugeruje, że inne czynniki, takie jak środowisko i dziedziczenie genetyczne, również odgrywają istotną rolę w etiologii tych zaburzeń neurorozwojowych.

	53 geny ASD			49 genów ASD & NDD		
Regulatory ekspresji genów 58 genów	<b>ASH1L</b>	<b>KMT2C</b>	<b>RFX3</b>	<b>ADNP</b>	<b>IRF2BPL</b>	<b>SETD5</b>
	<b>CELF4</b>	<b>KMT2E</b>	<b>RORB</b>	<b>ANKRD11</b>	<b>MBD5</b>	<b>SIN3A</b>
	<b>CHD8</b>	<b>KMT5B</b>	<b>SATB1</b>	<b>ABID1B</b>	<b>MED13L</b>	<b>TBL1XR1</b>
	<b>DEAF1</b>	<b>LDB1</b>	<b>SKI</b>	<b>ASXL3</b>	<b>MYT1L</b>	<b>TCF4</b>
	<b>EIF3G</b>	<b>MKX</b>	<b>SMARCC2</b>	<b>BCL11A</b>	<b>NACC1</b>	<b>TCF7L2</b>
	<b>ELAVL3</b>	<b>NCOA1</b>	<b>TBR1</b>	<b>CHD2</b>	<b>NSD1</b>	<b>TCF20</b>
	<b>HDLBP</b>	<b>PAX5</b>	<b>ZMYND8</b>	<b>CREBBP</b>	<b>NR3C2</b>	<b>TLK2</b>
	<b>KDM5B</b>	<b>PHF2</b>		<b>CTNNB1</b>	<b>PHF12</b>	<b>TRAF7</b>
	<b>KDM6B</b>	<b>PHF21A</b>		<b>DNMT3A</b>	<b>POGZ</b>	<b>TRIP12</b>
Komunikacja neuronalna 24 geny	<b>ANK2</b>	<b>GRIA2</b>	<b>SCN1A</b>	<b>FOXP1</b>	<b>PPP2R5D</b>	<b>VEZF1</b>
	<b>AP2S1</b>	<b>KCNMA1</b>	<b>SHANK2</b>	<b>FOXP2</b>	<b>RAI1</b>	<b>WAC</b>
	<b>CACNA2D3</b>	<b>NRXN1</b>	<b>SHANK3</b>	<b>CACNA1E</b>	<b>KCNQ3</b>	<b>SLC6A1</b>
	<b>DIP2A</b>	<b>PTEN</b>		<b>GABRB2</b>	<b>LRRC4C</b>	<b>STXBP1</b>
	<b>DSCAM</b>	<b>PPP1R9B</b>		<b>GABRB3</b>	<b>PRR12</b>	<b>SYNGAP1</b>
Cytoszkielec 9 genów	<b>CORO1A</b>	<b>GFAP</b>	<b>PTK7</b>	<b>GRIN2B</b>	<b>SCN2A</b>	
	<b>DPYSL2</b>	<b>MAP1A</b>	<b>SPAST</b>	<b>DYNC1H1</b>	<b>DYRK1A</b>	<b>TAOK1</b>
Inne 11 genów	<b>GIGYF1</b>	<b>PPP5C</b>	<b>TM9SF4</b>	<b>GNAI1</b>	<b>HECTD4</b>	
	<b>KIAA0232</b>	<b>SRPRA</b>	<b>TRIM23</b>			
	<b>NUP155</b>	<b>TEK</b>	<b>UBR1</b>			

Rysunek 1.1: Kategorie fenotypowe i funkcjonalne genów związanych z ASD. Geny można funkcjonalnie podzielić na cztery grupy (regulacja ekspresji genów [GER], wyróżnione na fioletowym tle; komunikacja neuronalna [NC], na zielonym tle; związane z cytoszkieletem, na ciemnoszarym tle i inne zaznaczone na jasnoszaro).  $FWER \leq 0,05$ ;  $FDR \leq 0,05$ ;  $FDR \leq 0,10$  ( $FWER$ , *family-wise error rate*, wskaźnik równy prawdopodobieństwu, że zostanie popełniony co najmniej jeden błąd typu I [niewłaściwe odrzucenie hipotezy zerowej] dla całej rodziny przeprowadzonych testów statystycznych;  $FDR$ , *false discovery rate*, miara kontrolująca ryzyko popełnienia błędu typu I w kontekście wielokrotnego testowania hipotez). Rycinę zaczerpnięto z [10], zmodyfikowano.



## Czynniki środowiskowe

Pewne czynniki środowiskowe mogą odgrywać rolę w rozwoju ASD [16]. Jako potencjalne czynniki ryzyka badano ekspozycje prenatalne, okołourodzeniowe oraz postnatalne. Najczęściej cytowane źródła ryzyka środowiskowego obejmują narażenie na toksyny i metale ciężkie w życiu płodowym [17], narodziny dziecka i miejsce zamieszkania matki w pobliżu źródeł zanieczyszczenia powietrza [18], stosowanie leków [19, 20] i substancji psychoaktywnych podczas ciąży [21, 22], a także czynniki zdrowotne rodziców, w tym wiek [23], otyłość matki i cukrzyca [24, 25] i stan witamin w okresie przed i okołociążowym [26, 27, 28] oraz choroby zakaźne i stan zapalny u matki [22].

Interakcje między czynnikiem genetycznym a czynnikami środowiskowymi zostały zaproponowane jako główny mechanizm etiologii autyzmu [29, 30]. Jako najważniejszy czynnik pośredniczący w interakcjach między środowiskiem a genomem uważane są oddziaływania epigenetyczne [31]. Efekt czynników środowiskowych może wyrażać się przez wpływ na jakość i ilość ekspresji genów poprzez mechanizmy epigenetyczne, w tym metylację DNA, zmiany w białkach histonowych i ekspresję niekodujących RNA [16]. Dodatkowo, pojawiają się przesłanki o tym, że narażenie na czynniki środowiskowe, które przypisuje się jako istotne czynniki ryzyka dla zaburzeń ze spektrum autyzmu, może odgrywać przyczynową rolę w pojawianiu się szkodliwych mutacji *de novo* [32]. Należy podkreślić, że żaden z czynników środowiskowych nie jest wystarczający, aby wywołać zaburzenia ze spektrum autyzmu, raczej zbiór czynników może odgrywać rolę w występowaniu ASD [33].

## 1.2 Badania dotyczące mikrobiomu jelitowego w kontekście ASD

Mikrobiota to społeczność składająca się głównie z bakterii, archeonów, wirusów i mikroorganizmów eukariotycznych, takich jak grzyby, czy protisty [34, 35, 36]. Obok genomów jądrowych i mitochondrialnych, mikrobiom, odnoszący się do materiału genetycznego mikrobioty, odgrywa ważną rolę w

zdrowiu i chorobach człowieka [36], na przykład poprzez uzupełnianie funkcji molekularnych i metabolicznych [37]. W szczególności mikrobiom jelitowy jest postrzegany jako niezbędny element zapewniający homeostazę [38, 39]. Ponadto, jak podano w literaturze, jelitowy układ nerwowy i centralny układ nerwowy mogą komunikować się i oddziaływać na układy odpornościowy, endokrynologiczny i neuronalny [40]. Koncepcja osi jelito–mikrobiota–mózg jako dwukierunkowego systemu komunikacyjnego, korzystającego z wielu wspólnych ścieżek, takich jak autonomiczny system nerwowy (część układu nerwowego, która działa niezależnie od naszej świadomej kontroli, jest odpowiedzialny za regulację funkcji wewnętrznych organizmu) i produkcja neuroprzekazników czy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA, *ang. Short-Chain Fatty Acid*) [41], zyskała na popularności na przestrzeni lat w podejściu ekosystemowym do zdrowia człowieka [42]. Zainteresowanie tym tematem ciągle rośnie i jest dokładnie opisywane [41, 43, 44] ze względu na jego udowodnioną rolę w regulacji wielu funkcji organizmu [39]. Kluczową rolę mikrobioty jelitowej wykazano w wielu schorzeniach, w tym w alergiach, zaburzeniach wydzielania wewnętrznego, powikłaniach związanych ze stanem odżywiania i zmianami metabolicznymi, takimi jak otyłość i cukrzyca, chorobach zapalnych jelit, a także w zaburzeniach z spektrum autyzmu [45].

Mikrobiota, jako niegenetyczny element dziedziczny, przyczynia się do metabolizmu i wpływa na układ nerwowy i odpornościowy gospodarza [46, 47, 48], a nabywana jest w trakcie ciąży, podczas porodu i po narodzinach, gdy niemowlę dziedziczy mikrobiotę pochwy, skóry, kału i ust matki [49, 50, 51]. Następnie, poprzez mleko matki lub mleko modyfikowane, noworodek otrzymuje kolejne inokulum mikroorganizmów, które zasiedlą jego jelita [52, 53, 51]. Mikrobiota jelitowa formuje się w pierwszych latach życia dziecka [51] i przechodzi większość swojego rozwoju na wczesnym etapie życia dziecka, a główne zmiany w składzie obserwuje się do momentu, gdy dziecko ma 2 do 3 lat [54, 55, 56, 57]. Niektóre dowody wskazują, że prawie połowa dojrzałości mikrobioty jest osiągnięta około trzeciego roku życia [56]. Niemniej jednak, dorosły poziom różnorodności mikrobioty jelitowej może nie być osiągnięty nawet w wieku 5 lat [54, 57] i pewne dowody wskazują, że dojrzewanie mikrobioty może trwać przez okres dojrzewania [58, 59]. W

tym czasie, czynniki środowiskowe, takie jak typ żywienia, karmienie piersią, dieta zależna od kultury i pory roku, a także inne narażenia środowiskowe czy higiena, wpływają na jego formowanie [60, 51]. Mikrobiota może zostać łatwo zaburzona, na przykład przez stosowanie kortykosteroidów lub leków hamujących wydzielanie kwasu żołądkowego (inhibitory pompy protonowej, ograniczają wydzielania kwasu solnego przez komórki okładzinowe błony śluzowej żołądka), eliminowana przez terapię antybiotykową, zmieniana przez terapie probiotyczne lub zakłócana przez infekcje lub choroby przewodu pokarmowego [61]. Sugeruje się, że różnorodność i wzorce kolonizacji mikrobioty są kształtowane przez czynniki takie jak sposób porodu [55], posiadanie rodzeństwa [55], wiek ciążowy [55], masę urodzeniową [62], stosowanie antybiotyków podczas pierwszych lat życia [55], obecność zwierząt domowych z sierścią [55] oraz dietę [55]. Sposób porodu jest uznawany za główny determinant składu mikrobioty, a dzieci urodzone w różny sposób mają różny skład mikrobioty jelitowej przez pierwsze lata życia [55, 63, 64, 65, 66]. Istnieje pewien stopień zmienności w składzie mikrobioty jelitowej u dorosłych, który, poza wspomnianą dietą, czy stosowaniem antybiotyków, może być kształtowany też przez styl życia i genetykę [67, 68]. Rosnąca liczba obserwacji sugeruje, że mikrobiom jelitowy ma wpływ na rozwój neurologiczny i może wpływać na zachowanie, w tym, na udział mikrobioty i jej metabolitów w kształtowaniu objawów spektrum autyzmu [69].

Coraz więcej dowodów wskazuje, że dzieci z ASD cierpią na zaburzenia przewodu pokarmowego częściej niż dzieci neurotypowe [70], a dolegliwości przewodu pokarmowego, takie jak zaparcia, biegunka i ból brzucha, są skorelowane z nasileniem ASD [71]. Układ pokarmowy został uwzględniony w hipotezach dotyczących ASD, zarówno terapeutycznych, jak i przyczynowych [72], ponieważ dzieci autystyczne wykazują wyższą częstość występowania dolegliwości związanych z przewodem pokarmowym w porównaniu do dzieci zdrowych [73]. Prawie połowa dzieci z ASD doświadcza jednego lub więcej przewlekłych dolegliwości przewodu pokarmowego [74]. Jednakże nie jest wiadome, czy dysfunkcja przewodu pokarmowego i dysbioza są konsekwencją większego zaburzenia, czy sama przyczyniają się do powstania ASD [69].

Biorąc pod uwagę trudności w ocenie ilościowej, w literaturze obliczono

medianę proporcji występowania dolegliwości z przewodu pokarmowego wykrytych w różnych badaniach wśród osób z ASD, która wynosi 46,8% dla dowolnego lub zestawu więcej niż jednego objawu z przewodu pokarmowego, 22% dla zaparć, 14% dla dolegliwości brzusznych i 13% dla biegunki [75]. Szacuje się, że około 95% zaparć u dzieci może nie mieć pierwotnej przyczyny fizjologicznej (związanej z procesami biologicznymi lub strukturalnymi), ale funkcjonalną (przyczyny, które mogą wynikać z wielu czynników, w tym psychologicznych, behawioralnych i środowiskowych) [76]. Wiele dzieci z ASD prezentuje dodatkowo warunki nasilające, takie jak opóźnione uczenie się lub brak umiejętności korzystania z toalety, które negatywnie wpływają na opróżnianie jelit [77]. Dzieci z ASD mają również trudności w przetwarzaniu bodźców sensorycznych, a często wykazują ograniczoną mobilność wynikającą z ich wzorców zachowań, które są czynnikami wtórnymi, które mogą zmniejszać ruchliwość przewodu pokarmowego [78].

Różnice w składzie mikrobioty przewodu pokarmowego u dzieci z ASD w porównaniu do neurotypowego rodzeństwa i/lub neurotypowych niespokrewnionych dzieci kontroli zostały opisane w różnych badaniach [79]. Zmiany w mikrobiocie jelitowej, które obserwuje się w ASD, mogą mieć rolę przyczynową i podtrzymywać symptomy ze strony przewodu pokarmowego lub mogą jedynie stanowić czynnik zakłócający, wynikający z ograniczeń dietetycznych [79]. Obecność objawów ze strony przewodu pokarmowego jest ważnym czynnikiem zakłócającym (*ang. confounder*) w badaniu mikrobioty jelitowej i ASD [79]. Ograniczenia dietetyczne stanowią ważny aspekt zaburzeń ze spektrum autyzmu, a dieta jest także niezwykle ważnym czynnikiem kształtującym mikrobiotę [80, 81, 82].

Większość badań opisywanych w literaturze nie gromadziła szczegółów na temat diety, ani nie oceniała wpływu diety na mikrobiotę jelitową. Ze względu na to, że dieta jest ważnym czynnikiem zakłócającym, niejasne pozostaje, do jakiego stopnia dieta wpływa na skład mikroorganizmów w populacji osób z ASD [79]. W badaniu autorstwa Son i in. [83] nie raportowano żadnych znaczących różnic w składzie mikrobioty w odniesieniu do dziennej podaży makroskładników. Nie zauważono żadnych istotnych różnic między czterema grupami (dzieci z ASD i ich neurotypowe rodzeństwo, mające lub

nie funkcjonalne zaburzenia ze strony układu pokarmowego) pod względem dziennej podaży makroskładników, takich jak kalorie, białka, tłuszcze, węglowodany, cukry i błonnik pokarmowy. W badaniu Parracho i in. [84] oraz Kang i in. [85] również nie znaleziono związku pomiędzy dietą a populacjami mikroorganizmów. Berding i in. [80] badali skład mikrobioty w odniesieniu do zachowań żywieniowych, spożycia składników odżywczych i grup żywności, a także wzorców dietetycznych. W tym badaniu spożycie błonnika pokarmowego korelowało negatywnie z obfitością Clostridiales. Z kolei obfitość *Faecalibacterium* była pozytywnie skorelowana z jedzeniem smażonym i negatywnie z owocami. Zidentyfikowali również, że 2 odrębne wzorce dietetyczne były związane z unikalnymi profilami mikrobiologicznymi u dzieci z ASD [80]. Podobne różnice w wzorcach żywienia i mikrobioty zaobserwowano u dzieci z ASD w badaniu przeprowadzonym przez Plaza-Díaz i in. [86].

Porównując różnorodność mikrobioty jelitowej u dzieci z ASD i grup kontrolnych, 3 badania wykazały większą różnorodność w grupie osób z ASD [87, 88, 89], a 2 inne raportowały zmniejszoną różnorodność [85, 90], z kolei 3 nie wykazały różnicy [91, 83, 92].

Firmicutes, Bacteroidetes i Proteobacteria są najliczniej reprezentowane typami bakterii we wszystkich badaniach (występującymi w największej obfitości) [79]. Bacteroidetes były bardziej obficie występującym typem u dzieci z ASD w 5 badaniach [93, 94, 87, 88, 89]. Z kolei w trzech innych badaniach zauważono istotny wzrost stosunku Firmicutes do Bacteroidetes ze względu na obniżoną obfitość Bacteroidetes u dzieci z ASD [95, 96, 92], a w dwóch badaniach nie wykazano różnicy w poziomach Bacteroidetes i Firmicutes [97, 98].

Do bakterii, których zmiany zostały raportowane w badaniach nad mikrobiotą w ASD, należą m. in. *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Lactobacillus* i *Sutterella* [79]. Zmieniony skład mikrobioty może prowadzić do zakłócenia bariery jelitowej, co potencjalnie umożliwia przechodzenie bakterii i ich antygenów, toksyn i metabolitów poza światło jelita [99].

Jedno z pierwszych badań, w którym została wysunięta hipoteza, że zakłócenia mikrobioty jelitowej mogą przyczyniać się do objawów autystycznych, zostało opublikowane w 2000 roku przez Sandlera i in. [100]. To badanie wykazało poprawę objawów autystycznych po podaniu doustnym wancomy-

cyny. Objawy powróciły po zakończeniu leczenia, więc zasugerowano, że się, że mogło to być spowodowane tym, że *Clostridium* są bakteriami wytwarzającymi przetrwalniki, co promuje nawroty [100].

W obrębie typu Firmicutes, wzrost poziomu Clostridiales zaobserwowano u osób z ASD, w kilku badaniach, stosując różną metodologię w badaniach. Z wykorzystaniem metody pirosekwencjonowania *16S rRNA* [86, 101, 97, 102, 80, 96, 88]. Strati i in. [95] wykazali, że problemy ze strony przewodu pokarmowego u dzieci z ASD były związane z wysokim poziomem Clostridia. W badaniach z użyciem metody qPCR: 3 grupy Clostridium (I, XI i XIVab) oraz *C. bolteae*, były statystycznie istotnie bardziej obfite u pacjentów z ASD w badaniu Song i in. [103]. Inne badanie z użyciem metody qPCR wykazało wzrost grupy Clostridium I w ASD [104]. Używając fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*, zidentyfikowano wzrost *Clostridium histolyticum* w stolcach pacjentów z ASD w porównaniu do zdrowych osób kontrolnych, chociaż neurotypowe rodzeństwo dzieci z ASD również miało wyższy poziom *C. histolyticum* niż osoby kontrolne [84]. Williams i in. [96] stwierdzili, że wzrost Clostridiales był w dużej mierze przypisywany wzrostowi w obrębie rodzin Lachnospiraceae i Ruminococcaceae. Wzrost Lachnospiraceae i Ruminococcaceae zaobserwowano również u dzieci z ASD z objawami jelitowymi w porównaniu do dzieci kontrolnych z podobnymi objawami w badaniu Rose i in. [105]. W badaniu Pulikkan i in. [92] autorzy zauważyli również wzrost Ruminococcaceae, podczas gdy Liu i in. [106] stwierdzili przeciwnie, że Ruminococcaceae były istotnie zmniejszone u osób z ASD. Bakterie z rodziny Clostridiaceae syntezują produkty metaboliczne, np. fenole, p-krezol, niektóre pochodne indolu, które są potencjalnie toksyczne dla ludzi, a także są producentami kwasu propionowego [79].

Gatunki *Desulfovibrio* są związane ze zwiększoną produkcją kwasu propionowego, który przypuszcza się, że może mieć udział w patogenezie ASD [107]. Dwa badania wykazały większą obfitość gatunków *Desulfovibrio* u osób z ASD [89, 104]. Ponadto, zauważono silną korelację między obecnością *Desulfovibrio* a nasileniem objawów autyzmu [104].

W trzech badaniach wykazano, że bakterie z rodzaju *Lactobacillus* występowały istotnie obficie u osób z ASD [95, 92, 104]. Są to bakterie często

stosowane w preparatach probiotycznych [79]. Z kolei inne bakterie probiotyczne, *Bifidobacterium*, były mniej obfite w grupie ASD w odniesieniu do neurotypowego rodzeństwa i neurotypowej niespokrewnionej kontroli [108], a także [80, 88, 89], ale inne badania wykazały przeciwnie, zwiększenie obfitości bakterii tego rodzaju [86, 92]. W wymienianych badaniach nie zbadano jednak użycia probiotyków [79].

Większa obfitość bakterii z rodzaju *Sutterella*, który należy do klasy Betaproteobacteria i dla której stwierdzono pozytywną korelację z chorobą jelit, chorobą Leśniowskiego-Crohna [109], została opisana w kilku badaniach i dotyczyła dzieci z ASD [110, 87, 88, 111]. Williams i in. [96] stwierdzili podwyższony poziom Betaproteobacteria u pacjentów z ASD, odzwierciedlające obecność Alcaligenaceae, a później opisali te bakterie jako gatunki *Sutterella* [110]. Potwierdzili obecność gatunków *Sutterella* u ponad 50% dzieci z ASD i brak tych bakterii u dzieci kontrolnych. Dwa inne badania zaobserwowały, że *Sutterella* była mniej obecna u pacjentów z ASD [85, 101].

Inną bakterią opisywaną w literaturze dotyczącej ASD jest *Akkermansia muciniphila*, należąca do typu Verrucomicrobiota. Jest to bakteria rozkładająca mucynę, zazwyczaj obecna w dużych ilościach w zdrowym jelicie, więc jej brak może przyczynić się do zaburzenia funkcji bariery śluzowej [79]. Są doniesienia, że obfitość bakterii *Akkermansia muciniphila* była mniejsza u pacjentów z ASD w porównaniu z grupą kontrolną [108], ale również przeciwstawne, raportowano także zwiększone poziomy *Akkermansia* u osób z ASD [88].

Mniejsze obfitości bakterii z rodzaju *Prevotella* zauważono u pacjentów z ASD w trzech badaniach [85, 91, 90], ale Plaza-Díaz i in. [86] donieśli o znacząco zwiększonych poziomach *Prevotella* u osób z ASD. *Prevotella* to rodzaj bakterii zazwyczaj dominujący w jelitach osób spożywających dietę bogatą w błonnik i inne węglowodany, zwłaszcza w populacjach niezachodnich [112, 113]. *Prevotella* to rodzaj o dużej różnorodności gatunkowej i dużej różnorodności genetycznej między szczepami [114]. Jej różne szczepy mogą pełnić różne funkcje, zarówno korzystne, jak i szkodliwe, co może zależeć od kontekstu [115]. Wysoka różnorodność gatunkowa i genetyczna *Prevotella* sprawia, że trudno przewidzieć ich konkretną funkcję, która może się różnić

między jednostkami.

### 1.3 Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, SCFA (*ang. Short-Chain Fatty Acids*) są organicznymi związkami chemicznymi. Składają się z krótkiego łańcucha węglowego, zawierającego od 2 do 6 atomów węgla [116]. Występują naturalnie w przewodzie pokarmowym i są głównymi produktami końcowymi metabolizmu bakterii [117]. Najważniejszymi SCFA są kwas octowy ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ; C2), kwas propionowy ( $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$ ; C3) i kwas masłowy ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$ ; C4) [118]. Są syntetyzowane przez mikroorganizmy beztlenowe ze składników, takich jak polisacharydy, oligosacharydy, białka, peptydy i glikoproteiny [119].

Główne SCFA jak octan, propionian i maślan, powstają zarówno w wyniku fermentacji węglowodanów, jak i aminokwasów [117]. Jeśli chodzi o ilość, to węglowodany są najważniejszymi prekursorami krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [117]. Węglowodany są fermentowane przez bakterie sacharolityczne głównie w proksymalnej części jelita grubego, co prowadzi do powstawania liniowych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych,  $\text{H}_2$  i  $\text{CO}_2$  [120, 117, 121]. Z kolei fermentacja białek i aminokwasów przez bakterie proteolityczne prowadzi do powstawania rozgałęzionych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych,  $\text{H}_2$ ,  $\text{CO}_2$ ,  $\text{CH}_2$ , fenoli i amin [120, 121].

Procesy biochemiczne, w wyniku których produkowane są SCFA, zachodzą głównie w kątnicy i dalszej proksymalnej części jelita grubego, czyli miejscu bogatym w substraty metaboliczne, ponieważ jest to miejsce połączenia jelita cienkiego z grubym. Niestrawialne oligosacharydy, czyli te, które nie uległy strawieniu przez enzymy w przewodzie pokarmowym człowieka, stają się substratem odżywczym dla bakterii jelitowych [118]. Poddane bakteryjnemu metabolizmowi, wykorzystywane są dalej przez organizm w formie SCFA. Głównymi substratami fermentacji są (a) skrobie, które nie są strawione w jelicie cienkim oraz (b) polisacharydy ścian komórkowych roślin (celulozy i polisacharydy niecelulozowe, takie jak pektyny, ksylany, arabinogalaktany,



gumy i śluzy) [117]. W związku z tym, węglowodany z diety, w tym skrobia oporna oraz błonnik pokarmowy stanowią ważne źródło do fermentacji i produkcji SCFA [118]. Reakcje fermentacji w jelicie grubym są w dużym stopniu zależne od chemicznego składu źródła substratu [122] oraz mikroorganizmów w jelicie grubym, które posiadają różne enzymy i ścieżki metaboliczne, poprzez które mogą efektywnie rozkładać i fermentować określone substraty [121].

Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe pełnią ważne funkcje w organizmie, m.in. dostarczanie energii dla komórek nabłonka jelitowego, wpływ na metabolizm glukozy i lipidów, regulację procesów zapalnych oraz utrzymanie zdrowej mikrobioty jelitowej, w związku z efektem wzajemnego dostarczania substancji odżywczych (*ang. cross-feeding*) [120].

SCFA ulegają wchłonięciu, a następnie są metabolizowane w trzech głównych miejscach w organizmie: (1) komórki nabłonka kątnicy i okrężnicy, które wykorzystują maślan jako główny substrat dla szlaków metabolicznych, które dostarczają energię niezbędną do utrzymania homeostazy i wykonywania podstawowych funkcji komórkowych [122]; (2) komórki wątroby, gdzie octan, który jest pobierany przez wątrobę w 50% do 70% jest wykorzystywany w procesach syntezy cholesterolu i kwasów tłuszczowych [123, 124], a także pozostały maślan i głównie propionian, które mogą być substratami glukoneogenezy [120, 118, 121], kwas propionowy ma działanie przeciwlipogenne i obniżające poziom cholesterolu [125]; (3) komórki mięśniowe, które generują energię poprzez utlenianie pozostałego octanu [120, 118, 121]. Wchłanianie kwasów tłuszczowych krótkołańcuchowych w kątnicy i okrężnicy jest bardzo efektywnym procesem, i tylko 5% do 10% wydalanych jest w kale [121, 126, 118].

### **Kwas mlekowy**

Poza SCFA, w jelicie istotną rolę pełni metabolizm kwasu mlekowego. Jest produkowany przez mikroorganizmy i ma wpływ na skład mikrobioty jelitowej [127], źródłem tego kwasu jest też metabolizm tkanki gospodarza w procesie glikolizy [128], jednak względny udział źródeł bakteryjnych i gospodarza

jest obecnie niejasny [127]. U myszy hodowanych w warunkach sterylnych (*ang. germ-free*, wolne od drobnoustrojów) odnotowano niskie (0,38 mM) stężenie kwasu mlekowego w jelicie ślepym, świadczące o pochodzeniu tego kwasu z tkanek gospodarza [129].

Mikrobiota jelitowa ulega dynamicznym zmianom od momentu narodzin. W pierwszych miesiącach życia, mikrobiota jelitowa niemowląt jest mniej zróżnicowana i różni się składem oraz funkcją od mikrobioty dorosłych [130]. Najbardziej znaczące różnice to podwyższone stężenie kwasu mlekowego w kale niemowląt oraz brak lub bardzo niski poziom maślanu, co skorelowane jest z małym udziałem bakterii produkujących kwas masłowy [130], co wynika ze sposobu żywienia niemowląt. Jelita karmionych piersią niemowląt zasiedlane są głównie przez *Bifidobacteria*, które wytwarzają kwas mlekowy jako końcowy produkt fermentacji [127]. Większość pierwotnych kolonizatorów w jelitach niemowląt stanowią bakterie produkujące kwas mlekowy, takie jak *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* i *Enterococcus* [131, 132], zatem musi być on efektywnie wykorzystywany, aby zapobiegać negatywnym skutkom jego nagromadzenia [133, 134].

Bakterie wykorzystujące mleczan jako substrat energetyczny dzielą się na takie, które produkują H<sub>2</sub>, np. *Veillonella*, oraz takie, które wytwarzają go w minimalnej ilości lub wcale, np. *Eubacterium limosum* i *Propionibacterium avidum* [133]. Nadmierna produkcja H<sub>2</sub> z wykorzystania mleczanu może prowadzić do wzdęć i jest możliwym czynnikiem kolki u niemowląt [135]. Zauważono większe występowanie bakterii metabolizujących kwas mlekowy i produkujących H<sub>2</sub> u niemowląt z kolką [133].

U dorosłych udział bakterii z rodzaju *Bifidobacterium* spada do 5-10% mikrobioty [136]. W przypadku aktywnej nieswoistej choroby zapalnej jelit (IBD, *ang. inflammatory bowel disease*), obfitość bifidobakterii i lactobacilli wzrasta (producentów kwasu mlekowego), co wiąże się ze spadkiem liczby gatunków produkujących kwas masłowy i wzrostem poziomu kwasu mlekowego w stolcu [137]. Tę sytuację można wyjaśnić tym, że inne gatunki bakterii jelitowych są zdolne do wykorzystywania kwasu mlekowego, co oznacza, że mogą go wykorzystywać jako źródło energii (*cross-feeding*). Kwas mlekowy może służyć jako źródło energii dla patogenów, takich jak gatunki *Campylobacter* i

*Salmonella* [138]. Jednak wytwarzany przez drobnoustroje mleczań może być też przekształcany w propionian lub maślan przez bakterie wykorzystujące mleczań [139].

Co więcej, akumulacja kwasu mlekowego wiąże się z operacyjnym usunięciem części jelita cienkiego i grubego u ludzi [140], a także z występowaniem nieswoistego zapalenia jelit (IBD), takimi jak choroba Leśniowskiego-Crohna i wrzodziejące zapalenie jelita grubego [141].

W zdrowym jelicie grubym zachodzi równowaga między produkcją a wykorzystaniem kwasu mlekowego, co zapobiega jego nagromadzeniu. Bakterie wyspecjalizowane w przetwarzaniu kwasu mlekowego pomagają utrzymać stabilność mikrobioty, nie dopuszczając do jego nadmiernej akumulacji i obniżeniu pH [127].

## Kwas propionowy

Kwas propionowy (PPA, *ang. propionic acid*) jest produktem fermentacji bakterii związanych z ASD, takimi jak *Clostridia*, *Bacteroidetes*, *Desulfovibrio* [142]. Jako przedstawiciele konsorcjum produkującego PPA można wymienić m.in. *Bacteroides vulgates*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Coprococcus catus*, *Veillonella parvula*, *Ruminococcus obeum* (*Blautia*), *Akkermansia muciniphila*, *Lactobacillus plantarum* [143]. PPA jest także powszechnie stosowany jako konserwant w przetworzonej żywności ze względu na swoje właściwości przeciwgrzybicze [144, 69, 142, 145, 146, 95]. Jego ilość w jelicie ilustruje wzajemne powiązania między profilem mikrobiomu a nawykami żywieniowymi (natura kontra wychowanie, *ang. nature versus nurture*) [147].

Kwas propionowy łatwo przenika przez bariery krew–jelita i krew–mózg, zdobywając dostęp do centralnego układu nerwowego, gdzie może przechodzić przez błony komórkowe i gromadzić się w komórkach, zmieniając ich pH [148, 149, 150]. To z kolei może wywoływać zmiany w uwalnianiu neuroprzekazników i wpływać na przewodnictwo nerwowe poprzez połączenia szczelinowe (*ang. gap junctions*), potencjalnie modyfikując komunikację neuronalną i zachowanie [151, 152, 150].

Kwas propionowy może wpływać na gospodarkę dopaminy, wapnia, i se-

rotoniny (5-HT, 5-hydroksytryptamina) [151, 153]. Wykazano, że obecność PPA i innych kwasów tłuszczowych zwiększa uwalnianie 5-HT w jelitach [153]. W mózgu, PPA i octan (SA, *sodium acetate*, octan sodu) mogą wnikać do komórek i gromadzić się w ich wnętrzu, gdzie mogą pośrednio zwiększać uwalnianie 5-HT poprzez obniżanie pH wewnątrzkomórkowego [148, 149, 152]. Z kolei zmiany w poziomach 5-HT zostały związane z zachowaniem społecznym [154]. Agonista receptorów 5-HT to substancja, która wiąże się z receptorami 5-HT i aktywuje je, naśladując efekty serotoniny. Gdy podano go szczurom, zaobserwowano spadek zachowań związanych z badaniem społecznym, co sugeruje, że zwiększona aktywność receptorów serotoniny może tłumić zaangażowanie społeczne [155]. Z drugiej strony, po podaniu antagonisty 5-HT, czyli substancji, która blokuje receptory 5-HT, uniemożliwiając serotoninie wywoływanie jej zwykłych efektów, odwrócono efekty agonisty, co oznacza, że zachowania związane z badaniem społecznym u szczurów zwiększyły się ponownie. Sugeruje to, że blokowanie aktywności receptorów serotoniny może zwiększać zachowania społeczne.

Propionian może powodować zmiany w zachowaniu oraz objawiać się reakcją neurozapalną. Wstrzyknięcia PPA bezpośrednio do komórek mózgowych wywołują u szczurów objawy podobne do tych, które charakteryzują ASD, a są to powtarzające się zachowania, nadaktywność, obracanie się, ruchy wsteczne, napady padaczkowe, rozpowszechniony stres oksydacyjny i reakcję neurozapalną [145, 156, 150]. W wyniku badań, zasugerowano, że PPA wywołuje odpowiedź neuroplastyczną lub neurozapalną, charakteryzującą się astrogliozą reaktywną, czyli nieprawidłowym wzrostem liczby astrocytów [150].

Wyniki badania, które kontynuowało badanie wpływu PPA w układzie nerwowym, sugerują, że propionian ma istotną rolę w modulowaniu proliferacji i różnicowania się ludzkich komórek macierzystych układu nerwowego (hNSC, *ang. human Neural Stem Cells*) [147]. PPA prowadzi do (a) gliozy (hNSC spontanicznie różnicowały się do neuronów i komórek glejowych, traktowanie PPA drastycznie przesunęło różnicowanie w kierunku glejowych), (b) zaburzeń w połączeniach między neuronami (większa liczba neurosfer, struktur trójwymiarowych utworzonych przez niezróżnicowane komórki nerwowe,

w obecności PPA w porównaniu do kontroli oraz zmniejszenie wydłużania wypustek komórek nerwowych w obecności PPA) i (c) reakcji zapalnej (blisko 5-krotny wzrost poziomu transkrypcji *TNF- $\alpha$*  i 3-krotny wzrost stężenia tej cytokiny po traktowaniu 2 mM PPA, w porównaniu do kontroli) [147]. Zaobserwowano wzrost poziomu GPR41 (receptora dla PPA) i białka promującego przeżycie komórek, p-Akt (aktywowana przez fosforylację kinaza serynowo-treoninowa Akt), podczas gdy poziom PTEN (inhibitora Akt) zmniejszył się [147]. Te wyniki są zgodne z obserwacjami dotyczącymi zaburzeń obserwowanych w rozwoju ASD [147]. Autorzy tego badania sugerują, że zmiana mikrobiomu w jelitach matki prowadzi do powstania produktów ubocznych, takich jak PPA, które następnie mogą zakłócać formowanie obwodów neuronowych podczas wczesnych etapów rozwoju nerwowego płodu.

## Kwas masłowy

Głównymi producentami maślanu są bakterie z rodzaju *Clostridium*, *Eubacterium* i *Fusobacterium* [157, 120, 158], a szczególnie *Clostridium leptum*, *Roseburia spp.*, *Faecalibacterium prausnitzii* i *Coprococcus spp.* [120, 159].

Maślan odgrywa rolę w regulacji osi mikrobiom-jelito-mózg, która łączy działalność układu pokarmowego, mikroorganizmów w nim występujących z układem nerwowym człowieka [106]. Dieta i składniki pokarmowe mogą wpływać na funkcje biologiczne na poziomie molekularnym.

Jedną z funkcji maślanu jest wspomaganie utrzymania integralności bariery jelitowej, czyli warstwy komórek nabłonka jelita, połączonych za pomocą połączeń ścisłych (*ang. tight junctions*) [160, 161], która chroni organizm przed szkodliwymi substancjami zawartymi w pokarmie i kontroluje ich przepływ pomiędzy jelitami a resztą ciała. Wykazano, że maślan aktywuje montaż połączeń ścisłych, kluczowych struktur bariery jelitowej, poprzez aktywację kinazy aktywowanej przez AMP (AMPK, *ang. 5' AMP-activated protein kinase*) [162]. AMPK działa kontrolując ścieżki metaboliczne zaangażowane w przemianę glukozy, metabolizm kwasów tłuszczowych oraz syntezę białek [163]. Montaż białek składających się na połączenia ścisłe jest zaburzony przy obniżonej aktywności AMPK [164, 165].

Wykazano także, że maślan, działając jako inhibitor deacetylazy histonowej-1 (HDAC-1), przywraca funkcję bariery jelitowej poprzez regulację kanału potasowego Trek1 [166]. Wyniki tego badania dowiodły, że białko Trek1 ulega syntezie w komórkach nabłonkowych jelit, a inhibicja znacząco narusza funkcję bariery jelitowej. Przywrócenie ekspresji Trek1 ułatwiło odzyskanie funkcji bariery jelitowej i zwiększyło efekt specyficznych immunoterapii na hamowanie reakcji alergicznych w jelitach [166]. HDAC-1 jest jednym z członków rodziny deacetylaz histonowych (HDAC, *ang. histone deacetylases*), które są odpowiedzialne za usuwanie grup acetylowych z histonów. Acetylacja histonów, czyli dodawanie grup acetylowych, prowadzi do rozluźnienia upakowania chromatyny i zwiększa dostępność DNA dla białek regulujących ekspresję genów. Deacetylacja histonów prowadzi do kondensacji chromatyny i ograniczenia dostępu do DNA, co skutkuje obniżeniem ekspresji genów.

## Rozdział 2

### Cel pracy

Celem niniejszej pracy doktorskiej jest przeprowadzenie szczegółowej analizy i wykazanie różnic w składzie mikrobioty fekalnej w trzech grupach: dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, ich neurotypowego rodzeństwa oraz w grupie kontrolnej neurotypowych, niespokrewnionych dzieci.

W ramach tego badania dokonano oceny diety i dolegliwości jelitowych u badanych grup, a także zbadano krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe jako marker aktywności metabolicznej mikrobioty. Celem tych analiz było zrozumienie, jak te czynniki mogą wiązać się ze zmianami w składzie mikrobioty oraz ich potencjalny związek z zaburzeniami ze spektrum autyzmu. Rola mikrobiomu w kontekście zaburzeń ze spektrum autyzmu jest badana z nadzieją, że wyniki mogą przyczynić się do głębszego zrozumienia jego potencjalnego wpływu na objawy tej grupy zaburzeń neurorozwojowych.

# Rozdział 3

## Materiały i metody

### 3.1 Materiały

#### 3.1.1 Uczestnicy badania

Badanie obejmowało dzieci z diagnozą zaburzeń ze spektrum autyzmu (ASD), liczącą 71 uczestników oraz ich neurotypowe rodzeństwo – 29 uczestników, a także neurotypową grupę kontrolną dzieci niespokrewnionych, liczącą 44 osoby. Uczestnicy badania byli wieku od 3 do 18 lat.

Uczestnicy zostali zrekrutowani za pośrednictwem ogłoszeń i kontaktów osobistych, a informacje na ich temat rozprzestrzeniały się również na forach internetowych dla rodziców dzieci z ASD. Uczestnicy badania pochodzili z różnych regionów Polski. Dla każdego z uczestników w grupie badanej rodzice deklarowali diagnozę ASD.

Grupa kontrolna składała się z dzieci rekrutowanych za pośrednictwem kontaktów osobistych.

Rodzicom lub opiekunom prawnym, którzy deklarowali chęć udziału w badaniu, przedstawiano informacje na jego temat, po czym wysyłano do nich dokumenty i kwestionariusze do wypełnienia, a także sterylne pojemniki na próbki stolca. Rodzice lub opiekunowie otrzymywali także szczegółowe instrukcje dotyczące wypełniania ankiet i pobierania próbek. Materiał do badania pobierano po 14-dniowej obserwacji dolegliwości ze strony układu



pokarmowego oraz 7-dniowej obserwacji diety. Rodzice zostali poproszeni o zamrożenie próbki i dostarczenie jej do laboratorium, zapewniając chłodzenie na czas transportu.

### 3.1.2 Materiał badawczy

**Próbki stolca:** niezbędne do przeprowadzenia (1) analizy mikrobiomu i (2) analizy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA). Mikrobiom jest badany w celu zidentyfikowania i analizy mikroorganizmów (komponenty bakteryjnej i archeonów) żyjących w przewodzie pokarmowym dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu w kontekście neurotypowego rodzeństwa i w odniesieniu do neurotypowej grupy dzieci niespokrewnionych. Analiza SCFA służy do zbadania ilości krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, które są ważnymi produktami metabolizmu bakterii jelitowych.

**Dane ankietowe:** Informacje zebrane za pomocą ankiet od rodziców lub opiekunów dzieci, które obejmują (1) pytania z zakresu perinatalnego wywiadu medycznego i demograficznego oraz obecnego stanu zdrowia. (2) Zbierano informacje na temat nawyków żywieniowych dzieci w okresie niemowlęcym, które mogły mieć wpływ na ich obecny stan zdrowia i skład mikrobiomu. (3) Zebrano także szczegółowe informacje na temat 7-dniowej diety poprzedzającej pobranie próbki stolca, co umożliwiło dokładną ocenę spożywanej diety i uwzględniono jej wpływ w analizie mikrobiomu. (4) Przez okres 14 dni obserwowano dolegliwości ze strony układu pokarmowego oraz kształt i kolor stolca. Te informacje zostały zebrane w celu oceny stopnia, w jakim dzieci mogą cierpieć na zaburzenia układu pokarmowego. Wszystkie te ankietowe informacje stanowią cenne źródło danych do analizy i interpretacji wyników badań.

## 3.2 Metody

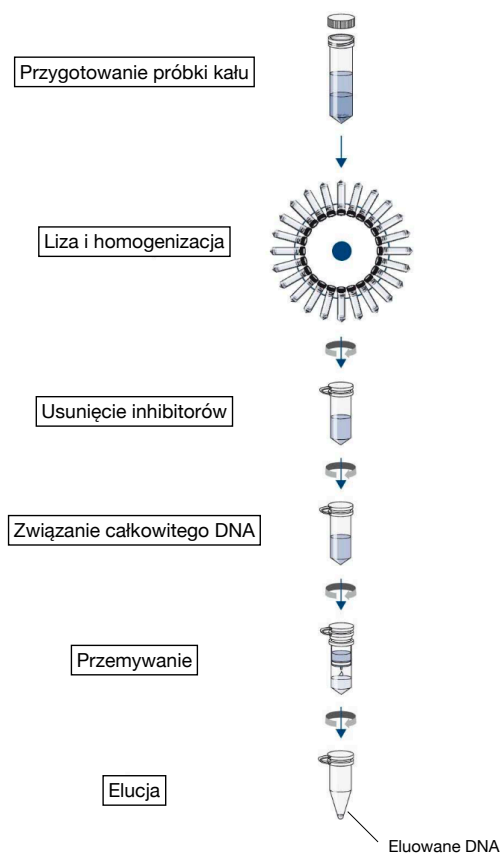
### 3.2.1 Ekstrakcja kwasów nukleinowych mikroorganizmów z próbek kału

W celu ekstrakcji kwasów nukleinowych mikroorganizmów z materiału biologicznego, jakim były próbki stolca pobrane do sterylnych pojemników, zastosowano dwa komercyjnie dostępne zestawy do izolacji kwasów nukleinowych: *QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit* (Qiagen, Hilden, Niemcy) do izolacji DNA oraz *AllPrep PowerFecal DNA/RNA Kit* (Qiagen, Hilden, Niemcy) do jednoczesnego oczyszczania genomowego DNA i całkowitego RNA drobnoustrojów z próbek kału. Oba zestawy charakteryzują się wysoką wydajnością ekstrakcji kwasów nukleinowych, a także pozwalają na uzyskanie wysokiej jakości DNA i RNA, pozbawionych zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych, które mogą negatywnie wpływać na zastosowania materiału genetycznego w późniejszych etapach, szczególnie w przygotowaniu bibliotek DNA do sekwencjonowania następnej generacji (NGS, *ang. next-generation sequencing*).

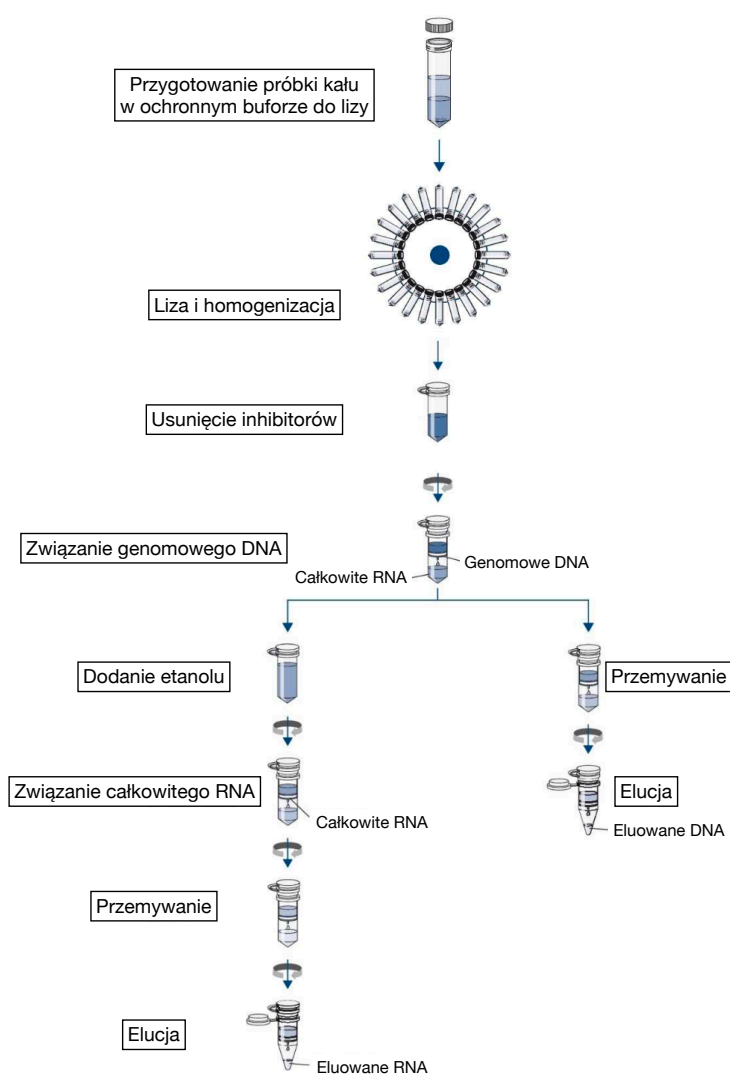
W pierwszej metodzie, w której wykorzystano zestaw *QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit*, który usprawnia ekstrakcję DNA drobnoustrojów za pomocą próbki z kulkami i zoptymalizowanej chemii w celu wydajnej lizy komórek bakteryjnych. Zestaw zawiera technologię usuwania inhibitorów (IRT, Inhibitor Removal Technology<sup>®</sup>), która skutecznie eliminuje inhibitory takie jak takie jak polisacharydy, związki hemowe i sole kwasów żółciowych, z próbek kału, uzyskując wysokiej jakości DNA przy minimalnym czasie przetwarzania. Próbki poddawano obróbce poprzez dodawanie 250 mg kału do próbek wypełnionych kulkami, a następnie wykonywano szybką homogenizację metodami mechanicznymi (wyrząsanie przez 10 minut przy 3000 rpm) i chemicznymi (w buforze do lizy, będącym częścią zestawu do izolacji). Inhibitory usunięto za pomocą opatentowanego przez firmę Qiagen odczynnika IRT<sup>®</sup>, a całkowity genomowy DNA (zarówno DNA ludzkie, pochodzące z nabłonka jelit, jak i DNA drobnoustrojów zawartych w masie kałowej) wychwycono na

kolumnie z membraną krzemionkową. Następnie DNA przemyto i eluowano, pozyskując materiał genetyczny do dalszych zastosowań. Schemat podsumowujący procedurę znajduje się na rysunku 3.1.

