

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Katarina D. Bojović

**POVEZANOST NEURORAZVOJNIH POREMEĆAJA SA
VARIJANTAMA GENA ZA LAKTAZU, HUMANI
ANTIGEN LEUKOCITA I RECEPTOR VITAMINA D, KAO
I SA PRISUSTVOM OPIOIDNIH PEPTIDA U URINU I
CREVNOM DISBIOZOM**

doktorska disertacija

Beograd, 2020

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Katarina D. Bojović

**THE ASSOCIATION OF NEURODEVELOPMENTAL
DISORDERS WITH GENETIC VARIANTS LINKED WITH
LACTOSE INTOLERANCE, HUMAN LEUKOCYTE
ANTIGEN AND VITAMIN D RECEPTOR, AS WELL AS
THE PRESENCE OF OPIOID PEPTIDES IN THE URINE
AND INTESTINAL DYSBIOSIS**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2020

Mentori:

dr Đurđica Ignjatović, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković"

Prof. dr Dušanka Savić Pavićević, redovni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Članovi komisije:

dr Maja Tolinački, viši naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Biljana Stanković, naučni saradnik, Univerzitet u Beogradu - Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo

dr Katarina Zeljić, vanredni profesor, Univerzitet u Beogradu - Biološki fakultet

Datum odbrane: _____2021. godine

IZJAVE ZAHVALNOSTI

Doktorska disertacija „Povezanost neurorazvojnih poremećaja sa varijantama gena za laktazu, humani antigen leukocita i receptor vitamina D, kao i sa prisustvom opioidnih peptida u urinu i crevnom disbiozom” urađena je pod mentorstvom dr Đurđice Ignjatović, višeg naučnog saradnika Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković” (IBISS), Univerziteta u Beogradu i Prof. dr Dušanke Savić Pavićević, redovnog profesora na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Ovom prilikom želim da izrazim svoju duboku zahvalnost Prof. dr Dušanki Savić Pavićević koja je među prvima razumela značaj ovog multidisciplinarnog projekta, kao i vezu između naučnog istraživanja i kliničke prakse, i koja je bez ikakvih predrasuda, širom otvorenih ruku, dočekala i podržala ovaj istraživački rad.

Iskrenu i ogromnu zahvalnost dugujem mom mentoru dr Đurđici Ignjatović, bez čije nesebične posvećenosti, znanja, zalaganja i iskustva ove doktorske teze ne bi ni bilo. Hvala na ukazanom poverenju, podršci, razumevanju, dragocenim savetima i smernicama. Velika je čast i privilegija imati tako kvalitetnu osobu i velikog stručnjaka za mentora.

Zahvaljujem Biološkom fakultetu, posebno Prof. dr Marini Stamenković Radak, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, na ukazanom poverenju i безусловnoj podršci.

Zahvalnost dugujem i Prof. dr Katarini Zeljić, vanrednom profesoru na Biološkom fakultetu na vremenu koje je posvetila čitanju ove doktorske disertacije i svim korisnim savetima i sugestijama.

Iskrenu zahvalnost dugujem dr Biljani Stanković, naučnom saradniku Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), Univerziteta u Beogradu, pod čijim neposrednim rukovođenjem su urađeni eksperimenti analize genetičkih markera netolerancije na laktozu i gluten, kao i efekta vitamina D kod dece sa neurorazvojnim poremećajima, kao i dr Maji Tolinački, višem naučnom saradniku IMGGI-a, Univerziteta u Beogradu, pod čijim neposrednim rukovođenjem su urađeni eksperimenti analize crvene mikrobiote.

Zahvalnost dugujem i dr Danijeli Vojnović-Milutinović, višem naučnom saradniku IBISS-a, na nesebičnoj pomoći u tehničkoj finalizaciji radova i