W drugiej metodzie wykorzystano zestaw *AllPrep PowerFecal DNA/RNA Kit* do jednoczesnego oczyszczania genomowego DNA i całkowitego RNA z próbek kału. Zestaw łączy w sobie technologię do selektywnego wiązania dwuniciowego DNA i technologię RNeasy, która polega na selektywnym wiązaniu RNA z membraną krzemionkową w obecności buforów, wraz z włączeniem IRT<sup>®</sup> podczas początkowego procesu lizy próbki. Próbkę kału o masie 200 mg homogenizowano, a następnie poddano połączonej lizie chemicznej i mechanicznej przy użyciu probówek zawierających kulki do homogenizacji i rozbijania ścian komórek bakteryjnych, w buforze ochronnym zawierającym 1 M ditiotretitol (1 M DTT). Lizat był następnie przepuszczany przez kolumnę wirową AllPrep DNA MinElute, która w połączeniu z buforem o wysokiej zawartości soli umożliwia selektywne i wydajne wiązanie genomowego DNA. Ten etap pozwolił na oddzielenie DNA (związane do membrany krzemionkowej) i RNA (zawarte w przesączu). Rozdzielono kolumnę i część z membraną ze związanym DNA poddawano krokom wypłukiwania i elucji. Z kolei do przesączu z kolumny wirowej AllPrep DNA MinElute dodawano etanol, aby stworzyć odpowiednie warunki wiązania RNA. Próbkę była następnie przenoszona do RNeasy Mini Spin Column, gdzie całkowity RNA wiąże się do membrany. RNA jest przemywane i eluowane w wodzie wolnej od RNaz. W ten sposób wyizolowano kwasy nukleinowe: genomowy DNA unieruchomiono na membranie krzemionkowej, podczas gdy cząsteczki RNA przechodziły do eluatu. Przesącz przenoszono na inne kolumny w celu związania RNA. Zarówno DNA, jak i RNA przemyto i eluowano oddzielnie uzyskując DNA i RNA do dalszych analiz. Schematyczne podsumowanie metody znajduje się na rysunku 3.2.



Rysunek 3.1: Schemat procedury ekstrakcji DNA przy użyciu zestawu do izolacji QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit. Rycina zaczerpnięta z *QIAamp<sup>®</sup> PowerFecal<sup>®</sup> Pro DNA Kit Handbook, Luty 2020*, zmodyfikowano.



Rysunek 3.2: Schemat procedury ekstrakcji DNA i RNA przy użyciu zestawu do izolacji AllPrep PowerFecal DNA/RNA. Rycina zaczerpnięta z *AllPrep<sup>®</sup> PowerFecal<sup>®</sup> DNA/RNA Kit Handbook*, Styczeń 2018, zmodyfikowano.

### 3.2.2 Sekwencjonowanie DNA

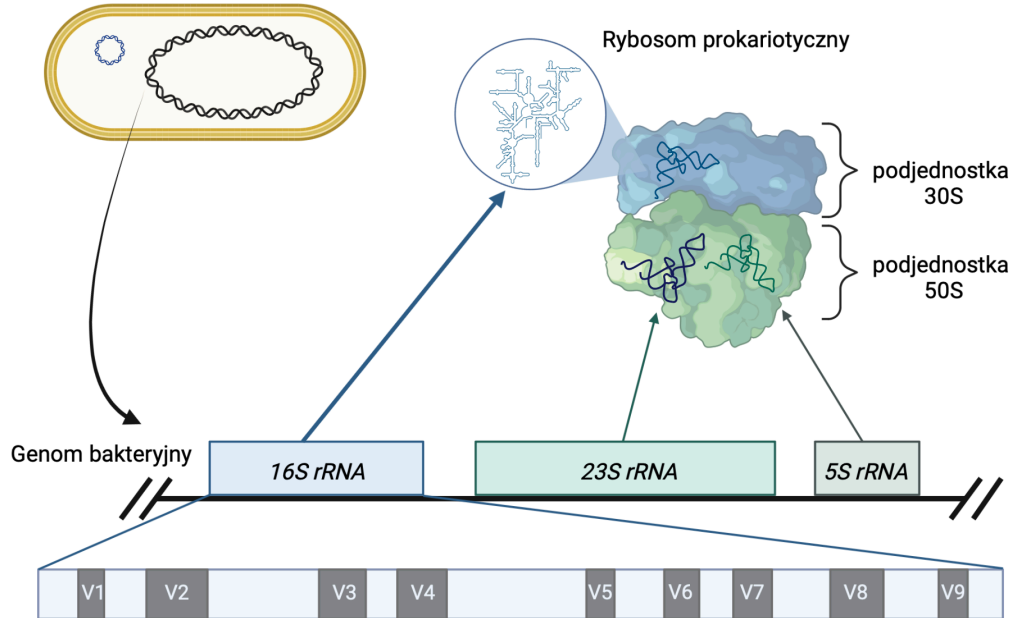
#### Wstęp teoretyczny do sekwencjonowania genu *16S rRNA*

W celu scharakteryzowania składu mikrobioty fekalnej wykonano sekwencjonowanie następnej generacji (NGS, *ang. next-generation sequencing*) ampliconów zmiennych regionów genu markerowego *16S rRNA*, V3–V4 oraz V7–V9.

Sekwencjonowanie to odnosi się do sekwencjonowania zmiennych regionów genu *16S rRNA*, który koduje część małej podjednostki rybosomu występującą u prokariotów [167]. Rybosomy są kompleksami złożonymi z wielu białek i podjednostek RNA. Obecne są we wszystkich komórkach żywych i odgrywają kluczową rolę w syntezie białek, w procesie translacji. Składają się z dwóch głównych komponentów: małej podjednostki rybosomalnej (podjednostka 30S w komórkach prokariotycznych) oraz dużej podjednostki (podjednostka 50S w komórkach prokariotycznych). Każda podjednostka zawiera jedną lub więcej cząsteczek RNA rybosomalnego (rRNA) oraz białka rybosomalne. Aktywność katalityczna rybosomu, czyli przeprowadzanie reakcji polimeryzacji aminokwasów i tworzenie łańcucha polipeptydowego, związana jest z zawartym w nim rRNA [168]. Białka będące częścią kompleksu budują strukturę rybosomu i działają jako kofaktory zwiększające wydajność translacji [168]. Gen *16S rRNA* koduje cząsteczkę rybosomalnego RNA podjednostki 30S, obecną we wszystkich komórkach prokariotycznych, w tym bakteriach i archeonach. Istnieje kilka czynników, które sprawiają, że ten gen jest dobrym celem umożliwiającym badania taksonomiczne. Gen *16S rRNA* zawiera zarówno regiony wysoce konserwatywne, jak i dziewięć regionów o wysokiej zmienności (V1–V9) [169]. Obecność wysoce konserwatywnych regionów pozwala używać starterów, które w reakcji PCR (*ang. polymerase chain reaction*, reakcja łańcuchowa polimerazy) będą amplifikować region zmienny 16S (lub kilka regionów). Schematyczne przedstawienie kompleksu rybosomu i budowy genu *16S rRNA* zaprezentowano na rysunku 3.3. Obecność regionów zmiennych pozwala na różnicowanie bakterii do poziomu rodzaju, z różną wydajnością klasyfikacji taksonomicznej na podstawie poszczególnych regio-

nów, ponieważ stopień różnorodności sekwencji jest różny wśród dziewięciu regionów zmiennych w genie *16S rRNA* [169].

Sekwencjonowanie 16S rDNA (*ang. 16S ribosomal DNA*, sekwencja DNA, która koduje gen *16S rRNA*) to jedna z wiodących metod badań filogenetycznych, zapoczątkowana przez Carla Woese, amerykańskiego mikrobiologa, który zapoczątkował rewolucję w dziedzinie taksonomii mikroorganizmów. Zaproponował bowiem, aby zamiast wywodzić powiązania na podstawie cech fizycznych mikroorganizmów, zastosować porównanie uniwersalnej jednostki porównawczej, występującej u wszystkich żywych organizmów. Twierdził, że struktury molekularne i sekwencje, takie jak białka, DNA oraz RNA, mają większy potencjał na uwidocznienie związków ewolucyjnych, niż klasyczne podejście porównywania fenotypu [170], podobnie jak Francis Crick [171] oraz Linus Pauling i Emil Zuckerkandl (zegar molekularny) [172]. Woese zauważył, że cząsteczka rRNA, występuje we wszystkich trzech domenach życia: Eukarya, Bacteria i Archaea. Podejście opierało się na twierdzeniu, że wraz z ewolucją, cząsteczki DNA, RNA i białek gromadzą zmiany, więc u gatunków będących blisko spokrewnionymi zmian będzie mniej, niż u gatunków dalej spokrewnionych. To pozwoliło na odkrycie archeonów, nowych grup mikroorganizmów, które różniły się znacznie od bakterii i eukariontów [173]. Klasyfikacja trzech domen (Eukarya, Bacteria i Archaea) została zaproponowana zgodnie z drzewem filogenetycznym opartym na sekwencjach genów rRNA [170]. Obecnie do badania społeczności drobnoustrojów dostępne są technologie sekwencjonowania następnej generacji (NGS), pozwalające na wysokoprzepustowe badania złożonych mikrobiomów. Umożliwia to wolną od hodowli metodę analizy. Profilowanie większości taksonów bakterii (i archeonów) znajdujących się w próbce podczas jednej analizy, scharakteryzowanie bakterii, których nie można hodować, szybką i dokładną klasyfikację drobnoustrojów, w porównaniu do tradycyjnych metod, a próbki mogą być multipleksowane w tym samym przebiegu sekwencjonowania, co zapewnia opłacalne rozwiązanie.



Rysunek 3.3: Schemat kompleksu rybosomu ze szczególnym uwzględnieniem 16S rRNA. Rysunek zaczerpnięto z [167], zmodyfikowano i wykonano z użyciem narzędzia graficznego online BioRender.

### Preparatyka bibliotek DNA

Przed sekwencjonowaniem *16S rRNA* stoją jednak pewne wyzwania. Są to, m.in. (a) obniżona jakość odczytu i *base calling* (proces przypisywania konkretnych nukleotydów do odczytów sekwencji DNA uzyskanych podczas sekwencjonowania) będąca wynikiem niskiej złożoności biblioteki DNA, ponieważ biblioteki złożone z ampliconów tego samego genu; (b) zmniejszona specyficzność klasyfikacji dla wielu taksonów bakteryjnych spowodowana niepełnym pokryciem wszystkich regionów zmiennych *16S rRNA*. Istnieją jednak metody, które stanowią przynajmniej częściowe rozwiązanie tych problemów.

Do przygotowania bibliotek DNA do sekwencjonowania NGS wykorzy-



stano zestaw do preparatyki QIAseq<sup>®</sup> 16S/ITS Panel, dla regionów zmiennych V3–V4 oraz V7–V9. Zestaw ten stosuje 2-etapowy proces z wykorzystaniem reakcji PCR. Regiony zmienne amplifikowane są w pierwszej reakcji PCR, gdzie stosowane są startery fazowane (*ang. phased primers*), aby rozwiązać problem niskiej różnorodności bibliotek. W tym celu, przed sekwencją startera specyficznego do amplifikowanego fragmentu, dodawanych jest od 0 do 11 dodatkowych nukleotydów. To podejście zwiększa różnorodność zasad, co jest szczególnie ważne w czasie pierwszych 11 cykli sekwencjonowania i ostatecznie prowadzi do wyższych wyników jakości, mierzonej współczynnikiem Q30 (*ang. Quality score*, wyniki jakości; prawdopodobieństwo błędnego odczytu w danej pozycji wynoszące 0,001, czyli 1 błąd na 1000 nukleotydów) i zwiększa liczbę użytecznych odczytów. Jednocześnie eliminuje konieczność dodawania PhiX (kontrola jakości sekwencjonowania, zawiera sekwencje DNA, które są dobrze znane i dobrze scharakteryzowane, pochodzą z ikosaedralnego, bezogonkowego bakteriofaga PhiX o jednoniciowym DNA), co również przekłada się na większą liczbę odczytów do późniejszej analizy (ponieważ sekwencje kontrolne nie są sekwencjonowane). Kolejnym krokiem jest oczyszczanie uzyskanych produktów amplifikacji na kulkach magnetycznych, które pozwalają na oddzielenie produktów PCR od pozostałych składników mieszaniny reakcyjnej. Następnie w drugiej reakcji PCR, do amplikonów dodawane są adaptory, które za pomocą 2 × 8-nukleotydowej sekwencji (indeksy na końcu 3' oraz 5') pozwalają (a) na zidentyfikowanie, do jakiej próbki należy dany odczyt i (b) związanie się do komórki przepływowej (*ang. flow cell*), na której odbywa się reakcja amplifikacji podczas sekwencjonowania. Tak uzyskany produkt ponownie poddawany jest oczyszczaniu z wykorzystaniem kulek magnetycznych, wynikiem czego jest uzyskanie bibliotek DNA, które w następnym kroku poddawane są analizie jakościowej i ilościowej.

Analiza ilościowa przeprowadzana jest przez pomiar stężenia uzyskanych bibliotek. Biblioteki mierzone były z wykorzystaniem zestawu QuantiFluor<sup>®</sup> dsDNA System (Promega) na aparacie Quantus<sup>™</sup> Fluorometer. Sposób działania opiera się na technologii fluorymetrycznej, która wykorzystuje barwniki fluorescencyjne, zdolne do specyficznego wiązania się z dwuniciowymi cząsteczkami DNA (dsDNA, *ang. double-stranded DNA*).

Analizę jakościową, czyli elektroforezę, w celu sprawdzenia, czy obecne są fragmenty pożądanej wielkości, przeprowadzono na aparacie TapeStation, z wykorzystaniem taśm High Sensitivity D1000 ScreenTape, automatycznym systemie przeznaczonym jest do analizy cząsteczek DNA o wielkości od 35 do 1000 pz. System TapeStation firmy Agilent Technologies opiera się na technologii elektroforezy w żelu. Na taśmach znajdują się kanały wypełnione żelem, w których próbki kwasów nukleinowych są rozdzielane w procesie elektroforezy i mierzone są sygnały fluorescencyjne emitowane przez barwniki, które są związane z DNA w próbce. Sygnały te są rejestrowane i przetwarzane, co umożliwia generowanie precyzyjnych wykresów elektroforetycznych.

Progiem wejściowym do sekwencjonowania jest stężenie biblioteki wynoszące 2 nM. Aby przeliczyć zmierzone stężenie, wyrażone w ng/ $\mu$ L, z wykorzystaniem informacji o wielkości biblioteki, wyrażonej w parach zasad (pz), przeliczano stężenia z użyciem wzoru 3.1, gdzie 660 g/mol to średnia masa molowa DNA [174]:

$$\frac{\text{stężenie [ng/}\mu\text{L]}}{660 \text{ [g/mol]} \times \text{średnia wielkość biblioteki [pz]}} \times 10^6 = \text{stężenie [nM]} \quad (3.1)$$

Gdy znano stężenia oraz wielkości bibliotek DNA, następnie wykonywano rozcieńczenia, przy użyciu wody wolnej od nukleaz, do stężenia 2 nM. Kolejno pobierano jednakowe objętości bibliotek (np. po 5  $\mu$ L) i łączono w jednej, nisko-adherentnej probówce eppendorf 1,5 mL (łączenie próbek, *ang. sample pooling*). Celem łączenia próbek w równych stężeniach molowych jest ich późniejsza równomierna reprezentacja w procesie sekwencjonowania tak, aby każda próbka była sekwencjonowana z podobnym pokryciem.

Tak przygotowane próbki poddawano kolejnemu koniecznemu etapowi, jakim jest denaturacja 5  $\mu$ L połączonych bibliotek przy pomocy 5  $\mu$ L 0.2 N NaOH, czego wynikiem jest otrzymanie jednoniciowego DNA, które podlega sekwencjonowaniu przez syntezę. 10  $\mu$ L rozcieńczano w 990  $\mu$ L schłodzonego do około 4°C buforu do hybrydyzacji (bufor HT1, z zestawu do sekwencjonowania), uzyskując bibliotekę w stężeniu 10 pM. Takie rozcieńczenie pozwala na związaniu się pojedynczych nici DNA do komórki, na której odbywa się

sekwencjonowanie (*ang. flow cell*) i generowanie klastrów danego amplikonu w procesie amplifikacji mostkowej (*ang. bridge amplification*).

W celu wykonania sekwencjonowania na aparacie MiSeq, stosowano zestaw v3 MiSeq Reagent Kit (600 cykli), generując surowe dane w formacie FASTQ (tekstowym format pliku używanym do przechowywania zarówno sekwencji nukleotydowych, jak i odpowiadających im wartości jakości odczytów w sekwencjonowaniu DNA). Sekwencjonowanie odbywało się w trybie *paired-end*,  $2 \times 276$  (nt) co oznacza, że fragment jest sekwencjonowany z obu końców, generując dwa odczyty jednej sekwencji dla każdego fragmentu. Wynikiem są dwie sekwencje, tzw. odczyty *forward* (od końca 5') i *reverse* (od końca 3'), które w sumie pokrywają z dobrą jakością cały amplikon i w analizie bioinformatycznej zostaną połączone w jedną sekwencję i wykorzystane do identyfikacji taksonów. W przypadku paneli do preparatyki bibliotek DNA QIAseq 16S/ITS wymagane jest także zastosowanie niestandardowych starterów do sekwencjonowania zarówno dla odczytu od końca 5' (odczyt R1), jak i odczytu od końca 3' (odczyt R2). Dodanie tych dedykowanych starterów umożliwia rozpoczęcie sekwencjonowania i generowania odczytów na startarach fazowanych, które zastosowane zostały w celu zwiększenia różnorodności nukleotydów na poszczególnych pozycjach, co przekłada się na polepszenie dokładności odczytów.

### 3.2.3 Analiza bioinformatyczna

W celu przetworzenia i analizy tych danych zastosowano środowisko Qiime2 (wersja 2021.8) [175], uzupełnione o dodatkowe wtyczki (*ang. plugins*), co pozwoliło na efektywne i dokładne badanie skomplikowanych wzorców mikrobiomu jelitowego.

Aby przeprowadzić jednoczesną analizę na podstawie dwóch sekwencjonowanych amplikonów genu *16S rRNA* (V3-V4 oraz V7-V9), zastosowano *Sidle* [176], czyli wersję algorytmu Short Multiple Reads Framework (SMURF) [177] w języku Python. To narzędzie umożliwia rekonstrukcję z wielu krótkich, fragmentarycznych amplikonów. Dzięki porównaniu z bazą danych, można uzyskać większą precyzję w odtworzeniu składu mikrobiomu, niż przy

analizie pojedynczych ampliconów (sam amplicon V3-V4, czy sam V7-V9).

Do analizy różnic w obfitościach poszczególnych taksonów (*ang. differential abundance*) wykorzystano najnowsze narzędzie ANCOM-BC2 [178]. Z uwagi na brak implementacji tego narzędzia w Pythonie, konieczne było przeprowadzenie tej części analizy w języku programowania R.

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono w Pythonie z wykorzystaniem biblioteki SciPy [179]. Wykresy prezentowane w pracy zostały stworzone przy użyciu biblioteki matplotlib [180], również w Pythonie.

### 3.2.3.1 Analiza danych z sekwencjonowania DNA

#### Przygotowanie danych

W pierwszym kroku należy przygotować dane do dalszej analizy. Obejmuje to *demultiplexing*, czyli przycięcie adapterów i indeksów oraz rozdział odczytów *forward* i *reverse* do folderów odpowiadającym próbkom. Ten krok jest wykonywany automatycznie na sekwenatorze. Następnie, wykonywany jest rozdział sekwencji ze względu na region, z którego pochodzą (V3-V4 lub V7-V9) do uporządkowanych katalogów.

Sekwencje indeksowe są dodawane do każdej próbki przed procesem sekwencjonowania (tu, w drugiej reakcji PCR). Dzięki temu, po zakończeniu sekwencjonowania, odczyty można *demultiplexować*, czyli przypisać do odpowiednich próbek na podstawie tych indeksów. Proces ten wykonywany jest automatycznie na sekwenatorze i obejmuje także usuwanie sekwencji indeksów i adapterów z odczytów *forward* i *reverse* dla każdej próbki. Produktem są pliki FASTQ dla wszystkich odczytów *forward* i *reverse* dla każdej próbki, zebrane w jednym folderze. Na tym etapie sekwencje dla obu ampliconów (V3-V4 i V7-V9) zebrane są razem.

Odczyty te nie zawierają już sekwencji indeksowych, ale zawierają sekwencje starterów oraz poprzedzające je nukleotydy dodane w celu zwiększenia różnorodności (od 0 do 11 dodatkowych nukleotydów, *ang. phased primers*). Startery są następnie wykorzystywane do rozdzielenia właściwych sekwencji do folderów odpowiadających poszczególnym regionom. W tym celu zastosowano skrypt, który używa metody *cutadapt* [181]. Poniżej wymie-

niono sekwencje starterów, które zastosowano w celu rozdzielania wyników sekwencjonowania.

- Startery *forward*
  - V3-V4: CCTACGGGNGGCWGCAG
  - V7-V9: YAACGAGCGMRACCC
  
- Startery *reverse*
  - V3-V4: GACTACHVGGGTATCTAATCC
  - V7-V9: TACGGYTACCTTGTTAYGACTT

Wynikiem tego wstępnego przygotowania danych jest otrzymanie sekwencji w formacie FASTQ, uporządkowanych do katalogów odpowiadającym danemu regionowi (V3–V4 i V7–V9), *forward* i *reverse* dla każdej sekwencjonowanej próbki.

#### Odszumianie i łączenie

Następnym krokiem jest łączenie odczytów *forward* i *reverse* w celu otrzymania jednej, pełnej sekwencji dla danego wariantu, ASV (ang. *Amplicon Sequence Variant*), unikalnej sekwencji DNA identyfikowanej podczas sekwencjonowania, która reprezentuje jednoznacznie zdefiniowany ciąg nukleotydów w badanej próbce.

Jakość odczytu spada wraz z kolejnym cyklem sekwencjonowania, dlatego pierwszym krokiem w tej części było sprawdzenie jakości odczytów *forward* i *reverse* i przycięcie sekwencji do długości, gdzie ostatni nukleotyd odczytany był średnio z jakością nie mniejszą niż Q20 (prawdopodobieństwo błędu 1 na 100 nukleotydów, tzn. z 99% dokładnością). Jakość odczytów sprawdzono wykorzystując metodę `summarize_demux` z wtyczki *dada2*.

Do łączenia wykorzystano algorytm DADA2. Umożliwia on modelowanie i korekcję błędów amplifikacji PCR oraz błędów sekwencjonowania, co pozwala na precyzyjne odszumianie danych [182]. Wykorzystano implementację `denoise_paired` z wtyczki *dada2* w Qiime2. Decyzję o dokładnym miejscu przycięcia kontroluje się sprawdzając procent sekwencji, które skutecznie zostały połączone, pamiętając, że aby odczyty *forward* i *reverse* były skutecznie

połączone, muszą nakładać się w centralnej części na długości przynajmniej 12 nukleotydów. Wynikiem działania DADA2 jest tablica zliczeń danych ASV oraz zbiór zrekonstruowanych (połączonych) sekwencji osobno dla V3–V4 i dla V7–V9.

### **Łączenie wyników z regionów V3–V4 i V7–V9**

Próbki z tego badania sekwencjonowane były podczas różnych przebiegów sekwencjonowania, dlatego w analizie należało połączyć wstępnie przetworzone dane w zbiorcze tablice zliczeń (*feature table*) oraz listę wszystkich ASV (*representative sequences*). W całym zbiorze danych najmniejsza głębokość sekwencjonowania wyniosła 10313 odczytów.

Aby w pełni wykorzystać wyniki dostępne dla obu sekwencjonowanych amplikonów, zdecydowano się wykorzystać algorytm identyfikacji pełnego genu *16S rRNA* na podstawie krótszych fragmentów, SMURF [177] w jego wersji zaimplementowanej jako wtyczka środowiska Qiime2, *Sidle* [176].

Użycie metod sekwencjonowania następnej generacji zwiększyło liczbę próbek i głębokość sekwencjonowania, ale długość odczytu najczęściej używanych platform sekwencyjnych jest krótka, co wymaga wyboru regionu do sekwencjonowania (zwykle 16-33% całkowitej długości genu). W związku z tym wiele bakterii może nie różnić się obrębem amplifikowanego regionu, więc rozdzielczość profilowania jest z założenia ograniczona [177].

Podjęcia oferujące długie odczyty, które pozwalają na otrzymanie dużej rozdzielczości, również mają swoje ograniczenia. Pierwszym z nich może być konieczność niestandardowej preparatyki bibliotek 16S rRNA, z koniecznością użycia np. sonikacji do cięcia DNA i kroków ligacji, które wpływają na znaczną stratę materiału. Kolejno, startery amplifikujące cały gen *16S rRNA* są wydajne, ale nie dość uniwersalne i należałoby używać mieszaniny różnych starterów. Ostatnim ograniczeniem metodologii długich odczytów może być pofragmentowane DNA wyjściowe, pochodzące z blozków parafinowych, czy z materiału kopalnego lub poddane działaniu niszczących czynników zewnętrznych, takich jak np. promieniowanie [177].

Alternatywnym podejściem jest wykorzystanie wielu krótkich regionów, które w sposób bardziej jednoznaczny, niż pojedynczy region, określają taksonomiczne pochodzenie danego zbioru sekwencji. Możliwa jest rekonstrukcja

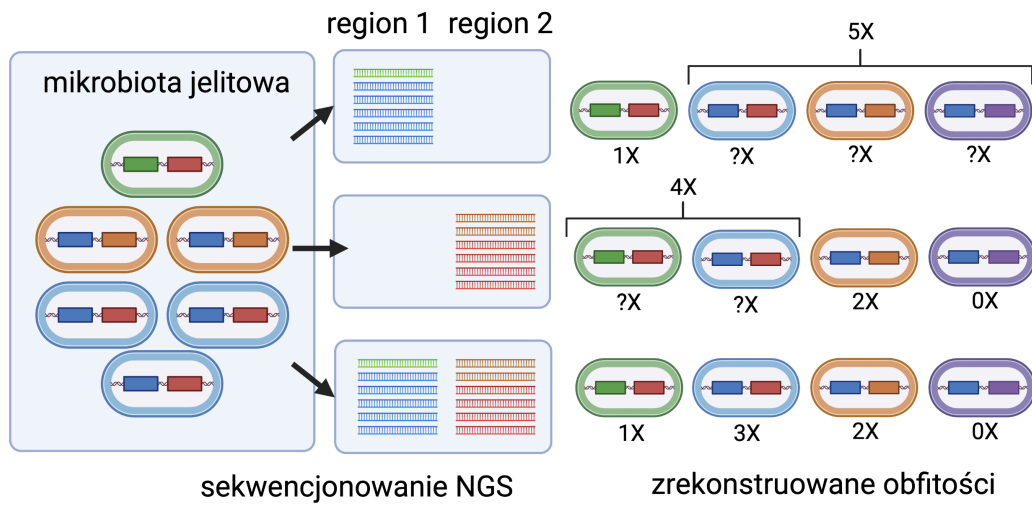
takiej tablicy zliczeń (*feature table*), która jest najbardziej prawdopodobna w kontekście obserwowanych amplikonów, jak w podejściu zastosowanym w algorytmie SMURF [177]. Statystycznie zrekonstruowana tablica zliczeń maksymalizuje funkcję wiarygodności obserwowanych danych (*ang. maximum likelihood*). Na rysunku 3.4 zobrazowano ideę, w jaki sposób sekwencjonowanie dwóch regionów może w jednoznaczny sposób określić tablicę zliczeń, czyli zmniejszyć niejednoznaczność względem sekwencjonowania tylko jednego regionu. Zalety sekwencjonowania wielu krótkich regionów to m. in.: (1) dostępność dostosowanych starterów (*ang. custom primers*) i standardowe przygotowanie bibliotek DNA; (2) możliwość doboru starterów łącznie zapewniających dużą uniwersalność, niedostępną dla żadnej pary z osobna; (3) skuteczność także dla silnie pofragmentowanego DNA; (4) uśrednianie systematycznego błędu charakterystycznego dla danej pary starterów (*ang. PCR bias*) [177].

W tym badaniu wykorzystano *Sidle* (*ang. SMURF Implementation Done to accelerate Efficiency*) [176], wtyczka Qiime2, implementujący wydajną wersję algorytmu SMURF, w którym szybkość została uzyskana m. in. dzięki zastosowaniu innej metody do budowania drzew filogenetycznych w celu rekonstrukcji genów rRNA z indywidualnie amplifikowanych regionów. Jako bazę sekwencji rybosomalnego rRNA wykorzystano kompatybilną z *Sidle* bazę SILVA 128 [183, 184].

### 3.2.3.2 Różnorodność alfa

Różnorodność alfa to termin używany w ekologii do opisu różnorodności gatunkowej w konkretnym ekosystemie lub próbce. W kontekście mikrobiomów, różnorodność alfa odnosi się do różnorodności mikroorganizmów w danym mikrobiomie, co obejmuje liczbę różnych gatunków, czy też, bardziej ogólnie – *cech*, które mogą obejmować różne taksony, a także jak równomiernie są one rozłożone.

Obecność *cech* jest najprostszym parametrem różnorodności alfa, mierzona parametrem *observed features* – **obserwowane cechy**, który zlicza liczbę różnych ASV, jako indywidualnych *cech* obecnych w próbce (warian-



Rysunek 3.4: Schematyczna ilustracja zasady działania algorytmu SMURF. Sekwencjonowanie 2 regionów, zilustrowane w ostatnim rzędzie jednoznacznie określa zliczenia taksonów w tablicy obfitości. Rysunek na podstawie [177], zmodyfikowano i rozbudowano, wykonano wykorzystując narzędzie graficzne online BioRender.

tów sekwencji, pochodzących z ampliconów, będących wypadkową połączenia ampliconów regionów V3-V4 i V7-V9, branych pod uwagę w analizie taksonomicznej).

**Entropia Shannona** ( $H$ ) jest bardziej zaawansowanym wskaźnikiem, który uwzględnia zarówno liczbę różnych taksonów, jak i ich równomierność (czyli to, jak równomiernie są one rozłożone w mikrobiomie) [185, 186]. Wskaźnik ten oblicza się wg wzoru:

$$H = - \sum_{i=1}^S p_i \ln p_i = -(p_1 \ln p_1 + \dots + p_S \ln p_S),$$

gdzie:

- $H$  jest entropią Shannona,
- $S$  to liczba gatunków (różnorodność gatunkowa),
- $p_i$  to proporcja gatunku  $i$  w mikrobiomie,



- $\ln$  to logarytm naturalny.

Liczba różnych taksonów odnosi się do liczby różnych typów organizmów (na przykład gatunków, rodzin itd.), które można znaleźć w danym mikrobiomie. Ta liczba sama w sobie może dać nam pewną miarę różnorodności biologicznej, ale nie uwzględnia ona tego, jak te taksony są rozłożone. Na przykład, dwa mikrobiomy mogą mieć tę samą liczbę różnych taksonów, ale jeden z nich może być zdominowany przez jeden takson, podczas gdy drugi może mieć równomierny rozkład taksonów.

Równomierność odnosi się do tego, jak równomiernie różne taksony są rozłożone w mikrobiomie. Jeśli jeden takson dominuje nad innymi, mówimy, że mamy niską równomierność. Z drugiej strony, jeśli wszystkie taksony są równo reprezentowane, mówimy, że mamy wysoką równomierność. Wysoka wartość wskaźnika entropii Shannona oznacza, że mamy wiele różnych taksonów, które są równomiernie rozłożone. Niska wartość wskaźnika entropii Shannona oznacza, że jest mało różnych taksonów, lub że taksony nie są równomiernie rozłożone (czyli jeden lub kilka taksonów dominują nad innymi). Większa różnorodność gatunków i większa równomierność obu prowadzą do wyższej wartości entropii Shannona.

Wartość 0 entropii Shannona oznacza, że w danym środowisku występuje tylko jeden gatunek (lub *cecha*) – nie ma różnorodności. Wartość maksymalna entropii Shannona zależy od liczby gatunków i jest osiągnięta, gdy wszystkie gatunki są równomiernie rozłożone.

**Równocенność Pielou** ( $J$ ) jest miarą, która koncentruje się wyłącznie na równomierności [187]. Wysoka równomierność oznacza, że wszystkie gatunki są równie liczne; niska równomierność oznacza, że niektóre gatunki są dużo liczniejsze niż inne. Równocенność Pielou jest zdefiniowana jako stosunek entropii Shannona ( $H$ ) do logarytmu liczby gatunków ( $S$ ). Matematycznie, równomierność Pielou ( $J$ ) jest wyrażana wzorem:

$$J = \frac{H}{\ln S}$$

gdzie:

- $J$  jest równomiernością Pielou,

- $H$  jest entropią Shannona,
- $S$  to liczba gatunków w danym ekosystemie,
- $\ln$  to logarytm naturalny.

Równocенność Pielou przyjmuje wartości od 0 do 1, gdzie 0 oznacza, że jeden gatunek dominuje całkowicie, podczas gdy pozostałe są niewielkie lub nieobecne, a 1 oznacza idealną równomierność, tzn. że każdy gatunek jest reprezentowany przez tę samą liczbę osobników. Wysoki indeks równomierności Pielou sugeruje, że wszystkie gatunki mikroorganizmów są równie liczne, podczas gdy niski indeks wskazuje, że niektóre gatunki są znacznie bardziej liczne niż inne.

**Wskaźnik różnorodności filogenetycznej Faitha** jest miarą różnorodności, która uwzględnia pokrewieństwo filogenetyczne między gatunkami [188]. To oznacza, że dwa różne taksony, które są blisko spokrewnione, przyczyniają się mniej do różnorodności niż dwa gatunki, które są daleko spokrewnione. Różnorodność filogenetyczna według Faitha jest obliczana jako suma długości krawędzi drzewa filogenetycznego prowadzących do gatunków obecnych w danym ekosystemie. W praktyce, wartość tego wskaźnika może przyjmować dowolną dodatnią wartość, i jej maksymalny limit zależy od drzewa filogenetycznego używanego do analizy.

Analizę różnorodności alfa przeprowadzono za pomocą pakietu narzędzi QIIME2 (wersja 2021.8). Wykorzystano funkcję `q2-diversity` do obliczenia czterech wskaźników różnorodności alfa: Shannona, Pielou, Faitha i obserwowane cechy (*ang. observed features*) dla każdej z badanych próbek.

W celu identyfikacji statystycznie istotnych różnic w wartościach tych wskaźników między grupami, przeprowadzono analizę statystyczną w języku Python. Najpierw zastosowano test Kruskala-Wallis. Następnie, aby precyzyjnie określić, które pary grup różnią się między sobą, przeprowadzono test *post hoc* Dunna. Także w tym przypadku zastosowano korektę wartości  $p$  na podstawie metody Benjamini-Hochberga, pozwalającą na kontrolę fałszywie dodatnich wyników, które mogą wynikać z porównania wielu grup.

### 3.2.3.3 Różnorodność beta

Analiza różnorodności beta przeprowadzona została przy wykorzystaniu środowiska QIIME2 (wersja 2021.8), z wykorzystaniem funkcji `q2-diversity`. Użyto wskaźników Jaccarda, Bray-Curtisa, Unweighted UniFrac oraz Weighted UniFrac, aby otrzymać macierze wskaźników różnorodności między parami próbek, które następnie analizowano przy pomocy PCoA (*ang. Principal Coordinates Analysis*, analiza głównych współrzędnych), aby ocenić różnice w różnorodności pomiędzy grupami w kontekście różnorodności mikrobiomów.

W celu identyfikacji statystycznie istotnych różnic między grupami, przeprowadzono test PERMANOVA zrealizowany z 9999 powtórzeniami (*ang. Permutational Multivariate Analysis of Variance*, permutacyjna wielowymiarowa analiza wariancji). Jest to statystyczna metoda używana do porównywania różnic między grupami w kontekście wielowymiarowych danych, która pozwala na porównanie grup na podstawie wielu zmiennych jednocześnie. Analizę statystyczną przeprowadzono w języku programowania Python.

**Indeks Jaccarda** to jakościowa miara różnorodności taksonów, jest zdefiniowany jako liczba gatunków wspólnych dla dwu próbek podzielona przez ogólną liczbę gatunków w obu próbkach, wg następującego wzoru:

$$J = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|}$$

gdzie:

- $J$  to indeks Jaccarda,
- $|A \cap B|$  to liczba gatunków występujących w dwu próbkach,
- $|A \cup B|$  to łączna liczba gatunków w dwu próbkach.

**Indeks Bray-Curtisa** to wskaźnik ilościowy, który mierzy różnicę między dwoma próbkami poprzez uwzględnienie zarówno obecności/braku obecności poszczególnych taksonów, jak i ich obfitości. Wartość indeksu Bray-Curtisa wynosi od 0 do 1, gdzie 0 oznacza, że dwie próbki są identyczne (wszystkie gatunki i ich obfitości są takie same), a 1 oznacza, że dwie próbki

są całkowicie różne (nie ma wspólnych gatunków lub ich obfitości są zupełnie inne). Obliczany jest wg wzoru:

$$BC = 1 - \frac{2 \sum_{i=1}^s \min(x_i, y_i)}{\sum_{i=1}^s x_i + \sum_{i=1}^s y_i}$$

gdzie:

- $BC$  to indeks Bray-Curtisa,
- $x_i$  i  $y_i$  to obfitości gatunku  $i$  w próbkach  $x$  i  $y$  odpowiednio,
- $s$  to liczba gatunków,
- $\min(x_i, y_i)$  to mniejsza z obfitości gatunku  $i$  w próbkach  $x$  i  $y$ ,
- $\sum_{i=1}^s \min(x_i, y_i)$  to suma najmniejszych obfitości każdego gatunku w obu próbkach,
- $\sum_{i=1}^s x_i + \sum_{i=1}^s y_i$  to suma obfitości wszystkich gatunków w obu próbkach.

**Unweighted UniFrac** to miara, która porównuje mikrobiomy na podstawie struktury filogenetycznej i ocenia jedynie obecność/brak taksonu, nie uwzględniając ich obfitości. Oznacza to, że dwie próbki, które mają te same gatunki, ale w różnych obfitościach, będą uważane za identyczne [189]. W **Weighted UniFrac** dodatkowo do pokrewieństwa na drzewie filogenetycznym, uwzględniana jest obfitość taksonów [190]. To znaczy, że jeśli dwa mikrobiomy mają te same gatunki, ale w różnych obfitościach, to będą miały różne wartości tego indeksu.

### 3.2.3.4 Analiza różnic w obfitości

Analiza różnic w obfitości odnosi się do oceny różnic w liczbie różnych mikroorganizmów w mikrobiomie. Jest to kontrowersyjne, ponieważ idealnie, do oceny różnic w obfitościach, byłoby mierzyć absolutną liczbę mikroorganizmów, ale to jest trudne do wykonania, ponieważ dane pochodzące z

sekwencjonowania są z natury kompozycyjne, to znaczy mierzą względne obfitości, czyli pozwalają wnioskować o proporcjach pomiędzy różnymi typami mikroorganizmów, ale nie o ich absolutnej zawartości [191].

Różne metody na każdym etapie przetwarzania próbek zostały zaproponowane do ilościowego określenia całkowitego ładunku mikrobiologicznego z próbek [191]. Dodanie znanej ilości DNA referencyjnego jako standardu wewnętrznego wykorzystywano do ekstrapolacji ilości materiału wyjściowego [192, 193]. Jednak normalizacja za pomocą tej metody jest skomplikowana ze względu na wyzwania kalibracyjne związane z wyborem odpowiedniej ilości standardu wewnętrznego [193]. Na poziomie poekstrakcyjnym, ilościowy PCR (qPCR) DNA genomowego z uniwersalnymi starterami dla genu *16S rRNA* został zastosowany do oszacowania całkowitego ładunku mikrobiologicznego [194]. Jednakże niemożliwe jest zapobiegnięcie błędom starterów (*primer bias*), co skutkuje nierównomierną amplifikacją między gatunkami, a zastosowana metoda ekstrakcji DNA może wpływać na skład mikrobioty [195, 196, 197]. Ponadto, kwantyfikacja zarówno przez dodawanie sztucznego DNA jak i qPCR jest przeprowadzana na wielu podzbiorach oryginalnej próbki [191]. Kwantyfikacja ładunku mikrobiologicznego za pomocą cytometrii przepływowej jest przeprowadzana na oryginalnej próbce i jest niezależna od sekwencji nukleotydowych [191]. W jednym z badań wykazano, że dodanie informacji ilościowej uzyskanej za pomocą cytometrii przepływowej znacznie poprawiło interpretację danych sekwencjonowania amplikonów genu *16S rRNA* [198]. Jednak cytometria przepływowa wymaga drogiego, stosunkowo mało wydajnego sprzętu, i często może tylko szacować koncentrację komórek, a nie całkowity ładunek mikrobiologiczny [191].

Jeżeli znana jest bezwzględna obfitość jednego taksonu i względna obfitość wszystkich taksonów, jest możliwe obliczenie absolutnej obfitości wszystkich taksonów. Znaczna ilość informacji zawarta jest w względnych obfitościach, a ważne wnioski można wyciągnąć bez kosztownych metod kwantyfikacji mikrobiologicznej [191].

Sekwencjonowanie o wysokiej przepustowości NGS dostarcza oszacowania obfitości każdego, albo (1) OTU (*ang. Operational Taxonomic Unit*, jednostki taksonomicznej, zbioru mikroorganizmów grupowanych razem na podstawie

podobieństwa ich sekwencji DNA, zazwyczaj na poziomie określonego procentu podobieństwa, np. 97%, zatem dwa organizmy mogą być zgrupowane razem jako jedna OTU, jeśli ich sekwencje DNA są podobne na określonym poziomie, nawet jeśli nie są one klasyfikowane jako ten sam gatunek według tradycyjnej taksonomii) lub (2) ASV, podejście zastosowane w niniejszej pracy, w badanych próbkach [199]. Co bardzo ważne, obfitości ASV, nie powinny być interpretowane jako prawdziwa, parametryczna obfitość odpowiadającego im taksonu w ekosystemie mikrobiologicznym, z którego pochodziła dana próbka [199].

Wyniki uzyskane z sekwencjonowania nie są bezpośrednim odzwierciedleniem rzeczywistych proporcji mikroorganizmów w danym ekosystemie, ale raczej dają informację o względnej obfitości różnych grup mikroorganizmów w próbce. Wynika to z różnych czynników wpływających na proces sekwencjonowania, takich jak skuteczność ekstrakcji DNA, preferencje amplifikacji PCR dla różnych sekwencji oraz inne potencjalne błędy i obciążenia [199].

Względne obfitości mikroorganizmów w próbce sumują się do jedności, np. 100% (ponieważ mają charakter kompozycyjny) i znajdują się w tzw. sympleksie (przestrzeni, w której te dane istnieją, i w której dane sumują się do jedności), a nie w przestrzeni euklidesowej (zdefiniowanej za pomocą układu współrzędnych, w której funkcjonuje klasyczna odmiana geometrii) [200]. W rezultacie standardowe metody statystyczne, takie jak współczynnik korelacji Pearsona, test t, ANOVA, analiza regresji liniowej itp., nie są bezpośrednio stosowne do analizy danych na temat względnej obfitości mikrobiomu [199].

Zignorowanie faktu, że dane te są w sympleksie, może prowadzić do błędnych wyników [201]. Na przykład, ponieważ suma względnych obfitości wynosi 1 (czy 100%), wymogiem matematycznym jest, aby współczynnik korelacji Pearsona był ujemny dla co najmniej jednej pary taksonów [199]. Współczynnik korelacji Pearsona mierzy liniową zależność między dwoma zestawami danych. Jeżeli obfitość jednego mikroorganizmu wzrośnie, musi to spowodować spadek obfitości innego (lub innych) mikroorganizmów, aby suma obfitości wszystkich w próbce wynosiła nadal jeden. Stąd wynika, że współczynnik korelacji Pearsona musi być ujemny dla co najmniej jednej

pary taksonów. Oznacza to, że nie możemy traktować zmian w obfitościach różnych mikroobów jako niezależnych - zawsze są one wzajemnie powiązane.

Różnice w obfitości na poziomie próbki nie mogą być ekstrapolowane na różnice w obfitości na poziomie ekosystemu. Jednak, zakładając, że próbki są losowymi obserwacjami, można przyjąć, że oczekiwana względna obfitość taksonu w próbce jest taka sama, jak w ekosystemie. W związku z tym, porównanie oczekiwanych względnych obfitości na poziomie próbki jest w przybliżeniu równoznaczne z dokonywaniem porównań na poziomie ekosystemu [199].

Logarytm stosunku, czyli *log-ratio*, jest uważany za dobre narzędzie w analizie danych kompozycyjnych [191]. Główną zaletą jest to, że pozwala na porównywanie zmian w obfitości (ilości) poszczególnych mikroorganizmów między różnymi próbkami, nawet jeśli nie znamy całkowitej liczby mikroorganizmów w tych próbkach. Istotnym w pracy z logarytmami stosunków są zera występujące w tablicy zliczeń (oznaczające brak danego taksonu w próbce). Typowym rozwiązaniem tego problemu jest dodanie niewielkiej liczby do wszystkich zer (*ang. pseudo-count*). Wartość dodawaną ustala się arbitralnie i może mieć wpływ na wyniki końcowe. ANCOM-BC2 dodaje kilka możliwych wartości i testuje ich wpływ na końcowy wynik, dając możliwość usunięcia detekcji, które były czułe na zmianę wartości *pseudo-count* [178].

Dzięki użyciu *log-ratio*, wprowadzona symetria względem zera sprawia, że równą wagę przypisuje się względnym wzrostom i spadkom obfitości mikroorganizmów [191, 202, 203]. Niemniej, mimo wielu zalet, stosowanie *log-ratio* nie jest wolne od pewnych ograniczeń i wyzwań, takich jak kontrola wyników fałszywie pozytywnych i fałszywie negatywnych. Przekształcenie układu współrzędnych sympleksu na przestrzeń euklidesową wykonywane jest w transformacji logarytmiczno-stosunkowej (*ang. log-ratio transformation*) [204].

W niniejszym badaniu zastosowano metodę ANCOM-BC2 [178], odpowiednią dla przeprowadzania szerokiego zakresu analiz wielogrupowych z uwzględnieniem korekty dla kowariatów i powtarzalnych pomiarów, z wykorzystaniem którego wykonano wielokrotne porównanie par grup (*ang. multiple pairwise comparison*, grupa dzieci z ASD vs. kontrola, dzieci z ASD vs. rodzeństwo oraz rodzeństwo vs. kontrola).

Metodologia narzędzia ANCOM-BC2 uwzględnia ważne dla analizy aspekty, które są niedostępne w innych algorytmach przeznaczonych do analizy różnicy obfitości (takich jak ANCOM [199], ANCOM-BC [204], LOCOM [205])

Poza uwzględnieniem błędu specyficznego dla próbki (jak w ANCOM-BC [204]), uwzględniany jest także błąd specyficzny dla taksonu [178]. Jest to ważne, ponieważ efektywność sekwencjonowania może różnić się między taksonami, gdy niektóre taksony ulegają preferencyjnie detekcji podczas sekwencjonowania. Na przykład, bakterie Gram-dodatnie mają mocniejsze ściany komórkowe niż bakterie Gram-ujemne, co sprawia, że ich DNA jest trudniejsze do ekstrakcji. W rezultacie, bakterie Gram-dodatnie mogą być niedoreprezentowane w obserwowanych obfitościach, prowadząc do zniekształconych wyników, jeśli nie zostaną odpowiednio uwzględnione w analizie [206].

Korzystając z metod opartych na ograniczonym wnioskowaniu statystycznym [207] oraz metod mdFDR (*ang. mixed directional false discovery rate*; metoda statystyczna używana do kontroli wyników fałszywie pozytywnych, która bierze pod uwagę kierunek testów statystycznych, to znaczy czy obfitość danego taksonu zwiększa się czy zmniejsza, do wielokrotnych porównań parami [208, 209]). ANCOM-BC2 pozwala na modelowanie kowariatów, czyli zmiennych kontrolnych, takich jak np. wiek, czy płeć, które mają wpływ na zmienną zależną (w tym przypadku jest nią występowanie zaburzeń ze spektrum autyzmu), ale nie są głównym punktem zainteresowania badania [178]. Jako kowariaty w analizie podano: grupę, płeć, wiek, obecność chorób układu pokarmowego, długość karmienia piersią, miesiąc wprowadzenia sfermentowanych produktów mlecznych do diety w pierwszym roku życia dziecka oraz z danych z obserwacji diety w ciągu 7 dni: średnie spożycie tłuszczu, białka ogółem, błonnika pokarmowego, laktozy [g] i  $\beta$ -karotenu [ $\mu$ g]. Wybrano je biorąc pod uwagę znane czynniki wpływające na mikrobiom, takie jak płeć, wiek, obecność chorób układu pokarmowego, czy żywienie oraz wskazano parametry, którymi istotnie różniły się grupy w tym badaniu. Dzięki wyborowi kowariatów zapewniono, że wykryte różnice nie są efektem niedoskonale zrandomizowanej próby, jaką zapewnia badanie obserwacyjne.



### 3.2.3.5 Przewidywanie funkcji metabolicznych mikrobiomu

Jako ostatni krok w analizie mikrobiomów zdecydowano się wykonać analizę funkcji metagenomu. Całe badanie opierało się o sekwencjonowanie genu markerowego (*16S rRNA*), który pozwala na poznanie profilu taksonomicznego, ale nie informuje bezpośrednio o profilu funkcjonalnym, jak to jest w przypadku sekwencjonowania metagenomowego typu shotgun. Niemniej, interesującym jest poznanie przybliżonego profilu funkcjonalnego w mikrobiomach badanych grup, które możliwe jest z wykorzystaniem metod przewidywania funkcji na podstawie genu markerowego [210, 211, 212]. W tym badaniu wykorzystano metodę PICRUSt2 (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States 2*) [211]. Narzędzie to rekonstruuje profil funkcjonalny przez odniesienie sekwencji fragmentu genu *16S rRNA* do bazy danych zawierającej pełne genomy referencyjne, które zostały poddane analizie funkcjonalnej. Nawet jeżeli dana bakteria nie posiada wyniku sekwencjonowania pełnego genomu, to informacja o liczbie kopii wszystkich genów jest przewidywana na podstawie pokrewieństwa ewolucyjnego. Odnosi się to zarówno do genu markerowego, jak i wszystkich pozostałych genów poddawanych analizie. Przy braku dodatkowych kosztów, metoda ta pozwala na poznanie przybliżonego profilu funkcjonalnego mikrobiomów i może stanowić podstawę do podjęcia decyzji o dalszej kosztownej analizie typu shotgun. Analizę różnicową funkcji (KO, KEGG Orthology; EC, Enzyme Commission numbers i Pathways, ścieżki metaboliczne) wykonano wykorzystując ANCOM-BC2, który może być stosowany do różnych danych kompozycyjnych, w tym funkcji metagenomu [178]. Wyniki zaprezentowano w Dodatku A, na rysunkach 1, 2 i 3.

### 3.2.4 Analiza krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych

Analizę krótko łańcuchowych kwasów tłuszczowych, SCFA, przeprowadzono w Laboratorium Mikrobiologii Lekarskiej, IITD PAN, za pomocą deerywatyzowanych ekstraktów kału za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC, *ang. High-Performance Liquid Chromatography*), według

wcześniej opisanej metody [213, 214].

Próbki kału ważono na wadze analitycznej, pobierając od 200 do 500 mg, a następnie ekstrahowano z użyciem 3 mL 70% etanolu cz.d.a. Materiał biologiczny poddawano wirowaniu 4000 rpm (rpm, *ang. rotation per minute*, obrotów na minutę) przez 5 minut, w celu oddzielenia cząstek stałych z próbek, a uzyskane w ten sposób 500  $\mu$ L supernatantu przenoszono do nowych próbek i mieszano z 50  $\mu$ L standardu wewnętrznego (200 mM standardu wewnętrznego czyli kwasu 2-etylomasłowego w 50% metanolu) oraz 300  $\mu$ L odwodnionego 3% v/v roztworu pirydyny (Merck, St.Luis, MO, USA) w etanolu, 300  $\mu$ L 250 mM N-(3-dimetyloaminopropyl)-N'-etylokarbodiimidu chlorkowego (Sigma-Aldrich, St.Luis, MO, USA) w etanolu i 300  $\mu$ L 20 mM 2-nitrofenylohydrazinu chlorkowego (Sigma-Aldrich, St. Luis, MO, USA) w etanolu.

Tak przygotowane próbki inkubowano w temperaturze 60°C przez 20 minut, po czym mieszano z 200  $\mu$ L roztworu wodorotlenku potasu (15% w/v w wodzie, stosunek roztworu wodorotlenku potasu/metanolu wynosił 80/20), który jest odczynnikiem zatrzymującym, reakcja była prowadzona przez kolejne 20 minut w temperaturze 60°C.

Po ostygnięciu mieszaninę wstrząsano z 2,0 mL roztworu kwasu fosforowego (0,5 mol/L) i 2,0 mL eteru przez 3 minuty na każdą z reakcji, w celu ekstrakcji. Do czystych próbek przenoszono warstwę organiczną (górną warstwę eterową). Ponownie dodawano do próbek 2 mL eteru dietylowego i powtarzano poprzedni krok (2 minuty ekstrakcji) po czym przenoszono otrzymaną warstwę organiczną i łączono ją z tą, którą uzyskano w wyniku pierwszej ekstrakcji.

W celu wypłukania i wyekstrahowania pozostałych związków wodnych do otrzymanej warstwy organicznej dodawano 2 mL wody miliQ i wytrząsano próbki przez 2 minuty po czym przenoszono do czystych próbek warstwę organiczną (górną warstwę eterową). Eter usunięto stosując gazowy azot.

Uzyskano hydrazydową postać kwasów tłuszczowych (pochodne kwasów tłuszczowych), które rozpuszczono w 150  $\mu$ L metanolu, a 20  $\mu$ L poddano analizie HPLC.

Analizę HPLC przeprowadzono przy użyciu pompy HPLC 1525 Binary z

detektorem UV/Vis 2489 oraz kolumną Shimadzu 5  $\mu\text{m}$  C18-120 Å (250 x 4.6 mm). Faza ruchoma składała się z acetonitrylu–metanolu–wody (30:16:54). Temperatura kolumny wynosiła 50°C, prędkość przepływu 1,0 mL/min, a długość fali pomiarowej 400 nm.

Oznaczono następujące SCFA: kwas mlekowy, kwas octowy (C2), kwas propionowy (C3), kwas masłowy (C4), kwas izomasłowy (iC4), kwas walerianowy (C5) i kwas izowalerianowy (iC5). Wyniki przedstawiono w jednostkach [ $\mu\text{mol}/1\text{g}$  kału].

### 3.2.5 Analiza danych ankietowych

W celu zebrania informacji przeprowadzono badanie ankietowe. Rodzice lub opiekunowie dzieci zgłoszonych do projektu zostali poproszeni o udzielenie odpowiedzi na pytania dotyczące perinatalnego wywiadu medycznego i demograficznego oraz obecnego stanu zdrowia. Pytano o datę urodzenia, sposób porodu, płeć, czy poród odbył się terminowo, jaki był wiek ciążowy dziecka, jakie były urodzeniowa waga i wzrost oraz jakie są obecne, wiek rodziców w momencie urodzenia dziecka, czy dziecko choruje przewlekle, czy występują objawy neurologiczne oraz czy u dziecka zdiagnozowano zaburzenia ze spektrum autyzmu.

#### 3.2.5.1 Nawyki żywieniowe

Celem badania ankietowego było określenie nawyków żywieniowych i diety biorących udział w badaniu dzieci. Aby ocenić żywienie i reakcje organizmu w okresie niemowlęcym, pytano o karmienie piersią, karmienie mlekiem modyfikowanym oraz o wprowadzenie do diety dziecka pokarmów stałych. Następnie zapytano o obecne zwyczaje żywieniowe oraz o przyjmowane przez dziecko leki, suplementy diety i antybiotyki.

Początkowo przeprowadzono ogólną ocenę, czy między grupami występują różnice. Do analizy statystycznej danych numerycznych użyto testu Kruskala-Wallisa, natomiast do zliczeń - testu chi-kwadrat ( $\chi^2$ ). Przy ocenie globalnej nie dokonano korekty wartości  $p$  na wielokrotne testowanie. Gdyby naiwnie zliczać liczbę wykonanych testów i dokonywać korekty, moc

testu zostałaaby znacznie obniżona. Rozważano użycie bardziej zaawansowanych metod korekcji, ale w imię prostoty zdecydowano się nie dokonywać korekty. Tabela 4.1 jest jedynie częścią testowanych danych, badano więcej parametrów.

Aby ocenić różnice występujące między grupami (dzieci z ASD vs. grupa kontrolna, dzieci z ASD vs. rodzeństwo, rodzeństwo vs. grupa kontrolna) zastosowano testy post hoc. Dla danych numerycznych użyto testu Dunna, natomiast dla zliczeń ponownie testu  $\chi^2$ . W przypadku testów post hoc zastosowano korektę wartości  $p$  metodą Bonferroniego, aby zminimalizować ryzyko błędu pierwszego rodzaju.

### 3.2.5.2 Ocena diety uczestników badania

Ocena diety uczestników badania została przeprowadzona za pomocą ankiet, które zostały dostarczone w formie papierowej do samodzielnego wypełnienia. W celu ułatwienia procesu, dostarczono również wzór do wypełnienia ankiety. Rodzice lub opiekunowie uczestników badania zostali poproszeni o monitorowanie i dokładne zapisywanie diety swoich dzieci przez siedem dni poprzedzających pobranie próbki stolca. Prośba ta obejmowała szczegółowe notowanie składu każdego posiłku oraz wielkość zjadanych porcji. Zebrane w ten sposób informacje zostały następnie wprowadzone do programu DietetykPro, używanego przez dietetyków do tworzenia zbilansowanych planów żywieniowych. Program ten umożliwił ekstrakcję szczegółowych danych na temat spożywanych przez dzieci pokarmów, takich jak np. liczba kalorii i składniki odżywcze. Te wartościowe informacje zostały zapisane i poddane dalszej analizie statystycznej. Informacje dietetyczne dostępne były dla 141 ze 144 uczestników badania. Przeprowadzenie analizy statystycznej odbyło się za pomocą języka programowania Python.

#### 3.2.5.2.1 Analiza danych żywieniowych

Globalna analiza wzorców dietetycznych uczestników badania została przeprowadzona za pomocą analizy głównych składowych (PCA, *ang. Principal Component Analysis*). Analizę wykonano w celu odkrycia, jak rozkładają

się wzorce żywieniowe, rozumiane jako wynik kombinacji składników odżywczych spożywanych w pożywieniu. Dane jakościowe, zawierające informacje o posiłkach, zostały zebrane za pomocą ankiet dietetycznych. Następnie, za pomocą programu dla dietetyków, DietetykPro, przeliczono je na dane liczbowe, które wykorzystano w analizach. Ocenę przeprowadzono w kontekście trzech grup: dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, ich neurotypowe rodzeństwo oraz neurotypowa grupa kontrolnych dzieci niespokrewnionych.

Na pierwszej składowej PCA (PC1) przeprowadzono testy statystyczne, takie jak test Kruskala-Wallisa oraz test PERMANOVA.

Lista składników odżywczych i parametrów żywności brana pod uwagę w analizie PCA:

1. Wartość energetyczna kcal	20. Cynk mg	41. C 14:0 g
2. Białko ogółem g	21. Miedź mg	42. C 15:0 g
3. Tłuszcz g	22. Mangan mg	43. C 16:0 g
4. Węglowodany ogółem g	23. Jod $\mu\text{g}$	44. C 17:0 g
5. Błonnik pokarmowy g	24. Witamina A $\mu\text{g}$	45. C 18:0 g
6. Cholesterol mg	25. Retinol $\mu\text{g}$	46. C 20:0 g
7. Odpadki	26. $\beta$ -karoten $\mu\text{g}$	47. Kwasy tłuszczowe nasycone ogółem g
8. Woda g	27. Witamina D $\mu\text{g}$	48. C 14:1 g
9. Białko zwierzęce g	28. Witamina E mg	49. C 15:1 g
10. Białko roślinne g	29. Tiamina mg	50. C 16:1 g
11. Węglowodany przyswajalne g	30. Ryboflawina mg	51. C 17:1 g
12. Popiół g	31. Niacyna mg	52. C 18:1 g
13. Sód mg	32. Witamina B6 mg	53. C 20:1 g
14. Sól g	33. Fiolany $\mu\text{g}$	54. C 22:1 g
15. Potas mg	34. Witamina B12 $\mu\text{g}$	55. Kwasy tłuszczowe jednonienasycone ogółem g
16. Wapń mg	35. Witamina C mg	56. C 18:2 g
17. Fosfor mg	36. C 4:0 g	57. C 18:3 g
18. Magnez mg	37. C 6:0 g	58. C 18:4 g
19. Żelazo mg	38. C 8:0 g	59. C 20:3 g
	39. C 10:0 g	
	40. C 12:0 g	

---

60. C 20:4 g	72. Fenylalanina mg	84. Seryna mg
61. C 20:5 g	73. Tyrozyna mg	85. Glukoza g
62. C 22:5 g	74. Treonina mg	86. Fruktaza g
63. C 22:6 g	75. Tryptofan mg	87. Sacharoza g
64. n-3 ogółem	76. Walina mg	88. Laktoza g
65. n-6 ogółem	77. Arginina mg	89. Skrobia g
66. Kwasy tłuszczowe wielonienasycone g	78. Histrydina mg	90. Ładunek gliko- miczny
67. Izoleucyna mg	79. Alanina mg	91. Wymienniki węglo- wodanowe
68. Leucyna mg	80. Kwas asparaginowy mg	92. Wymienniki białkowo- tłuszczowe
69. Lizyna mg	81. Kwas glutaminowy mg	
70. Metionina mg	82. Glicyna mg	
71. Cystyna mg	83. Prolina mg	93. Odpadki %

Do zobrazowania ogólnych zarysów danego klastra w przestrzeni PCA zastosowano metodę otoczek wypukłych (*ang. convex hulls*) w celu ułatwienia interpretacji i porównania wzorców grupowania między różnymi grupami w przestrzeni wielowymiarowej. Należy zauważyć, że otoczka wypukła nie jest jednak miarą wariacji wewnątrz grupy. Po zidentyfikowaniu globalnych różnic w przyjmowanych z pożywieniem składnikach odżywczych, zbadano które konkretne zmienne można wyróżnić jako różne między grupami. W tym celu zastosowano test Kruskala-Wallisa z korektą FDR (*ang. False Discovery Rate*) Benjamini-Hochberga na wielokrotne testowanie. Korekta FDR Benjamini-Hochberga to metoda statystyczna stosowana do kontrolowania błędów typu I (fałszywie dodatnich, fałszywie odkrytych różnic) w przypadku przeprowadzania wielu testów statystycznych jednocześnie. Zastosowanie tej korekty pozwala zminimalizować ryzyko otrzymania fałszywie dodatnich wyników, które mogą wynikać z wielokrotnego testowania na tych

samych danych. Następnie przeprowadzono analizę post hoc, aby zidentyfikować, które pary grup wykazują istotne statystycznie różnice. Wykorzystano do tego metodę Dunna, a wartości  $p$  skorygowano za pomocą metody Holm-Bonferroniego.

### 3.2.5.2.2 Analiza danych żywieniowych w kontekście rodzin

W ramach badania podjęto próbę zidentyfikowania różnic we wzorcach żywieniowych rodzeństwa. W tym celu porównano grupę rodzin gdzie jest dziecko z diagnozą spektrum autyzmu i neurotypowe rodzeństwo oraz grupę rodzin z wyłącznie neurotypowym rodzeństwem (dzieci z grupy kontrolnej). Analiza ta koncentrowała się na badaniu różnorodności diet w obu grupach. W przypadku dzieci, które nie miały rodzeństwa, nie dokonywano takich porównań.

W tym celu wykorzystano analizę głównych składowych (PCA), gdzie ukazano globalne wzorce żywieniowe. Reprezentacje punktowe osób (odzwierciedlające ich globalne wzorce żywieniowe) na wykresie PCA zostały połączone liniami w ramach jednej rodziny. Linie te reprezentują wektory odległości przemieszczenia między punktami na wykresie PCA. Histogramy długości tych wektorów (gdzie większa odległość sugeruje większą różnicę w wzorcach żywieniowych) umożliwiły zbadanie, czy średnie różnice w żywieniu między rodzeństwem są statystycznie istotne w obu grupach.

Dane o długościach wektorów, wyrażone w jednostkach arbitralnych, zostały poddane testowi Shapiro-Wilka w celu sprawdzenia, czy pochodzą z rozkładu normalnego. Wynik testu wskazał, że nie spełniają tego kryterium. Dlatego, do porównania średnich długości wektorów w obu grupach zastosowano nieparametryczny test Manna-Whitneya.

### 3.2.5.3 Ocena dolegliwości ze strony układu pokarmowego

W badaniu przez okres 14 dni prowadzono obserwacje objawów ze strony układu pokarmowego. Rodzicom lub opiekunom dostarczono ankietę do samodzielnego wypełnienia. Poproszono o zaznaczanie, (1) czy danego dnia wystąpiło wypróżnienie [tak/nie], (2) jeśli tak, to jaką konsystencję miał sto-



lec [typy 1-7], (3) jakiego był koloru [brązowy, zielony, czarny, żółty, szary, czerwony], (4) czy zaobserwowano ból brzucha u dziecka [tak/nie], (5) czy występowały gazy [tak/nie], (6) czy widoczne było wzdęcie [tak/nie].

Analizie poddano wyłącznie te ankiety, które zawierały kompletne odpowiedzi na wszystkie sześć pytań, udzielane w ciągu 14-dniowego okresu obserwacji. Kompletne zestawy danych, zawierające odpowiedzi na wszystkie pytania, uzyskano od 115 osób spośród 144 uczestników badania. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą języka programowania Python, natomiast test dokładny Fishera zrealizowano przy użyciu środowiska statystycznego R.

### 3.2.5.3.1 Wypróżnienia, ból brzucha, gazy, wzdęcia

Podobnie jak w przypadku innych badanych cech, analizy statystyczne przeprowadzono na trzech grupach: dzieciach z ASD, ich neurotypowym rodzeństwie oraz niespokrewnionej neurotypowej grupie kontrolnej. Badanie skupiło się na czterech aspektach: wypróżnieniu, bólach brzucha, gazach oraz wzdęciach. Zostały one ocenione na podstawie obserwacji, która trwała 14 dni, a odpowiedzi na te pytania były kategoryzowane jako "tak", gdy objaw lub wypróżnienie wystąpiło danego dnia lub "nie", gdy nie wystąpiło.

W celu oceny różnic pomiędzy grupami, przeprowadzono analizy statystyczne przy użyciu dokładnego testu Fishera (*ang. Fisher's exact test*). Test ten pozwolił na sprawdzenie, czy istnieją globalne różnice w zliczeniach tych cech (suma odpowiedzi tak/nie u poszczególnych osób zebrane w 3 grupach) pomiędzy grupami. Decyzję o zastosowaniu dokładnego testu Fishera podjęto, ponieważ w niektórych badanych cechach liczba zliczeń wynosiła 0. Z tego powodu nie zdecydowano się na wykonanie typowo wykorzystywanego testu chi-kwadrat ( $\chi^2$ ). Po tej analizie, przeprowadzono testy post hoc, które również były dokładnymi testami Fishera, aby dokładniej zbadać różnice pomiędzy grupami.

Aby uwzględnić problem wielokrotnych testowań i ryzyko odkrycia fałszywie pozytywnych wyników, przeprowadzono korektę wartości  $p$  przy użyciu metody Bonferroniego. Ta korekta pozwoliła na kontrolę błędu I rodzaju,








zapewniając większą pewność we wnioskowaniu.

### 3.2.5.3.2 Wypróżnienia i skala uformowania stolca

Jednym z badanych aspektów było monitorowanie wypróżnień i uformowania stolca badanych dzieci, klasyfikując go według Bristolskiej Skali Uformowania Stolca. Odnotowywano, czy danego dnia wystąpiło wypróżnienie, a jeśli tak, to jak uformowany był stolec.

Bristolska Skala Uformowania Stolca składa się z siedmiu obrazków przedstawiających różne formy stolca, które ułatwiają rejestrowanie jego konsystencji. Typ 1 odnosi się do formy stolca jako oddzielnych twardych grudek, podobnych do orzechów (trudnych do wydalania); typ 2 – o kształcie wydłużonym, grudkowatym; typ 3 – stolec w kształcie wydłużonym, z pęknięciami na powierzchni; typ 4 – stolec o kształcie wydłużonym lub węzowatym, gładki i miękki; typ 5 – miękkie, małe grudki o wyraźnych krawędziach (łatwe do wydalania), typ 6 – małe elementy o postrzępionych brzegach (kłaczkami), papkowaty stolec; oraz typ 7 – wodnisty, całkowicie płynny, bez grudek [215], podsumowanie znajduje się na rysunku 3.5. Typy 3, 4 i 5 są uważane za normalne formy stolca [215]. Skala ta została zweryfikowana zarówno dla zdrowych dorosłych jak i osób zmagających się z problemami układu pokarmowego [215, 216, 217]. Wraz z upływem lat, zyskała uznanie w literaturze medycznej jako wartościowe i ustandaryzowane narzędzie do badania konsystencji stolca, zarówno u dorosłych jak i dzieci [215].

Wykorzystano dokładny test Fishera w celu porównania częstości występowania poszczególnych typów stolca, jak również braku wypróżnienia pomiędzy grupami. Ten test używany jest do określenia, czy istnieją istotne różnice między grupami (dwoma lub większą liczbą) na podstawie niewielkich próbek danych. Test ten nie polega na żadnych założeniach dotyczących rozkładu populacji. W celu kontrolowania błędów typu I, wynikających z wielokrotnych porównań, wartości  $p$  zostały skorygowane za pomocą metody Bonferroniego.

Bristolska Skala Uformowania Stolca		
Typ 1		Pojedyncze twarde grudki, podobne do orzechów (trudne do wydalenia)
Typ 2		Stolec o kształcie wydłużonym, grudkowaty
Typ 3		Stolec o kształcie wydłużonym, z pęknięciami na powierzchni
Typ 4		Stolec o kształcie wydłużonym lub wężowatym, gładki i miękki
Typ 5		Miękkie, małe grudki o wyraźnych brzegach (łatwe do wydalenia)
Typ 6		Małe elementy o postrzępionych brzegach (kłaczkki), papkowaty stolec
Typ 7		Wodnisty, całkowicie płynny, bez grudek

Rysunek 3.5: Bristolska Skala Uformowania Stolca zaadaptowana do języka polskiego. Rysunek pochodzi z [215].

#### 3.2.5.4 Wypróżnienia i kolor stolca

Kolejnym badanym aspektem był kolor stolca. Kolor brązowy jest prawidłowym kolorem stolca, wynika z obecności bilirubiny, produktu rozpadu hemoglobiny oraz żółci, wydzielanej przez wątrobę, a która ma kluczowe znaczenie w rozkładzie i absorpcji tłuszczów [218]. Na kolor stolca duży wpływ ma dieta, zatem może się znacznie różnić w zależności od spożywanego pokarmu [218], ale także może wskazywać na zmiany stanu zdrowia. Stolec bledy, o barwie glinki lub w kolorze szarym obserwuje się w przypadku zatatorów żółciowych [218]. Smolisty stolec o zabarwieniu czarnym obserwuje się w przypadku utraty więcej niż 100 ml krwi z górnego układu pokarmowego [218]. Jednak poza krwawieniem, czarny stolec może również być obserwowany na skutek leczenia żelazem lub bizmutem [218]. Czerwony stolec obserwuje się w przypadku krwawienia z dolnego odcinka przewodu pokarmowego [218], a także po spożyciu pokarmów o tym zabarwieniu. Zielony kolor może wynikać z szybkiego przemieszczania się treści pokarmowej przez przewód pokarmowy, jak w przypadku biegunki [219], wówczas bilirubina nie ulega całkowitemu rozpadowi do urobilinogenu i sterkobilinogenu, które nadają charakterystyczny kolor prawidłowemu stolcowi. Spożywanie diety bogatej w warzywa liściaste, zawierające dużą ilość chlorofilu lub barwników spożywczych również może nadać zielone zabarwienie kałowi [219]. Kolor żółty stolca może wynikać z nadmiaru tłuszczu, co często jest spowodowane zaburzeniami związanymi z niewłaściwym wchłanianiem składników pokarmowych [220]. Stolec o żółtym kolorze często wiąże się z występowaniem gazów i nieprzyjemnego zapachu [219]. Może to sugerować zaburzenia związane z niewłaściwym wchłanianiem składników pokarmowych, jak w przypadku celiakii czy mukowiscydozy [219, 221].

Podobnie jak w przypadku sprawdzenia, czy występują różnice w udziale stolców danego typu (uformowanie wg skali bristolskiej) między grupami badanymi (dzieci z ASD oraz ich neurotypowe rodzeństwo) i kontrolną (neurotypowe dzieci niespokrewnione) zastosowano test dokładny Fishera, który wykonano na zliczeniach wystąpień stolca w danym z sześciu kolorów. W celu wskazania, które konkretnie grupy różnią się parami między sobą wykonano

test post hoc, ponownie stosując test dokładny Fishera, wykonano korektę wartości  $p$  na wielokrotne testowanie stosując metodę Bonferroniego.

#### 3.2.5.4.1 Wskaźnik dolegliwości jelitowych

Na podstawie zebranych danych ankietowych, skonstruowano prosty wskaźnik dolegliwości jelitowych. Kalkulacja wskaźnika obejmowała sumowanie liczby dolegliwości dla każdej osoby, obserwowanej przez okres 14 dni. Uwzględniono takie czynniki jak występowanie wypróżnienia, charakterystyka stolca (w tym kolor i konsystencja), a także występowanie gazów, wzdęć i bólów brzucha. W wyniku tej procedury, każdy z uczestników badania, dla którego dostępne były pełne informacje (115 osób), otrzymał wynik wyrażony w punktach. Maksymalna wartość wskaźnika to 70.

Każda obserwowana dolegliwość, tak jak gazy, wzdęcia i bóle brzucha, przekładała się na dodatkowy punkt. Brak wypróżnienia także skutkowało przyznaniem punktu, podczas gdy jego występowanie to 0 punktów. Kolor stolca brązowy to 0 pkt., a kolor inny niż brązowy był traktowany jako symptomatyczny i przyznawano punkt. Za prawidłowe uznawano stolce typu 3, 4 i 5 - za nie nie przydzielano punktów, natomiast za nieprawidłowe typy (1 i 2 oraz 6 i 7) punkty były przydzielane. Im więcej punktów, tym większe dolegliwości jelitowe.

W celu określenia, czy istnieją statystycznie istotne różnice między grupami (ASD, Rodzeństwo, Kontrola) w zakresie dolegliwości jelitowych, zastosowano test Kruskala-Wallisa. Dodatkowo przeprowadzono testy post hoc Dunna z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego.

# Rozdział 4

## Wyniki

### 4.1 Charakterystyka uczestników badania

W badaniu wzięło udział 71 dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, 29 dzieci neurotypowych, będących rodzeństwem dzieci z ASD oraz 44 neurotypowe dzieci niespokrewnione, stanowiące grupę kontrolną. Omawiane poniżej informacje zebrane zostały w tabeli 4.1.

Chłopcy w grupie ASD stanowili 88,7%, w grupie rodzeństwa 44,8%, a w grupie kontrolnej 34,1%. Wykazano istotnie różny udział chłopców w grupie dzieci z autyzmem względem rodzeństwa i grupy kontrolnej ( $p \leq 0,001$  w przypadku obu porównań, test post hoc Dunna z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Mediana wieku w grupie dzieci z ASD wynosiła 7 lat ( $\pm 2,6$ , odchylenie ćwiartkowe), u neurotypowego rodzeństwa 8,2 ( $\pm 2,7$ ), a w grupie kontrolnej 7,5 ( $\pm 2,5$ ). Grupy zostały dobrze dobrane ze względu na wiek, nie wykazano istotnie statystycznych różnic (test Kruskala-Wallisa,  $p = 0,439$ ). Uczestnicy badania nie różnili się istotnie ze względu na obecny wzrost i wagę ( $p = 0,534$  i  $p = 0,920$ , test Kruskala-Wallisa).

Większość uczestników badania stanowili mieszkańcy miast, w grupach ASD, rodzeństwo i kontrola odpowiednio 76,1%, 79,3% i 72,7% ( $p = 0,858$ , test  $\chi^2$ ).

Tabela 4.1: Charakterystyki demograficzne, karmienie i doświadczenia z problemami jelitowymi w okresie niemowlęcym oraz inne wybrane parametry charakteryzujące uczestników badania w grupach.

	ASD (n=71)	Rodzeństwo (n=29)	Kontrola (n=44)	NA	Wartość p	Wartość p w testach post hoc		
						A vs. K	A vs. R	K vs. R
pleć, męska	63 (88.7%)	13 (44.8%)	15 (34.1%)	0 (0.0%)	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	0.498
wiek, lata	7.0 ± 2.6	8.2 ± 2.7	7.5 ± 2.5		0.439	0.605	1.000	1.000
obecny wzrost, m	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.2		0.534	0.847	1.000	1.000
obecna waga, kg	24.0 ± 7.5	28.6 ± 8.7	24.3 ± 12.0		0.920	1.000	1.000	1.000
zamieszkanie, miasto	54 (76.1%)	23 (79.3%)	32 (72.7%)	0 (0.0%)	0.810	0.858	0.929	0.718
choroby przewlekłe	19 (27.5%)	5 (17.2%)	2 (4.5%)	2 (1.4%)	<b>0.009</b>	<b>0.005</b>	0.410	0.163
objawy neurologiczne	15 (21.7%)	3 (10.3%)	0 (0.0%)	2 (1.4%)	<b>0.003</b>	<b>0.002</b>	0.297	0.115
alergia/nietol. pokarm.	41 (58.6%)	11 (40.7%)	7 (16.3%)	4 (2.8%)	≤ 0.001	≤ 0.001	0.177	<b>0.046</b>
choroby ukl. pokarmowego	21 (31.3%)	3 (13.0%)	4 (10.5%)	16 (11.1%)	<b>0.024</b>	<b>0.030</b>	0.150	1.000
dieta elim.	48 (67.6%)	10 (34.5%)	2 (4.7%)	1 (0.7%)	≤ 0.001	≤ 0.001	<b>0.005</b>	<b>0.003</b>
dieta elim. w przeszłości	44 (62.9%)	10 (34.5%)	9 (20.9%)	2 (1.4%)	≤ 0.001	≤ 0.001	<b>0.018</b>	0.314
leki stałe	18 (25.4%)	4 (13.8%)	3 (7.1%)	2 (1.4%)	<b>0.041</b>	<b>0.031</b>	0.317	0.604
suplementy diety	46 (64.8%)	11 (39.3%)	14 (33.3%)	3 (2.1%)	<b>0.002</b>	<b>0.002</b>	<b>0.037</b>	0.799
antybiotyki, ost. 3 msc	10 (14.5%)	1 (4.2%)	3 (7.9%)	13 (9.0%)	0.297	0.490	0.326	0.959
wraż. na zapach jedzenia	26 (36.6%)	7 (24.1%)	6 (14.0%)	1 (0.7%)	<b>0.028</b>	<b>0.017</b>	0.332	0.430
wraż. na fakturę jedzenia	32 (45.7%)	5 (17.9%)	6 (14.0%)	3 (2.1%)	≤ 0.001	<b>0.001</b>	<b>0.019</b>	0.913
wyb. pokarm.	27 (38.0%)	6 (20.7%)	1 (2.3%)	1 (0.7%)	≤ 0.001	≤ 0.001	0.150	<b>0.030</b>
wyb. pokarm. w przeszłości	34 (48.6%)	3 (10.3%)	5 (11.6%)	2 (1.4%)	≤ 0.001	≤ 0.001	≤ 0.001	1.000
poród, naturalny	38 (53.5%)	14 (48.3%)	22 (50.0%)	0 (0.0%)	0.871	0.861	0.798	1.000
urodzona/y w terminie	47 (66.2%)	19 (65.5%)	33 (76.7%)	1 (0.7%)	0.442	0.326	1.000	0.438
wiek ciążowy, tygodnie	39.0 ± 1.0	39.0 ± 1.0	40.0 ± 0.5		0.506	0.831	1.000	1.000
waga urodzeniowa, kg	3.2 ± 0.3	3.2 ± 0.3	3.4 ± 0.3		0.543	0.824	1.000	1.000
wzrost urodzeniowy, cm	54.0 ± 2.1	53.5 ± 2.0	55.0 ± 1.5		0.482	1.000	0.944	0.737
wiek matki, lata	31.0 ± 3.5	31.0 ± 2.5	30.5 ± 3.1		0.850	1.000	1.000	1.000
wiek ojca, lata	33.0 ± 3.8	32.0 ± 5.0	33.5 ± 3.1		0.904	1.000	1.000	1.000
karmienie piersią	65 (91.5%)	29 (100.0%)	42 (95.5%)	0 (0.0%)	0.232	0.672	0.250	0.666
długość KP, msc	6.0 ± 4.5	8.8 ± 4.6	12.0 ± 6.0		<b>0.040</b>	<b>0.037</b>	1.000	0.308
antybiotyki matki (KP)	10 (16.1%)	3 (10.7%)	2 (5.0%)	14 (9.7%)	0.226	0.165	0.724	0.677
alergia skórna (KP)	19 (31.7%)	9 (31.0%)	4 (10.0%)	15 (10.4%)	<b>0.033</b>	<b>0.023</b>	1.000	0.058
zaparcia (KP)	22 (35.5%)	4 (15.4%)	5 (13.5%)	19 (13.2%)	<b>0.023</b>	<b>0.032</b>	0.103	1.000
służ w kale (KP)	24 (38.1%)	2 (7.1%)	7 (17.5%)	13 (9.0%)	<b>0.003</b>	<b>0.045</b>	<b>0.006</b>	0.381
karmienie MM	56 (80.0%)	16 (55.2%)	25 (59.5%)	3 (2.1%)	<b>0.016</b>	<b>0.033</b>	<b>0.023</b>	0.904
długość karmienia MM, msc	23.0 ± 8.0	20.0 ± 7.0	14.0 ± 4.5		0.095	0.107	1.000	0.337
wzdęcia (MM)	23 (41.1%)	6 (33.3%)	4 (15.4%)	44 (30.6%)	0.071	<b>0.040</b>	0.758	0.303
łapczywie jadlo (MM)	20 (36.4%)	3 (17.6%)	2 (8.3%)	48 (33.3%)	<b>0.023</b>	<b>0.022</b>	0.251	0.679
<i>W pierwszym roku życia, pokarmy stałe:</i>								
wzdęcia (PS)	20 (28.6%)	5 (18.5%)	4 (9.3%)	4 (2.8%)	<b>0.047</b>	<b>0.028</b>	0.450	0.451
zaparcia (PS)	29 (41.4%)	7 (24.1%)	8 (18.2%)	1 (0.7%)	<b>0.022</b>	<b>0.018</b>	0.162	0.749
biegunki (PS)	25 (35.2%)	5 (17.9%)	6 (14.3%)	3 (2.1%)	<b>0.028</b>	<b>0.028</b>	0.147	0.947
stolec wodnisty (PS)	15 (21.4%)	2 (7.1%)	2 (4.8%)	4 (2.8%)	<b>0.024</b>	<b>0.035</b>	0.164	1.000
służ w kale (PS)	21 (30.4%)	1 (3.4%)	3 (7.0%)	3 (2.1%)	≤ 0.001	<b>0.007</b>	<b>0.008</b>	0.907
krew w kale (PS)	6 (8.7%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	4 (2.8%)	<b>0.040</b>	0.125	0.239	1.000
gotowane warzywa	71 (100.0%)	29 (100.0%)	37 (92.5%)	4 (2.8%)	0.084	<b>0.022</b>	1.000	0.363
kaszki bezgluten., chętnie	51 (77.3%)	27 (96.4%)	32 (88.9%)	14 (9.7%)	<b>0.044</b>	0.240	0.050	0.519
produkty gluten., ZPP	17 (26.2%)	3 (13.0%)	2 (6.1%)	23 (16.0%)	<b>0.040</b>	<b>0.035</b>	0.317	0.671
ryby, chętnie	41 (65.1%)	21 (84.0%)	29 (85.3%)	22 (15.3%)	<b>0.044</b>	0.060	0.135	1.000
SPM, msc	10.0 ± 1.5	10.0 ± 1.5	8.0 ± 1.8		<b>0.002</b>	<b>0.017</b>	0.695	<b>0.002</b>
mleko krowie, alergia	13 (31.0%)	4 (25.0%)	1 (4.2%)	62 (43.1%)	<b>0.039</b>	<b>0.025</b>	0.903	0.143
mleko krowie, ZPP	14 (35.0%)	3 (23.1%)	1 (4.5%)	69 (47.9%)	<b>0.027</b>	<b>0.018</b>	0.647	0.265

Różnice istotne statystycznie ( $p < 0,05$ ) zostały zaznaczone pogrubioną czcionką. Dane wyrażone jako mediana ± IQR/2 (odchylenie ćwiartkowe) lub n (%). Dane numeryczne testowane testem Kruskala-Wallisa, z testami post hoc Dunna, dane o liczeniach testowane w teście  $\chi^2$  i testach post hoc  $\chi^2$ . Wartości p w testach post hoc podlegały korekcie metodą Bonferroniego. Wyjaśnienie skrótów: A vs. K – ASD vs. Kontrola; A vs. R – ASD vs. Rodzeństwo; K vs. R – Kontrola vs. Rodzeństwo; alergia/nietol. pokarm. – alergia lub nietolerancja pokarmowa; dieta elim. – dieta eliminacyjna; wraż. – wrażliwość; wyb. pokarm. – wybiórczość pokarmowa; KP – karmienie piersią; msc – miesiące; MM – mleko modyfikowane; PS – pokarmy stałe; ZPP – zaburzenia przewodzenia pokarmowego; SPM – sfermentowane produkty mleczne.

Dzieci z ASD częściej niż dzieci z grupy kontrolnej cierpią na choroby przewlekłe (27,5% vs. 4,5%,  $p = 0,005$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego), ale różnica między dziećmi z ASD a grupą neurotypowego rodzeństwa (17,2%) nie jest istotna statystycznie ( $p = 0,410$ ).

Objawy neurologiczne dotyczą istotnie większą część dzieci z ASD, niż dzieci z grupy kontrolnej (21,7% vs. nie dotyczą nikogo z grupy kontrolnej,  $p = 0,002$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Różnica między dziećmi z ASD a neurotypowym rodzeństwem (10,3%) nie jest istotna statystycznie ( $p = 0,297$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Alergie i nietolerancje pokarmowe dotyczą 58,6%, 40,7% i 16,3% kolejno dzieci z ASD, neurotypowego rodzeństwa i grupy kontrolnej. Istotnie częściej dzieci z ASD niż kontroli i istotnie częściej neurotypowego rodzeństwa niż kontroli ( $p \leq 0,001$  i  $p = 0,046$  odpowiednio,  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Można zatem stwierdzić, że alergie i nietolerancje pokarmowe są częściej raportowane w rodzinach, w których dzieci dotknięte są zaburzeniami se spektrum autyzmu.

Choroby układu pokarmowego częściej dotyczą dzieci z ASD, niż dzieci z grupy kontrolnej (31,3% vs. 10,5%,  $p = 0,030$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego), ale nie istotnie częściej niż neurotypowego rodzeństwa (13,0%,  $p = 0,150$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Dieta eliminacyjna była stosowana u 67,6% dzieci z ASD, 34,5% neurotypowego rodzeństwa i 4,7% dzieci z grupy kontrolnej, czyli istotnie częściej u dzieci z ASD względem rodzeństwa ( $p = 0,005$ ) i względem grupy kontrolnej ( $p \leq 0,001$ ) i częściej w grupie neurotypowego rodzeństwa względem grupy kontrolnej ( $p = 0,003$ ). wartości  $p$  pochodzą z testu post hoc  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego.

Stosowanie diety eliminacyjnej w przeszłości zaraportowano dla 62,9% dzieci z ASD, 34,5% neurotypowego rodzeństwa i 20,9% dzieci z grupy kontrolnej, czyli istotnie częściej u dzieci z autyzmem, w porównaniu do neurotypowego rodzeństwa i do grupy kontrolnej ( $p = 0,018$  i  $p \leq 0,001$ , odpowiednio, test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Leki stale przyjmowane raportowane są dla 25,4% dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, 13,8% dzieci będących w grupie neurotypowego ro-



dzeństwa i 7,1% dzieci z grupy kontrolnej, przy czym istotna statystycznie różnica występuje między dziećmi z ASD a kontrolą,  $p = 0,031$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego.

Suplementy diety przyjmowane są we wszystkich trzech grupach, istotnie częściej przez dzieci z ASD (64,8%) niż w grupie kontrolnej (33,3%) i niż przez grupę neurotypowego rodzeństwa (39,3%) ( $p = 0,002$  i  $p = 0,037$ , odpowiednio,  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Antybiotyk w ciągu ostatnich trzech miesięcy przyjmowało 14,5% dzieci z ASD, 4,2% z grupy neurotypowego rodzeństwa i 7,9%, bez istotnej różnicy między grupami ( $p = 0,297$ , test  $\chi^2$ ).

Dzieci wrażliwe na zapach jedzenia stanowią większą grupę wśród dzieci z zaburzeniami se spektrum autyzmu (36,6%), niż wśród dzieci z grupy kontrolnej (14,0%) ( $p = 0,017$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Wśród neurotypowego rodzeństwa 24,1% dzieci jest wrażliwych na zapach jedzenia.

Wrażliwość na fakturę jedzenia jest bardziej charakterystyczną cechą, niż wrażliwość na zapach, bo zgłaszana wśród 45,7% dzieci z ASD, a 17,9% neurotypowego rodzeństwa (ASD vs. rodzeństwo  $p = 0,019$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego) i 14,0% dzieci z grupy kontrolnej (ASD vs.  $p = 0,001$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Trwająca wybiórczość pokarmowa zgłaszana była częściej dla dzieci z ASD niż w grupie kontrolnej (38,0% vs. 2,3%,  $p \leq 0,001$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego), ale nie częściej u dzieci z ASD niż dla neurotypowego rodzeństwa (ASD 38,0% vs. 20,7% rodzeństwo  $p = 0,150$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Wybiórczość wśród rodzeństwa również jest istotnie częstsza w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p = 0,030$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Wybiórczość pokarmową występującą w przeszłości zgłaszano dla 48,6% dzieci z grupy ASD, 10,3% neurotypowego rodzeństwa i 11,6% (istotne statystycznie różnice to ASD vs. rodzeństwo, ASD vs. kontrola,  $p \leq 0,001$  dla obu porównań, różnica między rodzeństwem a kontrolą nie jest istotna statystycznie  $p = 1,0$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Wykazano jednolity rozkład typów porodu, z zaskakująco równomiernym

podziałem na porody naturalne i cesarskie cięcia. W każdej z analizowanych grup, rozkład typów porodu ukazywał proporcje, z blisko 50% przypadków zaliczanych do każdego z typów porodu (poród naturalny wśród dzieci z ASD to 53,5% przypadków, wśród neurotypowego rodzeństwa to 48,3%, a wśród grupy kontrolnej dokładnie 50,0%). Równy podział pomiędzy typami porodów w badanych grupach umożliwia wykluczenie wpływu metody porodu na kształtowanie się mikrobiomu, co jest szczególnie istotne dla celów tego badania.

66,2% dzieci z grupy ASD, 65,5% neurotypowego rodzeństwa i 76,7% grupy kontrolnej przyszło na świat w terminie i te różnice nie są istotne statystycznie ( $p = 0,442$ , test  $\chi^2$ ). Również wiek ciążowy (długość trwania ciąży) nie różnił się między grupami (mediana dla ASD:  $39,0 \pm 1,0$ , rodzeństwo neurotypowe:  $39,0 \pm 1,0$ , grupa kontrolna:  $40,0 \pm 0,05$ ,  $p = 0,506$ , test Kruskala-Wallisa). Wzrost i waga urodzeniowa dzieci w trzech grupach także nie różni się istotnie statystycznie ( $p = 0,482$  i  $p = 0,543$ , odpowiednio test Kruskala-Wallisa). Mediana wieku matki w czasie urodzenia dzieci z grupy ASD to  $31,0 \pm 3,5$ , neurotypowego rodzeństwa  $31,0 \pm 2,5$  i grupy kontrolnej to  $30,5 \pm 3,1$  (różnice nieistotne statystycznie,  $p = 0,850$ , test Kruskala-Wallisa). Z kolei mediana wieku ojca w czasie urodzenia dzieci z grupy ASD to  $33,0 \pm 3,8$ , neurotypowego rodzeństwa  $32,5 \pm 5,0$  i grupy kontrolnej to  $33,5 \pm 3,1$  (różnice nieistotne statystycznie,  $p = 0,904$ , test Kruskala-Wallisa).

Wszystkie dzieci w grupie neurotypowego rodzeństwa były karmione piersią, w grupie kontrolnej 42 z 44 dzieci (95,5%), a w grupie dzieci z ASD 65 z 71 (91,5%) i te różnice nie są istotne statystycznie ( $p = 0,232$ , test  $\chi^2$ ). Z kolei dzieci z grupy ASD były karmione piersią istotnie krócej niż dzieci z grupy kontrolnej ( $6 \pm 4,5$  vs.  $12 \pm 6,0$ ,  $p = 0,037$ , test Kruskala-Wallisa, korekta wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Alergie skórne w czasie karmienia piersią częściej dotyczyły dzieci z ASD (31,7%), niż dzieci z neurotypowej grupy kontrolnej (10,0%) ( $p = 0,023$ ,  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Podobnie zaparcia w czasie karmienia piersią częściej dotyczyły dzieci z ASD (35,5%) niż dzieci z grupy kontrolnej (13,5%) ( $p = 0,032$ ,  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Z kolei śluz w kale w cza-

sie karmienia piersią częściej raportowany był u dzieci z ASD (38,1%), niż u neurotypowego rodzeństwa (7,1%) ( $p = 0,006$ ,  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego) oraz częściej niż u dzieci z grupy kontrolnej (17,6%) ( $p = 0,045$ ,  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Nie wszystkie dzieci były w okresie niemowlęcym karmione mlekiem modyfikowanym. Żywnienie to dotyczyło 80,0% dzieci z grupy ASD, 55,2% dzieci z grupy neurotypowego rodzeństwa i 59,5% dzieci neurotypowych niespokrewnionych, istotnie większej proporcji grupy ASD w odniesieniu do rodzeństwa ( $p = 0,023$ ) i kontroli niespokrewnionej ( $p = 0,033$ ). Długość karmienia mlekiem modyfikowanym nie była parametrem różniącym się istotnie między tymi grupami ( $p = 0,095$ , test Kruskala-Wallisa), choć w grupie ASD ten sposób żywienia trwał  $23,0 \pm 8,0$ , w grupie neurotypowego rodzeństwa  $20,0 \pm 7,0$ , a w grupie kontrolnej  $14,0 \pm 4,5$ . W ankiecie częściej dla grupy dzieci z ASD zaznaczono, że jadły one łączywie w czasie karmienia mlekiem modyfikowanym (36,4%), niż dla dzieci z grupy kontrolnej (8,3%) ( $p = 0,022$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Pytano także o reakcje dzieci na wprowadzane w pierwszym roku życia pokarmy stałe i tak, wzdęcia, zaparcia, biegunki i stolce wodniste raportowane były częściej dla dzieci z ASD (wzdęcia 28,6%, zaparcia 41,4%, biegunki 35,2%, stolce wodniste 21,4%) w odniesieniu do grupy neurotypowych dzieci neurotypowych (wzdęcia 9,3%, zaparcia 18,2%, biegunki 14,3%, stolce wodniste 4,8%) (odpowiednio  $p = 0,028$ ,  $p = 0,018$ ,  $p = 0,028$ ,  $p = 0,035$  test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego), ale nie do neurotypowego rodzeństwa (wzdęcia 18,5%, zaparcia 24,1%, biegunki 17,9%, stolce wodniste 7,1%, odpowiednio  $p = 0,450$ ,  $p = 0,162$ ,  $p = 0,147$ ,  $p = 0,164$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Obecność śluzu w kale raportowano częściej dla grupy ASD (30,4%) niż dla rodzeństwa (3,4%) i kontroli (7,0%) ( $p = 0,008$  i  $p = 0,007$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Krew w kale występowała u 8,7% dzieci z grupy ASD i nie występowała u rodzeństwa i grupy kontrolnej ( $p = 0,040$ , test  $\chi^2$ ).

Spożywanie w pierwszym roku życia produktów zawierających gluten wywoływało zaburzenia przewodu pokarmowego istotnie częściej u dzieci z grupy ASD, niż w grupie kontrolnej (26,2% vs. 6,1%,  $p = 0,035$ , test  $\chi^2$  z korektą

wartości  $p$  metodą Bonferroniego), ale różnica względem rodzeństwa, u którego problemy te raportowane były dla 13,0%, nie była istotna statystycznie ( $p = 0,317$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego).

Miesiąc życia dziecka, w którym wprowadzano sfermentowane produkty mleczne okazał się zmienną odróżniającą grupę dzieci z ASD od grupy kontrolnej ( $p = 0,017$ , test Kruskala-Wallisa z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego) oraz neurotypowe rodzeństwo od grupy kontrolnej ( $p = 0,002$ , test Kruskala-Wallisa z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Produkty te u dzieci z ASD i w grupie neurotypowego rodzeństwa wprowadzano w  $10 \pm 1,5$  miesiącu życia, a w grupie kontrolnej wcześniej, bo w  $8 \pm 1,8$  miesiącu życia.

Alergię na mleko krowie u dzieci, u których wprowadzono je w pierwszym roku życia, a było to 39,7% wszystkich ankietowanych, raportowano istotnie częściej ( $p = 0,025$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego) w grupie dzieci z ASD (31,0%) względem neurotypowej kontroli (4,2%). Podobnie, mleko krowie powodowało zaburzenia pracy przewodu pokarmowego istotnie częściej ( $p = 0,018$ , test  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego) u dzieci z ASD (35,0%) względem neurotypowej niespokrewnionej grupy kontrolnej (4,5%).

Test globalny ( $\chi^2$ ) wykazał istotność statystyczną między trzema grupami,  $p = 0,040$  dla chętnego zjadania kaszek bezglutenowych i  $p = 0,044$  dla chętnego spożywania ryb, sugerując różnicę między badanymi grupami. To może sugerować, że przynajmniej jedna z grup różni się od pozostałych. Niemniej jednak, w celu lepszego zrozumienia, jakie grupy różnią się między sobą, przeprowadzono analizy post hoc, również testem  $\chi^2$  z korektą wartości  $p$  metodą Bonferroniego. Te szczegółowe testy porównawcze nie wykazały jednak istotnych różnic między poszczególnymi parami grup (wszystkie  $p \geq 0,05$  po korekcie). Może to oznaczać, że różnica wykryta w analizie globalnej jest subtelna i nie jest widoczna w bezpośrednich porównaniach między grupami, lub też że mamy do czynienia z błędem I rodzaju.

W przypadku wprowadzania gotowanych warzyw wynik globalny nie wykazał istotnej różnicy między grupami ( $p = 0,084$ ,  $\chi^2$ ), jedno z porównań parami w testach post hoc było istotne (ASD vs. kontrola,  $p = 0,022$ ,  $\chi^2$

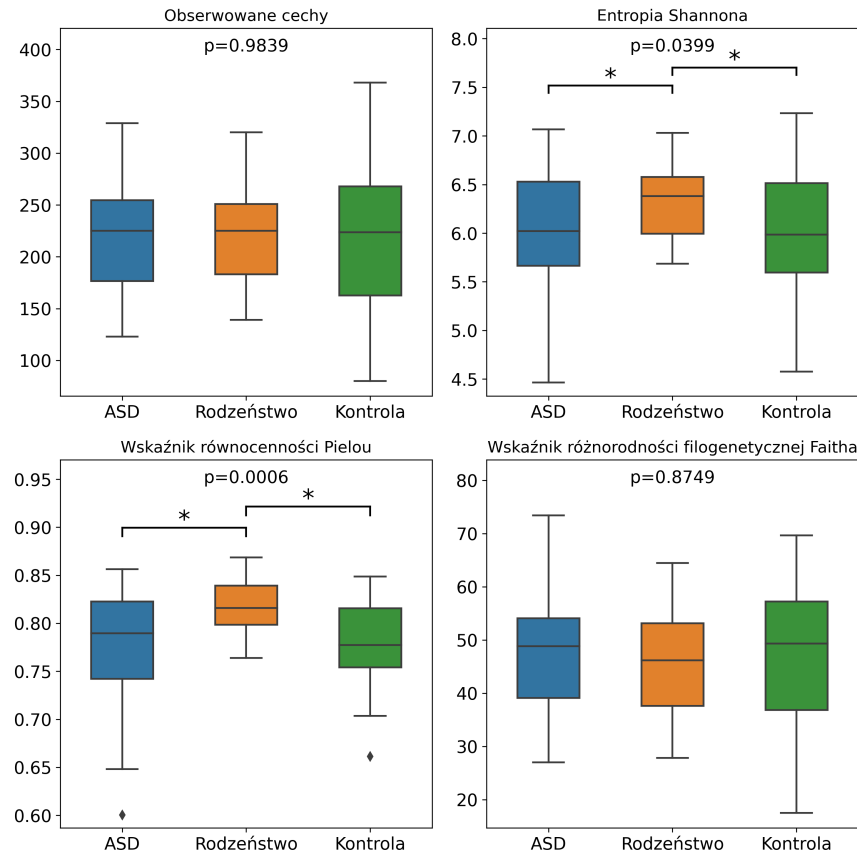
po korekcie wartości  $p$  metodą Bonferroniego). Może to sugerować istotną różnicę między dwiema konkretnymi grupami, ale efekt ten nie jest na tyle silny, aby być wykrytym w teście globalnym. U wszystkich dzieci z ASD i w grupie neurotypowego rodzeństwa w pierwszym roku życia wprowadzono gotowane warzywa, ale nie dla wszystkich dzieci w grupie kontrolnej (92,5%) wprowadzono ten typ pokarmu. Ze względu na ryzyko popełnienia błędu I rodzaju wymaga to jednak ostrożnej interpretacji.

## 4.2 Wyniki analizy mikrobiomu jelitowego

### 4.2.1 Różnorodność alfa

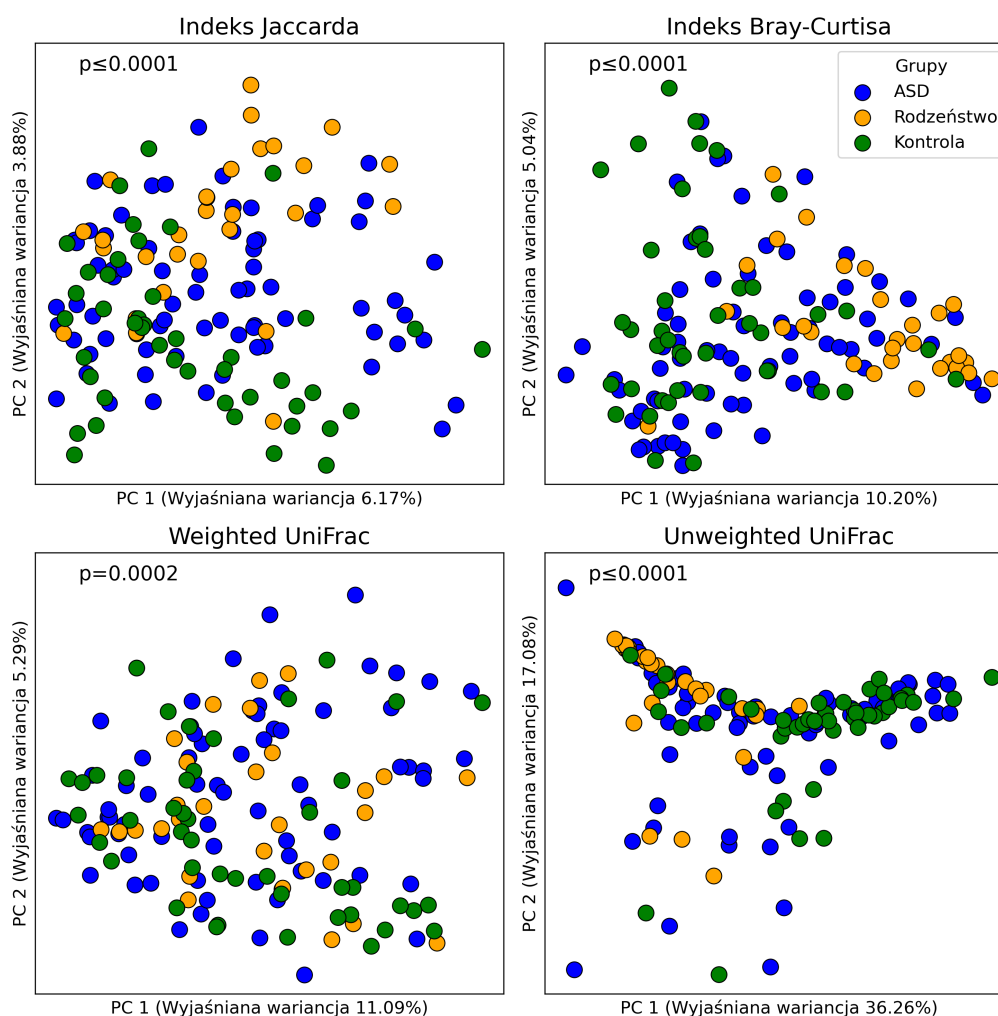
Różnorodność mikrobiomu, analizowana za pomocą różnych wskaźników różnorodności alfa, różniła się istotnie pomiędzy badanymi grupami, wyniki przedstawiono na rysunku 4.1. Aby zidentyfikować potencjalne istotne statystycznie różnice między grupami, zastosowano test Kruskala-Wallisa, zidentyfikowano istotne statystycznie różnice między grupami we wskaźniku Entropia Shannona ( $p = 0,0399$ ) oraz we wskaźniku równocенności Pielou ( $p = 0,0006$ ). Analiza wskaźnika entropii Shannona, który uwzględnia zarówno liczbę różnych taksonów, jak i ich równomierność, wykazała, że mikrobiom grupy neurotypowego rodzeństwa był bardziej różnorodny niż mikrobiom grupy kontrolnej oraz grupy dzieci z ASD ( $p = 0,035$ , test post hoc Dunna, korekta wartości  $p$  metodą Benjamini-Hochberga). To sugeruje, że rodzeństwo posiadało większą liczbę różnych taksonów lub/i były one bardziej równomiernie rozłożone w mikrobiomie, w porównaniu do grupy kontrolnej i dzieci z ASD.

Podobnie, analiza wskaźnika równocенności Pielou, który koncentruje się na równomierności rozkładu taksonów, wykazała istotne różnice między grupą dzieci z ASD a ich neurotypowym rodzeństwem, a także między grupą rodzeństwa a grupą kontrolną (dla obu porównań  $p = 8.13 \times 10^{-4}$ , test post hoc Dunna, korekta wartości  $p$  metodą Benjamini-Hochberga). Wyniki te wskazują, że taksony mikroorganizmów były bardziej równomiernie rozłożone w mikrobiomie grupy rodzeństwa, w porównaniu do pozostałych grup.



Rysunek 4.1: Rysunek przedstawia cztery panele dla każdego z badanych wskaźników różnorodności alfa między trzema grupami (dzieci z ASD, ich neurotypowe rodzeństwo i niespokrewniona neurotypowa grupa kontrolna). Wykorzystano test Kruskala-Wallisa, aby sprawdzić, czy istnieją statystycznie istotne różnice między grupami i na panelach podano wartości  $p$  dla tych testów. Stwierdzono, że wskaźnik Shannona oraz wskaźnik równocенności Pielou wykazują istotne statystycznie różnice (odpowiednio  $p = 0,0399$  i  $p = 0,0006$ ). Aby zidentyfikować, między którymi grupami występują te istotne różnice, wykonano test post hoc Dunna z korektą wartości  $p$  metodą Benjamini-Hochberga (grupy, między którymi zachodzą istotne statystycznie różnice zaznaczono symbolem \*). Grupa rodzeństwa ma średnio wyższy wskaźnik Shannona zarówno od dzieci z ASD, jak i grupy kontrolnej (korygowana wartość  $p = 0,035$  dla obu porównań). Podobne zależności zachodzą we wskaźniku równocенności Pielou (korygowane wartości w obu przypadkach  $p = 8,13 \times 10^{-4}$ ).

## 4.2.2 Różnorodność beta



Rysunek 4.2: Analiza głównych współrzędnych (PCoA) różnorodności beta dla trzech badanych grup: dzieci z ASD, ich neurotypowego rodzeństwa oraz niespokrewnionej neurotypowej grupy kontrolnej. Wszystkie cztery indeksy wskazują na statystycznie istotne różnice między grupami (testowano za pomocą PERMANOVA z 9999 permutacjami): Indeks Jaccarda  $p \leq 0,0001$ , Indeks Bray-Curtisa  $p \leq 0,0001$ , Unweighted UniFrac  $p \leq 0,0001$ , Weighted UniFrac  $p = 0,0002$ .

Analizy różnorodności beta, które oceniają różnice w składzie mikrobiomu między grupami, zostały przeprowadzone za pomocą wskaźników Jaccarda, Bray-Curtisa oraz Unweighted i Weighted UniFrac. Wyniki przedstawione są na wykresach PCoA, które pokazują różnice w składzie mikrobiomu między poszczególnymi grupami na podstawie wybranych wskaźników różnorodności beta, wykresy przedstawiono na rysunku 4.2.

Testy PERMANOVA przeprowadzone z liczbą permutacji równą 9999 pokazały, że wszystkie grupy różnią się od siebie pod względem składu mikrobiomu we wszystkich zastosowanych wskaźnikach różnorodności beta.

Dla wskaźnika Jaccarda, który uwzględnia jedynie obecność lub nieobecność taksonów, wyniki pokazują istotne różnice między grupami ( $p \leq 0,0001$ ). Podobnie, wyniki dla wskaźnika Bray-Curtis, który uwzględnia również obfitość taksonów, pokazały istotne różnice między badanymi grupami ( $p \leq 0,0001$ ).

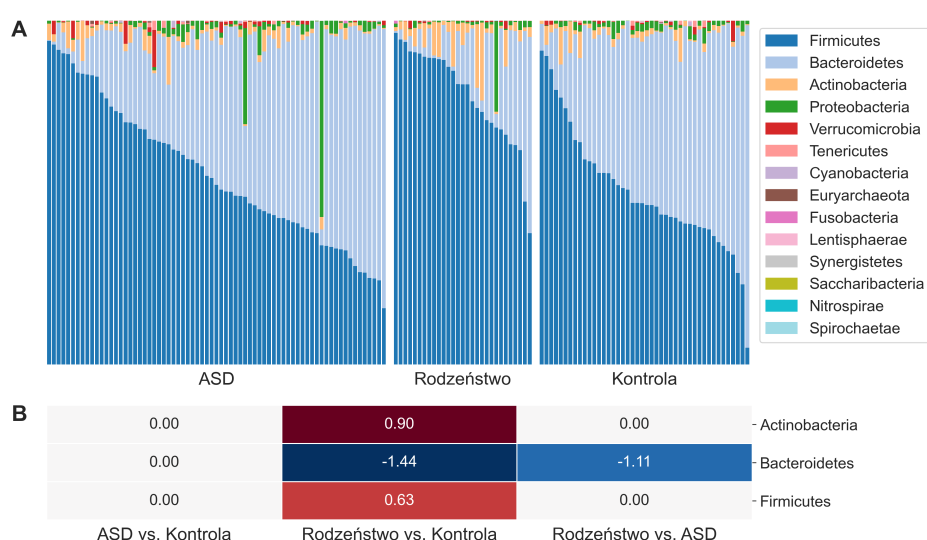
Dodatkowo, wyniki dla wskaźników Unweighted UniFrac ( $p \leq 0,0001$ ), który zwraca uwagę na obecność lub brak danego taksonu (tu ASV) w analizowanych próbkach i bierze pod uwagę filogenetyczne podobieństwo między różnymi mikroorganizmami w porównywanych mikrobiomach, ale nie uwzględnia względnej obfitości tych taksonów, oraz Weighted UniFrac ( $p = 0,0002$ ), który uwzględnia filogenetyczne podobieństwo, oraz względne obfitości taksonów, również pokazały istotne różnice między grupami, co sugeruje, że różnice w składzie mikrobiomu między grupami odzwierciedlają również różnice w relacjach filogenetycznych między obecnymi mikroorganizmami.

### 4.2.3 Analiza różnic w obfitości

W literaturze często pojawia się porównanie stosunku obfitości Firmicutes i Bacteroidetes, w związku z tym, zdecydowano się wykonać porównanie na poziomie taksonomicznym typu (*phylum*). Wyniki tego porównania zaprezentowano na rysunku 4.3. Różnice, które nie były istotne statystycznie ( $p \leq 0,05$ ) zrównano do logarytmicznej różnicy zero. Firmicutes są 1,88 razy bardziej obfite w grupie neurotypowego rodzeństwa niż wśród grupy kontrolnej. Bacteroidetes są 3,03 razy mniej obfite u neurotypowego rodzeństwa, niż w grupie dzieci z ASD oraz 4,22 razy mniej obfite w porównaniu do niespokrew-



nionej grupy kontrolnej dzieci neurotypowych. Actinobacteria są 2,46 razy bardziej obfite u neurotypowego rodzeństwa, niż w grupie kontrolnej. Metoda porównania obfitości zastosowana w niniejszym badaniu (ANCOM-BC2) nie wykazuje wystarczającej precyzji w estymacji korekty błędu systematycznego na wysokim poziomie taksonomicznym, dlatego przede wszystkim wykonano porównanie na poziomie rodzaju (*genus*) między trzema parami grup, dzieci z ASD – grupa kontrolna, neurotypowe rodzeństwo – grupa kontrolna, neurotypowe rodzeństwo – dzieci z ASD, wyniki przedstawiono na rysunku 4.4.



Rysunek 4.3: Analiza porównawcza struktury i dominujących taksonów mikrobiomu w trzech grupach: dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, neurotypowego rodzeństwa i grupy kontrolnej. (A) Taksonomia na poziomie typu (*phylum*). Każdy słupek na wykresie reprezentuje udział danego typu w mikrobiocie każdego uczestnika. (B) Porównanie trzech najbardziej dominujących typów bakterii między badanymi grupami, które jednocześnie różnią się istotnie obfitością na poziomie typu, Firmicutes, Bacteroidetes oraz Actinobacteria. Różnice w obfitości zidentyfikowano za pomocą ANCOM-BC2. Zilustrowane zmiany w obfitości tych taksonów (wyrażone jako logarytm naturalny ze zmiany (*log fold change*)), pozwalają na ocenę różnic w dystrybucji tych typów bakterii między grupami. Różnice nieistotne statystycznie zostały wyrażone przez zero.

Na rysunku 4.4 przedstawiono 53 taksony bakteryjne, których różnice w obfitości przynajmniej między jedną parą grup są istotne statystycznie. Te taksony, które nie wykazały istotnych różnic między porównywanymi grupami, zostały znormalizowane do logarytmicznej różnicy równej zero (logarytm naturalny). Analizę różnicową zliczeń przeprowadzono za pomocą ANCOM-BC2 [178], na podstawie zrekonstruowanej tablicy obfitości przygotowanej za pomocą wtyczki *Sidle* [176] w Qiime2, wykorzystującego metodę SMURF [177]. Nie wszystkie taksony bakteryjne udało się zidentyfikować jednoznacznie do poziomu rodzaju (*genus*). W przypadku niejednoznaczności identyfikacji podano najniższy poziom klasyfikacji, który był jednoznaczny, oznaczony symbolem \*. Gdy identyfikacja na poziomie rodzaju nie była możliwa, wykazano pierwszy dostępny poziom taksonomiczny, gdzie klasyfikacja była dostępna. Poniżej opisano bardziej szczegółowo te taksony, których różnice między grupą dzieci z ASD a kontrolną są nie mniej niż 2-krotne.

Rodzina *Lachnospiraceae*\* to bakterie, które są częścią normalnej mikroflory jelitowej człowieka i są producentami kwasu masłowego [222, 223], a także wykazano ich udział w rozwoju cukrzycy u genetycznie podatnych na otyłość myszy wolnych od mikroorganizmów [224]. Ta rodzina jest 11,89 razy bardziej obfita u osób z autyzmem w porównaniu do grupy kontrolnej, 4,24 razy bardziej obfita w grupie neurotypowego rodzeństwa względem kontroli oraz 2,78 razy mniej obfita u rodzeństwa względem osób ze spektrum autyzmu.

*Gelria* to rodzaj bakterii, które potrafią rozkładać glutaminian [225]. Jest 5,44 razy bardziej obfity u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, występuje 6,67 razy mniej obficie u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli, a także 33,33 razy mniej u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

*Desulfovibrio* jest to rodzaj bakterii siarkowych, które produkują czynniki wirulencji takie jak siarkowodór ( $H_2S$ ) oraz LPS (lipopolisacharyd).  $H_2S$  jest znany z korodowania różnych metali, może mieć możliwość reakcji z metalami, takimi jak żelazo, rtęć, molibden, itp. w jelitach [89]. *Desulfovibrio* izolowany był w przypadku poważnych infekcji, takich jak bakteriemia [89]. Powiązany z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego [226]. Jest 5,22 razy

bardziej obficie obecny u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 10,43 razy bardziej obficie występuje u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli, a także w obfitości 2-krotnie większej u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

*Tyzzarella.3* to rodzaj bakterii, który należy do rodziny Lachnospiraceae. Obecność tych bakterii jest 3,62 razy większa u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 4,74 razy większa u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli oraz 1,31 razy większa u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

*Clostridium sensu stricto 1* są jednym z ważnych beztlenowców w ludzkim przewodzie pokarmowym [227, 228]. Mogą metabolizować różne związki, takie jak węglowodany, aminokwasy, alkohole i puryny [229, 230]. Kwas mąsłowy jest produktem fermentacji specyficznym dla bakterii z tego rodzaju [231]. Różne stężenia kwasu octowego, kwasu mlekowego i/lub etanolu, propanolu lub butanolu są również tworzone jako produkty fermentacji [231]. Jest 3,59 razy bardziej obfity u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 7,51 razy bardziej obficie występujący u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli oraz 2,10 razy bardziej obficie występujący u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

Kolejna grupa taksonomiczna jednoznacznie zidentyfikowana do poziomu rodziny Lachnospiraceae. Jest obecna 2,98 razy bardziej obficie u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 1,22 razy bardziej obficie u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli oraz 2,45 razy mniej obficie u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

Rodzaj *Ruminococcaceae UCG-014* z typu Firmicutes jest rozpoznawany jako producent krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, który naturalnie zasiedla jelito ślepe i okrężnicę [232, 233, 234]. Członkowie rodziny Ruminococcaceae są wyposażeni w geny kodujące endo-1,4-beta-ksylanazy i celulazy, które są odpowiedzialne za rozkład różnych składników celulozy i hemicelulozy z materiału roślinnego [235, 234]. Jest 2,86 razy bardziej obficie obecny u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 1,69 razy mniej obficie występujący u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli, a także 4,83 razy mniej obficie występujący u neurotypowego rodzeństwa w porów-

naniu do osób ze spektrum autyzmu.

Grupa taksonomiczna jednoznacznie zidentyfikowana do poziomu rodziny Clostridiales: obfitość tych bakterii jest 2,78 razy większa u osób z autyzmem w porównaniu do grupy kontrolnej, 2,82 razy większa u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli oraz 1,02 razy większa u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

Rodzaj *Eubacterium* (*Eubacterium..brachy.group*) to bakterie ściśle beztlenowe, sacharolityczne lub niesacharolityczne [227, 228, 236]. Zazwyczaj wytwarzają mieszaniny kwasów organicznych z węglowodanów, często zawierające duże ilości kwasu masłowego, octowego lub mrówkowego [227, 228, 236]. 2,64 razy bardziej obfite u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 1,18 razy bardziej obfite u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli oraz 2,24 razy mniej obfite u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

Członkowie rodzaju *Terrisporobacter* są ścisłymi fermentującymi beztlenowcami [227, 228, 237]. Octan jest głównym produktem ich metabolizmu [237, 238, 239]. Obfitość większa 2,31 raza u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 3,13 razy większa u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli oraz 1,35 raza większa u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

Bakterie z rodzaju *Butyricoccus* są znane z produkcji kwasu masłowego, który ma liczne korzystne efekty na zdrowie człowieka, w tym poprawę funkcji jelit i odporności [240]. Niski poziom *Butyricoccus* jest związane z dysfunkcjami w połączeniach ścisłych (*ang. tight junctions*) i chorobami zapalnymi jelit [240, 241, 242]. Obfitość tych bakterii jest 2,28 razy większa u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 3,27 razy większa u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli oraz 1,44 razy większa u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

Raportowano, że obecność *Ruminococcaceae UCG 013* w organizmie myszy przyczynia się do ochrony przed rozwojem otyłości [243]. Obfitość tego rodzaju bakterii jest 2,22 razy większa u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 2,59 razy większa u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli oraz 1,17 razy większa u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spek-

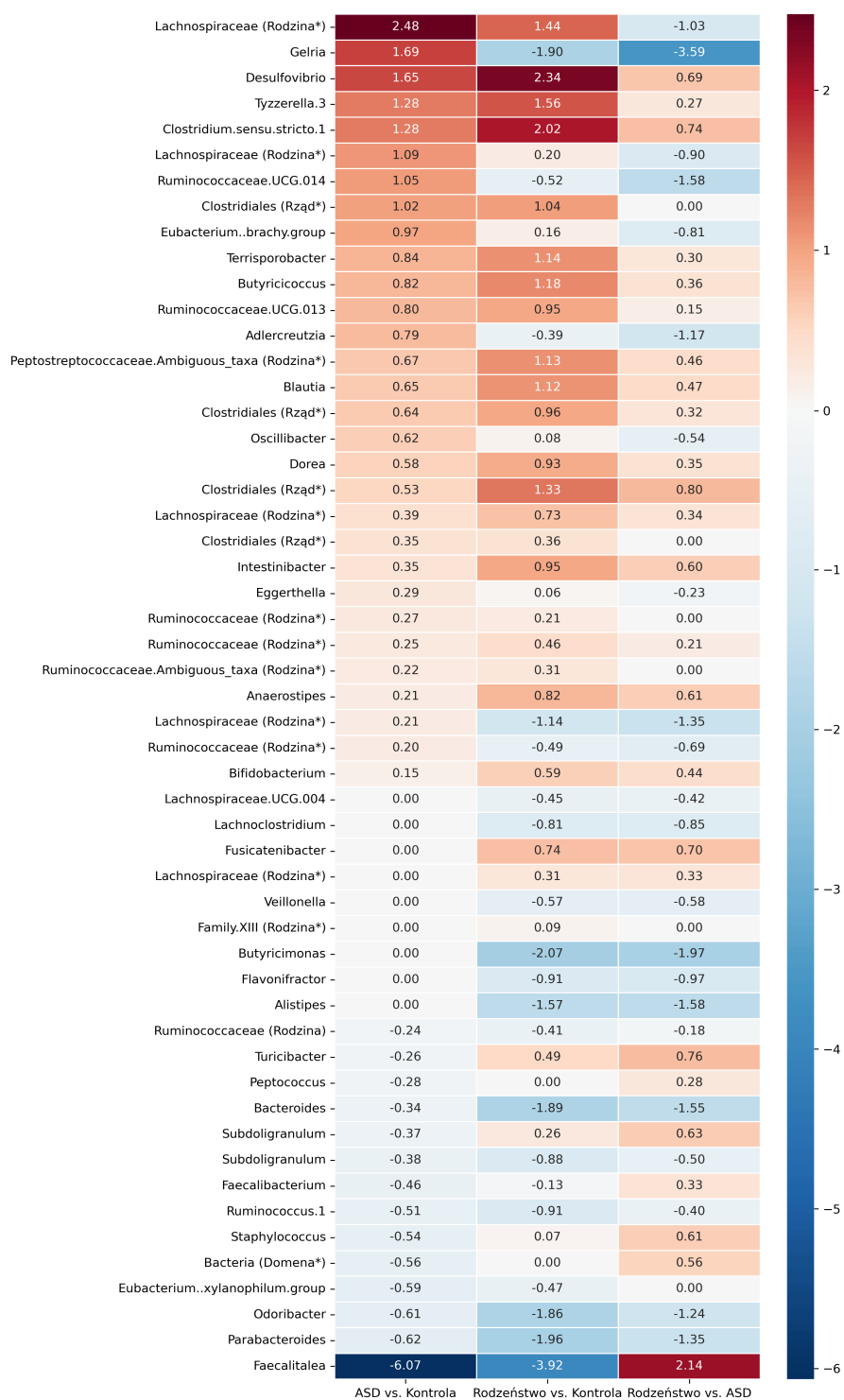
trum autyzmu.

Istnieją doniesienia w literaturze, że obfitość *Adlercreutzia* pozytywnie koreluje z BMI (indeksem masy ciała) oraz stanem zapalnym u osób z otyłością i bólem pleców [244]. Wiadomo, że *Adlercreutzia* odgrywa rolę w rozkładzie izoflawonów, które pełnią funkcję fitoestrogenów i pochodzą głównie z diety bogatej w soję [244]. Jej obfitość jest 2,19 razy większa u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 1,47 razy mniejsza u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli oraz 3,23 razy mniejsza u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

Z kolei rodzajem, którego obfitość jest najmniejsza w grupie ASD względem grupy kontrolnej jest *Faecalitalea*, bakterie które występują 430,85 razy mniej obficie u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 50,56 razy mniej obficie u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli, a także 8,52 razy bardziej obficie u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu. Bakterie z rodzaju *Faecalitalea*, należące do typu Firmicutes, mają zdolność do fermentacji różnych cukrów, w tym d-glukozy, sacharozy, d-mannozy i rafinozy [245, 246, 247]. Jednym z kluczowych produktów tego procesu metabolicznego jest kwas masłowy. Kwas masłowy jest związkami, który jest w stanie stymulować wydzielanie insuliny po posiłku, a tym samym poprawić odpowiedź organizmu na insulinę u osób z cukrzycą [247].

*Parabacteroides* mają ścisły związek ze zdrowiem gospodarza, np. zespołem metabolicznym, zapalną chorobą jelit i otyłością [248]. *Parabacteroides* mają zdolność do przetwarzania węglowodanów i wytwarzania krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [248]. Ten rodzaj występuje 1,85 razy mniej obficie u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 7,13 razy mniej obficie u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli, a także 3,85 razy mniej obficie u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.

*Odoribacter* to rodzaj bakterii, które są producentem kwasu masłowego [249]. *Odoribacter* występuje 1,84 razy mniej obficie u osób z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej, 6,39 razy mniej obficie u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do kontroli, a także 3,5 razy mniej obficie u rodzeństwa w porównaniu do osób ze spektrum autyzmu.



Rysunek 4.4: Analiza różnic w obfitości taksonów bakteryjnych między grupami – pełny rysunku opis poniżej.

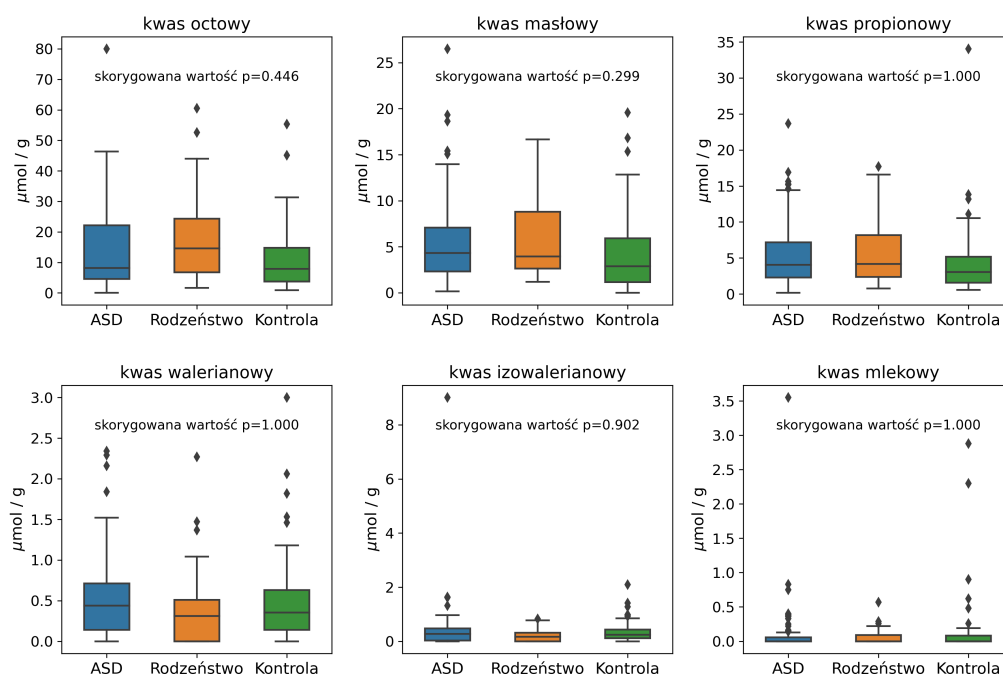
Rysunek 4.4: Porównanie istotnych statystycznie, nieczułych na dodanie *pseudo-counts*, taksonów na poziomie rodzaju (*genus*), różniących się co najmniej między jedną parą grup. Taksony, dla których nie stwierdzono istotnych różnic między porównywanymi grupami, zostały znormalizowane do logarytmicznej różnicy równej zero (logarytm naturalny). Analizę zliczeń przeprowadzono za pomocą metody ANCOM-BC2, na podstawie zliczeń zrekonstruowanych za pomocą wtyczki Qiime2, *Sidle*, wykorzystującego metodę SMURF. Dla taksonów, gdzie identyfikacja na tym poziomie była niejednoznaczna, podano najniższy poziom klasyfikacji, który był jednoznaczny, zaznaczony \*. W przypadkach, gdzie identyfikacja na poziomie rodzaju nie była możliwa, wskazano pierwszy dostępny poziom taksonomiczny, gdzie klasyfikacja była dostępna. Taksony jednoznacznie zidentyfikowane na poziomie rodzaju są bezpośrednio podpisane na rysunku. Przykładowo, dla taksonu Lachnospiraceae (Rodzina\*), podano klasyfikację na poziomie Rodzina z powodu niejednoznaczności klasyfikacji na niższych poziomach. Logarytmiczne różnice wynoszą odpowiednio 2,48; 1,44; -1,03 dla par: ASD vs. Kontrola, Rodzeństwo vs. Kontrola oraz Rodzeństwo vs. ASD. Wartość logarytmicznej różnicy 2,48 oznacza, że w grupie ASD obfitość rodziny Lachnospiraceae jest średnio  $\exp 2,48 \approx 12$  razy większa niż w grupie kontrolnej. Tabela z wartościami *p* znajduje się w Dodatku.

### 4.3 Wyniki analizy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych

W ramach badania przeprowadzono szczegółową analizę krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA) za pomocą techniki wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC). SCFA, w tym kwas octowy (C2), propionowy (C3), masłowy (C4), walerianowy (C5) oraz izowalerianowy (C5i), kwasy tłuszczowe będące produktem metabolizmu bakterii jelitowych, odgrywają rolę w wielu procesach metabolicznych i immunologicznych. Oznaczono także stężenie kwasu mlekowego (C3), który jest kwasem karboksylowym obecnym w stolcu, poddawanym metabolizmowi i jest prekursorem SCFA.

Analiza SCFA może dostarczać informacji o stanie zdrowia i funkcjonowaniu organizmu. W tym kontekście, naszym głównym celem było zidentyfikowanie i kwantyfikacja tych kwasów w próbkach. W pierwszej kolejności sprawdzono normalność rozkładu wyników stężenia badanych kwasów, wyrażonego w  $\mu\text{mol/g}$  kału. W tym celu przeprowadzono test normalności Shapiro-Wilka. Test przeprowadzono dla każdego z kwasów, w każdej z trzech grup: dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, ich neurotypowe rodzeństwo oraz niespokrewniona grupa kontrolna. Otrzymane wartości  $p$  były mniejsze niż 0,05, co stanowi podstawę do odrzucenia hipotezy zerowej o normalności rozkładu uzyskanych wyników pomiarów. W związku z tym, do porównań między grupami, zastosowano test Kruskala-Wallisa, test rangowy, nieparametryczny, który nie wymaga normalności rozkładu danych i pozwala na sprawdzenie, czy próbki pochodzą z tego samego rozkładu statystycznego. Przeprowadzono również korektę wartości  $p$ , na wielokrotne testowanie, stosując metodę Bonferroniego. Wyniki przedstawiono na rysunku 4.5. Wyniki pomiarów kwasów ułożono według malejącej średniej ich stężenia. Najwięcej zanotowano kwasu octowego, a następnie kwasu masłowego, propionowego, walerianowego, izowalerianowego, a najmniej – kwasu mlekowego. Nie stwierdzono istotnych różnic statystycznych w stężeniu żadnego z badanych kwasów między grupami.





Rysunek 4.5: Rysunek przedstawia sześć paneli z wykresami typu pudełkowy, które ilustrują stężenie pięciu krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (kwasu octowego, masłowego, propionowego, walerianowego i izowalerianowego) oraz kwasu mlekowego. Panele są uporządkowane według malejącej średniej stężenia kwasów, wyrażonego w  $\mu\text{mol/g}$  kału. Stężenie krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych zostało zmierzone metodą HPLC. Na każdym z paneli przedstawione są trzy wykresy pudełkowy odpowiadające trzem grupom: dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ASD) w kolorze niebieskim, ich neurotypowe rodzeństwo w kolorze pomarańczowym oraz niespokrewniona neurotypowa grupa kontrolna w kolorze zielonym. Wysokość pudełka, rozstęp międzykwartyłowy (IQR), pokazuje rozstęp, w którym zawiera się połowa danych. Pozioma linia wewnątrz pudełka to mediana (Q2) stężenia kwasu, dolna granica pudełka to pierwszy (Q1), a górna to trzeci kwartył (Q3), wąsy wykreślone do najdalszych punktów, które są nie dalej niż  $1,5 \times IQR$  od pudełka, wartości odstające zaznaczono czarnymi rombami. Kwas octowy wykryty został w kale w najwyższym stężeniu, kolejno są to kwas masłowy, propionowy, walerianowy, izowalerianowy, a na końcu kwas mlekowy. *Kontynuacja podpisu na następnej stronie.*

Rysunek 4.5: Przeprowadzone analizy statystyczne przy użyciu testu Kruskala-Wallisa, a następnie korekty Bonferroni, nie wykazały istotnych różnic między badanymi grupami pod względem stężenia każdego z badanych kwasów (kwas octowy, skorygowana wartość  $p = 0,446$ ; kwas masłowy, skorygowana wartość  $p = 0,299$ ; kwas propionowy, skorygowana wartość  $p = 1,0$ ; kwas walerianowy, skorygowana wartość  $p = 1,0$ ; kwas izowalerianowy, skorygowana wartość  $p = 0,902$ ; kwas mlekowy skorygowana wartość  $p = 1,0$ ).

#### 4.4 Wyniki analizy diety uczestników

W analizie statystycznej, za pomocą testu Kruskala-Wallisa z korektą FDR Benjamini-Hochberga, zidentyfikowano globalne różnice w spożywaniu składników odżywczych między grupami. Analizowane dane o żywieniu pochodzą z 7-dniowych obserwacji dietetycznych, z których wyekstrahowano liczbowe wartości poszczególnych składników odżywczych zawartych w raportowanych posiłkach. Następnie przeprowadzono analizę post hoc metodą Dunna, z korektą wartości  $p$  metodą Holma-Bonferroniego, aby ustalić, które konkretne parametry różniły się między grupami.

Wyniki analizy post hoc pokazały istotne statystycznie różnice między grupami dla następujących parametrów, **pogrubieniem** zaznaczono grupę, w której estymowana wartość parametru przyjętego z pożywieniem była większa:

1. Dla parametru "Wapń mg":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 2,2 \times 10^{-5}$ )
2. Dla parametru " $\beta$ -karoten  $\mu\text{g}$ ":
  - **Grupa Kontrolna** i Rodzeństwo ( $p = 3,33 \times 10^{-3}$ )
3. Dla parametru "Foliany  $\mu\text{g}$ ":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 1,88 \times 10^{-2}$ )
  - **Grupa Kontrolna** i Rodzeństwo ( $p = 1,88 \times 10^{-2}$ )

4. Dla parametru "C 4:0 g":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 1,0 \times 10^{-6}$ )
  - Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 1,02 \times 10^{-4}$ )
5. Dla parametru "C 6:0 g":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 3,0 \times 10^{-6}$ )
  - Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 6,29 \times 10^{-4}$ )
6. Dla parametru "C 8:0 g":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 6,53 \times 10^{-4}$ )
  - Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 4,48 \times 10^{-2}$ )
7. Dla parametru "C 10:0 g":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 7,4 \times 10^{-5}$ )
  - Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 3,49 \times 10^{-3}$ )
8. Dla parametru "C 12:0 g":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 3,17 \times 10^{-3}$ )
9. Dla parametru "C 14:0 g":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 5,31 \times 10^{-4}$ )
  - Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 3,3 \times 10^{-3}$ )
10. Dla parametru "C 15:0 g":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 2,71 \times 10^{-2}$ )
  - Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 2,71 \times 10^{-2}$ )
11. Dla parametru "C 17:0 g":
  - **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 9,38 \times 10^{-3}$ )
  - Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 1,13 \times 10^{-2}$ )

12. Dla parametru "C 14:1 g":

- **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 4,6 \times 10^{-4}$ )
- Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 1,81 \times 10^{-3}$ )

13. Dla parametru "C 17:1 g":

- **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 2,63 \times 10^{-3}$ )
- Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 3,79 \times 10^{-2}$ )

14. Dla parametru "Laktoza g":

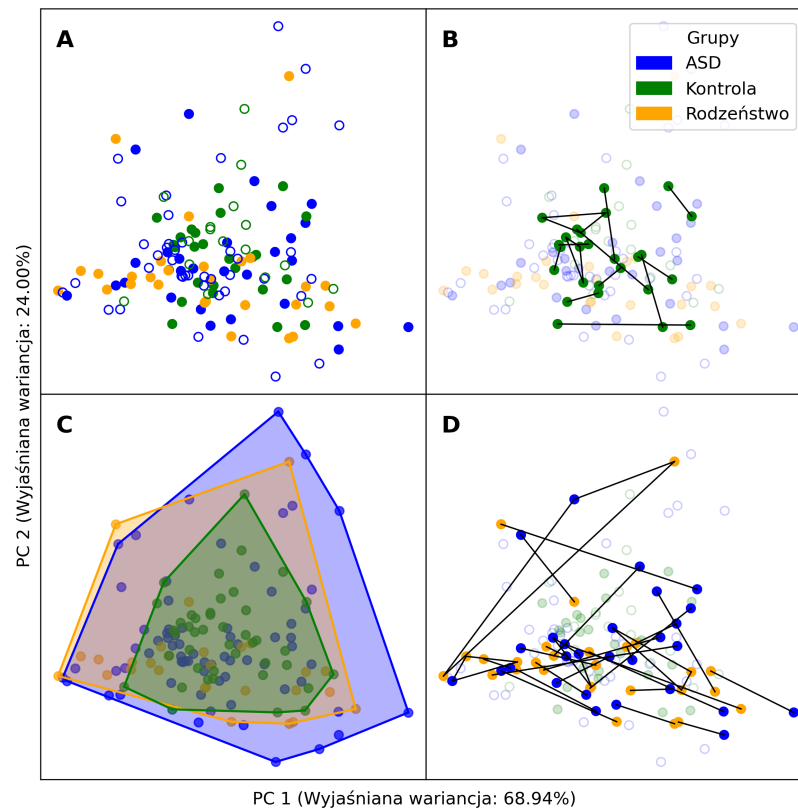
- **Grupa Kontrolna** i Dzieci z ASD ( $p = 3,47 \times 10^{-8}$ )
- Dzieci z ASD i **Rodzeństwo** ( $p = 3,89 \times 10^{-3}$ )

Analizę tę obrazuje seria wykresów typu pudełko-wąsy dla 14 parametrów dietetycznych, które przedstawiają te różnice między grupami, dane zaprezentowane na rysunku 4.8. Wykresy te pokazują wyniki dla trzech grup: dzieci z ASD (niebieski), ich neurotypowe rodzeństwo (pomarańczowy) oraz neurotypowe dzieci niespokrewnione (zielony). Na wykresach zaraportowano wartości  $p$  globalne.

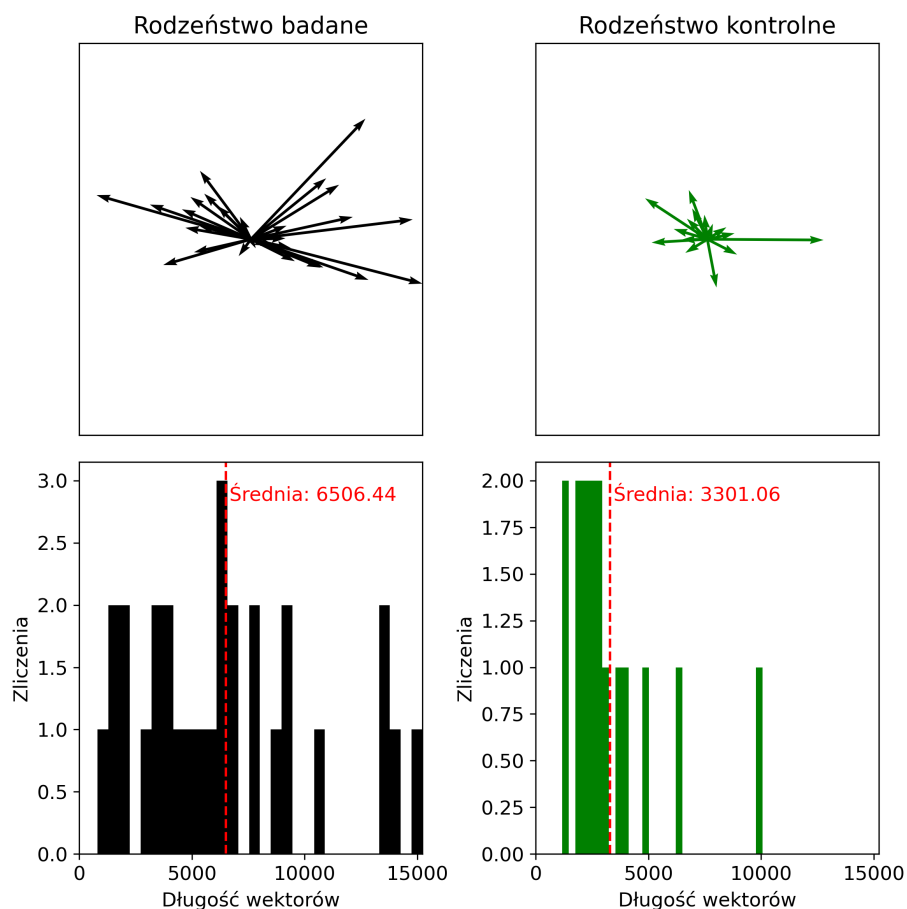
Dla zebranych informacji o diecie, obejmujących 93 parametry i składniki odżywcze, wykonano analizę PCA, której wyniki zestawiono na rysunku 4.6. Zauważono, że występują istotne różnice w różnorodności żywienia wśród rodzin z dziećmi neurotypowymi (rodzeństwo w grupie kontrolnej) a rodzinami, w których co najmniej jedno dziecko jest w spektrum autyzmu (dzieci z ASD i ich neurotypowe rodzeństwo). W celu ilościowego porównania różnorodności żywienia wykonano dodatkową analizę, której wyniki zestawiono na rysunku 4.7, gdzie przedstawiono przemieszczenia między punktami reprezentującymi dzieci z tej samej rodziny (diagram PCA na panelu B dla rodzeństwa wśród grupy kontrolnej i panel D dla rodzeństwa w grupie badanej, czyli grupa ASD z neurotypowym rodzeństwem, na rysunku 4.6). Średnia długość wektora przemieszczenia wśród rodzeństwa badanego wynosiła 6506,44 jednostek arbitralnych, a w grupie rodzeństwa kontrolnego 3301,06. Sprawdzone, że różnice w rozkładach długości są istotne statystycznie (test

---

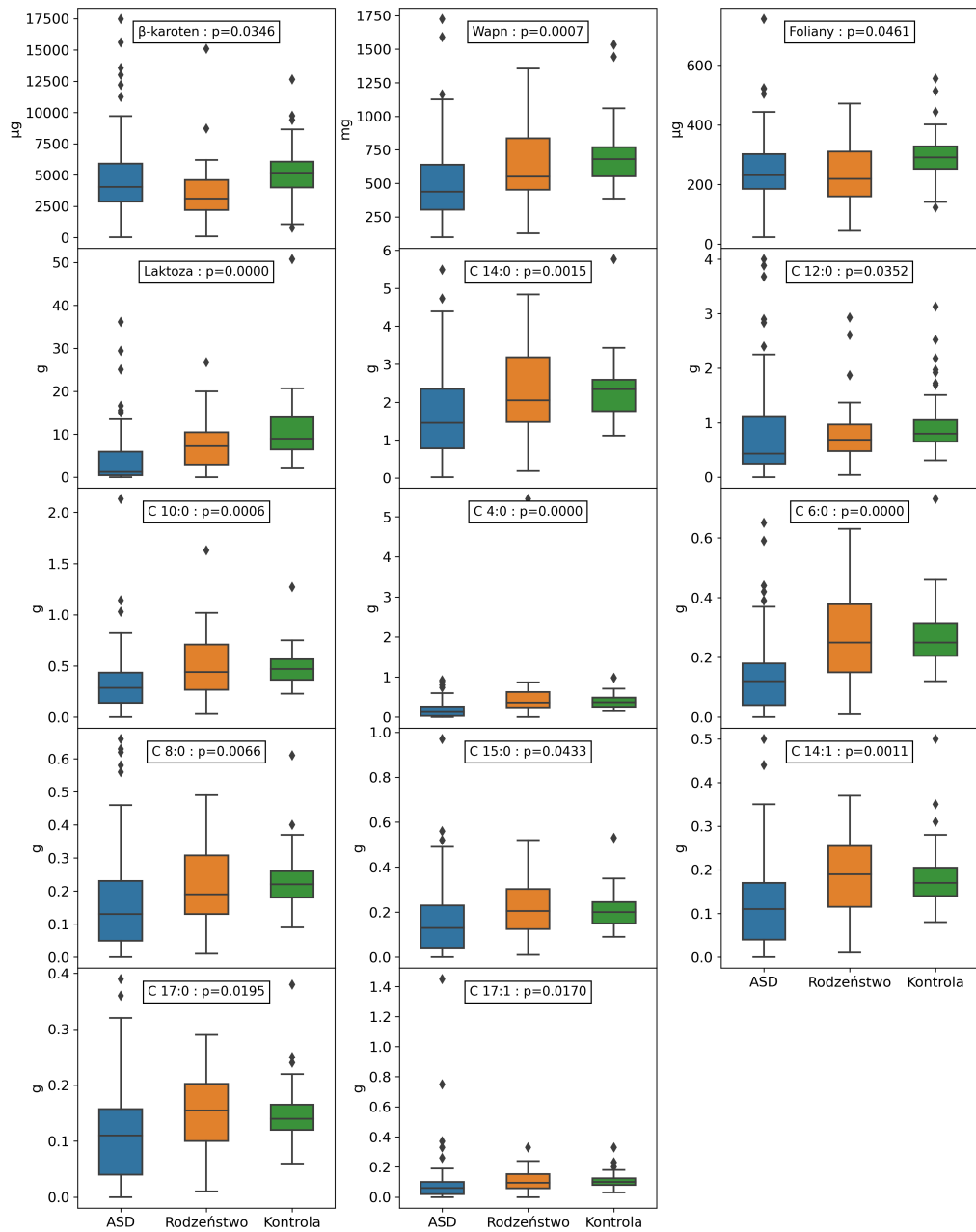
Manna-Whitneya,  $p = 0,004$ ). Ten wynik wskazuje, że różnorodność przyjmowanych z pożywieniem składników odżywczych u rodzeństwa w rodzinach z ASD jest większa niż w rodzinach, gdzie wszystkie dzieci są neurotypowe.



Rysunek 4.6: Analiza PCA przedstawiająca zależności dietetyczne trzech grup: dzieci z ASD (niebieski), ich neurotypowego rodzeństwa (pomarańczowy) oraz neurotypowych dzieci niespokrewnionych (zielony). Uczestników badania, którzy nie posiadali rodzeństwa biorącego udział w badaniu, oznaczono są na wykresie punktami będącymi okręgami (o). Natomiast ci, którzy mają rodzeństwo uczestniczące w badaniu, zaznaczeni są punktami będącymi kołami (●). Oś X to pierwsza składowa (PC1), wraz z wyjaśnianą wariancją, a oś Y to druga składowa (PC2), wraz z wyjaśnianą wariancją. Panel A przedstawia wyniki analizy PCA, opartej na siedmiodniowych danych dietetycznych zebranych przy użyciu programu DietetykPro. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami pod względem pierwszej składowej głównej (test testu Kruskala-Wallis  $p = 0,2$  i test PERMANOVA  $p = 0,3$ ). Czarnymi liniami połączono punkty odpowiadające dzieciom z jednej rodziny, na panelu B dzieci z grupy kontrolnej, a na panelu D dzieci z ASD z ich neurotypowym rodzeństwem. Na panelu C analiza PCA z zaznaczonymi otoczkami wypukłymi ilustrującymi zasięg każdej grupy.



Rysunek 4.7: Rysunek ilustruje przemieszczenie między punktami reprezentującymi dzieci z tej samej rodziny na diagramie PCA (zaprezentowanym na rysunku 4.6). Na górnym lewym panelu, czarne wektory oznaczają odległości między punktami przedstawiającymi dzieci z ASD i ich neurotypowe rodzeństwo. Na górnym prawym panelu, wektory zielone reprezentują odległości między punktami oznaczającymi rodzeństwo z grupy kontrolnej. Dolna część rysunku pokazuje histogramy długości tych wektorów: czarny dla rodzeństwa badanego (panel po lewej) i zielony dla rodzeństwa kontrolnego (panel po prawej). Długość wektorów wyrażona jest w jednostkach arbitralnych. Średnią długość wektora zaznaczono czerwoną przerywaną linią i średnie te różnią się między wyróżnionymi grupami (test Manna-Whitneya,  $p = 0,004$ ), co sugeruje, że różnorodność przyjmowanych z pożywieniem składników odżywczych u rodzeństwa w rodzinach z ASD jest większa niż w rodzinach, gdzie wszystkie dzieci są neurotypowe.



Rysunek 4.8: Seria wykresów typu pudełko-wąsy dla 14 parametrów dietetycznych, w których istotnie statystycznie różnice między grupami zostały zidentyfikowane w teście Kruskala-Wallisa, z globalnymi wartościami  $p$  skorygowanymi metodą FDR Benjamini-Hochberga. *Kontynuacja na następnej stronie.*



Rysunek 4.8: Na każdym panelu pokazane są wyniki dla trzech grup: dzieci z ASD (niebieski), ich neurotypowe rodzeństwo (pomarańczowy) i neurotypowe dzieci niespokrewnione (zielony). Dane prezentowane na wykresach pochodzą z 7-dniowych obserwacji dietetycznych, z których, przy użyciu programu DietetykPro, wyekstrahowano liczbowe wartości poszczególnych składników odżywczych zawartych w raportowanych posiłkach. Na każdym z wykresów, oś Y jest oznaczona odpowiednią jednostką pomiarową, zgodnie z przedstawianą na danym wykresie zmienną.

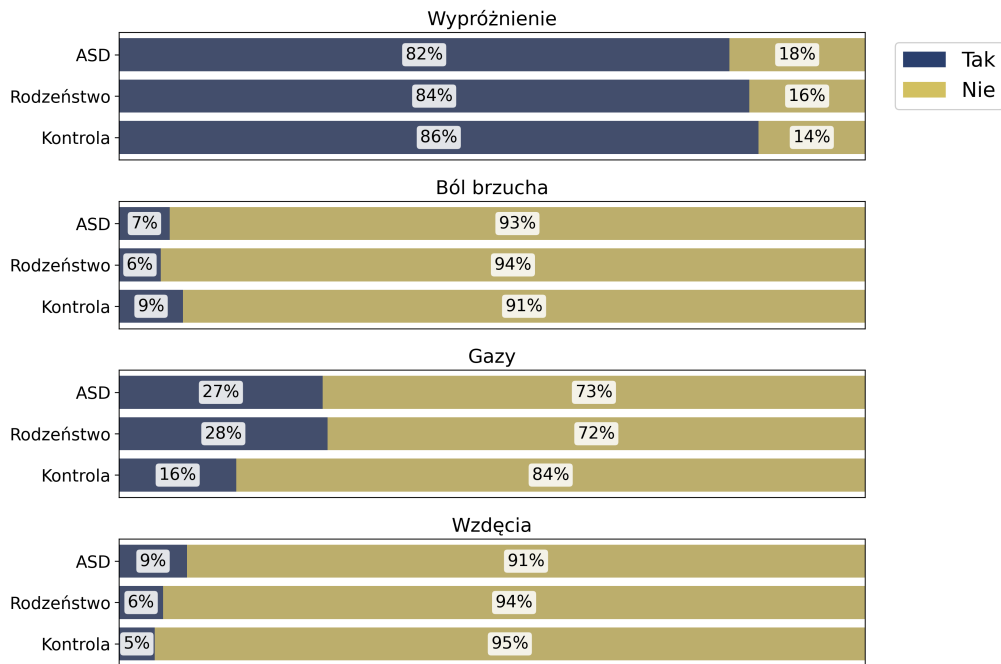
## 4.5 Wyniki analizy dolegliwości ze strony układu pokarmowego

### 4.5.0.1 Wypróżnienia, ból brzucha, gazy, wzdęcia

W wyniku 14-dniowej obserwacji i analizy czterech aspektów: wypróżnienia, bólu brzucha, gazów oraz wzdęć, zidentyfikowano istotne statystycznie różnice pomiędzy grupą dzieci z ASD, ich neurotypowym rodzeństwem oraz niespokrewnioną neurotypową grupą kontrolną. Na podstawie dokładnego testu Fishera, stwierdzono, że występowanie gazów oraz wzdęć różniło się istotnie między grupami ( $p = 6,0 \times 10^{-6}$  dla gazów i  $p = 0,011$  dla wzdęć). Pozostałe cechy, czyli liczba dni z wypróżnieniami i liczba dni z bólem brzucha nie były istotnie różne między tymi trzema grupami.

W wyniku analizy post hoc, przeprowadzonej z zastosowaniem dokładnego testu Fishera, istotne różnice zaobserwowano między dziećmi z ASD a grupą kontrolną, gdzie średnia liczba dni z gazami u dzieci z ASD wynosiła 27%, a w grupy kontrolnej 16% ( $p = 1,023 \times 10^{-5}$ ) oraz między neurotypowym rodzeństwem, gdzie średnia liczba dni z gazami wynosiła 28% a w grupie kontrolnej wspomniane 16% ( $p = 1,81 \times 10^{-4}$ ). Dodatkowo, w odniesieniu do wzdęć, zaobserwowano istotne różnice między grupą dzieci z ASD a grupą kontrolną ( $p = 0,016$ ), dzieci z ASD miały średnią liczbę dni z wzdęciem wynoszącą 9%, a dzieci z grupy kontrolnej 5%. Wszystkie wartości  $p$  zostały skorygowane metodą Bonferroniego, aby uwzględnić problem wielo-

krotnych testowań. Szczegółowe wyniki są przedstawione na rysunku 4.9. Na wykresie przedstawiono procentowe podsumowanie zliczeń badanego parametru dla każdego uczestnika badania, sumowane w grupach, w ciągu 14 dni obserwacji.



Rysunek 4.9: Na 4 panelach zaprezentowano podsumowanie analizy dolegliwości ze strony układu pokarmowego: wypróżnienie, ból brzucha, gazy i wzdęcia. Istnieją statystycznie istotne różnice między grupami dzieci z ASD, ich neurotypowym rodzeństwem i niespokrewnioną kontrolą neurotypową, w odniesieniu do występowania gazów oraz wzdęć ( $p = 6,0 \times 10^{-6}$  i  $p = 0,011$ , odpowiednio, dokładny test Fishera). Konkretnie, występują istotne różnice między dziećmi ASD a grupą kontrolną ( $p = 1,023 \times 10^{-5}$ , dokładny test Fishera, wartość  $p$  korygowana metodą Bonferroniego) oraz neurotypowym rodzeństwem a grupą kontrolną ( $p = 1,81 \times 10^{-4}$ , dokładny test Fishera, wartość  $p$  korygowana metodą Bonferroniego) w odniesieniu do gazów. W odniesieniu do wzdęć istnieje różnica między grupą dzieci z ASD a grupą kontrolną ( $p = 0,016$ , dokładny test Fishera, wartość  $p$  korygowana metodą Bonferroniego).

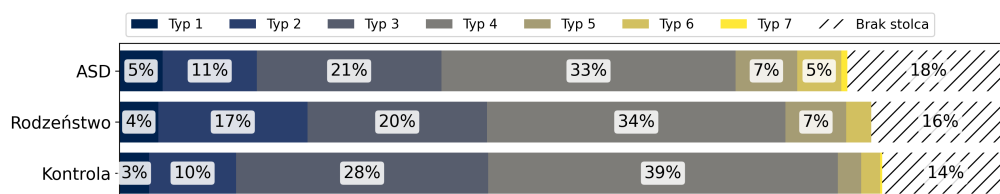
#### 4.5.0.2 Wypróżnienia i skala uformowania stolca

Podczas przeprowadzania badania wykorzystano Bristolską Skalę Uformowania Stolca do monitorowania i klasyfikacji konsystencji stolca u badanych dzieci. Wyniki wykazały istotne różnice między grupami w zakresie częstości występowania poszczególnych typów stolca, jak również dni bez wypróżnień ( $p = 3,5 \times 10^{-5}$ , dokładny test Fishera), co wskazuje na różnice w funkcjonowaniu układu pokarmowego badanych dzieci.

Zarówno dzieci z ASD, jak i ich neurotypowe rodzeństwo wykazywały odmienne wzorce wypróżnień w stosunku do neurotypowej niespokrewnionej grupy kontrolnej ( $p = 1,7 \times 10^{-4}$ ,  $p = 4,15 \times 10^{-3}$ , odpowiednio, dokładny test Fishera, wartość  $p$  skorygowana metodą Bonferroniego). Niemniej jednak, dzieci z ASD nie wykazywały istotnych różnic w porównaniu z ich neurotypowym rodzeństwem ( $p = 0,26$ , dokładny test Fishera, wartość  $p$  skorygowana metodą Bonferroniego).

Grupa dzieci z ASD w trakcie 14 dni obserwacji średnio nie miała wypróżnienia przez 18% dni obserwacji, typ 1 stanowił w tej grupie 5%, typ 2 – 11%, typ 3 – 21%, typ 4 – 33%, typ 5 – 7%, typ 6 – 5%, a typ 7 – 0,7%. Neurotypowe rodzeństwo dzieci z ASD miało następujący udział poszczególnych typów stolca: dni bez wypróżnienia stanowiły 16%, typ 1 – 4%, typ 2 – 17%, typ 3 – 20%, typ 4 – 34%, typ 5 – 7%, typ 6 – 2,8%, a typ 7 – 0%. Niespokrewnione dzieci neurotypowe z kolei średnio charakteryzowały się następującym wzorcem: dni bez wypróżnienia – 14%, typ 1 – 3%, typ 2 – 10%, typ 3 – 28%, typ 4 – 39%, typ 5 – 2,6%, typ 6 – 2,1%, a typ 7 – 0,2%.

Podsumowanie tych wyników zaprezentowano na rysunku 4.10, który przedstawia procentowe podsumowanie zliczeń każdego z siedmiu typów stolca według Bristolskiej Skali Uformowania Stolca, a także dni bez wypróżnień dla każdego uczestnika badania, sumowane w grupach, w ciągu 14 dni obserwacji.



Rysunek 4.10: Procentowy udział typów stolca według bristolskiej skali uformowania stolca oraz udział dni bez wypróżnień przez okres 14 dni, w trzech grupach. Typ 1 to stolec bardzo twardy, trudny do wydalenia, a typ 7 to stolec całkowicie płynny. Typy 3, 4 i 5 uznawane są za prawidłowe stolce. Grupy różnią się pod względem procentowego udziału poszczególnych typów stolca (dokładny test Fishera,  $p = 3,5 \times 10^{-5}$ ). Zarówno dzieci ASD jak ich neurotypowe rodzeństwo różnią się od neurotypowej niespokrewnionej grupy kontrolnej ( $p = 1,7 \times 10^{-4}$ ,  $p = 4,15 \times 10^{-3}$ , odpowiednio, dokładny test Fishera, wartość  $p$  korygowana metodą Bonferroniego), ale dzieci z ASD nie różnią się od neurotypowego rodzeństwa ( $p = 0,26$ , dokładny test Fishera, wartość  $p$  korygowana metodą Bonferroniego).

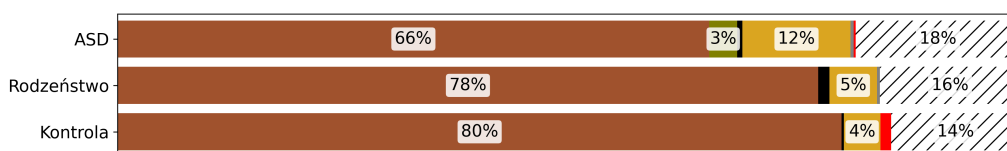
#### 4.5.0.3 Wypróżnienia i kolor stolca

Oprócz kształtu stolca, zwrócono również uwagę na jego kolor, który jest jednym z ważnych wskaźników stanu zdrowia układu pokarmowego. Zgodnie ze wskazaniami literaturowymi, kolor stolca może wskazywać na różne stany zdrowotne, począwszy od normalnego metabolizmu bilirubiny i żółci, a skończywszy na poważnych stanach patologicznych [218].

W tym badaniu, zastosowano analizę ilościową (zliczenia) każdego z sześciu kolorów stolca: brązowego, zielonego, czarnego, szarego, czerwonego, i żółtego oraz dni bez wypróżnień. Te dane były zbierane i analizowane w ciągu 14 dni obserwacji dla każdej z grup: dzieci z ASD, ich neurotypowego rodzeństwa oraz grupy kontrolnej składającej się z neurotypowych dzieci niespokrewnionych.

Podobnie jak w analizie uformowania stolca, zastosowano dokładny test Fishera na zliczeniach wystąpień stolca w danym kolorze, aby ustalić, czy występują znaczące różnice między badanymi grupami. Wyniki wskazały, że

grupy różnią się pod względem procentowego udziału poszczególnych kolorów stolca ( $p = 1,0 \times 10^{-6}$ , dokładny test Fishera). W szczególności, dzieci z ASD wykazywały istotne różnice zarówno od swojego neurotypowego rodzeństwa, jak i od niespokrewnionej neurotypowej kontroli ( $p = 3,0 \times 10^{-6}$ ,  $p = 6,0 \times 10^{-6}$ , odpowiednio, dokładny test Fishera, wartość  $p$  skorygowana metodą Bonferroniego). Neurotypowe rodzeństwo nie wykazywało istotnych różnic w porównaniu z grupą kontrolną ( $p = 0,3$ , dokładny test Fishera, wartość  $p$  skorygowana metodą Bonferroniego).



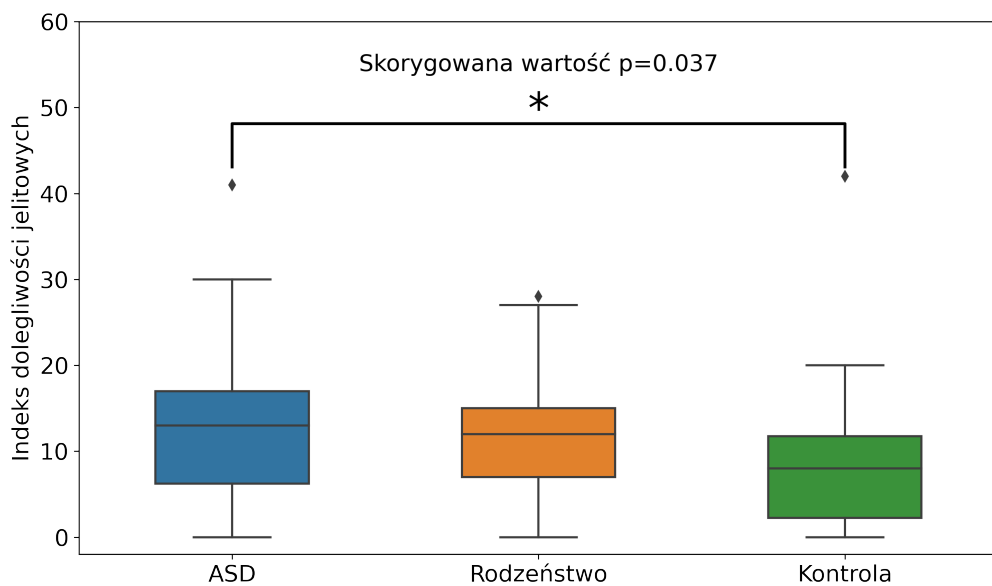
Rysunek 4.11: Procentowy udział kolorów stolca oraz udział dni bez wypróżnień przez okres 14 dni, w trzech grupach. Kolory na wykresie odpowiadają kolorom stolca: brązowy, zielony, czarny, szary i czerwony, zakreskowane pole odpowiada dniom bez wypróżnień. Grupy różnią się pod względem procentowego udziału poszczególnych typów stolca (dokładny test Fishera,  $p = 1,0 \times 10^{-6}$ ). Dzieci ASD różnią się zarówno od neurotypowego rodzeństwa, jak i od niespokrewnionej neurotypowej kontroli ( $p = 3,0 \times 10^{-6}$ ,  $p = 6,0 \times 10^{-6}$ , odpowiednio, dokładny test Fishera, wartość  $p$  korygowana metodą Bonferroniego). Z kolei neurotypowe rodzeństwo nie różni się od kontroli ( $p = 0,3$ , dokładny test Fishera, wartość  $p$  korygowana metodą Bonferroniego).

Podsumowanie tych wyników, wraz z procentowym podziałem dla każdego z sześciu kolorów stolca oraz dni bez wypróżnień, zostało przedstawione na rysunku 4.11. Grupa dzieci z ASD: brązowy: 66%, zielony: 3%, czarny: 1%, żółty: 12%, szary: 0%, czerwony: 0%, brak wypróżnienia: 18%. Grupa neurotypowego rodzeństwa: brązowy: 78%, zielony: 0%, czarny: 1%, żółty: 5%, szary: 0%, czerwony: 0%, brak wypróżnienia: 16%. Grupa kontrolna: brązowy: 80%, zielony: 0%, czarny: 0%, żółty: 4%, szary: 0%, czerwony: 1%, brak wypróżnienia: 14%. Ta wizualizacja dostarcza ilościowego podsumowa-

nia obserwacji, ilustrując różnice w rozkładzie kolorów stolca między różnymi grupami badanych dzieci.

#### 4.5.0.4 Wskaźnik dolegliwości jelitowych

Wskaźnik dolegliwości jelitowych został skonstruowany na podstawie zebranych danych ankietowych. Każdemu z uczestników, dla których dostępne były pełne informacje (115 osób), przypisano wartość wskaźnika wynikającą z sumy punktów za dolegliwości obserwowane przez 14 dni. Do analizy włączono takie czynniki jak występowanie wypróżnienia, kolor i konsystencja stolca oraz występowanie dodatkowych objawów, takich jak gazy, wzdęcia i bóle brzucha. Maksymalna wartość wskaźnika wynosiła 70 punktów.



Rysunek 4.12: Porównanie wyników wskaźnika dolegliwości jelitowych między grupami dzieci z ASD, ich neurotypowego rodzeństwa i neurotypowej kontroli niespokrewnionej. Wykresy pudełkowe prezentują rozkład wartości wskaźnika dla każdej z grup. Zgodnie z testem post hoc Dunna, dzieci z grupy ASD wykazują istotnie większe dolegliwości jelitowe w porównaniu z grupą kontrolną ( $p = 0,037$  po korekcie Bonferroniego), natomiast różnice między grupą ASD a grupą rodzeństwa nie są statystycznie istotne.

Na rysunku 4.12 przedstawiono porównanie wskaźnika dolegliwości jelitowych dla trzech grup: dzieci z ASD, ich neurotypowego rodzeństwa oraz niespokrewnionej neurotypowej grupy kontrolnej. Wykresy pudełkowe ilustrują rozkład wartości wskaźnika dla każdej z grup. Analiza statystyczna przy użyciu testu Kruskala-Wallisa, a następnie testu post hoc Dunna z korektą Bonferroniego, wykazała istotne różnice pomiędzy grupą ASD a grupą kontrolną ( $p = 0,037$  po korekcie Bonferroniego). Wskaźnik dolegliwości jelitowych był wyższy dla dzieci z ASD w porównaniu z grupą kontrolną, co sugeruje, że dzieci z ASD doświadczały większych dolegliwości jelitowych. Różnice między grupą ASD a grupą neurotypowego rodzeństwa nie okazały się statystycznie istotne, co wskazuje na podobieństwo doświadczeń dolegliwości jelitowych w obu tych grupach.

## Rozdział 5

### Dyskusja

W niniejszej pracy przeprowadzono badania nad mikrobiotą jelitową u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (71 osób), w kontekście neurotypowego rodzeństwa (29 osób) i w odniesieniu do niespokrewnionej neurotypowej grupy kontrolnej (44 osoby). W celu poznania składu mikrobioty zastosowano technikę sekwencjonowania wysokoprzepustowego NGS na podstawie zmiennych regionów genu *16S rRNA* V3–V4 oraz V7–V9. Wszyscy uczestnicy badania zostali poddani ocenie dolegliwości jelitowych. Przeprowadzono szczegółowy wywiad dotyczący żywienia w okresie niemowlęcym. Dodatkowo, zebrano informacje o diecie w ciągu 7 dni poprzedzających pobranie próbki kału do badania. Te kroki zostały podjęte, aby próbować zrozumieć nawyki żywieniowe i zachowania, które odgrywają kluczową rolę w kształtowaniu mikrobioty jelitowej. Zbadano także krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe, SCFA, w kale.

W tym badaniu wykazano znacząco wyższy udział procentowy chłopców w grupie dzieci z autyzmem (88,7%) w porównaniu z grupą rodzeństwa (44,8%) oraz grupą kontrolną (34,1%). Wyniki te są statystycznie istotne ( $p \leq 0,001$  w przypadku obu porównań). Dane literaturowe wskazują, że zaburzenia ze spektrum autyzmu są niemal cztery razy częściej diagnozowane u chłopców [5], co wspierają również nasze obserwacje. Nieproporcjonalne zwiększenie liczby chłopców w grupie badanej z ASD potwierdza dane literaturowe, sugerując, że jest to odzwierciedlenie rzeczywistości klinicznej, a nie



artefakt wynikający z doboru próby.

Nie było statystycznie istotnych różnic w wieku pomiędzy grupą dzieci z ASD, neurotypowym rodzeństwem i grupą kontrolną ( $p = 0,439$ ). Mediana wieku dla grupy dzieci z ASD wynosiła 7 lat ( $\pm 2,6$ , odchylenie ćwiartkowe), dla neurotypowego rodzeństwa 8,2 lat ( $\pm 2,7$ ), a dla grupy kontrolnej 7,5 lat ( $\pm 2,5$ ). Ponadto, badanie nie wykazało istotnych różnic w obecnym wzroście i wadze między uczestnikami ( $p = 0,534$  i  $p = 0,920$ , odpowiednio). W kwestii miejsca zamieszkania, większość uczestników badania, zarówno w grupie ASD (76,1%), grupie rodzeństwa (79,3%), jak i w grupie kontrolnej (72,7%), stanowili mieszkańcy miast. Nie wykazano istotnych różnic ( $p = 0,858$ ). Uwzględnienie miejsca zamieszkania uczestników badania, czyli miasta lub wsi, może mieć istotne znaczenie dla wyników analizy, ze względu na potencjalne różnice w stylu życia rodzin, nawykach żywieniowych, a także ekspozycji na różnorodność mikroorganizmów, które mogą różnić się w zależności od środowiska miejskiego czy wiejskiego.

We wszystkich badanych grupach zaobserwowano niemal równy podział ze względu na rodzaje porodów, naturalne i cesarskie cięcia. Wśród dzieci z ASD 53,5% porodów było naturalnych, wśród neurotypowego rodzeństwa - 48,3%, a w grupie kontrolnej - dokładnie 50%. Tak zrównoważony podział pomiędzy typami porodów we wszystkich trzech grupach pozwala na eliminację wpływu metody porodu na różnice w kształtowaniu mikrobiomu między grupami, co jest istotne dla tego badania. Metoda porodu ma wpływ na kształtowanie się mikrobiomu jelitowego dziecka, zwłaszcza w pierwszych latach życia, ale w kontekście tego badania, równomierny rozkład typów porodów pozwala uznać, że wpływ ten jest podobny we wszystkich grupach.

Nie zaobserwowano również istotnych różnic w zakresie terminowości porodów, długości ciąży oraz wag i wzrostu urodzeniowego między grupami ( $p = 0,506$ ,  $p = 0,482$ ,  $p = 0,543$ , odpowiednio). Wiek rodziców w momencie urodzenia dziecka nie różnił się istotnie między grupami. Mediana wieku matki w czasie urodzenia dzieci wynosiła 31 lat w grupie dzieci z ASD i neurotypowego rodzeństwa, oraz 30,5 roku w grupie kontrolnej. Mediana wieku ojca wynosiła odpowiednio 33,0 32,0 i 33,5 lat.

Te dane sugerują, że dobrze dobrano próby co minimalizuje możliwość, że

czynniki demograficzne i antropometryczne mogłyby wpłynąć na różnice w obserwowanych wynikach. W związku z tym, każde znaczące różnice pomiędzy grupami można przypisać z większą pewnością do ASD, a nie do różnic wynikających z doboru osób w badanych grupach.

Podczas analizy różnic w karmieniu piersią, nie zaobserwowano istotnych różnic w częstości karmienia piersią między grupami (91,5% dzieci ASD, 100% neurotypowego rodzeństwa i 95,5% niespokrewnionej neurotypowej kontroli było karmionych piersią). Jednak okres karmienia piersią był istotnie krótszy w grupie dzieci z ASD w porównaniu do neurotypowej grupy kontrolnej i wynosił średnio  $6 \pm 4,5$  miesięcy vs.  $12,0 \pm 6,0$ . W czasie karmienia, dolegliwości takie jak alergię skórne i zaparcia były znacznie częstsze u dzieci z ASD. Jest to istotne odkrycie, które sugeruje, że problemy związane z przewodem pokarmowym mogą występować na wczesnych etapach rozwoju u dzieci z ASD. Zauważalne jest, że większy odsetek dzieci z ASD (80%) był karmiony mlekiem modyfikowanym w porównaniu do neurotypowego rodzeństwa (55,2%) i niespokrewnionej grupy kontrolnej (59,5%). Chociaż nie odnotowano istotnych różnic w długości karmienia mlekiem modyfikowanym między grupami, wyniki sugerują, że dzieci z ASD mogły mieć tendencję do łapczywego jedzenia tego pokarmu w porównaniu do grupy kontrolnej. Można spekulować, że wynikać to mogło z łatwiejsze dla dzieci ssanie pokarmu z butelki, niż z piersi, co ma związek z poniższym.

Chociaż w wynikach tego badania nie wykazano istotności statystycznej w odniesieniu do objawu krztuszenia się podczas pierwszego roku życia, widoczne są pewne tendencje, które mogą być istotne, zwłaszcza w kontekście trudności z połykaniem, często zgłaszanych przez dzieci z ASD. Podczas karmienia piersią, większy odsetek dzieci z ASD (23,7%) doświadczał krztuszenia się w porównaniu z neurotypowym rodzeństwem (14,3%) i grupą kontrolną (8,6%). Ta tendencja utrzymuje się również podczas karmienia mlekiem modyfikowanym (14,5% dzieci z ASD w porównaniu do 11,8% neurotypowego rodzeństwa i 8,0% dzieci kontrolnych) oraz podczas karmienia pokarmami stałymi (18,3% dzieci z ASD w porównaniu do 6,9% neurotypowego rodzeństwa i 7,1% dzieci kontrolnych). Choć te różnice nie są statystycznie istotne, zwracają uwagę na możliwość, że trudności z połykaniem mogą po-

jawić się wcześniej u dzieci z ASD. Te trudności z połykaniem mogą wpływać na wybiórczość pokarmową i późniejsze zachowania związane z jedzeniem u dzieci z ASD. Należy jednak zauważyć, że te wyniki są jedynie wskazówką i konieczne są dalsze badania, aby lepiej zrozumieć tę potencjalną korelację i jej wpływ na trudności związane z jedzeniem u dzieci z ASD.

Wprowadzenie pokarmów stałych w pierwszym roku życia wydaje się wiązać się z większą liczbą zgłaszanych problemów, takich jak wzdęcia, zaparcia, biegunki i stolce wodniste u dzieci z ASD, w porównaniu do grupy kontrolnej. Co ciekawe, te różnice nie były jednak tak wyraźne, gdy porównano dzieci z ASD z ich neurotypowym rodzeństwem. Również obecność śluzu w kale była częściej zgłaszana w grupie dzieci z ASD, zarówno w porównaniu do rodzeństwa, jak i do grupy kontrolnej, a także obecność krwi w kale odnotowano tylko dla dzieci z ASD. Mniejsze różnice pomiędzy dziećmi z ASD a ich neurotypowym rodzeństwem, większe między dziećmi z ASD i grupą kontrolną mogą sugerować pewną gradację nasilenia. Wydaje się, że sugeruje ona, iż mogą istnieć pewne wspólne czynniki (genetyczne lub środowiskowe), które wpływają na funkcje przewodu pokarmowego, ale które mogą mieć różne skutki w zależności od stopnia ich ekspresji lub interakcji z innymi czynnikami. Pierwszą rzeczą do uwzględnienia jest fakt, że ASD ma najprawdopodobniej podłoże genetyczne, ale jest bardzo złożone i obejmuje wiele różnych genów, o wielu funkcjach. Dzieci z ASD i ich neurotypowe rodzeństwo mogą mieć pewne wspólne warianty genów, wykazując tym samym podatność, ale decydującym czynnikiem wywołującym objawy z przewodu pokarmowego może być czynnik środowiskowy. Istnieje rosnące dowody na to, że mikrobiota jelitowa może mieć wpływ na ASD. Dzieci z ASD i ich neurotypowe rodzeństwo mogą mieć podobne podłoże genetyczne, ale ich mikrobiota jelitowa mogą różnić się na skutek różnic w ekspozycji na różne środowiskowe czynniki wpływające na skład, takie jak dieta, antybiotyki czy styl życia lub zupełnie inne, niezidentyfikowane dotychczas okoliczności i czynniki, które mogły wpłynąć na różną odpowiedź układu odpornościowego. Te różnice mogą z kolei wpływać na zdrowie przewodu pokarmowego. Odmienną hipotezą, która również może tłumaczyć obserwowaną gradację w nasileniu objawów ze strony układu pokarmowego w okresie niemowlęcym jest wpływ

stresu i lęku. Stres i lęk są często większe u dzieci z ASD. Warto pamiętać, że te osoby doświadczają nadwrażliwości na bodźce sensoryczne, napotykają trudności w komunikacji oraz adaptacji do zmian, co może prowadzić do poczucia frustracji i intensywniejszej reakcji na stres. Wszystko to może wpływać na funkcjonowanie układu pokarmowego, na przykład poprzez oś podwzgórze-przysadka-nadnercza, co z kolei może prowadzić np. do zmian w perystaltyce jelit.

Wprowadzanie produktów zawierających gluten w pierwszym roku życia było istotnie częściej związane z zaburzeniami przewodu pokarmowego u dzieci z ASD, niż w grupie kontrolnej. To może sugerować, że dzieci z ASD mogą być bardziej wrażliwe na gluten, co mogłoby wpływać na funkcje ich przewodu pokarmowego. Sfermentowane produkty mleczne wprowadzono później u dzieci z ASD i ich neurotypowego rodzeństwa, w porównaniu do grupy kontrolnej. To może sugerować, że wprowadzanie tych produktów wcześniej może mieć potencjalnie korzystny wpływ na wpływ mniejsze problemy z dokuczliwymi objawami z przewodu pokarmowego, ale konieczne są dalsze badania, aby to potwierdzić. Alergia na mleko krowie była istotnie częściej raportowana u dzieci z ASD, które były karmione mlekiem krowim w pierwszym roku życia. Istniała statystyczna różnica między trzema grupami w odniesieniu do chęci spożywania kaszek bezglutenowych i ryb. Wyniki te są trudne do interpretacji, ponieważ nie istnieją istotne różnice między poszczególnymi parami grup. To może sugerować, że te preferencje mogą być subtelnie różne między grupami, ale dalsze badania są potrzebne, aby to potwierdzić. Wynik globalny nie wykazał istotnej różnicy między grupami w odniesieniu do wprowadzania gotowanych warzyw, choć wynik był na granicy istotności. Jednak porównanie par w testach post hoc wykazało istotną różnicę między grupą dzieci z ASD a grupą kontrolną. To sugeruje, że wprowadzanie gotowanych warzyw może być trudniej tolerowane przez dzieci z ASD. Wprowadzanie nowych pokarmów może być stresujące dla dzieci o wysokiej wrażliwości sensorycznej, takich jak dzieci z ASD, dodatkowo, wykazują silniejsze reakcje alergiczne oraz problemy jelitowe, co może potęgować niechęć do przyjmowania nowych typów pokarmów i prowadzić do wykształcenia się wybiórczości pokarmowej w późniejszym życiu.

Niniejsze badanie potwierdza wcześniejsze obserwacje, które wskazywały na związek pomiędzy zaburzeniami ze spektrum autyzmu a różnymi problemami zdrowotnymi wpływającymi na jakość życia, w szczególności z chorobami przewlekłymi [250, 251], objawami neurologicznymi [252], alergiami i nietolerancjami pokarmowymi [253], a także chorobami układu pokarmowego [254]. W tej pracy wskazano istotną dysproporcję w częstości występowania chorób przewlekłych i zaburzeń neurologicznych między dziećmi z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ASD) a grupą kontrolną (27,5% vs. 4,5%,  $p = 0,005$ ). Jednakże, analiza porównawcza między grupą dzieci z ASD a ich neurotypowym rodzeństwem nie wykazała statystycznie istotnej różnicy (27,5% vs. 17,2%;  $p = 0,410$ ). Dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu częściej też ( $p = 0,031$ ) przyjmują leki na stałe (25,4%) w porównaniu z grupą kontrolną (7,1%), ale nie istotnie częściej niż ich neurotypowe rodzeństwo (13,8%), co może mieć związek z tym, że również w grupie rodzeństwa częste jest występowanie chorób przewlekłych oraz objawów neurologicznych.

Objawy neurologiczne dotyczą istotnie większą część dzieci z ASD, niż dzieci z grupy kontrolnej (21,7% vs. nie dotyczą nikogo z grupy kontrolnej,  $p = 0,002$ ). Różnica ta nie jest istotna statystycznie między grupą dzieci z ASD a grupą neurotypowego rodzeństwa (10,3%,  $p = 0,297$ ), co może oznaczać rodzinne genetyczne obciążenie.

Co do stosowania antybiotyków w ciągu ostatnich trzech miesięcy, nie stwierdzono istotnej różnicy pomiędzy grupami ( $p = 0,297$ ). Ta obserwacja jest kluczowa, ponieważ antybiotyki mogą istotnie wpływać na mikrobiotę jelitową. Stąd brak istotnych różnic w tej kwestii między grupami sugeruje, że wyniki badania mikrobioty nie były znacząco zakłócone przez niedawne kuracje antybiotykowe, co zwiększa wiarygodność wyników badania.

W przypadku alergii i nietolerancji pokarmowych, odnotowano zdecydowanie wyższy odsetek dzieci z ASD (58,6%), a także neurotypowego rodzeństwa (40,7%), w porównaniu do grupy kontrolnej (16,3%),  $p \leq 0,001$  i  $p = 0,046$ , odpowiednio. Istotnie częściej alergię i nietolerancję pokarmowe są raportowane w rodzinach, w których są dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu. Taki trend może sugerować, że czynniki żywieniowe, a dokładniej wpływ alergii i nietolerancji pokarmowych, czyli problemy manifestujące się

przez układ odpornościowy, mogą odgrywać pewną rolę w przebiegu ASD.

Można to również połączyć z obserwacją, że choroby układu pokarmowego występują częściej u dzieci z ASD niż w grupie kontrolnej (31,3% vs. 10,5%,  $p = 0,030$ ). Różnica pomiędzy dziećmi z ASD a neurotypowym rodzeństwem nie była jednak istotna (13,0%,  $p = 0,150$ ). Jest to szczególnie interesujące w kontekście informacji, że u dzieci z ASD częściej zgłaszane są problemy jelitowe [91, 110, 96], a nawet wykazano, że nasilenie objawów ze strony układu pokarmowego koreluje pozytywnie z nasileniem objawów ze spektrum autyzmu [71]. Brak istotnej różnicy w występowaniu chorób układu pokarmowego pomiędzy grupą dzieci z ASD a ich neurotypowym rodzeństwem może sugerować, że genetyczne lub środowiskowe czynniki rodzinne mogą wpływać na zdrowie układu pokarmowego niezależnie od ASD.

Obserwacje wskazują na znacząco wyższy wskaźnik stosowania diet eliminacyjnych wśród dzieci z ASD (67,6%) w porównaniu do ich neurotypowych rodzeństwa (34,5%) oraz grupy kontrolnej (4,7%). Znacząca różnica w stosowaniu diet eliminacyjnych pomiędzy grupą dzieci z ASD a grupą kontrolną ( $p \leq 0,001$ ) oraz dzieci z ASD w porównaniu do neurotypowego rodzeństwa ( $p = 0,005$ ) jest znamienna i sugeruje specyficzną rolę diet eliminacyjnych w kontekście ASD, a także wskazuje ten czynnik jako ważny kowariat, czyli zmienną, która może wpływać na wyniki badania mikrobioty. Podobne różnice obserwowano w kontekście stosowania diety eliminacyjnej w przeszłości. Była ona stosowana znacznie częściej przez dzieci z ASD (62,9%) w porównaniu do ich neurotypowych rodzeństwa (34,5%) i dzieci z grupy kontrolnej (20,9%). W tym przypadku również różnica była istotna statystycznie zarówno w porównaniu do neurotypowego rodzeństwa ( $p = 0,018$ ), jak i grupy kontrolnej ( $p \leq 0,001$ ). Podobnie, suplementy diety były częściej stosowane przez dzieci z ASD (64,8%) niż przez dzieci z grupy kontrolnej (33,3%) i niż przez grupę neurotypowego rodzeństwa (39,3%) ( $p = 0,002$  i  $p = 0,037$ ). Ten wynik może być odzwierciedleniem prób poprawy stanu zdrowia lub zmniejszenia objawów ASD za pomocą interwencji dietetycznych poprzez suplementację, które są często zalecane dla tej populacji. Probiotyki stosowane były we wszystkich grupach: przez 36,6% dzieci z ASD oraz 21,4% neurotypowego rodzeństwa i 24,4% niespokrewnionej neurotypowej kontroli.

Pomimo tego, że różnice w częstości stosowania probiotyków nie okazały się istotne statystycznie ( $p = 0,215$ ), widoczny jest trend, że u dzieci z ASD są one podawane częściej niż w przypadku rodzeństwa. Te obserwacje wskazują, że rodzice dzieci z ASD są bardziej skłonni do stosowania interwencji żywieniowych w ramach strategii leczenia lub zarządzania objawami ASD [255]. Zarządzanie objawami odnosi się do podejścia do leczenia, które skupia się na minimalizowaniu negatywnych skutków objawów choroby/zaburzenia, zamiast skupiać się na eliminacji samej przyczyny. W kontekście zaburzeń ze spektrum autyzmu, zarządzanie objawami może obejmować różne strategie, takie jak terapia behawioralna, interwencje edukacyjne, a także zmiany w diecie i stylu życia, które pomagają w minimalizowaniu negatywnych skutków objawów ASD, takich jak problemy z komunikacją, trudności w interakcji społecznej czy specyficzne zachowania. Wiele z tych interwencji jest dostosowanych do indywidualnych potrzeb dziecka.

Zauważono istotną wybiórczość pokarmową zgłaszaną dla dzieci z ASD w porównaniu z grupą kontrolną (38,0% vs. 2,3%,  $p \leq 0,001$ ), ale nie w porównaniu do ich neurotypowego rodzeństwa (38,0% vs. 20,7%,  $p = 0,150$ ). Te statystyki są zgodne z licznymi badaniami w literaturze naukowej, które pokazują, że dzieci z ASD często wykazują wybiórczość w stosunku do pokarmów [256], a dotyczące neurotypowego rodzeństwa, przypuszczalnie przez dzielone środowisko domowe. Dotychczasowe dowody w sugerują, że wybiórczość pokarmowa jest problemem często występującym u dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu i że ich nietypowe nawyki żywieniowe mogą stanowić znaczący czynnik stresujący dla ich rodzin [257, 258], co może częściowo wyjaśniać wybiórczość u neurotypowego rodzeństwa. Na wybiórczość pokarmową może wpływać wiele czynników. Wrażliwość sensoryczna często występująca u dzieci z ASD [256] może być jednym z nich, zwracając uwagę na fakt, że wiele dzieci z ASD jest szczególnie wrażliwych na teksturę, zapach, smak czy kolor pokarmów.

W tym badaniu udało się również zidentyfikować szczególne czynniki, które mogą wpływać na wybiórczość pokarmową. Wykazano, że dzieci z ASD są znacznie bardziej wrażliwe na zapach jedzenia w porównaniu do dzieci z grupy kontrolnej (36,6% vs. 14,0%,  $p = 0,017$ ). Ta wrażliwość jest również

zauważalna, choć w mniejszym stopniu, wśród ich neurotypowego rodzeństwa (24,1%, różnica nieistotna statystycznie). Wrażliwość na fakturę jedzenia jest jeszcze bardziej wyraźna, a jest zgłaszana przez rodziców 45,7% dzieci z ASD, a tylko 17,9% neurotypowego rodzeństwa i 14,0% dzieci z grupy kontrolnej (ASD vs. rodzeństwo  $p = 0,019$  i ASD vs. kontrola  $p = 0,001$ ). Na podstawie tych wyników można spekulować, że sensoryczna wrażliwość może być jednym z kluczowych czynników wpływających na wybiórczość pokarmową u dzieci z ASD. Wrażliwość sensoryczna, zarówno na zapach, jak i teksturę pokarmów, mogą prowadzić do ograniczenia ich diety do określonych pokarmów, które są dla nich akceptowalne pod względem sensorycznym. Jednakże, warto zauważyć, że wrażliwość ta nie jest jedynym czynnikiem, który może wpływać na wybiórczość pokarmową. Może to także wynikać z innych związanych z jedzeniem wyzwań często występujących u dzieci z ASD, takich jak trudności z połykaniem [259] lub nadwrażliwość na określone smaki. Ponadto, badania pokazują, że dzieci z ASD mogą mieć określone upodobania pokarmowe, które mogą prowadzić do wybiórczości [256]. Ważne jest podkreślenie, że wybiórczość pokarmowa może mieć poważne konsekwencje dla zdrowia i dobrostanu dzieci z ASD [260]. Może prowadzić do niezrównoważonej diety, co z kolei może wpływać na ich rozwój i zdrowie. Ponadto, nasze wyniki pokazują, że wybiórczość pokarmowa była istotnie częściej zgłaszana w również w przeszłości u dzieci z ASD (48,6%) w porównaniu do ich neurotypowego rodzeństwa (10,3%) i grupy kontrolnej (11,6%), co wskazuje na długotrwałe zjawisko.

**Dieta** Na podstawie liczby przyjmowanych przez dzieci we wszystkich grupach kilokalorii (kcal) nie można stwierdzić ( $p = 0,626$ ), aby dzieci z ASD ze względu na wybiórczość pokarmową wykazywały objawy niedożywienia. Nie stwierdzono także istotnych statystycznie różnic w ogólnej podaży białka, tłuszczów, czy węglowodanów. Uczestnicy badania nie różnili się też pod względem BMI (*ang. Body Mass Index*, wskaźnik masy ciała),  $p = 0,116$ , mediana w grupie ASD wynosiła 16,35 (odchylenie ćwiartkowe 1,37), w grupie neurotypowego rodzeństwa 16,45 (0,88) i w grupie kontrolnej 16,17 (1,93). Oznacza to, że dzieci nie różniły się między grupami w kontekście



masy ciała. Zidentyfikowano jednak pewne różnice w przyjmowanych składnikach pożywienia. C4:0, C6:0, C8:0, C10:0, C14:0, C15:0, C17:0, są krótko- i średniołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi nasyconymi, a C14:1, C17:1 jedno-nienasyconymi. Można je znaleźć w tłuszczach zwierzęcych i olejach roślinnych. Dzieci z ASD spożywały mniej tych kwasów, jak również mniej laktozy (cukier mleczny), w porównaniu zarówno z neurotypowym rodzeństwem, jak i grupą kontrolną. Spożywały także mniej C12:0, który jest średniołańcuchowym kwasem tłuszczowym oraz mniej wapnia (minerał ważny dla budowy i zdrowia kości, a także w przekaźnictwie nerwowym) i folianów (kluczowy składnik witaminy B, niezbędnej do prawidłowego rozwoju układu nerwowego, którego głównym źródłem w diecie są warzywa i produkty zbożowe), ale tylko w porównaniu z grupą kontrolną. Neurotypowe rodzeństwo spożywało mniej  $\beta$ -karotenu (barwnik roślinny, który organizm przekształca w witaminę A) i folianów w porównaniu z grupą kontrolną. Mniejsze spożycie laktozy i wapnia można łatwo wyjaśnić stosowaniem diet eliminacyjnych u dzieci z ASD (bez glutenu, bez cukru, bez kazeiny, czyli głównie z wykluczeniem produktów zbożowych i przetworów mlecznych). Wykonując globalne porównanie spożywanej diety nie wykazano istotnych różnic, natomiast porównując rodzeństwa: badane i kontrolne zaobserwowano, że pod względem żywienia, bardziej podobni są przedstawiciele rodzin gdzie są wyłącznie dzieci neurotypowe. Dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu bardziej różnią się pod względem spożywanej diety od swojego neurotypowego rodzeństwa, co wspiera obserwację o wybiórczości pokarmowej. To z kolei może mieć przełożenie na obraz mikrobioty i dolegliwości jelitowych.

**Dolegliwości jelitowe** W przypadku tego badania, dane empiryczne potwierdzają wcześniejsze doniesienia, że dolegliwości jelitowe są częstszym zjawiskiem wśród dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu w porównaniu do dzieci neurotypowych [70, 71, 73]. Ta różnica, określona na podstawie skonstruowanego na potrzeby badania wskaźnika, okazała się istotna statystycznie ( $p = 0,037$ ), co sugeruje związek między ASD a problemami jelitowymi. Analiza 14-dniowa wykazała, że dzieci z ASD i ich neurotypowe rodzeństwo doświadczały częściej dni z gazami, w porównaniu do grupy kontrolnej (27%

vs. 16%,  $p = 1,023 \times 10^{-5}$  i 28% vs. 16%,  $p = 1,81 \times 10^{-4}$ ). Ponadto, dzieci z ASD wykazywały większy udział dni z wzdęciami (9%) w porównaniu do grupy kontrolnej (5%), na poziomie istotności statystycznej  $p = 0,016$ . Co więcej, obserwowano odmienne globalne wzorce występowania różnych typów stolca zarówno u dzieci z ASD, jak i ich neurotypowego rodzeństwa, w porównaniu do grupy kontrolnej. Kolejnym interesującym wynikiem były różnice w kolorach wydalanych stolców między dziećmi z ASD, ich neurotypowym rodzeństwem i grupą kontrolną. Dzieci z ASD wykazywały różnicę zarówno w stosunku do rodzeństwa ( $p = 3,0 \times 10^{-6}$ ), jak i do grupy kontrolnej ( $p = 6,0 \times 10^{-6}$ ), podczas gdy rodzeństwo neurotypowe nie różniło się od grupy kontrolnej. Te wyniki mogą wskazywać na specyficzne zmiany w trawieniu lub przyswajaniu pokarmów u dzieci z ASD.

**Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe** SCFA są produktami fermentacji bakterii jelitowych, a różnice w ich poziomach mogą odzwierciedlać różnice w diecie, szczególnie w kontekście spożycia błonnika. Dowody z modeli zwierzęcych sugerują związek między krótkołańcuchowymi kwasami tłuszczowymi, kluczową grupą metabolitów mikrobioty jelitowej, a zaburzeniami ze spektrum autyzmu [261]. Jednak wyniki badań na ludziach na ten temat są niejasne [261]. W literaturze można znaleźć wyniki, które pokazują, że różnice w badanych poziomach SCFA u dzieci z ASD różnią się istotnie od tych u dzieci neurotypowych, ale także takie, gdzie autorzy nie wykazują różnic między grupami ze względu na ASD. W populacji dzieci chińskich wykazano zmiany w składzie mikrobioty jelitowej i poziomach krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych u osób z autyzmem w porównaniu do dzieci neurotypowych [106]. Zauważono niższe poziomy kwasu octowego i masłowego oraz wyższy poziom kwasu walerianowego w próbkach kału od osób z ASD. Stwierdzono zmniejszone obfitości taksonów kluczowych dla produkcji maślanu: Ruminococcaceae, *Eubacterium*, Lachnospiraceae i Erysipelotrichaceae, a także zwiększoną obfitość bakterii związanych z kwasem walerianowym Acidobacteria wśród osób autystycznych. Jeśli chodzi o zaburzenia ze strony układu pokarmowego, to zaparcie było jedynym zaburzeniem jelitowym u dzieci z ASD w tym badaniu, istotnie częstsze niż u osób neurotypo-

wych. Wśród osób z ASD z zaparciami zaobserwowano zwiększone względnej obfitości *Fusobacterium*, *Barnesiella*, *Coprobacter* i bakterii związanych z kwasem walerianowym, Actinomycetaceae, oraz zmniejszone obfitości taksonów wytwarzających maślan. Większość bakterii produkujących maślan należy do klastrow Clostridium IV i XIVa, w tym Ruminococcaceae, Lachnospiraceae, *Butyricoccus* i *Eubacterium\_rectale\_group* [262, 263]. Inne klastry Clostridium również produkują maślan, w tym klastry I i XVI, ale w mniejszym stopniu w porównaniu z klastrami IV i XIVa [264, 265]. Co więcej, są doniesienia, że *Lactobacillus brevis* przyczyniają się do wzrostu bakterii Clostridium produkujących maślan [266]. W tym badaniu stwierdzono także, że oprócz Firmicutes, obfitość rodziny Erysipelotrichaceae była silnie zredukowane u osób z ASD, a w literaturze wskazano, że Erysipelotrichaceae jest również kluczowym taksonem produkującym maślan [267]. W związku z wynikami tego badania, zasugerowano się, że mikrobiota jelitowa wpływa na poziom SCFA w kale oraz na zaparcia u osób z autyzmem. Z drugiej strony, w innym badaniu dotyczącym dzieci chińskich z kolei stwierdzono, że stężenie SCFA w kale nie różniło się istotnie między dziećmi z ASD a grupą kontrolną [261].

W badaniu będącym przedmiotem tej pracy, nie stwierdzono istotnych różnic w stężeniach żadnego z badanych krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych między grupami: dziećmi z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, ich neurotypowym rodzeństwem oraz niespokrewnioną neurotypową grupą kontrolną. Wszystkie te grupy miały podobny poziom spożycia błonnika, co sugeruje, że ich dieta nie różniła się na tyle, aby wpłynąć na produkcję SCFA. Wyniki te mogą sugerować, że różnice dietetyczne między grupami nie są na tyle duże, aby miały istotny wpływ na poziom SCFA. Niemniej, należy traktować te wyniki z dużą ostrożnością.

**Różnorodność alfa** Różnorodność mikrobiomu była kluczowym aspektem tego badania, a analiza różnic w różnorodności alfa stanowiła jeden z elementów tego badania. Wskaźnik entropii Shannona uwzględnia nie tylko liczbę różnych taksonów, ale także ich równomierność. Wyniki wykazały, że mikrobiota grupy neurotypowego rodzeństwa cechowała się wyższym wynikiem

we wskaźniku Shannona niż mikrobiota grupy kontrolnej oraz grupy dzieci z ASD ( $p = 0,035$ ). To sugeruje, że mikrobiom rodzeństwa mógł zawierać większą liczbę różnych taksonów i były one bardziej równomiernie rozłożone w porównaniu do dwóch pozostałych grup, co jest zastanawiające i godne uwagi. Na podstawie analizy wskaźnika równocенności Pielou, można zauważyć podobne relacje. Istotne różnice między grupą dzieci z ASD a ich neurotypowym rodzeństwem, a także między grupą rodzeństwa a grupą kontrolną (dla obu porównań  $p = 8.13 \times 10^{-4}$ ). Te wyniki potwierdzają, że taksony mikroorganizmów były bardziej równomiernie rozłożone w mikrobiomie grupy rodzeństwa. Nie wykazano istotnych różnic między próbkami w obserwowanych cechach (*observed features*), co sugeruje podobną liczbę obserwowanych gatunków. Ponadto, brak istotnych różnic we wskaźniku różnorodności filogenetycznej Faitha wskazuje na porównywalną różnorodność filogenetyczną próbek, co sugeruje, że zawierają one mikroorganizmy o podobnym stopniu pokrewieństwa ewolucyjnego. Tak więc, mimo podobieństwa w liczbie obserwowanych gatunków i różnorodności filogenetycznej, istnieją wyraźne różnice w równomierności rozkładu gatunków, charakterystyczne dla grupy neurotypowego rodzeństwa. Mimo że skład mikrobioty jest podobny pod względem obecności poszczególnych taksonów i ich ewolucyjnego pokrewieństwa, ich względne proporcje mogą być różne. Mikrobiota grupy rodzeństwa wykazują większą równość gatunków. Te wyniki otwierają nowe perspektywy dla dalszych badań i dyskusji na temat różnorodności mikrobiomu i ujęcia w aspekcie rodzinnym.

**Różnorodność beta** Kolejnym elementem badania różnorodności mikrobiomu była analiza różnorodności beta, która analizuje różnice w składzie mikrobiomu między grupami. Pokazano istotne różnice między wszystkimi badanymi grupami. W analizie skorzystano z różnych wskaźników do oceny różnorodności beta, takich jak wskaźnik Jaccarda, Bray-Curtisa oraz Unweighted i Weighted UniFrac. Wszystkie te wskaźniki ujawniły istotne różnice między grupami, co sugeruje, że skład mikrobiomu między nimi różni się pod względem obecności, obfitości oraz relacji filogenetycznych między obecnymi mikroorganizmami. Dodatkowo, grupa neurotypowego rodzeństwa wyraźnie

odseparowuje się od niespokrewnionej kontroli, podczas gdy dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu są rozmieszczone między tymi dwiema grupami. Relacje te nie są jednak tak wyraźne, gdy przyjrzeć się wskaźnikowi Weighted UniFrac, który bierze pod uwagę obfitość i pokrewieństwo filogenetyczne mikroorganizmów. Sugeruje to, że podczas gdy obecność określonych mikroorganizmów, a także ich względne proporcje mogą być odmienne między grupami, to ich relacje filogenetyczne mogą być bardziej podobne. Może to sugerować, że różne grupy mogą dzielić wiele wspólnych gatunków mikroorganizmów, ale te gatunki mogą występować w różnych proporcjach w różnych grupach. Może to również oznaczać, że podczas gdy istnieją różnice w obecności i proporcjach różnych mikroorganizmów między grupami, relacje filogenetyczne między tymi mikroorganizmami mogą być podobne. Wykazanie różnic w różnorodności beta stanowiło dobrą podstawę do podjęcia kolejnego korku analizy, jakim była analiza różnic obfitości.

**Analiza różnic w obfitości** Analiza stosunku obfitości Firmicutes do Bacteroidetes często jest punktem dyskusji w literaturze naukowej. W kilku badaniach wykazano wyższy stosunek Firmicutes do Bacteroidetes u dzieci z ASD w porównaniu do kontroli neurotypowej [96, 95], podczas gdy inne prace donoszą o przeciwnym wyniku, większym stosunku Bacteroidetes do Firmicutes [94, 87, 104]. W tym badaniu analizie poddano porównanie na poziomie taksonomicznym typu (*phylum*). Co ciekawe, różnice między typami Firmicutes i Bacteroidetes nie dotyczyły dzieci z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej - takie wyniki znajdują odzwierciedlenie również w literaturze [98, 97]. Firmicutes były 1,88 razy bardziej obfite w grupie neurotypowego rodzeństwa niż wśród grupy kontrolnej. Zauważono także, że Bacteroidetes były 3,03 razy mniej obfite wśród neurotypowego rodzeństwa niż w grupie dzieci z ASD, a także 4,22 razy mniej obfite w porównaniu do niespokrewnionej grupy kontrolnej dzieci neurotypowych. W literaturze można znaleźć prace prezentujące różne wyniki dotyczące tego aspektu. Należy jednak pamiętać, że badania te różnią się znacząco pod względem metodologii i wyboru grup badawczych [79], co może być przyczyną tak zróżnicowanych wyników. Inny typ bakterii, którego różnice obfitości okazały się być istotne statystycznie to

Actinobacteria i były 2,46 razy bardziej obfite wśród neurotypowego rodzeństwa niż w grupie kontrolnej.

Przeprowadzono analizę różnic w obfitości na poziomie taksonomicznym rodzaju (genus), za pomocą metody ANCOM-BC2. Wyniki wykazały, że obfitość 53 taksonów bakteryjnych różniła się istotnie przynajmniej między jedną parą porównywanych grup. Należy jednak zaznaczyć, że nie wszystkim zidentyfikowanym bakteriom udało się przypisać jednostkę taksonomiczną jednoznacznie do poziomu rodzaju (genus). Wynikało to z problemów z jednoznaczną identyfikacją taksonu na podstawie dostępnych sekwencji fragmentów genu *16S rRNA*. Dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu najbardziej różniły się od niespokrewnionej grupy kontrolnej obfitością bakterii z rodzaju należącego do rodziny Lachnospiraceae oraz rodzaju *Faecalitalea*.

Rodzina Lachnospiraceae należy do klasy Clostridia, a jej przedstawiciele są producentami kwasu masłowego [222, 223] i potrafią degradować polisacharydy roślinne, dostarczając energii dla gospodarza, dzięki czemu, gospodarz może uzyskać więcej energii [247]. Wzrost obfitości Lachnospiraceae może być jednym z czynników powodujących choroby metaboliczne, takie jak cukrzyca i otyłość [247]. Wykazano udział tych bakterii w rozwoju cukrzycy u genetycznie podatnych na otyłość myszy wolnych od mikroorganizmów [224]. W tym badaniu okazało się, że takson należący do tej rodziny jest 11,89 razy bardziej obfity u osób z autyzmem w porównaniu do grupy kontrolnej, a co więcej, taksony należące do rodziny Lachnospiraceae zidentyfikowano jako różnie (bardziej) obfite u dzieci z ASD niż u kontroli więcej niż jednokrotnie. Ten wynik potwierdza dane z literatury, które wskazują na wyższą obfitość Lachnospiraceae u dzieci z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej [96, 92]. Dodatkowo, obserwowano, że bakterie należące do tej rodziny były bardziej obfite u dzieci z ASD i dolegliwościami jelitowymi niż u zdrowej kontroli z dolegliwościami jelitowymi [105]. Niemniej, przeciwstawne wyniki dotyczące tej rodziny bakterii także były publikowane [106, 97, 86]. Na podstawie danych uzyskanych z tego badania, grupy można uporządkować w kolejności malejącej obfitości taksonu należącego do rodziny Lachnospiraceae następująco: osoby z autyzmem, neurotypowe rodzeństwo, grupa kontrolna. Co ciekawe, w innej pozycji literaturowej wykazano gradację względnej obfitość

niezidentyfikowanych szczepów z rodziny Lachnospiraceae, najwyższą obfitość zanotowano u dzieci z ciężkim ASD, drugą najwyższą u tych z łagodnym ASD, a najniższą u dzieci zdrowych [268]. Na podstawie uzyskanych wyników oraz dostępnej literatury naukowej można postawić hipotezę, że dzieci z ASD mogą wykazywać zaburzenia w trawieniu węglowodanów. Można to wywnioskować pośrednio na podstawie dużej obfitości taksonów należących do rodziny Lachnospiraceae. Jednakże, nie zaobserwowano wyższego poziomu kwasu masłowego, który jest produktem metabolizmu tej grupy bakterii, a także nie udowodniono wyższej podaży węglowodanów w diecie dzieci z ASD.

Z kolei rodzajem, którego obfitość była najbardziej obniżona w porównaniu do grupy kontrolnej był *Faecalitalea*. Są to bakterie należące do typu Firmicutes i zaliczane do bakterii korzystnych dla zdrowia [247]. W wynikach niniejszego badania wykazano, że są 430,85 razy rzadziej spotykane u osób z ASD w stosunku do grupy kontrolnej, oraz 50,56 razy rzadziej występują u neurotypowego rodzeństwa w porównaniu do grupy kontrolnej. Są fermentatorami różnorodnych cukrów [245, 246, 247] i również dla nich kwas masłowy to jeden z głównych produktów procesów metabolicznych. W literaturze wskazano, że ten kwas masłowy ma zdolność stymulowania wydzielania insuliny po spożyciu posiłku, co z kolei może ulepszyć reakcję organizmu na insulinę u pacjentów z cukrzycą [247, 265, 269]. W badaniu Ma i in. [247] stwierdzono, że obfitość bakterii *Faecalitalea* w przewodzie pokarmowym szczurów z cukrzycą typu 1 była zmniejszona się ponad 200-krotnie. Wskazuje to na możliwość, że te bakterie mogą odgrywać znaczącą rolę w rozwoju cukrzycy, co może być związane ze zmniejszonym wydzielaniem insuliny. W literaturze dotyczącej autyzmu mało jest doniesień na temat rodzaju *Faecalitalea* wprost, np. Lui i in. [106] donosi o obniżonej obfitości Erysipelotrichaceae w grupie ASD w odniesieniu do neurotypowej kontroli, więc jest to ciekawe i nowe odkrycie. Z kolei w badaniu Plaza-Díaz i in. [86] zaobserwowano odwrotną relację, rodzina bakterii Erysipelotrichaceae była bardziej obfita u osób z ASD, natomiast bakterie z rodziny Lachnospiraceae występowały w mniejszych ilościach u osób z ASD. Jednak podobnie, nie zaobserwowano istotnej różnicy, w tym przypadku redukcji zawartości kwasu masłowego w kale dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu w porównaniu

do ich rodzeństwa i grupy kontrolnej. Być może istnieją zmienione zależności w gospodarce SCFA, których ze względu na ograniczenia w tym badaniu nie udało się uchwycić, jest to jednak bardzo ciekawy kierunek kolejnych badań.

Stwierdzono, że obfitość bakterii rodzaju *Gelria* jest najmniejsza u neurotypowego rodzeństwa osób z ASD, większa u grupy kontrolnej, a największa u osób z ASD. *Gelria* potrafią rozkładać glutaminian [225], jest to ciekawe w kontekście dowodów, że glutaminian ma szerokie implikacje w patofizjologii autyzmu [270]. Aminokwas glutaminian jest niezbędnym pobudzającym neuroprzebieżnikiem w mózgu człowieka, który reguluje funkcje poznawcze, takie jak uczenie się i pamięć, które są zwykle upośledzone w ASD [270]. Receptory dla glutaminianu są zaangażowane w różne procesy poznawcze i rozwoju neuronalnego, takie jak uczenie się, formowanie pamięci, dojrzewanie kolców dendrytycznych, rozwój obwodów neuronalnych oraz plastyczność synaptyczną [271]. W ciągu ostatnich kilku lat, wzrost liczby dowodów z dziedzin takich jak genetyka, neuroobrazowanie, ekspresja białek oraz badania na modelach zwierzęcych sugerujących zmiany w metabolizmie glutaminianu, spowodował wzrost zainteresowania oceną zaburzeń funkcjonowania systemu glutaminergicznego w ASD [270]. Wiele farmakologicznych, behawioralnych i obrazowych badań wykazało nierównowagę między pobudzającymi i hamującymi neuroprzebieżnikami, co ujawnia zaangażowanie systemu glutaminergicznego w patologii ASD [270]. Badania genetyczne ujawniły obecność zmienionych szlaków sygnałowych glutaminianu w ASD. Geny kodujące transportery glutaminianu, *SLC1A1* i *SLC1A2*, są potencjalnymi czynnikami mającymi wpływ na autyzm, a konkretnie jednonukleotydowe polimorfizmy (SNP) zidentyfikowane w tych genach zostały powiązane z tym zaburzeniem [272, 273]. W kontekście funkcji *Gelria* oraz możliwego udziału gospodarki glutaminianu w ASD, relacje między grupami są bardzo ciekawe.

Analiza danych wykazała istotne zmiany w obecności bakterii z rodzaju *Desulfovibrio* pomiędzy badanymi grupami. Osoby z ASD miały 5,22-krotnie więcej tych bakterii w porównaniu do grupy kontrolnej. Tymczasem, u rodzeństwa neurotypowego stwierdzono aż 10,43-krotnie wyższą obfitość tych organizmów w porównaniu do grupy kontrolnej. Co więcej, w porównaniu do osób z ASD, rodzeństwo neurotypowe wykazywało 2-krotnie większą obfitość



*Desulfovibrio*, co stanowi najwyższy zanotowany wskaźnik. *Desulfovibrio* są bakteriami siarkowymi, które wytwarzają siarkowodor (H<sub>2</sub>S). Wiązano je z wrzodziejącym zapaleniem jelita grubego [226]. Mogą mieć wpływ na zdrowie, także w kontekście produkcji kwasu propionowego, który jest potencjalnie związany z patogenezą ASD [107]. W dwóch badaniach potwierdzono wyższą obfitość *Desulfovibrio* u osób z ASD [89, 104]. Ponadto, istnieje silna korelacja między obecnością tych bakterii a nasileniem symptomów autystycznych [104]. W tym kontekście szczególnie interesujący jest fakt, iż największą obecność tego taksonu obserwuje się u rodzeństwa neurotypowego, co zasługuje na dalsze badania.

W trakcie analizy funkcji mikrobiomu zidentyfikowano wiele cech dyskryminujących badane grupy. Należy jednak podkreślić, że nie wszystkie z nich zostały przedstawione na rysunkach z powodu ich wysokiej liczby. Podobne wyniki są obecne w literaturze [274]. Zdecydowano się skupić na 50 najważniejszych cechach, wybranych na podstawie największego/najmniejszego efektu, po 25 cech. W kontekście genów, enzymów i ścieżek, które reprezentują potencjał metaboliczny mikrobiomu, istotne różnice między grupami są widoczne. Różna obfitość genów, które ulegają ekspresji w mikrobiocie osób z zaburzeniami ze spektrum autyzmu w porównaniu do grupy neurotypowego rodzeństwa oraz niespokrewnionej grupy kontrolnej, wskazuje na różnorodność potencjału metabolicznego wynikającego z liczby komórek bakteryjnych będących "nośnikami" tego potencjału. Ciekawą obserwacją jest także to, że neurotypowe rodzeństwo jest wyróżniającą się grupą. Te zidentyfikowane różnice mogą stanowić solidną podstawę do dalszych rozważań na temat roli mikrobiomu w zaburzeniach ze spektrum autyzmu. Jednakże, szczegółowa analiza tych różnic przekracza ramy niniejszej pracy i może być przedmiotem dalszych badań.

**Ograniczenia** Badanie poziomu SCFA w kale, analiza mikrobioty kału, dzienniki dietetyczne oraz ocena dolegliwości jelitowych stanowią zintegrowane podejście do zrozumienia dynamiki zdrowia jelitowego w kontekście zaburzeń ze spektrum autyzmu. SCFA, będące produktami metabolicznymi mikroorganizmów jelitowych, są ważnym wskaźnikiem aktywności mikrobioty

i jej interakcji z gospodarzem. Analiza mikrobioty kału dostarcza w przybliżeniu informacji na temat składu bakterii, które są obecne w jelitach. Te dwa elementy, połączone z danymi z dziennika dietetycznego, pozwalają na lepsze zrozumienie, jak dieta może wpływać na mikrobiotę i produkcję SCFA, a co za tym idzie, na zdrowie jelitowe. Dodatkowo, ocena dolegliwości jelitowych pomaga powiązać te obiektywne miary z subiektywnym doświadczeniem pacjenta, co daje pełniejszy obraz jego stanu zdrowia. Elementy te razem składają się na wielokierunkowe podejście do badania mikrobiomu i jego wpływu na zdrowie, co może przyczynić się do lepszego zrozumienia jaki jest potencjalny wpływ tych czynników w obrazie zaburzeń ze spektrum autyzmu.

Jednym z kluczowych ograniczeń badania poziomów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych jest fakt, że tylko około 5% do 10% produkowanych SCFA jest wydalanych z kałem [121, 126, 118]. Większość jest wchłaniana do krwiobiegu w jelitach. Bez równoczesnej analizy poziomów SCFA w surowicy trudno jest dokładnie określić, ile SCFA jest faktycznie produkowane przez mikrobiotę jelitową i jak efektywne jest ich wchłanianie. Badanie SCFA w kale może dostarczyć informacji na temat potencjalnej aktywności fermentacyjnej mikrobioty jelitowej, której produktem są SCFA, w danym momencie. Może również dostarczyć pewnej wskazówki na temat dominujących gatunków bakterii w mikrobiocie, ponieważ różne bakterie produkują różne SCFA. Jednak takie pomiary powinny być interpretowane ostrożnie, biorąc pod uwagę powyższe ograniczenia oraz fakt, że skład mikrobioty i produkcja SCFA mogą się znacząco zmieniać w czasie oraz w reakcji m. in. na dietę.

W tym badaniu liczba uczestników w grupie badanej była znaczna w porównaniu do wielkości próbek podawanych w dostępnej literaturze naukowej [79]. Wartością badania jest wielopłaszczyznowe podejście do zrozumienia dynamiki mikrobioty jelitowej poprzez analizę SCFA i diety, składu mikrobioty kału oraz dolegliwości jelitowych. Jednakże, nie można pominąć ograniczeń tych metod. Analiza kału, choć użyteczna i nieinwazyjna, nie daje pełnego obrazu mikrobioty jelitowej, a konkretnie nie dostarcza informacji o mikroorganizmach znajdujących się blisko nabłonka jelita. Te mikroorganizmy mogą mieć bezpośredni wpływ na zdrowie gospodarza, a ich aktywność może być inna niż tych, które są obecne w kale [79]. Ten problem jest do-

brze rozpoznany i dyskutowany w literaturze naukowej. Jednakże, ze względu na etyczne i praktyczne ograniczenia związane z pobieraniem próbek biopsji z jelita, analiza kału jest powszechnie stosowana jako najbardziej dostępna metoda badania mikrobioty jelitowej. Mimo tych ograniczeń, badanie kału dostarcza cennych informacji, które mogą pomóc w zrozumieniu ogólnych trendów i wzorców w mikrobiocie jelitowej, a także w identyfikacji potencjalnych obszarów, które mogą wymagać dalszych badań.

Kolejnym ograniczeniem jest brak jednolitego wskaźnika nasilenia zaburzeń ze spektrum autyzmu w badanej grupie. Grupa badanych dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu nie przeszła formalnej oceny psychiatrycznej, co oznacza, że nie dysponowano jednolitym wskaźnikiem stopnia nasilenia tych zaburzeń. Identyfikacja uczestników jako osób z ASD opierała się na deklaracji rodziców lub opiekunów prawnych. Niemożność skorzystania z formalnej oceny psychiatrycznej stanowi istotne ograniczenie, ale również podkreśla potrzebę dalszych badań, które uwzględniają precyzyjne pomiary nasilenia ASD i porównują je z parametrami zdrowia jelitowego. Zaburzenia ze spektrum autyzmu mają wysoce heterogenną naturę. Objawy ASD są bardzo zróżnicowane pod względem symptomów i nasilenia u dotkniętych tą grupą zaburzeń osób, a to dodatkowo komplikuje interpretację wyników. W związku z tym, nie podejmowano próby korelacji badanych parametrów ze stopniem nasilenia choroby. Wyniki powinny być interpretowane z uwzględnieniem tych ograniczeń.

Zidentyfikowano kilka istotnych ograniczeń w zastosowanej metodzie zbierania danych dietetycznych, które mogą mieć wpływ na wiarygodność wyników. Przede wszystkim, dane dietetyczne były zbierane za pośrednictwem dziennika dietetycznego, prowadzonego przez rodziców lub opiekunów. Metoda ta, choć powszechnie stosowana w badaniach dotyczących żywienia, niesie ze sobą pewne potencjalne problemy. Jednym z nich jest subiektywność oceny, rodzice lub opiekunowie mogą różnie interpretować ilość spożywanego pokarmu przez dziecko, a błąd ten mógł zostać powielony przy interpretacji dziennika i przenoszenia danych o wielkościach porcji do programu Dietetyk-Pro. Po drugie, dane dotyczące posiłków nie były kwantyfikowane poprzez ważenie, a jedynie rejestrowane jakościowo. To oznacza, że niedostępne były

precyzyjne informacje na temat ilości konkretnych składników odżywczych spożywanych przez dzieci. W rezultacie, zrozumienie wpływu diety na badane zmienne może być ograniczone. Po trzecie, prawdopodobieństwo, że nie wszystkie składniki posiłków zostały uwzględnione w dziennikach, stanowi kolejne ograniczenie. Istnieje możliwość, że niektóre elementy diety, szczególnie te spożywane pomiędzy planowanymi posiłkami, mogły być pominięte. Nie brano pod uwagę także stosowanych suplementów diety, czy witamin. To może prowadzić do niedoszacowania spożycia niektórych składników odżywczych. Należy więc podkreślić, że choć metoda dziennika dietetycznego jest użyteczna w badaniach, ma pewne ograniczenia, które mogą wpływać na dokładność uzyskanych wyników.

Badanie to, pomimo pewnych ograniczeń, dostarczyło cennych informacji dotyczących dolegliwości jelitowych u dzieci. Ograniczenia te wynikały w dużej mierze z metody gromadzenia danych oraz zastosowanego wskaźnika dolegliwości jelitowych. Pierwszym z ograniczeń była subiektywność oceny dolegliwości jelitowych. Dane były zbierane za pomocą 14-dniowej karty obserwacji, w której rodzice zgłaszali subiektywne objawy, takie jak ból brzucha, gazy i wzdęcia, a także bardziej obiektywne dane dotyczące wypróżnienia. Subiektywizm jest nieuniknionym skutkiem metody zbierania danych opartej na obserwacjach rodziców, szczególnie dotyczy to dzieci z ASD, które nie zawsze komunikują swoje dolegliwości. Jednak nawet pomimo tego, zgromadzono informacje, które dostarczyły cennych danych dotyczących doświadczeń dzieci z dolegliwościami jelitowymi. Zastosowany wskaźnik dolegliwości jelitowych, który, chociaż oparty na publikowanej wcześniej 6-stopniowej skali dolegliwości jelitowych [71] i inspirowany kryteriami rzymskimi dotyczącymi zaparć [275], nie jest formalnie zwalidowanym wskaźnikiem.

# Rozdział 6

## Wnioski

W niniejszej pracy doktorskiej podjęto się zadania przeprowadzenia szczegółowej analizy mikrobioty fekalnej w trzech grupach: dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu, ich neurotypowego rodzeństwa oraz grupy kontrolnej neurotypowych, niespokrewnionych dzieci. Dążeniem tych analiz było wskazanie i opisanie różnic w składzie mikrobioty, w kontekście diety i dolegliwości jelitowych badanych grup oraz analizy krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych jako markerów aktywności metabolicznej mikrobioty. Przeprowadzono też eksploracyjną analizę potencjalnych funkcji mikrobiomu.

1. Potwierdzono, że u chłopców częściej diagnozuje się zaburzenia ze spektrum autyzmu.
2. Dzieci z ASD doświadczają różnych problemów związanych z żywieniem i układem pokarmowym. Dzieci z ASD były karmione piersią krócej niż niespokrewnione dzieci neurotypowe. Istniała również tendencja do częstszego występowania problemów z przewodem pokarmowym, takich jak wzdęcia, zaparcia czy obecność śluzu w kale, a także nietolerancja niektórych pokarmów, takich jak produkty zawierające gluten.
3. Badanie wykazało także, że dzieci z ASD i ich neurotypowe rodzeństwo doświadczają częściej chorób przewlekłych, zaburzeń neurologicznych i regularnej konieczności przyjmowania leków, co sugeruje genetyczne obciążenie rodzinne.

4. Wprowadzenie diety eliminacyjnej i suplementów diety jest znacznie częstsze u dzieci z ASD, co wskazuje na to, że te strategie dietetyczne mogą odgrywać kluczową rolę w zarządzaniu objawami ASD. Wybiórczość pokarmowa była cechą charakterystyczną dla grupy dzieci z ASD.
5. Nie zaobserwowano istotnych różnic w ogólnej podaży kalorii, białka, tłuszczów, węglowodanów, czy wskaźniku masy ciała (BMI) między grupą dzieci z zaburzeniami ze spektrum autyzmu (ASD), ich neurotypowym rodzeństwem i grupą kontrolną, co sugeruje, że wybiórczość pokarmowa u dzieci z ASD nie prowadzi do objawów niedożywienia. Jednakże zaobserwowano pewne różnice w spożyciu poszczególnych składników pożywienia. Dzieci z ASD spożywały mniej krótko- i średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych, jak również mniej laktozy, w porównaniu zarówno z neurotypowym rodzeństwem, jak i grupą kontrolną. Również spożywały mniej wapnia i folianów, ale tylko w porównaniu z grupą kontrolną. Neurotypowe rodzeństwo spożywało mniej  $\beta$ -karotenu i folianów w porównaniu z grupą kontrolną. Mniejsze spożycie laktozy i wapnia wśród dzieci z ASD mogło być wynikiem stosowania diet eliminacyjnych. Choć ogólne porównanie diet nie pokazało istotnych różnic, szczegółowa analiza wskazała, że dieta dzieci z ASD jest bardziej odmienna od diety ich neurotypowego rodzeństwa, niż w parach rodzeństwa neurotypowego, co potwierdza, że są bardziej wybiórcze w swoich wyborach żywieniowych.
6. Potwierdzono wcześniejsze doniesienia, że dolegliwości jelitowe są częstsze u dzieci z ASD niż u dzieci neurotypowych. Analiza dolegliwości jelitowych wykazała, że dzieci z ASD i ich neurotypowe rodzeństwo częściej doświadczają dni z gazami i wzdęciami w porównaniu do grupy kontrolnej. Dzieci z ASD wykazywały także istotne różnice w kolorach stolców w porównaniu do ich neurotypowego rodzeństwa i grupy kontrolnej, co może wskazywać na specyficzne zmiany w procesach trawienia lub przyswajania pokarmów.
7. Potwierdzono wcześniejsze doniesienia, że dolegliwości jelitowe są częst-

sze u dzieci z ASD niż u dzieci neurotypowych. Analiza dolegliwości jelitowych wykazała, że dzieci z ASD i ich neurotypowe rodzeństwo częściej doświadczały dni z gazami i wzdęciami w porównaniu do grupy kontrolnej. Dzieci z ASD wykazywały także istotne różnice w kolorach stolców w porównaniu do ich neurotypowego rodzeństwa i grupy kontrolnej, co może wskazywać na specyficzne zmiany w procesach trawienia lub przyswajania pokarmów. Nasze obserwacje pokazują odmiennie globalne wzorce występowania różnych typów stolca zarówno u dzieci z ASD, jak i ich neurotypowego rodzeństwa, w porównaniu do grupy kontrolnej. Jednak, rodzeństwo neurotypowe nie różniło się od grupy kontrolnej pod względem kolorów stolców, co sugeruje, że te różnice mogą być specyficzne dla ASD.

8. Nie wykryto istotnych statystycznie różnic w poziomach krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, co mogło potencjalnie wskazywać na odmienny metabolizmu mikrobioty w badanych grupach.
9. Analiza różnorodności alfa, wykazała, że mikrobiota neurotypowego rodzeństwa cechowała się większą różnorodnością w porównaniu do mikrobioty grupy kontrolnej i grupy dzieci z ASD. Analiza różnorodności beta ujawniła znaczące różnice między badanymi grupami. Grupa neurotypowego rodzeństwa była wyraźnie odmienna od niespokrewnionej kontroli, a mikrobiomy dzieci z ASD rozmieszczone były między nimi. Różnorodność filogenetyczna, zbadana za pomocą wskaźnika Weighted UniFrac, sugeruje jednak, że mimo różnic w obecności i proporcjach mikroorganizmów, ich relacje filogenetyczne mogą być podobne między grupami.
10. Różnice obfitości między Firmicutes i Bacteroidetes nie były istotne statystycznie dla dzieci z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej. Zauważono natomiast, że Firmicutes były prawie dwukrotnie bardziej obfite, a Bacteroidetes ponad trzykrotnie mniej obfite u neurotypowego rodzeństwa dzieci z ASD w porównaniu do grupy kontrolnej. Dla niespokrewnionej grupy kontrolnej dzieci neurotypowych obfitość Bacte-

roidetes była ponad cztery razy niższa.

11. Wyniki analizy różnic na poziomie taksonomicznym rodzaju, wykazały istotne różnice w obfitości 53 taksonów bakteryjnych. Najważniejsze z nich to: taksony o obfitości większej u dzieci z ASD w odniesieniu do grupy kontrolnej: takson należący do Lachnospiraceae, *Gelria*, *Desulfovibrio*, a o obfitości zmniejszonej u dzieci z ASD w odniesieniu do grupy kontrolnej: *Faecalitalea*, *Parabacteroides* i *Odoribacter*. Bakterie te są zaangażowane w produkcję kwasu masłowego, rozkładanie węglowodanów, czy glutaminianu, redukcję siarki i produkcję kwasu propionowego.



# Spis rysunków

1.1	Kategorie fenotypowe i funkcjonalne genów związanych z ASD	24
3.1	Schemat procedury ekstrakcji DNA przy użyciu zestawu do izolacji QIAamp PowerFecal Pro DNA Kit . . . . .	44
3.2	Schemat procedury ekstrakcji DNA i RNA przy użyciu zestawu do izolacji AllPrep PowerFecal DNA/RNA . . . . .	45
3.3	Schemat kompleksu rybosomu ze szczególnym uwzględnieniem 16S rRNA . . . . .	48
3.4	Schematyczna ilustracja zasady działania algorytmu SMURF .	56
3.5	Bristolska Skala Uformowania Stolca . . . . .	75
4.1	Wskaźniki różnorodności alfa . . . . .	86
4.2	Różnorodność beta - PCoA . . . . .	87
4.3	Analiza porównawcza struktury i dominujących taksonów mikrobiomu . . . . .	89
4.4	Analiza różnic w obfitości taksonów bakteryjnych między grupami . . . . .	94
4.5	SCFA . . . . .	97
4.6	Diety - PCA . . . . .	102
4.7	Różnorodność diet w rodzinach . . . . .	103
4.8	Dieta - różnice w istotnych elementach . . . . .	104
4.9	Dolegliwości ze strony układu pokarmowego . . . . .	106
4.10	Procentowy udział typów stolca . . . . .	108
4.11	Procentowy udział kolorów stolca . . . . .	109
4.12	Wskaźnika dolegliwości jelitowych . . . . .	110

1	Różnice w ortologach genów . . . . .	183
2	Różnice w enzymach . . . . .	184
3	Różnice w ścieżkach metabolicznych . . . . .	185

# Spis tabel

1.1	Rozpowszechnienie zaburzeń ze spektrum autyzmu, 2000-2020	21
4.1	Charakterystyka uczestników badania z podziałem na grupy	79
1	Różnice w obfitości mikrobiomu . . . . .	182

# Bibliografia

- [1] Ann Katrin Sauer, Janelle Stanton, Sakshi Hans, and Andreas Grabrucker. Autism spectrum disorders: etiology and pathology. *Exon Publications*, pages 1–15, 2021.
- [2] World Health Organization. *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems, Tenth Revision (ICD-10)*. World Health Organization, 1994.
- [3] World Health Organization. *International Classification of Diseases, Eleventh Revision (ICD-11)*. World Health Organization, 2019/2021. Licensed under Creative Commons Attribution-NoDerivatives 3.0 IGO licence (CC BY-ND 3.0 IGO).
- [4] American Psychiatric Association. *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*. American Psychiatric Association, Arlington, VA, 5 edition, 2013.
- [5] Centers for Disease Control and Prevention (U.S.). Prevalence and characteristics of autism spectrum disorder among children aged 8 years – autism and developmental disabilities monitoring network, 11 sites, united states, 2020. *Surveillance Summaries / March 24, 2023 / 72(2)*;1–14, 2023. [Online]; Accessed: 17th March 2023.
- [6] M. J. Maenner, K. A. Shaw, A. V. Bakian, D. A. Bilder, M. S. Durkin, A. Esler, S. M. Furnier, L. Hallas, J. Hall-Lande, A. Hudson, M. M. Hughes, M. Patrick, K. Pierce, J. N. Poynter, A. Salinas, J. Shenouda,

- A. Vehorn, Z. Warren, J. N. Constantino, M. DiRienzo, R. T. Fitzgerald, A. Grzybowski, M. H. Spivey, S. Pettygrove, W. Zahorodny, A. Ali, J. G. Andrews, T. Baroud, J. Gutierrez, A. Hewitt, L. C. Lee, M. Lopez, K. C. Mancilla, D. McArthur, Y. D. Schwenk, A. Washington, S. Williams, and M. E. Cogswell. Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2018. *MMWR Surveill Summ*, 70(11):1–16, Dec 2021.
- [7] M. S. Durkin, M. J. Maenner, J. Baio, D. Christensen, J. Daniels, R. Fitzgerald, P. Imm, L. C. Lee, L. A. Schieve, K. Van Naarden Braun, M. S. Wingate, and M. Yeargin-Allsopp. Autism Spectrum Disorder Among US Children (2002-2010): Socioeconomic, Racial, and Ethnic Disparities. *Am J Public Health*, 107(11):1818–1826, Nov 2017.
- [8] Centers for Disease Control and Prevention. Autism and developmental disabilities monitoring (addm) network, 2023.
- [9] Y. Yasuda, J. Matsumoto, K. Miura, N. Hasegawa, and R. Hashimoto. Genetics of autism spectrum disorders and future direction. *J Hum Genet*, 68(3):193–197, Mar 2023.
- [10] F. K. Satterstrom, J. A. Kosmicki, J. Wang, M. S. Breen, S. De Rubeis, J. Y. An, M. Peng, R. Collins, J. Grove, L. Klei, C. Stevens, J. Reichert, M. S. Mulhern, M. Artomov, S. Gerges, B. Sheppard, X. Xu, A. Bhaduri, U. Norman, H. Brand, G. Schwartz, R. Nguyen, E. E. Guerrero, C. Dias, C. Betancur, E. H. Cook, L. Gallagher, M. Gill, J. S. Sutcliffe, A. Thurm, M. E. Zwick, A. D. rglum, M. W. State, A. E. Cicek, M. E. Talkowski, D. J. Cutler, B. Devlin, S. J. Sanders, K. Roeder, M. J. Daly, J. D. Buxbaum, B. Aleksic, R. Anney, M. Barbosa, S. Bishop, A. Brusco, J. Bybjerg-Grauholm, A. Carracedo, M. C. Y. Chan, A. G. Chiochetti, B. H. Y. Chung, H. Coon, M. L. Cuccaro, A. ó, B. Dalla Bernardina, R. Doan, E. Domenici, S. Dong, C. Fallerini, M. ndez Prieto, G. B. Ferrero, C. M. Freitag, M. Fromer, J. J. Gargus,

D. Geschwind, E. Giorgio, J. as, S. Guter, D. Halpern, E. Hansen-Kiss, X. He, G. E. Herman, I. Hertz-Picciotto, D. M. Hougaard, C. M. Hultman, I. Ionita-Laza, S. Jacob, J. Jamison, A. Jugessur, M. Karttinen, G. P. Knudsen, A. Klevzon, I. Kushima, S. L. Lee, T. ki, E. T. Lim, C. Lintas, W. I. Lipkin, D. Lopergolo, F. Lopes, Y. Ludena, P. Maciel, P. Magnus, B. Mahjani, N. Maltman, D. S. Manoach, G. Meiri, I. Menashe, J. Miller, N. Minshew, E. M. S. Montenegro, D. Moreira, E. M. Morrow, O. Mors, P. B. Mortensen, M. Mosconi, P. Muglia, B. M. Neale, M. Nordentoft, N. Ozaki, A. Palotie, M. Parelada, M. R. Passos-Bueno, M. Pericak-Vance, A. M. Persico, I. Pessah, K. Puura, A. Reichenberg, A. Renieri, E. Riberi, E. B. Robinson, K. E. Samocha, S. Sandin, S. L. Santangelo, G. Schellenberg, S. W. Scherer, S. Schlitt, R. Schmidt, L. Schmitt, I. M. W. Silva, T. Singh, P. M. Siper, M. Smith, G. Soares, C. Stoltenberg, P. Suren, E. Susser, J. Sweeney, P. Szatmari, L. Tang, F. Tassone, K. Teufel, E. Trabetti, M. D. P. Trelles, C. A. Walsh, L. A. Weiss, T. Werge, D. M. Werling, E. M. Wigdor, E. Wilkinson, A. J. Willsey, T. W. Yu, M. H. C. Yu, R. Yuen, E. Zachi, E. Agerbo, T. D. Als, V. Appadurai, M. kvad Hansen, R. Belliveau, A. Buil, C. E. Carey, F. Cerrato, K. Chambert, C. Churchhouse, S. Dalsgaard, D. Demontis, A. Dumont, J. Goldstein, C. S. Hansen, M. E. Hauberg, M. V. Hollegaard, D. P. Howrigan, H. Huang, J. Maller, A. R. Martin, J. Martin, M. Mattheisen, J. Moran, J. Pallesen, D. S. Palmer, C. B. Pedersen, M. G. Pedersen, T. Poterba, J. B. Poulson, S. Ripke, A. J. Schork, W. K. Thompson, P. Turley, and R. K. Walters. Large-Scale Exome Sequencing Study Implicates Both Developmental and Functional Changes in the Neurobiology of Autism. *Cell*, 180(3):568–584, Feb 2020.

- [11] D. Bai, B. H. K. Yip, G. C. Windham, A. Sourander, R. Francis, R. Yoffe, E. Glasson, B. Mahjani, A. Suominen, H. Leonard, M. Gissler, J. D. Buxbaum, K. Wong, D. Schendel, A. Kodesh, M. Breshnahan, S. Z. Levine, E. T. Parner, S. N. Hansen, C. Hultman, A. Reichenberg, and S. Sandin. Association of Genetic and Environmental Factors With

- Autism in a 5-Country Cohort. *JAMA Psychiatry*, 76(10):1035–1043, Oct 2019.
- [12] B. Tick, P. Bolton, F. é, M. Rutter, and F. Rijdsdijk. Heritability of autism spectrum disorders: a meta-analysis of twin studies. *J Child Psychol Psychiatry*, 57(5):585–595, May 2016.
- [13] S. De Rubeis, X. He, A. P. Goldberg, C. S. Poultney, K. Samocha, A. E. Cicek, Y. Kou, L. Liu, M. Fromer, S. Walker, T. Singh, L. Klei, J. Kosmicki, F. Shih-Chen, B. Aleksic, M. Biscaldi, P. F. Bolton, J. M. Brownfeld, J. Cai, N. G. Campbell, A. Carracedo, M. H. Chahrour, A. G. Chiocchetti, H. Coon, E. L. Crawford, S. R. Curran, G. Dawson, E. Duketis, B. A. Fernandez, L. Gallagher, E. Geller, S. J. Guter, R. S. Hill, J. Ionita-Laza, P. Jimenz Gonzalez, H. Kilpinen, S. M. Klauck, A. Kolevzon, I. Lee, I. Lei, J. Lei, T. ki, C. F. Lin, A. Ma’ayan, C. R. Marshall, A. L. McInnes, B. Neale, M. J. Owen, N. Ozaki, M. Parellada, J. R. Parr, S. Purcell, K. Puura, D. Rajagopalan, K. m, A. Reichenberg, A. Sabo, M. Sachse, S. J. Sanders, C. Schafer, M. ther, D. Skuse, C. Stevens, P. Szatmari, K. Tammimies, O. Valladares, A. Voran, W. Li-San, L. A. Weiss, A. J. Willsey, T. W. Yu, R. K. Yuen, E. H. Cook, C. M. Freitag, M. Gill, C. M. Hultman, T. Lehner, A. Palotie, G. D. Schellenberg, P. Sklar, M. W. State, J. S. Sutcliffe, C. A. Walsh, S. W. Scherer, M. E. Zwick, J. C. Barrett, D. J. Cutler, K. Roeder, B. Devlin, M. J. Daly, J. D. Buxbaum, N. Akawi, S. Al-Turki, K. Ambridge, J. Barrett, D. Barrett, T. Bayzatinova, N. Carter, S. Clayton, E. Coomber, H. Firth, T. Fitzgerald, D. Fitzpatrick, S. Gererty, S. Gribble, M. Hurler, P. Jones, W. Jones, D. King, N. Krishnappa, L. Mason, J. McRae, P. Michael, A. Middleton, R. Miller, K. Morley, V. Parthiban, E. Prigmore, D. Rajan, A. Sifrim, A. Tivory, M. van Kogelenberg, C. Wright, M. Adli, S. Al-Awadi, L. Al-Gazali, Z. Allub, S. Al-Saad, M. Al-Saffar, B. Ataman, S. Balkhy, A. J. Barkovich, B. J. Barry, L. Bastaki, M. Bauman, T. Ben-Omran, N. E. Braverman, M. H. Chahrour, B. S. Chang, H. R. Chaudhry, M. Coulter, A. m. D’Gama, A. Daoud, V. Eapen, J. M. Felie, S. B. Gabriel, G. G. Gascon, M. E. Greenberg, E. Han-

- son, D. A. Harmin, A. Hashmi, S. Herguner, R. S. Hill, F. M. Hisama, S. Jiralerspong, R. M. Joseph, S. Khalil, N. Khuri-Bulos, O. Kwaja, B. Y. Kwan, E. LeClair, E. T. Lim, K. Markianos, M. Martin, A. Masri, B. Meyer, G. H. Mochida, E. M. Morrow, N. M. Mukaddes, R. H. Nasir, S. Niaz, K. Okarmura-Ikeda, O. Oner, J. N. Parlow, A. Poduri, A. Rajab, L. Rappaport, J. Rodriguez, K. Schmitz-Abe, Y. Shen, C. R. Stevens, J. M. Stoler, C. M. Sunu, W. H. Tan, H. Taniguchi, A. Tebebi, C. A. Walsh, J. Ware, B. L. Wu, S. Y. Yoo, T. Yu, R. Anney, M. Ayub, A. Bailey, G. Baird, J. Barrett, D. Blackwood, P. Bolton, G. Breen, D. Collier, P. Cormican, N. Craddock, L. Crooks, S. Curran, P. Danecek, R. Durbin, L. Gallagher, J. Green, H. Gurling, R. Holt, C. Joyce, A. LeCouteur, I. Lee, J. nnqvist, S. McCarthy, P. McGuffin, A. McIntosh, A. McQuillen, A. Merkangas, A. Monaco, D. Muddyman, M. O'Donovan, M. Owen, A. Palotie, J. Parr, T. Paunio, O. Pietilainen, K. m, D. Skuse, J. Stalker, D. St Clair, J. Suvisaari, and H. Williams. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*, 515(7526):209–215, Nov 2014.
- [14] I. Iossifov, B. J. O’Roak, S. J. Sanders, M. Ronemus, N. Krumm, D. Levy, H. A. Stessman, K. T. Witherspoon, L. Vives, K. E. Patterson, J. D. Smith, B. Paepfer, D. A. Nickerson, J. Dea, S. Dong, L. E. Gonzalez, J. D. Mandell, S. M. Mane, M. T. Murtha, C. A. Sullivan, M. F. Walker, Z. Waqar, L. Wei, A. J. Willsey, B. Yamrom, Y. H. Lee, E. Grabowska, E. Dalkic, Z. Wang, S. Marks, P. Andrews, A. Leotta, J. Kendall, I. Hakker, J. Rosenbaum, B. Ma, L. Rodgers, J. Troge, G. Narzisi, S. Yoon, M. C. Schatz, K. Ye, W. R. McCombie, J. Shendure, E. E. Eichler, M. W. State, and M. Wigler. The contribution of de novo coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*, 515(7526):216–221, Nov 2014.
- [15] S. J. Sanders, X. He, A. J. Willsey, A. G. Ercan-Sencicek, K. E. Samocha, A. E. Cicek, M. T. Murtha, V. H. Bal, S. L. Bishop, S. Dong, A. P. Goldberg, C. Jinlu, J. F. Keaney, L. Klei, J. D. Mandell, D. Moreno-De-Luca, C. S. Poultney, E. B. Robinson, L. Smith, T. Solli-Nowlan,



- M. Y. Su, N. A. Teran, M. F. Walker, D. M. Werling, A. L. Beaudet, R. M. Cantor, E. Fombonne, D. H. Geschwind, D. E. Grice, C. Lord, J. K. Lowe, S. M. Mane, D. M. Martin, E. M. Morrow, M. E. Talkowski, J. S. Sutcliffe, C. A. Walsh, T. W. Yu, D. H. Ledbetter, C. L. Martin, E. H. Cook, J. D. Buxbaum, M. J. Daly, B. Devlin, K. Roeder, and M. W. State. Insights into Autism Spectrum Disorder Genomic Architecture and Biology from 71 Risk Loci. *Neuron*, 87(6):1215–1233, Sep 2015.
- [16] P. Karimi, E. Kamali, S. M. Mousavi, and M. Karahmadi. Environmental factors influencing the risk of autism. *J Res Med Sci*, 22:27, 2017.
- [17] Ondine S von Ehrenstein, Hilary Aralis, Myles Cockburn, and Beate Ritz. In utero exposure to toxic air pollutants and risk of childhood autism. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 25(6):851, 2014.
- [18] Amy E Kalkbrenner, Gayle C Windham, Cheng Zheng, Rob McConnell, Nora L Lee, James J Schauer, Brian Thayer, Juhi Pandey, and Heather E Volk. Air toxics in relation to autism diagnosis, phenotype, and severity in a us family-based study. *Environmental health perspectives*, 126(3):037004, 2018.
- [19] Reem Masarwa, Hagai Levine, Einat Gorelik, Shimon Reif, Amichai Perlman, and Ilan Matok. Prenatal exposure to acetaminophen and risk for attention deficit hyperactivity disorder and autistic spectrum disorder: a systematic review, meta-analysis, and meta-regression analysis of cohort studies. *American journal of epidemiology*, 187(8):1817–1827, 2018.
- [20] Dheeraj Rai, Brian K Lee, Christina Dalman, Jean Golding, Glyn Lewis, and Cecilia Magnusson. Parental depression, maternal antidepressant use during pregnancy, and risk of autism spectrum disorders: population based case-control study. *Bmj*, 346, 2013.

- [21] Boris Guennewig, Maina Bitar, Ifeanyi Obiorah, James Hanks, Elizabeth A O'Brien, Dominik C Kaczorowski, Yasmin L Hurd, Panos Roussos, Kristen J Brennand, and Guy Barry. The exposure of human ipsc neurons impacts genes associated with neuropsychiatric disorders. *Translational psychiatry*, 8(1):89, 2018.
- [22] Asher Ornoy, L Weinstein-Fudim, and Z Ergaz. Prenatal factors associated with autism spectrum disorder (asd). *Reproductive toxicology*, 56:155–169, 2015.
- [23] S Wu, F Wu, Y Ding, J Hou, J Bi, and Z Zhang. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 135(1):29–41, 2017.
- [24] Mengying Li, M Daniele Fallin, Anne Riley, Rebecca Landa, Sheila O Walker, Michael Silverstein, Deanna Caruso, Colleen Pearson, Shannon Kiang, Jamie Lyn Dahm, et al. The association of maternal obesity and diabetes with autism and other developmental disabilities. *Pediatrics*, 137(2), 2016.
- [25] Anny H Xiang, Xinhui Wang, Mayra P Martinez, Johanna C Walthall, Edward S Curry, Kathleen Page, Thomas A Buchanan, Karen J Coleman, and Darios Getahun. Association of maternal diabetes with autism in offspring. *Jama*, 313(14):1425–1434, 2015.
- [26] Jianzhang Chen, Kuolin Xin, Junjie Wei, Kangli Zhang, and Huajun Xiao. Lower maternal serum 25 (oh) d in first trimester associated with higher autism risk in chinese offspring. *Journal of psychosomatic research*, 89:98–101, 2016.
- [27] Stephen Z Levine, Arad Kodesh, Alexander Viktorin, Lauren Smith, Rudolf Uher, Abraham Reichenberg, and Sven Sandin. Association of maternal use of folic acid and multivitamin supplements in the periods before and during pregnancy with the risk of autism spectrum disorder in offspring. *JAMA psychiatry*, 75(2):176–184, 2018.

- [28] Ramkripa Raghavan, Anne W Riley, Heather Volk, Deanna Caruso, Lynn Hironaka, Laura Sices, Xiumei Hong, Guoying Wang, Yuelong Ji, Martha Brucato, et al. Maternal multivitamin intake, plasma folate and vitamin b12 levels and autism spectrum disorder risk in offspring. *Paediatric and perinatal epidemiology*, 32(1):100–111, 2018.
- [29] Martha R Herbert. Contributions of the environment and environmentally vulnerable physiology to autism spectrum disorders. *Current opinion in neurology*, 23(2):103–110, 2010.
- [30] Richard Deth, Christina Muratore, Jorge Benzecry, Verna-Ann Power-Charnitsky, and Mostafa Waly. How environmental and genetic factors combine to cause autism: A redox/methylation hypothesis. *Neurotoxicology*, 29(1):190–201, 2008.
- [31] Frederica Perera and Julie Herbstman. Prenatal environmental exposures, epigenetics, and disease. *Reproductive toxicology*, 31(3):363–373, 2011.
- [32] K. Pugsley, S. W. Scherer, M. A. Bellgrove, and Z. Hawi. Environmental exposures associated with elevated risk for autism spectrum disorder may augment the burden of deleterious de novo mutations among probands. *Mol Psychiatry*, 27(1):710–730, Jan 2022.
- [33] Emma J Glasson, Carol Bower, Beverly Petterson, Nick de Klerk, Ge-rvase Chaney, and Joachim F Hallmayer. Perinatal factors and the development of autism: a population study. *Archives of general Psychiatry*, 61(6):618–627, 2004.
- [34] Joshua Lederberg and Alexa T McCray. Ome sweetomics—a genealogical treasury of words. *The scientist*, 15(7):8–8, 2001.
- [35] Peter J Turnbaugh, Ruth E Ley, Micah Hamady, Claire M Fraser-Liggett, Rob Knight, and Jeffrey I Gordon. The human microbiome project. *Nature*, 449(7164):804–810, 2007.

- [36] Baohong Wang, Mingfei Yao, Longxian Lv, Zongxin Ling, and Lanjuan Li. The human microbiota in health and disease. *Engineering*, 3(1):71–82, 2017.
- [37] Afrah Shafquat, Regina Joice, Sheri L Simmons, and Curtis Huttenhower. Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends in microbiology*, 22(5):261–266, 2014.
- [38] Inna Sekirov, Shannon L Russell, L Caetano M Antunes, and B Brett Finlay. Gut microbiota in health and disease. *Physiological reviews*, 2010.
- [39] F. Boem and A. Amedei. Healthy axis: Towards an integrated view of the gut-brain health. *World J Gastroenterol*, 25(29):3838–3841, Aug 2019.
- [40] T. G. Dinan and J. F. Cryan. The Microbiome-Gut-Brain Axis in Health and Disease. *Gastroenterol Clin North Am*, 46(1):77–89, Mar 2017.
- [41] M. Scriven, T. G. Dinan, J. F. Cryan, and M. Wall. Neuropsychiatric Disorders: Influence of Gut Microbe to Brain Signalling. *Diseases*, 6(3), Sep 2018.
- [42] P. Srikantha and M. H. Mohajeri. The Possible Role of the Microbiota-Gut-Brain-Axis in Autism Spectrum Disorder. *Int J Mol Sci*, 20(9), Apr 2019.
- [43] J. F. Cryan, K. J. O’Riordan, C. S. M. Cowan, K. V. Sandhu, T. F. S. Bastiaanssen, M. Boehme, M. G. Codagnone, S. Cusotto, C. Fulling, A. V. Golubeva, K. E. Guzzetta, M. Jaggar, C. M. Long-Smith, J. M. Lyte, J. A. Martin, A. Molinero-Perez, G. Moloney, E. Morelli, E. Morillas, R. O’Connor, J. S. Cruz-Pereira, V. L. Peterson, K. Rea, N. L. Ritz, E. Sherwin, S. Spichak, E. M. Teichman, M. van de Wouw, A. P. Ventura-Silva, S. E. Wallace-Fitzsimons, N. Hyland, G. Clarke, and

- T. G. Dinan. The Microbiota-Gut-Brain Axis. *Physiol Rev*, 99(4):1877–2013, Oct 2019.
- [44] Enriqueta Garcia-Gutierrez, Arjan Narbad, and Juan Miguel Rodríguez. Autism spectrum disorder associated with gut microbiota at immune, metabolomic, and neuroactive level. *Frontiers in neuroscience*, 14:578666, 2020.
- [45] Fergus Shanahan. The gut microbiota—a clinical perspective on lessons learned. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 9(10):609–614, 2012.
- [46] Ilseung Cho and Martin J Blaser. The human microbiome: at the interface of health and disease. *Nature Reviews Genetics*, 13(4):260–270, 2012.
- [47] Santiago Sandoval-Motta, Maximino Aldana, Esperanza Martínez-Romero, and Alejandro Frank. The human microbiome and the missing heritability problem. *Frontiers in genetics*, 8:80, 2017.
- [48] Joby Pulikkan, Agnisrota Mazumder, and Tony Grace. Role of the gut microbiome in autism spectrum disorders. *Reviews on biomarker studies in psychiatric and neurodegenerative disorders*, pages 253–269, 2019.
- [49] Esther Jiménez, María L Marín, Rocío Martín, Juan M Odriozola, Mónica Olivares, Jordi Xaus, Leonides Fernández, and Juan M Rodríguez. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in microbiology*, 159(3):187–193, 2008.
- [50] R Satokari, T Grönroos, K Laitinen, S Salminen, and E Isolauri. Bifidobacterium and lactobacillus dna in the human placenta. *Letters in applied microbiology*, 48(1):8–12, 2009.
- [51] Harm Wopereis, Raish Oozeer, Karen Knipping, Clara Belzer, and Jan Knol. The first thousand days—intestinal microbiology of early life:

- establishing a symbiosis. *Pediatric Allergy and Immunology*, 25(5):428–438, 2014.
- [52] Rocío Martín, Susana Langa, Carlota Reviriego, Esther Jiménez, María L Marín, Jordi Xaus, Leonides Fernández, and Juan M Rodríguez. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *The Journal of pediatrics*, 143(6):754–758, 2003.
- [53] Hiroshi Makino, Akira Kushiro, Eiji Ishikawa, Delphine Muyllaert, Hiroyuki Kubota, Takafumi Sakai, Kenji Oishi, Rocio Martin, Kaouther Ben Amor, Raish Oozeer, et al. Transmission of intestinal bifidobacterium longum subsp. longum strains from mother to infant, determined by multilocus sequencing typing and amplified fragment length polymorphism. *Applied and environmental microbiology*, 77(19):6788–6793, 2011.
- [54] M. L. Wernroth, S. Peura, A. M. Hedman, S. Hetty, S. Vicenzi, B. Kennedy, K. Fall, B. Svennblad, E. Andolf, G. Pershagen, J. w, D. Nguyen, S. Sayols-Baixeras, K. F. Dekkers, S. Bertilsson, C. Almqvist, J. Dickved, and T. Fall. years of life. *Sci Rep*, 12(1):9080, May 2022.
- [55] Christopher J Stewart, Nadim J Ajami, Jacqueline L O’Brien, Diane S Hutchinson, Daniel P Smith, Matthew C Wong, Matthew C Ross, Richard E Lloyd, HarshaVardhan Doddapaneni, Ginger A Metcalf, et al. Temporal development of the gut microbiome in early childhood from the teddy study. *Nature*, 562(7728):583–588, 2018.
- [56] Tanya Yatsunenko, Federico E Rey, Mark J Manary, Indi Trehan, Maria Gloria Dominguez-Bello, Monica Contreras, Magda Magris, Glida Hidalgo, Robert N Baldassano, Andrey P Anokhin, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *nature*, 486(7402):222–227, 2012.
- [57] Josefine Roswall, Lisa M Olsson, Petia Kovatcheva-Datchary, Staffan Nilsson, Valentina Tremaroli, Marie-Christine Simon, Pia Kiilerich,

- Rozita Akrami, Manuela Krämer, Mathias Uhlén, et al. Developmental trajectory of the healthy human gut microbiota during the first 5 years of life. *Cell host & microbe*, 29(5):765–776, 2021.
- [58] Richard Agans, Laura Rigsbee, Harshavardhan Kenche, Sonia Michail, Harry J Khamis, and Oleg Paliy. Distal gut microbiota of adolescent children is different from that of adults. *FEMS microbiology ecology*, 77(2):404–412, 2011.
- [59] Tamar Ringel-Kulka, Jing Cheng, Yehuda Ringel, Jarkko Salojärvi, Ian Carroll, Airi Palva, Willem M de Vos, and Reetta Satokari. Intestinal microbiota in healthy us young children and adults—a high throughput microarray analysis. *PloS one*, 8(5):e64315, 2013.
- [60] Catherine A Lozupone, Jesse I Stombaugh, Jeffrey I Gordon, Janet K Jansson, and Rob Knight. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature*, 489(7415):220–230, 2012.
- [61] Fernando Navarro, Yuying Liu, and Jon Marc Rhoads. Can probiotics benefit children with autism spectrum disorders? *World journal of gastroenterology*, 22(46):10093, 2016.
- [62] Cheng Chi, Yong Xue, Na Lv, Yanan Hao, Ruixia Liu, Yanxin Wang, Xin Ding, Huihui Zeng, Geng Li, Qun Shen, et al. Longitudinal gut bacterial colonization and its influencing factors of low birth weight infants during the first 3 months of life. *Frontiers in microbiology*, 10:1105, 2019.
- [63] Nicholas A Bokulich, Jennifer Chung, Thomas Battaglia, Nora Henderson, Melanie Jay, Huilin Li, Arnon D. Lieber, Fen Wu, Guillermo I Perez-Perez, Yu Chen, et al. Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Science translational medicine*, 8(343):343ra82–343ra82, 2016.
- [64] Marta Reyman, Marlies A van Houten, Debbie van Baarle, Astrid ATM Bosch, Wing Ho Man, Mei Ling JN Chu, Kayleigh Arp, Rebecca L Wat-

- son, Elisabeth AM Sanders, Susana Fuentes, et al. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nature communications*, 10(1):4997, 2019.
- [65] Fredrik Bäckhed, Josefine Roswall, Yangqing Peng, Qiang Feng, Huijue Jia, Petia Kovatcheva-Datchary, Yin Li, Yan Xia, Hailiang Xie, Huanzi Zhong, et al. Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life. *Cell host & microbe*, 17(5):690–703, 2015.
- [66] Hedvig E Jakobsson, Thomas R Abrahamsson, Maria C Jenmalm, Keith Harris, Christopher Quince, Cecilia Jernberg, Bengt Björkstén, Lars Engstrand, and Anders F Andersson. Decreased gut microbiota diversity, delayed bacteroidetes colonisation and reduced th1 responses in infants delivered by caesarean section. *Gut*, 63(4):559–566, 2014.
- [67] Jose C Clemente, Luke K Ursell, Laura Wegener Parfrey, and Rob Knight. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell*, 148(6):1258–1270, 2012.
- [68] Elizabeth Thursby and Nathalie Juge. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical journal*, 474(11):1823–1836, 2017.
- [69] H. K. Hughes, D. Rose, and P. Ashwood. The Gut Microbiota and Dysbiosis in Autism Spectrum Disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 18(11):81, Sep 2018.
- [70] Agustín Ernesto Martínez-González and Pedro Andreo-Martínez. The role of gut microbiota in gastrointestinal symptoms of children with asd. *Medicina*, 55(8):408, 2019.
- [71] James B Adams, Leah J Johansen, Linda D Powell, David Quig, and Robert A Rubin. Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism—comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC gastroenterology*, 11(1):1–13, 2011.
- [72] Timothy Buie, Daniel B Campbell, George J Fuchs III, Glenn T Furuta, Joseph Levy, Judy VandeWater, Agnes H Whitaker, Dan Atkins,



- Margaret L Bauman, Arthur L Beaudet, et al. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with asds: a consensus report. *Pediatrics*, 125(Supplement\_1):S1–S18, 2010.
- [73] Barbara O McElhanon, Courtney McCracken, Saul Karpen, and William G Sharp. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: a meta-analysis. *Pediatrics*, 133(5):872–883, 2014.
- [74] Victor Kang, George C Wagner, and Xue Ming. Gastrointestinal dysfunction in children with autism spectrum disorders. *Autism Research*, 7(4):501–506, 2014.
- [75] Calliope Hologue, Carol Newill, Li-Ching Lee, Pankaj J Pasricha, and M Daniele Fallin. Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence. *Autism Research*, 11(1):24–36, 2018.
- [76] Dinesh S Pashankar. Childhood constipation: evaluation and management. *Clinics in colon and rectal surgery*, 18(02):120–127, 2005.
- [77] Anna-Maria D’Cruz, Michael E Ragozzino, Matthew W Mosconi, Sunil Shrestha, Edwin H Cook, and John A Sweeney. Reduced behavioral flexibility in autism spectrum disorders. *Neuropsychology*, 27(2):152, 2013.
- [78] B. Peeters, I. Noens, E. M. Philips, S. Kuppens, and M. A. Benninga. Autism spectrum disorders in children with functional defecation disorders. *J Pediatr*, 163(3):873–878, Sep 2013.
- [79] N. Bezawada, T. H. Phang, G. L. Hold, and R. Hansen. Autism Spectrum Disorder and the Gut Microbiota in Children: A Systematic Review. *Ann Nutr Metab*, 76(1):16–29, 2020.
- [80] K. Berding and S. M. Donovan. Diet Can Impact Microbiota Composition in Children With Autism Spectrum Disorder. *Front Neurosci*, 12:515, 2018.

- [81] R. K. Singh, H. W. Chang, D. Yan, K. M. Lee, D. Ucmak, K. Wong, M. Abrouk, B. Farahnik, M. Nakamura, T. H. Zhu, T. Bhutani, and W. Liao. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *J Transl Med*, 15(1):73, Apr 2017.
- [82] K. Makki, E. C. Deehan, J. Walter, and F. ckhed. The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host Microbe*, 23(6):705–715, Jun 2018.
- [83] J. S. Son, L. J. Zheng, L. M. Rowehl, X. Tian, Y. Zhang, W. Zhu, L. Litcher-Kelly, K. D. Gadow, G. Gathungu, C. E. Robertson, D. Ir, D. N. Frank, and E. Li. Comparison of Fecal Microbiota in Children with Autism Spectrum Disorders and Neurotypical Siblings in the Simons Simplex Collection. *PLoS One*, 10(10):e0137725, 2015.
- [84] H. M. Parracho, M. O. Bingham, G. R. Gibson, and A. L. McCartney. Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol*, 54(Pt 10):987–991, Oct 2005.
- [85] D. W. Kang, J. G. Park, Z. E. Ilhan, G. Wallstrom, J. Labaer, J. B. Adams, and R. Krajmalnik-Brown. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One*, 8(7):e68322, 2013.
- [86] Julio Plaza-Díaz, Antonio Gómez-Fernández, Natalia Chueca, María José de la Torre-Aguilar, Ángel Gil, Juan Luis Perez-Navero, Katherine Flores-Rojas, Pilar Martín-Borreguero, Patricio Solis-Urra, Francisco Javier Ruiz-Ojeda, Federico Garcia, and Mercedes Gil-Campos. Autism spectrum disorder (asd) with and without mental regression is associated with changes in the fecal microbiota. *Nutrients*, 11(2), 2019.
- [87] Q. Zhai, S. Cen, J. Jiang, J. Zhao, H. Zhang, and W. Chen. Disturbance of trace element and gut microbiota profiles as indicators of autism spectrum disorder: A pilot study of Chinese children. *Environ Res*, 171:501–509, Apr 2019.

- [88] M. De Angelis, M. Piccolo, L. Vannini, S. Siragusa, A. De Giacomo, D. I. Serrazzanetti, F. Cristofori, M. E. Guerzoni, M. Gobetti, and R. Francavilla. Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One*, 8(10):e76993, 2013.
- [89] S. M. Finegold, S. E. Dowd, V. Gontcharova, C. Liu, K. E. Henley, R. D. Wolcott, E. Youn, P. H. Summanen, D. Granpeesheh, D. Dixon, M. Liu, D. R. Molitoris, and J. A. Green. Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe*, 16(4):444–453, Aug 2010.
- [90] D. W. Kang, Z. E. Ilhan, N. G. Isern, D. W. Hoyt, D. P. Howsmon, M. Shaffer, C. A. Lozupone, J. Hahn, J. B. Adams, and R. Krajmalnik-Brown. Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*, 49:121–131, Feb 2018.
- [91] R. I. Kushak, H. S. Winter, T. M. Buie, S. B. Cox, C. D. Phillips, and N. L. Ward. Analysis of the Duodenal Microbiome in Autistic Individuals: Association With Carbohydrate Digestion. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 64(5):e110–e116, May 2017.
- [92] J. Pulikkan, A. Maji, D. B. Dhakan, R. Saxena, B. Mohan, M. M. Anto, N. Agarwal, T. Grace, and V. K. Sharma. Gut Microbial Dysbiosis in Indian Children with Autism Spectrum Disorders. *Microb Ecol*, 76(4):1102–1114, Nov 2018.
- [93] L. Coretti, L. Paparo, M. P. Riccio, F. Amato, M. Cuomo, A. Natale, L. Borrelli, G. Corrado, M. Comegna, E. Buommino, G. Castaldo, C. Bravaccio, L. Chiariotti, R. Berni Canani, and F. Lembo. Gut Microbiota Features in Young Children With Autism Spectrum Disorders. *Front Microbiol*, 9:3146, 2018.
- [94] M. Zhang, W. Ma, J. Zhang, Y. He, and J. Wang. Analysis of gut

- microbiota profiles and microbe-disease associations in children with autism spectrum disorders in China. *Sci Rep*, 8(1):13981, Sep 2018.
- [95] F. Strati, D. Cavalieri, D. Albanese, C. De Felice, C. Donati, J. Hayek, O. Jousson, S. Leoncini, D. Renzi, A. ò, and C. De Filippo. New evidences on the altered gut microbiota in autism spectrum disorders. *Microbiome*, 5(1):24, Feb 2017.
- [96] B. L. Williams, M. Hornig, T. Buie, M. L. Bauman, M. Cho Paik, I. Wick, A. Bennett, O. Jabado, D. L. Hirschberg, and W. I. Lipkin. Impaired carbohydrate digestion and transport and mucosal dysbiosis in the intestines of children with autism and gastrointestinal disturbances. *PLoS One*, 6(9):e24585, 2011.
- [97] B. Ma, J. Liang, M. Dai, J. Wang, J. Luo, Z. Zhang, and J. Jing. Altered Gut Microbiota in Chinese Children With Autism Spectrum Disorders. *Front Cell Infect Microbiol*, 9:40, 2019.
- [98] N. Li, J. Yang, J. Zhang, C. Liang, Y. Wang, B. Chen, C. Zhao, J. Wang, G. Zhang, D. Zhao, Y. Liu, L. Zhang, J. Yang, G. Li, Z. Gai, L. Zhang, and G. Zhao. Correlation of Gut Microbiome Between ASD Children and Mothers and Potential Biomarkers for Risk Assessment. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 17(1):26–38, Feb 2019.
- [99] E. Y. Hsiao, S. W. McBride, S. Hsien, G. Sharon, E. R. Hyde, T. McCue, J. A. Codelli, J. Chow, S. E. Reisman, J. F. Petrosino, P. H. Patterson, and S. K. Mazmanian. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*, 155(7):1451–1463, Dec 2013.
- [100] R. H. Sandler, S. M. Finegold, E. R. Bolte, C. P. Buchanan, A. P. Maxwell, M. L. nen, M. N. Nelson, and H. M. Wexler. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol*, 15(7):429–435, Jul 2000.

- [101] R. A. Luna, N. Oezguen, M. Balderas, A. Venkatachalam, J. K. Runge, J. Versalovic, J. Veenstra-VanderWeele, G. M. Anderson, T. Savidge, and K. C. Williams. Functional Abdominal Pain in Children With Autism Spectrum Disorder. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 3(2):218–230, Mar 2017.
- [102] M. Wang, J. Wan, H. Rong, F. He, H. Wang, J. Zhou, C. Cai, Y. Wang, R. Xu, Z. Yin, and W. Zhou. Alterations in Gut Glutamate Metabolism Associated with Changes in Gut Microbiota Composition in Children with Autism Spectrum Disorder. *mSystems*, 4(1), 2019.
- [103] Y. Song, C. Liu, and S. M. Finegold. Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol*, 70(11):6459–6465, Nov 2004.
- [104] A. Tomova, V. Husarova, S. Lakatosova, J. Bakos, B. Vlkova, K. Babinska, and D. Ostatnikova. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiol Behav*, 138:179–187, Jan 2015.
- [105] D. R. Rose, H. Yang, G. Serena, C. Sturgeon, B. Ma, M. Careaga, H. K. Hughes, K. Angkustsiri, M. Rose, I. Hertz-Picciotto, J. Van de Water, R. L. Hansen, J. Ravel, A. Fasano, and P. Ashwood. Differential immune responses and microbiota profiles in children with autism spectrum disorders and co-morbid gastrointestinal symptoms. *Brain Behav Immun*, 70:354–368, May 2018.
- [106] S. Liu, E. Li, Z. Sun, D. Fu, G. Duan, M. Jiang, Y. Yu, L. Mei, P. Yang, Y. Tang, and P. Zheng. Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. *Sci Rep*, 9(1):287, Jan 2019.
- [107] S. M. Finegold. Desulfovibrio species are potentially important in regressive autism. *Med Hypotheses*, 77(2):270–274, Aug 2011.
- [108] L. Wang, C. T. Christophersen, M. J. Sorich, J. P. Gerber, M. T. Angley, and M. A. Conlon. Low relative abundances of the mucolytic

- bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Appl Environ Microbiol*, 77(18):6718–6721, Sep 2011.
- [109] Amélia Sarmiento and Catarina D. Simões. 1.31 - gut microbiota dysbiosis and chronic intestinal inflammation. In Maria Glibetic, editor, *Comprehensive Gut Microbiota*, pages 423–441. Elsevier, Oxford, 2022.
- [110] B. L. Williams, M. Hornig, T. Parekh, and W. I. Lipkin. Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances. *mBio*, 3(1), 2012.
- [111] L. Wang, C. T. Christophersen, M. J. Sorich, J. P. Gerber, M. T. Angley, and M. A. Conlon. Increased abundance of *Sutterella* spp. and *Ruminococcus torques* in feces of children with autism spectrum disorder. *Mol Autism*, 4(1):42, Nov 2013.
- [112] G. D. Wu, J. Chen, C. Hoffmann, K. Bittinger, Y. Y. Chen, S. A. Keilbaugh, M. Bewtra, D. Knights, W. A. Walters, R. Knight, R. Sinha, E. Gilroy, K. Gupta, R. Baldassano, L. Nessel, H. Li, F. D. Bushman, and J. D. Lewis. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science*, 334(6052):105–108, Oct 2011.
- [113] C. De Filippo, D. Cavalieri, M. Di Paola, M. Ramazzotti, J. B. Poullet, S. Massart, S. Collini, G. Pieraccini, and P. Lionetti. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(33):14691–14696, Aug 2010.
- [114] V. K. Gupta, N. M. Chaudhari, S. Iskepalli, and C. Dutta. Divergences in gene repertoire among the reference *Prevotella* genomes derived from distinct body sites of human. *BMC Genomics*, 16(1):153, Mar 2015.

- [115] R. E. Ley. Gut microbiota in 2015: Prevotella in the gut: choose carefully. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 13(2):69–70, Feb 2016.
- [116] Tom Brody. *Nutritional Biochemistry*. Academic Press, 2nd edition, 1999.
- [117] S. Macfarlane and G. T. Macfarlane. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc*, 62(1):67–72, Feb 2003.
- [118] J. M. Wong, R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam, and D. J. Jenkins. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*, 40(3):235–243, Mar 2006.
- [119] J. H. Cummings and G. T. Macfarlane. The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Bacteriol*, 70(6):443–459, Jun 1991.
- [120] Aleksandra Czajkowska and Bogumiła Szponar. Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (scfa) jako produkty metabolizmu bakterii jelitowych oraz ich znaczenie dla organizmu gospodarza. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej (online)*, 72:131–142, 2018.
- [121] M. B. Roberfroid. Inulin-type fructans: functional food ingredients. *J Nutr*, 137(11 Suppl):2493S–2502S, Nov 2007.
- [122] S. I. Cook and J. H. Sellin. Review article: short chain fatty acids in health and disease. *Aliment Pharmacol Ther*, 12(6):499–507, Jun 1998.
- [123] Y. Lin, R. J. Vonk, M. J. Slooff, F. Kuipers, and M. J. Smit. Differences in propionate-induced inhibition of cholesterol and triacylglycerol synthesis between human and rat hepatocytes in primary culture. *Br J Nutr*, 74(2):197–207, Aug 1995.
- [124] P. M. Nishina and R. A. Freedland. Effects of propionate on lipid biosynthesis in isolated rat hepatocytes. *J Nutr*, 120(7):668–673, Jul 1990.

- [125] N. M. Delzenne and C. M. Williams. Prebiotics and lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*, 13(1):61–67, Feb 2002.
- [126] W. E. Roediger and A. Moore. Effect of short-chain fatty acid on sodium absorption in isolated human colon perfused through the vascular bed. *Dig Dis Sci*, 26(2):100–106, Feb 1981.
- [127] Petra Louis, Sylvia Helen Duncan, Paul Owen Sheridan, Alan William Walker, and Harry James Flint. Microbial lactate utilisation and the stability of the gut microbiome. *Gut Microbiome*, 3:e3, 2022.
- [128] X. Li, Y. Yang, B. Zhang, X. Lin, X. Fu, Y. An, Y. Zou, J. X. Wang, Z. Wang, and T. Yu. Lactate metabolism in human health and disease. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1):305, Sep 2022.
- [129] C. C. Gillis, E. R. Hughes, L. Spiga, M. G. Winter, W. Zhu, T. Furtado de Carvalho, R. B. Chanin, C. L. Behrendt, L. V. Hooper, R. L. Santos, and S. E. Winter. Dysbiosis-Associated Change in Host Metabolism Generates Lactate to Support Salmonella Growth. *Cell Host Microbe*, 23(4):570, Apr 2018.
- [130] V. T. Pham, C. Lacroix, C. P. Braegger, and C. Chassard. Early colonization of functional groups of microbes in the infant gut. *Environ Microbiol*, 18(7):2246–2258, Jul 2016.
- [131] T. Jost, C. Lacroix, C. P. Braegger, and C. Chassard. New insights in gut microbiota establishment in healthy breast fed neonates. *PLoS One*, 7(8):e44595, 2012.
- [132] C. Chassard, T. de Wouters, and C. Lacroix. Probiotics tailored to the infant: a window of opportunity. *Curr Opin Biotechnol*, 26:141–147, Apr 2014.
- [133] V. T. Pham, C. Lacroix, C. P. Braegger, and C. Chassard. Lactate-utilizing community is associated with gut microbiota dysbiosis in colicky infants. *Sci Rep*, 7(1):11176, Sep 2017.



- [134] V. T. Pham, C. Chassard, E. Rifa, C. Braegger, A. Geirnaert, V. N. Rocha Martin, and C. Lacroix. Lactate Metabolism Is Strongly Modulated by Fecal Inoculum, pH, and Retention Time in PolyFermS Continuous Colonic Fermentation Models Mimicking Young Infant Proximal Colon. *mSystems*, 4(4), May 2019.
- [135] J. J. Miller, P. McVeagh, G. H. Fleet, P. Petocz, and J. C. Brand. Breath hydrogen excretion in infants with colic. *Arch Dis Child*, 64(5):725–729, May 1989.
- [136] S. Arboleya, C. Watkins, C. Stanton, and R. P. Ross. Gut Bifidobacteria Populations in Human Health and Aging. *Front Microbiol*, 7:1204, 2016.
- [137] W. Wang, L. Chen, R. Zhou, X. Wang, L. Song, S. Huang, G. Wang, and B. Xia. Increased proportions of Bifidobacterium and the Lactobacillus group and loss of butyrate-producing bacteria in inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*, 52(2):398–406, Feb 2014.
- [138] C. C. Gillis, M. G. Winter, R. B. Chanin, W. Zhu, L. Spiga, and S. E. Winter. Genes Involved in l-Lactate Utilization during Gut Colonization. *Infect Immun*, 87(4), Apr 2019.
- [139] H. J. Flint, K. P. Scott, P. Louis, and S. H. Duncan. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9(10):577–589, Oct 2012.
- [140] N. G. Kowlgi and L. Chhabra. D-lactic acidosis: an underrecognized complication of short bowel syndrome. *Gastroenterol Res Pract*, 2015:476215, 2015.
- [141] H. Hove, I. Nordgaard-Andersen, and P. B. Mortensen. Faecal DL-lactate concentration in 100 gastrointestinal patients. *Scand J Gastroenterol*, 29(3):255–259, Mar 1994.

- [142] D. F. Macfabe. Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders. *Microb Ecol Health Dis*, 23, 2012.
- [143] R. El Hage, E. Hernandez-Sanabria, M. Calatayud Arroyo, R. Props, and T. Van de Wiele. Model of the Human Intestinal Microbial Ecosystem. *Front Microbiol*, 10:1206, 2019.
- [144] E. Y. Hsiao. Gastrointestinal issues in autism spectrum disorder. *Harv Rev Psychiatry*, 22(2):104–111, 2014.
- [145] D. F. MacFabe, K. Rodríguez-Capote, J. E. Hoffman, A. E. Franklin, Y. Mohammad-Asef, A. R. Taylor, F. Boon, D. P. Cain, M. Kavaliers, F. Possmayer, and K. Ossenkopp. A novel rodent model of autism: Intraventricular infusions of propionic acid increase locomotor activity and induce neuroinflammation and oxidative stress in discrete regions of adult rat brain. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 4(2):146–166, 2008.
- [146] D. F. MacFabe, N. E. Cain, F. Boon, K. P. Ossenkopp, and D. P. Cain. Effects of the enteric bacterial metabolic product propionic acid on object-directed behavior, social behavior, cognition, and neuroinflammation in adolescent rats: Relevance to autism spectrum disorder. *Behav Brain Res*, 217(1):47–54, Feb 2011.
- [147] L. S. Abdelli, A. Samsam, and S. A. Naser. Propionic Acid Induces Gliosis and Neuro-inflammation through Modulation of PTEN/AKT Pathway in Autism Spectrum Disorder. *Sci Rep*, 9(1):8824, Jun 2019.
- [148] U. Bonnet, D. Bingmann, and M. Wiemann. Intracellular pH modulates spontaneous and epileptiform bioelectric activity of hippocampal CA3-neurons. *Eur Neuropsychopharmacol*, 10(2):97–103, Mar 2000.
- [149] A. R. Karuri, E. Dobrowsky, and I. F. Tannock. Selective cellular acidification and toxicity of weak organic acids in an acidic microenvironment. *Br J Cancer*, 68(6):1080–1087, Dec 1993.

- [150] S. R. Shultz, D. F. MacFabe, K. P. Ossenkopp, S. Scratch, J. Whelan, R. Taylor, and D. P. Cain. Intracerebroventricular injection of propionic acid, an enteric bacterial metabolic end-product, impairs social behavior in the rat: implications for an animal model of autism. *Neuropharmacology*, 54(6):901–911, May 2008.
- [151] C. Cannizzaro, R. Monastero, M. Vacca, and M. Martire. [3H]-DA release evoked by low pH medium and internal H<sup>+</sup> accumulation in rat hypothalamic synaptosomes: involvement of calcium ions. *Neurochem Int*, 43(1):9–17, Jul 2003.
- [152] C. A. Severson, W. Wang, V. A. Pieribone, C. I. Dohle, and G. B. Richardson. Midbrain serotonergic neurons are central pH chemoreceptors. *Nat Neurosci*, 6(11):1139–1140, Nov 2003.
- [153] R. Mitsui, S. Ono, S. Karaki, and A. Kuwahara. Neural and non-neural mediation of propionate-induced contractile responses in the rat distal colon. *Neurogastroenterol Motil*, 17(4):585–594, Aug 2005.
- [154] D. Kiser, B. Steemers, I. Branchi, and J. R. Homberg. The reciprocal interaction between serotonin and social behaviour. *Neurosci Biobehav Rev*, 36(2):786–798, Feb 2012.
- [155] L. E. Gonzalez, N. Andrews, and S. E. File. 5-HT<sub>1A</sub> and benzodiazepine receptors in the basolateral amygdala modulate anxiety in the social interaction test, but not in the elevated plus-maze. *Brain Res*, 732(1-2):145–153, Sep 1996.
- [156] D. F. MacFabe, D. P. Cain, K. Rodriguez-Capote, A. E. Franklin, J. E. Hoffman, F. Boon, A. R. Taylor, M. Kavaliers, and K. P. Ossenkopp. Neurobiological effects of intraventricular propionic acid in rats: possible role of short chain fatty acids on the pathogenesis and characteristics of autism spectrum disorders. *Behav Brain Res*, 176(1):149–169, Jan 2007.

- [157] C. Bourriaud, R. J. Robins, L. Martin, F. Kozlowski, E. Tenailleau, C. Cherbut, and C. Michel. Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident. *J Appl Microbiol*, 99(1):201–212, 2005.
- [158] L.V. Holdeman, E.P. Cato, and W.E. Moore. *Anaerobe Laboratory Manual*. Virginia Polytechnic Institute and State University. Anaerobe Laboratory, Blacksburg, Va, 1977.
- [159] P. Guilloteau, L. Martin, V. Eeckhaut, R. Ducatelle, R. Zabielski, and F. Van Immerseel. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. *Nutr Res Rev*, 23(2):366–384, Dec 2010.
- [160] J. M. Anderson and C. M. Van Itallie. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability. *Am J Physiol*, 269(4 Pt 1):G467–475, Oct 1995.
- [161] L. L. Mitic, C. M. Van Itallie, and J. M. Anderson. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 279(2):G250–254, Aug 2000.
- [162] L. Peng, Z. R. Li, R. S. Green, I. R. Holzman, and J. Lin. Butyrate enhances the intestinal barrier by facilitating tight junction assembly via activation of AMP-activated protein kinase in Caco-2 cell monolayers. *J Nutr*, 139(9):1619–1625, Sep 2009.
- [163] D. G. Hardie, S. A. Hawley, and J. W. Scott. AMP-activated protein kinase—development of the energy sensor concept. *J Physiol*, 574(Pt 1):7–15, Jul 2006.
- [164] L. Zhang, J. Li, L. H. Young, and M. J. Caplan. AMP-activated protein kinase regulates the assembly of epithelial tight junctions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(46):17272–17277, Nov 2006.

- [165] B. Zheng and L. C. Cantley. Regulation of epithelial tight junction assembly and disassembly by AMP-activated protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(3):819–822, Jan 2007.
- [166] H. Huang, J. Q. Liu, Y. Yu, L. H. Mo, R. T. Ge, H. P. Zhang, Z. G. Liu, P. Y. Zheng, and P. C. Yang. Regulation of TWIK-related potassium channel-1 (Trek1) restitutes intestinal epithelial barrier function. *Cell Mol Immunol*, 13(1):110–118, Jan 2016.
- [167] K. Fukuda, M. Ogawa, H. Taniguchi, and M. Saito. Molecular Approaches to Studying Microbial Communities: Targeting the 16S Ribosomal RNA Gene. *J UOEH*, 38(3):223–232, Sep 2016.
- [168] Jeremy Mark Berg, John L. Tymoczko, Lubert Stryer, and Neil D. Clarke. *Biochemia*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, 2007.
- [169] S. Chakravorty, D. Helb, M. Burday, N. Connell, and D. Alland. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, 69(2):330–339, May 2007.
- [170] C. R. Woese, O. Kandler, and M. L. Wheelis. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87(12):4576–4579, Jun 1990.
- [171] Francis Crick. On protein synthesis. *The Symposia of the Society for Experimental Biology*, 12:138–163, 1958.
- [172] Emile Zuckerkandl and Linus B. Pauling. Molecular disease, evolution, and genetic heterogeneity. In Michael Kasha and Bernard Pullman, editors, *Horizons in Biochemistry*, pages 189–225. Academic Press, New York, 1962.
- [173] C. R. Woese and G. E. Fox. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(11):5088–5090, Nov 1977.

- [174] D. L. Duewer, M. C. Kline, E. L. Romsos, and B. Toman. Evaluating droplet digital PCR for the quantification of human genomic DNA: converting copies per nanoliter to nanograms nuclear DNA per microliter. *Anal Bioanal Chem*, 410(12):2879–2887, May 2018.
- [175] E. Bolyen, J. R. Rideout, M. R. Dillon, N. A. Bokulich, C. C. Abnet, G. A. Al-Ghalith, H. Alexander, E. J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J. E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C. J. Brislawn, C. T. Brown, B. J. Callahan, A. M. guez, J. Chase, E. K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P. C. Dorrestein, G. M. Douglas, D. M. Durall, C. Duvallet, C. F. Edwardson, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J. M. Gauglitz, S. M. Gibbons, D. L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G. A. Huttley, S. Janssen, A. K. Jarmusch, L. Jiang, B. D. Kaehler, K. B. Kang, C. R. Keefe, P. Keim, S. T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciolk, J. Kreps, M. G. I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y. X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B. D. Martin, D. McDonald, L. J. McIver, A. V. Melnik, J. L. Metcalf, S. C. Morgan, J. T. Morton, A. T. Naimey, J. A. Navas-Molina, L. F. Nothias, S. B. Orchanian, T. Pearson, S. L. Peoples, D. Petras, M. L. Preuss, E. Pruesse, L. B. Rasmussen, A. Rivers, M. S. Robeson, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S. J. Song, J. R. Spear, A. D. Swafford, L. R. Thompson, P. J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P. J. Turnbaugh, S. Ul-Hasan, J. J. J. van der Hooft, F. Vargas, Y. zquez Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K. C. Weber, C. H. D. Williamson, A. D. Willis, Z. Z. Xu, J. R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight, and J. G. Caporaso. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol*, 37(8):852–857, Aug 2019.
- [176] Justine W Debelius, Michael Robeson, Luisa W. Hugerth, Fredrik Bohlund, Weimin Ye, and Lars Engstrand. A comparison of approaches to scaffolding multiple regions along the 16s rna gene for improved resolution. *bioRxiv*, 2021.

- [177] G. Fuks, M. Elgart, A. Amir, A. Zeisel, P. J. Turnbaugh, Y. Soen, and N. Shental. Combining 16S rRNA gene variable regions enables high-resolution microbial community profiling. *Microbiome*, 6(1):17, Jan 2018.
- [178] S. Peddada and H. Lin. Multi-group Analysis of Compositions of Microbiomes with Covariate Adjustments and Repeated Measures. *Res Sq*, May 2023.
- [179] Pauli Virtanen, Ralf Gommers, Travis E. Oliphant, Matt Haberland, Tyler Reddy, David Cournapeau, Evgeni Burovski, Pearu Peterson, Warren Weckesser, Jonathan Bright, Stéfan J. van der Walt, Matthew Brett, Joshua Wilson, K. Jarrod Millman, Nikolay Mayorov, Andrew R. J. Nelson, Eric Jones, Robert Kern, Eric Larson, C. J. Carey, İlhan Polat, Yu Feng, Eric W. Moore, Jake VanderPlas, Denis Laxalde, Josef Perktold, Robert Cimrman, Ian Henriksen, E. A. Quintero, Charles R. Harris, Anne M. Archibald, Antônio H. Ribeiro, Fabian Pedregosa, Paul van Mulbregt, and SciPy 1.0 Contributors. Scipy 1.0: Fundamental algorithms for scientific computing in python. *Nature Methods*, 17:261–272, 2020.
- [180] John D. Hunter. Matplotlib: A 2d graphics environment. *Computing in Science & Engineering*, 9(3):90–95, 2007.
- [181] Marcel Martin. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, 17(1):10–12, 2011.
- [182] B. J. Callahan, P. J. McMurdie, M. J. Rosen, A. W. Han, A. J. Johnson, and S. P. Holmes. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods*, 13(7):581–583, Jul 2016.
- [183] C. Quast, E. Pruesse, P. Yilmaz, J. Gerken, T. Schweer, P. Yarza, J. Peplies, and F. O. ckner. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41(Database issue):D590–596, Jan 2013.

- [184] P. Yilmaz, L. W. Parfrey, P. Yarza, J. Gerken, E. Pruesse, C. Quast, T. Schweer, J. Peplies, W. Ludwig, and F. O. ckner. The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks. *Nucleic Acids Res*, 42(Database issue):D643–648, Jan 2014.
- [185] C. E. Shannon. A mathematical theory of communication. *Bell System Technical Journal*, 27(3):379–423, 1948.
- [186] R. MacArthur. Fluctuations of animal populations and a measure of community stability. *Ecology*, 36(3):533–536, 1955.
- [187] E.C. Pielou. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 13:131–144, 1966.
- [188] Daniel P. Faith. Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61(1):1–10, 1992.
- [189] C. Lozupone and R. Knight. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 71(12):8228–8235, Dec 2005.
- [190] C. A. Lozupone, M. Hamady, S. T. Kelley, and R. Knight. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 73(5):1576–1585, Mar 2007.
- [191] J. T. Morton, C. Marotz, A. Washburne, J. Silverman, L. S. Zaramela, A. Edlund, K. Zengler, and R. Knight. Establishing microbial composition measurement standards with reference frames. *Nat Commun*, 10(1):2719, Jun 2019.
- [192] Wenke Smets, Jonathan W. Leff, Mark A. Bradford, Rebecca L. McCulley, Sarah Lebeer, and Noah Fierer. A method for simultaneous measurement of soil bacterial abundances and community composition via 16s rRNA gene sequencing. *Soil Biology and Biochemistry*, 96:145–151, 2016.



- [193] A. Tkacz, M. Hortalá, and P. S. Poole. Absolute quantitation of microbiota abundance in environmental samples. *Microbiome*, 6(1):110, Jun 2018.
- [194] M. A. Nadkarni, F. E. Martin, N. A. Jacques, and N. Hunter. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology (Reading)*, 148(Pt 1):257–266, Jan 2002.
- [195] B. E. Rubin, J. G. Sanders, J. Hampton-Marcell, S. M. Owens, J. A. Gilbert, and C. S. Moreau. DNA extraction protocols cause differences in 16S rRNA amplicon sequencing efficiency but not in community profile composition or structure. *Microbiologyopen*, 3(6):910–921, Dec 2014.
- [196] B. Wagner Mackenzie, D. W. Waite, and M. W. Taylor. Evaluating variation in human gut microbiota profiles due to DNA extraction method and inter-subject differences. *Front Microbiol*, 6:130, 2015.
- [197] S. Yuan, D. B. Cohen, J. Ravel, Z. Abdo, and L. J. Forney. Evaluation of methods for the extraction and purification of DNA from the human microbiome. *PLoS One*, 7(3):e33865, 2012.
- [198] D. Vandeputte, G. Kathagen, K. D’hoë, S. Vieira-Silva, M. Valles-Colomer, J. Sabino, J. Wang, R. Y. Tito, L. De Commer, Y. Darzi, S. Vermeire, G. Falony, and J. Raes. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature*, 551(7681):507–511, Nov 2017.
- [199] S. Mandal, W. Van Treuren, R. A. White, M. Eggestebo, R. Knight, and S. D. Peddada. Analysis of composition of microbiomes: a novel method for studying microbial composition. *Microb Ecol Health Dis*, 26:27663, 2015.
- [200] J. Aitchison. The statistical analysis of compositional data. *Journal of*

- the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*, 44(2):139–160, 1982.
- [201] J. Aitchison. The single principle of compositional data analysis, continuing fallacies, confusions and misunderstandings and some suggested remedies. In *Proceedings of CoDaWork'08, The 3rd Compositional Data Analysis Workshop*, Girona, Spain, 2008.
- [202] J. Aitchison. The statistical analysis of compositional data. *J. R. Stat. Soc. Series B Stat. Methodol.*, 44:139–160, 1982.
- [203] V. Pawlowsky-Glahn, J. J. Egozcue, and R. Tolosana-Delgado. *Modeling and Analysis of Compositional Data*. John Wiley & Sons, 2015.
- [204] H. Lin and S. D. Peddada. Analysis of compositions of microbiomes with bias correction. *Nat Commun*, 11(1):3514, Jul 2020.
- [205] Y. Hu, G. A. Satten, and Y. J. Hu. LOCOM: A logistic regression model for testing differential abundance in compositional microbiome data with false discovery rate control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119(30):e2122788119, Jul 2022.
- [206] M. R. McLaren, A. D. Willis, and B. J. Callahan. Consistent and correctable bias in metagenomic sequencing experiments. *Elife*, 8, Sep 2019.
- [207] S. D. Peddada, E. K. Lobenhofer, L. Li, C. A. Afshari, C. R. Weinberg, and D. M. Umbach. Gene selection and clustering for time-course and dose-response microarray experiments using order-restricted inference. *Bioinformatics*, 19(7):834–841, May 2003.
- [208] W. Guo, S. K. Sarkar, and S. D. Peddada. Controlling false discoveries in multidimensional directional decisions, with applications to gene expression data on ordered categories. *Biometrics*, 66(2):485–492, Jun 2010.

- [209] A. Grandhi, W. Guo, and S. D. Peddada. A multiple testing procedure for multi-dimensional pairwise comparisons with application to gene expression studies. *BMC Bioinformatics*, 17:104, Feb 2016.
- [210] M. G. Langille, J. Zaneveld, J. G. Caporaso, D. McDonald, D. Knights, J. A. Reyes, J. C. Clemente, D. E. Burkepille, R. L. Vega Thurber, R. Knight, R. G. Beiko, and C. Huttenhower. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences. *Nat Biotechnol*, 31(9):814–821, Sep 2013.
- [211] G. M. Douglas, V. J. Maffei, J. R. Zaneveld, S. N. Yurgel, J. R. Brown, C. M. Taylor, C. Huttenhower, and M. G. I. Langille. PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nat Biotechnol*, 38(6):685–688, Jun 2020.
- [212] S. Iwai, T. Weinmaier, B. L. Schmidt, D. G. Albertson, N. J. Poloso, K. Dabbagh, and T. Z. DeSantis. Piphillin: Improved Prediction of Metagenomic Content by Direct Inference from Human Microbiomes. *PLoS One*, 11(11):e0166104, 2016.
- [213] T. Torii, K. Kanemitsu, T. Wada, S. Itoh, K. Kinugawa, and A. Hagiwara. Measurement of short-chain fatty acids in human faeces using high-performance liquid chromatography: specimen stability. *Ann Clin Biochem*, 47(Pt 5):447–452, Sep 2010.
- [214] Agnieszka Żak Bochenek, Joanna Bajzert, Dominika Sambor, Natalia Siwińska, Bogumiła Szponar, Łukasz Łaczmanski, Paulina Żebrowska, Aleksandra Czajkowska, Maciej Karczewski, and Anna Chełmońska-Soyta. Homeostasis of the intestinal mucosa in healthy horses & correlation between the fecal microbiome, secretory immunoglobulin a and fecal egg count. *Animals*, 12(22), 2022.
- [215] K. Wojtyniak, H. Szajewska, and P. Dziechciarz. Translation to Polish, cross-cultural adaptation, and validation of the Bristol Stool Form Scale among healthcare professionals and patients. *Prz Gastroenterol*, 13(1):35–39, 2018.

- [216] R. J. Saad, S. S. Rao, K. L. Koch, B. Kuo, H. P. Parkman, R. W. McCallum, M. D. Sitrin, G. E. Wilding, J. R. Semler, and W. D. Chey. Do stool form and frequency correlate with whole-gut and colonic transit? Results from a multicenter study in constipated individuals and healthy controls. *Am J Gastroenterol*, 105(2):403–411, Feb 2010.
- [217] L. P. Degen and S. F. Phillips. How well does stool form reflect colonic transit? *Gut*, 39(1):109–113, Jul 1996.
- [218] E. rga. The importance of stool tests in diagnosis and follow-up of gastrointestinal disorders in children. *Turk Pediatri Ars*, 54(3):141–148, 2019.
- [219] Sharon Brewer and Shelly Seth. Stool characteristics explained. *Nursing made Incredibly Easy*, 16, 2018.
- [220] M.D. Michael F. Picco. Stool color: When to worry. <https://www.mayoclinic.org/stool-color/expert-answers/faq-20058080>.
- [221] B. P. O’Sullivan and S. D. Freedman. Cystic fibrosis. *Lancet*, 373(9678):1891–1904, May 2009.
- [222] C. J. Meehan and R. G. Beiko. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome Biol Evol*, 6(3):703–713, Mar 2014.
- [223] D. Ai, H. Pan, X. Li, Y. Gao, G. Liu, and L. C. Xia. Identifying Gut Microbiota Associated With Colorectal Cancer Using a Zero-Inflated Lognormal Model. *Front Microbiol*, 10:826, 2019.
- [224] K. Kameyama and K. Itoh. Intestinal colonization by a Lachnospiraceae bacterium contributes to the development of diabetes in obese mice. *Microbes Environ*, 29(4):427–430, 2014.
- [225] C. M. Plugge, M. Balk, E. G. Zoetendal, and A. J. M. Stams. *Gelria glutamica* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, obligately syntrophic,

- glutamate-degrading anaerobe. *Int J Syst Evol Microbiol*, 52(Pt 2):401–407, Mar 2002.
- [226] I. Kushkevych, D. é, and P. r. Strains from Individuals with Colitis. *Open Life Sci*, 13:481–488, Jan 2018.
- [227] M. K. D. Dueholm, M. Nierychlo, K. S. Andersen, V. bing, S. Knutsson, M. Albertsen, P. H. Nielsen, S. Arriaga, R. Bakke, N. Boon, F. Bux, M. Christensson, A. S. M. Chua, T. P. Curtis, E. Cytryn, L. Erijman, C. Etchebehere, D. Fatta-Kassinos, D. Frigon, M. C. Garcia-Chaves, A. Z. Gu, H. Horn, D. Jenkins, N. Kreuzinger, S. Kumari, A. Lanham, Y. Law, T. Leiknes, E. Morgenroth, A. ski, S. Petrovski, M. Pijuan, S. B. Pillai, M. A. M. Reis, Q. Rong, S. Rossetti, R. Seviour, N. Tooker, P. Vainio, M. van Loosdrecht, R. Vikraman, J. Wanner, D. Weissbrodt, X. Wen, T. Zhang, and P. H. Nielsen. MiDAS 4: A global catalogue of full-length 16S rRNA gene sequences and taxonomy for studies of bacterial communities in wastewater treatment plants. *Nat Commun*, 13(1):1908, Apr 2022.
- [228] M. Nierychlo, K. S. Andersen, Y. Xu, N. Green, C. Jiang, M. Albertsen, M. S. Dueholm, and P. H. Nielsen. MiDAS 3: An ecosystem-specific reference database, taxonomy and knowledge platform for activated sludge and anaerobic digesters reveals species-level microbiome composition of activated sludge. *Water Res*, 182:115955, Sep 2020.
- [229] M. T. Alou, S. Ndongo, L. re, N. Labas, C. Andrieu, M. Richez, C. Couderc, J. P. Baudoin, J. o, S. Brah, A. Diallo, C. Sokhna, N. Cassir, B. La Scola, F. Cadoret, and D. Raoult. . *New Microbes New Infect*, 21:128–139, Jan 2018.
- [230] K.H. Schleifer. *Phylum XIII: Firmicutes Gibbons and Murray 1978, 5 (Firmicutes (sic) Gibbons and Murray 1978, 5)*, volume 3. Springer, New York, U.S., 2009.
- [231] J. Wiegel, R. Tanner, and F.A. Rainey. *An Introduction to the family Clostridiaceae*, pages 654–678. Springer, U.S., 2006.

- [232] G. P. Donaldson, S. M. Lee, and S. K. Mazmanian. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol*, 14(1):20–32, Jan 2016.
- [233] Baoming Tian, Jianhua Zhao, Wei An, Jiawei Zhang, Xin Cao, Jiale Mi, Jinsong Zhao, Yingxiao Zhang, and Juxiu Li. Lycium ruthenicum diet alters the gut microbiota and partially enhances gut barrier function in male c57bl/6 mice. *Journal of Functional Foods*, 52:516–528, 2019.
- [234] Y.S. Liu, S. Li, X.F. Wang, T. Xing, J.L. Li, X.D. Zhu, L. Zhang, and F. Gao. Microbiota populations and short-chain fatty acids production in cecum of immunosuppressed broilers consuming diets containing  $\gamma$ -irradiated astragalus polysaccharides. *Poultry Science*, 100(1):273–282, 2021.
- [235] Amy Biddle, Lucy Stewart, Jeffrey Blanchard, and Susan Leschine. Untangling the genetic basis of fibrolytic specialization by lachnospiraceae and ruminococcaceae in diverse gut communities. *Diversity*, 5(3):627–640, 2013.
- [236] W.G. Wade. *Eubacterium*. John Wiley & Sons, Ltd, 2015.
- [237] J. Gerritsen, S. Fuentes, W. Grievink, L. van Niftrik, B. J. Tindall, H. M. Timmerman, G. T. Rijkers, and H. Smidt. Characterization of *Romboutsia ilealis* gen. nov., sp. nov., isolated from the gastrointestinal tract of a rat, and proposal for the reclassification of five closely related members of the genus *Clostridium* into the genera *Romboutsia* gen. nov., *Intestinibacter* gen. nov., *Terrisporobacter* gen. nov. and *Asaccharospora* gen. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(Pt 5):1600–1616, May 2014.
- [238] Y. Deng, X. Guo, Y. Wang, M. He, K. Ma, H. Wang, X. Chen, D. Kong, Z. Yang, and Z. Ruan. *Terrisporobacter petrolearius* sp. nov., isolated from an oilfield petroleum reservoir. *Int J Syst Evol Microbiol*, 65(10):3522–3526, Oct 2015.

- [239] Matthew D. Kane, Alain Brauman, and John A. Breznak. *Clostridium mayombe* sp. nov., an h<sub>2</sub>/co<sub>2</sub> acetogenic bacterium from the gut of the african soil-feeding termite, *cubitermes speciosus*. *Archives of Microbiology*, 156(2):99–104, 1991.
- [240] M. Maes, A. Vasupanrajit, K. Jirakran, P. Klomkiew, P. Chanchaem, C. Tunvirachaisakul, K. Plaimas, A. Suratane, and S. Payungporn. Adverse childhood experiences and reoccurrence of illness impact the gut microbiome, which affects suicidal behaviours and the phenome of major depression: towards enterotypic phenotypes. *Acta Neuropsychiatr*, pages 1–18, Apr 2023.
- [241] S. Devriese, V. Eeckhaut, A. Geirnaert, L. Van den Bossche, P. Hindryckx, T. Van de Wiele, F. Van Immerseel, R. Ducatelle, M. De Vos, and D. Laukens. Reduced Mucosa-associated *Butyricoccus* Activity in Patients with Ulcerative Colitis Correlates with Aberrant Claudin-1 Expression. *J Crohns Colitis*, 11(2):229–236, Feb 2017.
- [242] V. Eeckhaut, F. Van Immerseel, E. Teirlynck, F. Pasmans, V. Fievez, C. Snauwaert, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, P. Louis, and P. Vandamme. *Butyricoccus pullicaecorum* gen. nov., sp. nov., an anaerobic, butyrate-producing bacterium isolated from the caecal content of a broiler chicken. *Int J Syst Evol Microbiol*, 58(Pt 12):2799–2802, Dec 2008.
- [243] J. Feng, H. Ma, Y. Huang, J. Li, and W. Li. Ruminococcaceae UCG-013 Promotes Obesity Resistance in Mice. *Biomedicines*, 10(12), Dec 2022.
- [244] M. Dekker Nitert, A. Mousa, H. L. Barrett, N. Naderpoor, and B. de Courten. Altered Gut Microbiota Composition Is Associated With Back Pain in Overweight and Obese Individuals. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11:605, 2020.
- [245] C. De Maesschalck, F. Van Immerseel, V. Eeckhaut, S. De Baere, M. Cnockaert, S. Croubels, F. Haesebrouck, R. Ducatelle, and P. Van-

- damme. *Faecalicoccus acidiformans* gen. nov., sp. nov., isolated from the chicken caecum, and reclassification of *Streptococcus pleomorphus* (Barnes et al. 1977), *Eubacterium bifforme* (Eggerth 1935) and *Eubacterium cylindroides* (Cato et al. 1974) as *Faecalicoccus pleomorphus* comb. nov., *Holdemanella biformis* gen. nov., comb. nov. and *Faecalitalea cylindroides* gen. nov., comb. nov., respectively, within the family Erysipelotrichaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*, 64(Pt 11):3877–3884, Nov 2014.
- [246] S. Sanna, N. R. van Zuydam, A. Mahajan, A. Kurilshikov, A. Vich Vila, U. sa, Z. Mujagic, A. A. M. Masclee, D. M. A. E. Jonkers, M. Oosting, L. A. B. Joosten, M. G. Netea, L. Franke, A. Zhernakova, J. Fu, C. Wijmenga, and M. I. McCarthy. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nat Genet*, 51(4):600–605, Apr 2019.
- [247] Quantao Ma, Yaqi Li, Jingkang Wang, Pengfei Li, Yuhui Duan, Hongyu Dai, Yongcheng An, Long Cheng, Tieshan Wang, Chunguo Wang, Ting Wang, and Baosheng Zhao. Investigation of gut microbiome changes in type 1 diabetic mellitus rats based on high-throughput sequencing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 124:109873, 2020.
- [248] Y. Cui, L. Zhang, X. Wang, Y. Yi, Y. Shan, B. Liu, Y. Zhou, and X. ü. Roles of intestinal Parabacteroides in human health and diseases. *FEMS Microbiol Lett*, 369(1), Aug 2022.
- [249] J. Zhou, M. Li, Q. Chen, X. Li, L. Chen, Z. Dong, W. Zhu, Y. Yang, Z. Liu, and Q. Chen. Programmable probiotics modulate inflammation and gut microbiota for inflammatory bowel disease treatment after effective oral delivery. *Nat Commun*, 13(1):3432, Jun 2022.
- [250] K. Kuhlthau, F. Orlich, T. A. Hall, D. Sikora, E. A. Kovacs, J. Delahaye, and T. E. Clemons. Health-Related Quality of Life in children with autism spectrum disorders: results from the autism treatment network. *J Autism Dev Disord*, 40(6):721–729, Jun 2010.



- [251] C. V. Tyler, S. C. Schramm, M. Karafa, A. S. Tang, and A. K. Jain. Chronic disease risks in young adults with autism spectrum disorder: forewarned is forearmed. *Am J Intellect Dev Disabil*, 116(5):371–380, Sep 2011.
- [252] J. Xiong, S. Chen, N. Pang, X. Deng, L. Yang, F. He, L. Wu, C. Chen, F. Yin, and J. Peng. Neurological Diseases With Autism Spectrum Disorder: Role of ASD Risk Genes. *Front Neurosci*, 13:349, 2019.
- [253] G. Xu, L. G. Snetselaar, J. Jing, B. Liu, L. Strathearn, and W. Bao. Association of Food Allergy and Other Allergic Conditions With Autism Spectrum Disorder in Children. *JAMA Netw Open*, 1(2):e180279, Jun 2018.
- [254] K. Horvath and J. A. Perman. Autistic disorder and gastrointestinal disease. *Curr Opin Pediatr*, 14(5):583–587, Oct 2002.
- [255] Sylwia Jaruga-Sękowska, Monika Mazur, Wiktoria Staśkiewicz, Joanna Woźniak-Holecka, and Gabriela Wanat. Effect of elimination diets on the functioning of children with autism in the opinion of parents. *J. Educ. Health Sport*, 12(7):828–839, 2022. ExpertusIDT: 0000110458.
- [256] S. A. Cermak, C. Curtin, and L. G. Bandini. Food selectivity and sensory sensitivity in children with autism spectrum disorders. *J Am Diet Assoc*, 110(2):238–246, Feb 2010.
- [257] Brenda Legge. *Can't eat, won't eat: Dietary difficulties and autistic spectrum disorders*. Jessica Kingsley Publishers, 2002.
- [258] June Groden, Amy Diller, Margaret Bausman, Wayne Velicer, Gregory Norman, and Joseph Cautela. The development of a stress survey schedule for persons with autism and other developmental disabilities. *Journal of autism and developmental disorders*, 31:207–217, 2001.
- [259] Jill C. Fodstad and Johnny L. Matson. A comparison of feeding and mealtime problems in adults with intellectual disabilities with and without

- autism. *Journal of Developmental and Physical Disabilities*, 20(6):541–550, 2008. ISSN: 1573-3580.
- [260] Alison C. Herndon, Carolyn DiGuseppi, Susan L. Johnson, Jenn Leiferman, and Ann Reynolds. Does nutritional intake differ between children with autism spectrum disorders and children with typical development? *Journal of Autism and Developmental Disorders*, 39(2):212–222, 2009. ISSN: 1573-3432.
- [261] J. Wang, J. Pan, H. Chen, Y. Li, W. K. Amakye, J. Liang, B. Ma, X. Chu, L. Mao, and Z. Zhang. Fecal Short-Chain Fatty Acids Levels Were Not Associated With Autism Spectrum Disorders in Chinese Children: A Case-Control Study. *Front Neurosci*, 13:1216, 2019.
- [262] Adela Barcenilla, Susan E Pryde, Jennifer C Martin, Sylvia H Duncan, Colin S Stewart, Colin Henderson, and Harry J Flint. Phylogenetic relationships of butyrate-producing bacteria from the human gut. *Applied and environmental microbiology*, 66(4):1654–1661, 2000.
- [263] Susan E Pryde, Sylvia H Duncan, Georgina L Hold, Colin S Stewart, and Harry J Flint. The microbiology of butyrate formation in the human colon. *FEMS microbiology letters*, 217(2):133–139, 2002.
- [264] Venessa Eeckhaut, Filip Van Immerseel, Siska Croubels, Siegrid De Baere, Freddy Haesebrouck, Richard Ducatelle, Petra Louis, and Peter Vandamme. Butyrate production in phylogenetically diverse firmicutes isolated from the chicken caecum. *Microbial biotechnology*, 4(4):503–512, 2011.
- [265] Celine De Maesschalck, Filip Van Immerseel, Venessa Eeckhaut, Siegrid De Baere, Margo Cnockaert, Siska Croubels, Freddy Haesebrouck, Richard Ducatelle, and Peter Vandamme. *Faecalicoccus acidiformans* gen. nov., sp. nov., isolated from the chicken caecum, and reclassification of *Streptococcus pleomorphus* (Barnes et al. 1977), *Eubacterium bifforme* (Eggerth 1935) and *Eubacterium cylindroides* (Cato et al. 1974)

- as faecalicooccus pleomorphus comb. nov., holdemanella biformis gen. nov., comb. nov. and faecalitalea cylindroides gen. nov., comb. nov., respectively, within the family erysipelotrichaceae. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 64(Pt\_11):3877–3884, 2014.
- [266] Elias Hakalehto and Osmo Hänninen. Gaseous co<sub>2</sub> signal initiates growth of butyric-acid-producing clostridium butyricum in both pure culture and mixed cultures with lactobacillus brevis. *Canadian journal of microbiology*, 58(7):928–931, 2012.
- [267] Mehrbod Estaki, Jason Pither, Peter Baumeister, Jonathan P Little, Sandeep K Gill, Sanjoy Ghosh, Zahra Ahmadi-Vand, Katelyn R Marsden, and Deanna L Gibson. Cardiorespiratory fitness as a predictor of intestinal microbial diversity and distinct metagenomic functions. *Microbiome*, 4:1–13, 2016.
- [268] Xue Ding, Yiran Xu, Xiaoli Zhang, Lingling Zhang, Guiqin Duan, Chunlan Song, Zhenghua Li, Yanyan Yang, Yazhe Wang, Xiaoyang Wang, and Changlian Zhu. Gut microbiota changes in patients with autism spectrum disorders. *Journal of Psychiatric Research*, 129:149–159, 2020.
- [269] Serena Sanna, Natalie R van Zuydam, Anubha Mahajan, Alexander Kurilshikov, Arnau Vich Vila, Urmo Vösa, Zlatan Mujagic, Ad AM Masclee, Daisy MAE Jonkers, Marije Oosting, et al. Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases. *Nature genetics*, 51(4):600–605, 2019.
- [270] S. Nisar, A. A. Bhat, T. Masoodi, S. Hashem, S. Akhtar, T. A. Ali, S. Amjad, S. Chawla, P. Bagga, M. P. Frenneaux, R. Reddy, K. Fakhro, and M. Haris. Genetics of glutamate and its receptors in autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*, 27(5):2380–2392, May 2022.
- [271] V. L. Mahan. Neurointegrity and neurophysiology: astrocyte, gluta-

- mate, and carbon monoxide interactions. *Med Gas Res*, 9(1):24–45, 2019.
- [272] P Szatmari, AD Paterson, L Zwaigenbaum, W Roberts, J Brian, XQ Liu, JB Vincent, JL Skaug, AP Thompson, L Senman, et al. 2007. mapping autism risk loci using genetic linkage and chromosomal rearrangements. *Nat. Genet*, 39:319.
- [273] Suma Jacob, Camille W Brune, Judith A Badner, Katherine Ernstrom, Eric Courchesne, Catherine Lord, Bennett L Leventhal, Edwin H Cook, and Soo-Jeong Kim. Family-based association testing of glutamate transporter genes in autism. *Psychiatric genetics*, 21(4):212, 2011.
- [274] K. Nirmalkar, F. Qureshi, D. W. Kang, J. Hahn, J. B. Adams, and R. Krajmalnik-Brown. Shotgun Metagenomics Study Suggests Alteration in Sulfur Metabolism and Oxidative Stress in Children with Autism and Improvement after Microbiota Transfer Therapy. *Int J Mol Sci*, 23(21), Nov 2022.
- [275] Douglas A. Drossman, Lin Chang, John Kellow, Jan Tack, and William E. Whitehead. *Rome IV: Functional Gastrointestinal Disorders, Disorders of Gut-Brain Interaction*. Rome Foundation, 2016.

# Dodatek

Tabela 1: Różnice w obfitości mikrobiomu.

Takson	A vs. K	p	R vs. K	p	R vs. A	p
Adlercreutzia	0.785	2.97e-14	-0.387	1.26e-78	-1.17	6e-20
Alistipes	0.00564	0.934	-1.57	9.24e-257	-1.58	3.39e-45
Anaerostipes	0.209	0.00252	0.824	1.38e-241	0.615	2.1e-15
Bacteria (Domena*)	-0.556	4.75e-13	-2.83e-05	0.972	0.556	4.77e-13
Bacteroides	-0.343	1.51e-06	-1.89	1.93e-287	-1.55	2.44e-46
Bifidobacterium	0.151	0.028	0.592	2.1e-220	0.442	1.66e-09
Blautia	0.645	1.51e-16	1.12	1.57e-269	0.472	1.48e-10
Butyricoccus	0.823	2.35e-22	1.18	5.93e-246	0.36	5.18e-07
Butyricimonas	-0.0979	0.152	-2.07	9.18e-167	-1.97	2.12e-39
Clostridiales (Rząd*)	1.02	1.41e-24	1.04	2.02e-166	0.0173	0.799
Clostridiales (Rząd*)	0.525	3.41e-11	1.33	2.05e-171	0.801	7.8e-19
Clostridiales (Rząd*)	0.643	9.32e-15	0.96	1.59e-171	0.316	1.19e-05
Clostridiales (Rząd*)	0.351	8.38e-07	0.362	5.2e-204	0.0108	0.873
Clostridium.sensu.stricto.1	1.28	3.69e-33	2.02	1.97e-216	0.739	3.32e-18
Desulfovibrio	1.65	1.64e-05	2.34	2.29e-14	0.692	0.000505
Dorea	0.575	1.47e-13	0.927	8.42e-215	0.351	1.08e-06
Eggerthella	0.289	9.81e-05	0.0579	2.81e-49	-0.231	0.00134
Eubacterium..brachy.group	0.969	3.05e-15	0.161	1.28e-52	-0.808	3.72e-13
Eubacterium..xylanophilum.group	-0.587	9.45e-12	-0.465	1.36e-104	0.121	0.0782
Faecalibacterium	-0.461	4.04e-10	-0.129	8.15e-143	0.331	3.13e-06
Faecalitalea	-6.07	0.000123	-3.92	2.13e-08	2.14	0.000985
Family.XIII (Rodzina*)	0.105	0.143	0.0939	1.2e-22	-0.0113	0.87
Flavonifractor	0.0622	0.364	-0.912	8.44e-72	-0.975	8.83e-15
Fusicatenibacter	0.0383	0.573	0.736	6.56e-225	0.698	4.99e-18
Gelria	1.69	6.66e-09	-1.9	8.22e-26	-3.59	1.69e-11
Intestinibacter	0.346	1.44e-06	0.949	1.62e-217	0.602	1.59e-14
Lachnoclostridium	0.0345	0.612	-0.811	4.65e-227	-0.845	5.11e-23
Lachnospiraceae (Rodzina*)	0.208	0.00878	-1.14	7.64e-37	-1.35	3.73e-11
Lachnospiraceae (Rodzina*)	2.48	0.000738	1.44	1.53e-07	-1.03	0.00423
Lachnospiraceae (Rodzina*)	1.09	5.74e-08	0.195	8.71e-20	-0.897	3.17e-07
Lachnospiraceae (Rodzina*)	0.394	1.54e-07	0.734	1.97e-146	0.339	3.79e-06
Lachnospiraceae (Rodzina*)	-0.0208	0.759	0.308	2.42e-95	0.329	1.09e-05
Lachnospiraceae.UCG.004	-0.0274	0.686	-0.447	2.44e-145	-0.42	2.4e-08
Odoribacter	-0.611	1.42e-14	-1.86	1.26e-235	-1.24	9.01e-34
Oscillibacter	0.619	1.1e-11	0.0782	9.1e-57	-0.541	4.49e-10
Parabacteroides	-0.616	4.26e-15	-1.96	1.97e-258	-1.35	1.32e-38
Peptococcus	-0.28	0.0142	0	1	0.28	0.0142
Peptostreptococcaceae.Ambiguous_taxa (Rodzina*)	0.674	6.85e-16	1.13	1.99e-185	0.459	1.57e-09
Ruminococcaceae (Rodzina)	-0.235	0.000747	-0.41	5.92e-185	-0.175	0.011
Ruminococcaceae (Rodzina*)	0.27	0.000221	0.214	6.35e-83	-0.0561	0.41
Ruminococcaceae (Rodzina*)	0.201	0.00388	-0.487	9.45e-167	-0.687	8.63e-17
Ruminococcaceae (Rodzina*)	0.246	0.000487	0.457	2.11e-150	0.211	0.00261
Ruminococcaceae.Ambiguous_taxa (Rodzina*)	0.216	0.00203	0.309	2.27e-129	0.0928	0.174
Ruminococcaceae.UCG.013	0.795	6.28e-21	0.95	3.73e-220	0.155	0.0244
Ruminococcaceae.UCG.014	1.05	2.4e-24	-0.524	3.9e-132	-1.58	1.25e-34
Ruminococcus.1	-0.507	4.73e-11	-0.91	5.32e-187	-0.403	5.08e-08
Staphylococcus	-0.544	0.00396	0.0688	1.32e-06	0.613	0.0028
Subdoligranulum	-0.366	3.55e-07	0.261	8.27e-175	0.626	1.52e-15
Subdoligranulum	-0.379	6.48e-07	-0.88	1.19e-124	-0.501	7.38e-10
Terrisporobacter	0.839	2.78e-16	1.14	1.22e-109	0.301	5.29e-05
Turicibacter	-0.262	0.000398	0.494	5.1e-82	0.755	9.79e-14
Tyzzereella.3	1.28	1.38e-08	1.56	8.81e-28	0.271	0.00301
Veillonella	0.00815	0.904	-0.573	1.22e-110	-0.582	1.22e-11

K16792: aksD; methanogen homoacetylase large subunit [EC:4.2.1.114]	6.02	4.78	-1.24
K00392: sir; sulfite reductase (ferredoxin) [EC:1.8.7.1]	5.91	0.00	-5.91
K06981: ipk; isopentenyl phosphate kinase [EC:2.7.4.26]	5.82	3.40	-2.42
K01622: K01622; fructose 1,6-bisphosphate aldolase/phosphatase [EC:4.1.2.13 3.1.3.11]	5.82	3.40	-2.42
K12234: cofE, fbiB; coenzyme F420-0-L-glutamate ligase / coenzyme F420-1:gamma-L-glutamate ligase [EC:6.3.2.31 6.3.2.34]	5.82	3.40	-2.42
K08097: comA; phosphosulfolactate synthase [EC:4.4.1.19]	5.37	2.54	-2.83
K03795: cbtX; sirohydrochlorin cobaltochelatease [EC:4.99.1.3]	5.22	3.24	-1.97
K11781: cofH; FO synthase subunit 2 [EC:2.5.1.77]	5.20	2.22	-2.99
K11780: cofG; FO synthase subunit 1 [EC:2.5.1.77]	5.20	2.22	-2.99
K00150: gap2; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NAD(P)) [EC:1.2.1.59]	5.20	2.22	-2.99
K11260: fwdG; 4Fe-4S ferredoxin	4.81	1.09	-3.72
K07151: STT3; dolichyl-diphosphooligosaccharide---protein glycosyltransferase [EC:2.4.99.18]	2.67	2.45	-0.22
K08358: ttrB; tetrathionate reductase subunit B	2.38	1.28	-1.11
K03552: hjr; holliday junction resolvase Hjr [EC:3.1.22.4]	1.96	0.98	-0.99
K16793: aksE; methanogen homoacetylase small subunit [EC:4.2.1.114]	1.67	2.03	0.35
K10977: aksA; methanogen homocitrate synthase [EC:2.3.3.14 2.3.3.-]	1.67	2.03	0.35
K10550: alsC; D-allose transport system permease protein	1.59	1.25	-0.33
K13820: flir-flhB; flagellar biosynthetic protein Flir/FlhB	1.55	2.57	1.02
K12293: comB; competence factor transport accessory protein ComB	1.42	2.66	1.25
K01905: acdA; acetate---CoA ligase (ADP-forming) subunit alpha [EC:6.2.1.13]	1.36	0.17	-1.19
K15780: tiiS-hprT; bifunctional protein TiiS/HprT [EC:6.3.4.19 2.4.2.8]	1.23	1.01	-0.22
K13935: mdcH; malonate decarboxylase epsilon subunit [EC:2.3.1.39]	1.20	-0.64	-1.84
K02594: niV; homocitrate synthase NiV [EC:2.3.3.14]	1.20	1.89	0.70
K13275: isp; major intracellular serine protease [EC:3.4.21.-]	1.17	2.03	0.86
K05739: seaA; uncharacterized protein	1.17	2.03	0.86
K14166: ycnJ; copper transport protein	-7.27	8.05	15.32
K19084: braE, bceB; bacitracin transport system permease protein	-8.21	12.79	21.00
K11632: bceB, vraE; bacitracin transport system permease protein	-8.35	13.06	21.41
K11631: bceA, vraD; bacitracin transport system ATP-binding protein	-8.35	13.06	21.41
K19083: braD, bceA; bacitracin transport system ATP-binding protein	-8.35	13.06	21.41
K19080: vraG; cationic antimicrobial peptide transport system permease protein	-8.35	13.06	21.41
K19078: graR; two-component system, OmpR family, response regulator protein GraR	-8.35	13.06	21.41
K19077: graS; two-component system, OmpR family, sensor histidine kinase GraS [EC:2.7.13.3]	-8.35	13.06	21.41
K18941: arlR; two-component system, OmpR family, response regulator ArlR	-8.35	13.06	21.41
K18935: sdrM; MFS transporter, DHA2 family, multidrug resistance protein	-8.35	13.06	21.41
K18766: blaZ; beta-lactamase class A BlaZ [EC:3.5.2.6]	-8.35	13.06	21.41
K04478: sgtB; monofunctional glycosyltransferase [EC:2.4.1.129]	-8.35	13.06	21.41
K06347: kapB; kinase-associated protein B	-8.35	13.06	21.41
K07681: vraS; two-component system, NarL family, vancomycin resistance sensor histidine kinase VraS [EC:2.7.13.3]	-8.35	13.06	21.41
K07800: agrD; AgrD protein	-8.35	13.06	21.41
K08255: cdr; CoA-disulfide reductase [EC:1.8.1.14]	-8.35	13.06	21.41
K09813: hrtB; heme transport system permease protein	-8.35	13.06	21.41
K12552: pbbA; penicillin-binding protein 1 [EC:3.4.-.-]	-8.35	13.06	21.41
K12551: sgtA; monofunctional glycosyltransferase [EC:2.4.1.129]	-8.35	13.06	21.41
K09814: hrtA; heme transport system ATP-binding protein [EC:3.6.3.-]	-8.35	13.06	21.41
K10850: narT; MFS transporter, NNP family, putative nitrate transporter	-8.35	13.06	21.41
K11442: K11442; putative uridylyltransferase [EC:2.7.7.-]	-8.35	13.06	21.41
K11476: K11476, gntR; GntR family transcriptional regulator, gluconate operon transcriptional repressor	-8.35	13.06	21.41
K02352: drp35; lactonase [EC:3.1.1.-]	-8.54	11.70	20.24
K13531: adaB; methylated-DNA-[protein]-cysteine S-methyltransferase [EC:2.1.1.63]	-19.33	-10.35	8.98

ASD vs. Kontrola

Rodzeństwo vs. Kontrola

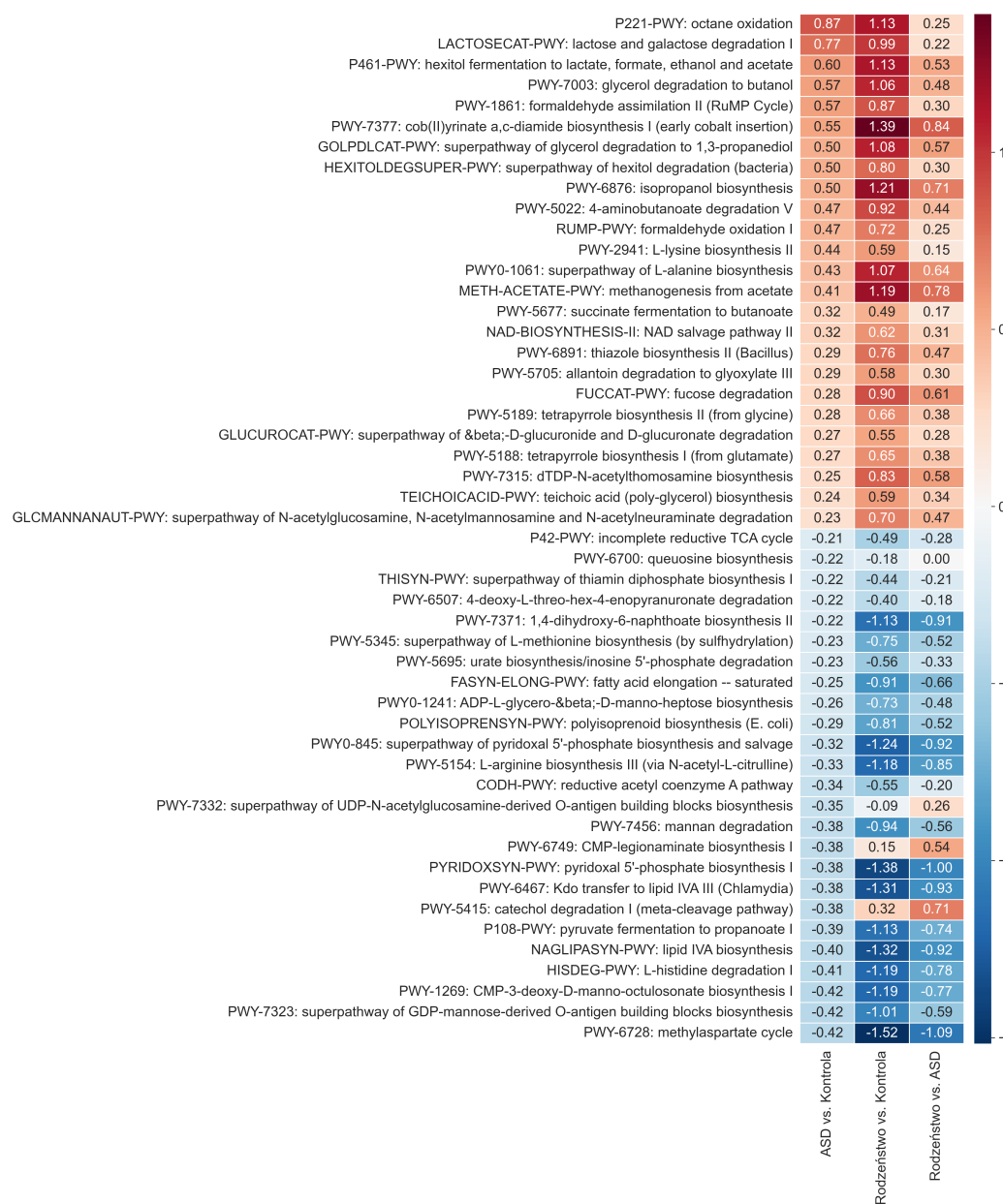
Rodzeństwo vs. ASD

Rysunek 1: Porównanie istotnych statystycznie, nieczułych na dodanie *pseudo-counts*, ortologów genów (KO, KEGG Orthology), różniących się co najmniej między jedną parą grup. Na rysunku zaprezentowano 50 ortologów o największym i najmniejszym efekcie, wszystkie  $p \leq 0,05$ , posortowane po malejącej logarytmicznej różnicy pomiędzy grupą ASD i grupą kontrolną.



Rysunek 2: Porównanie istotnych statystycznie, nieczułych na dodanie *pseudo-counts*, enzymów (EC, Enzyme Commission numbers), różniących się co najmniej między jedną parą grup. Na rysunku zaprezentowano 50 enzymów o największym i najmniejszym efekcie, wszystkie  $p \leq 0,05$ , posortowane po malejącej logarytmicznej różnicy pomiędzy grupą ASD i grupą kontrolną.





Rysunek 3: Porównanie istotnych statystycznie, nieczułych na dodanie *pseudo-counts*, ścieżek metabolicznych (Pathways), różniących się co najmniej między jedną parą grup. Na rysunku zaprezentowano 50 ścieżek metabolicznych o największym i najmniejszym efekcie, wszystkie  $p \leq 0,05$ , posortowane po malejącej logarytmicznej różnicy pomiędzy grupą ASD i grupą kontrolną.

## Lista publikacji

1. **Żebrowska, P.**, Łaczmańska, I., and Łaczmański, Ł. (2021). Future Directions in Reducing Gastrointestinal Disorders in Children With ASD Using Fecal Microbiota Transplantation. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 11, 630052, IF = 6,073.
2. Sheriff, A., Guri, I., **Żebrowska, P.**, Llopis-Hernandez, V., Brooks, I. R., Tekkela, S., Subramaniam, K., Gebrezgabher, R., Naso, G., Petrova, A., Balon, K., Onoufriadis, A., Kujawa, D., Kotulska, M., Newby, G., Łaczmański, Ł., Liu, D. R., McGrath, J. A., and Jacków, J. (2022). ABE8e adenine base editor precisely and efficiently corrects a recurrent COL7A1 nonsense mutation. *Scientific reports*, 12(1), 19643, IF = 4,997.
3. Bar, K., **Żebrowska, P.**, Łaczmański, Ł., and Sozańska, B. (2022). Airway Bacterial Biodiversity in Exhaled Breath Condensates of Asthmatic Children-Does It Differ from the Healthy Ones?. *Journal of clinical medicine*, 11(22), 6774, IF = 4,964
4. Pawelka, D., Laczmańska, I., Karpinski, P., Supplitt, S., Witkiewicz, W., Knychalski, B., Pelak, J., **Żebrowska, P.**, and Laczmański, Ł. (2022). Machine-learning-based Analysis Identifies miRNA Expression Profile for Diagnosis and Prediction of Colorectal Cancer: A Preliminary Study. *Cancer genomics and proteomics*, 19(4), 503–511, IF = 3,395.
5. Żak-Bochenek, A., Bajzert, J., Sambor, D., Siwińska, N., Szponar, B., Łaczmański, Ł., **Żebrowska, P.**, Czajkowska, A., Karczewski, M., and Chełmońska-Soyta, A. (2022). Homeostasis of the Intestinal Mucosa in Healthy Horses-Correlation between the Fecal Microbiome, Secretory Immunoglobulin A and Fecal Egg Count. *Animals : an open access journal from MDPI*, 12(22), 3094, IF = 3,000.
6. Misiak, B., Piotrowski, P., Cyran, A., Kowalski, K., Samochowiec, J.,

- 
- Jabłoński, M., Plichta, P., Łaczmański, Ł., **Żebrowska, P.**, Kujawa, D., Łoniewski, I., and Kaczmarczyk, M. (2023). Gut microbiota alterations in stable outpatients with schizophrenia: findings from a case-control study. *Acta neuropsychiatrica*, 35(3), 147–155, IF = 4, 513.
7. Kowalski, K., **Żebrowska-Różańska, P.**, Karpiński, P., Kujawa, D., Łaczmański, Ł., Samochowiec, J., Chęć, M., Piotrowski, P., and Misiak, B. (2023). Profiling gut microbiota signatures associated with the deficit subtype of schizophrenia: Findings from a case-control study. *Progress in neuro-psychopharmacology and biological psychiatry*, 127, 110834. Advance online publication, IF = 5, 201.
8. Karpiński, P., **Żebrowska-Różańska, P.**, Kujawa, D., Łaczmański, Ł., Samochowiec, J., Jabłoński, M., Plichta, P., Piotrowski, P., Bielawski, T., and Misiak, B. (2023). Gut microbiota alterations in schizophrenia might be related to stress exposure: Findings from the machine learning analysis. *Psychoneuroendocrinology*, 155, 106335, Advance online publication, IF = 3, 880.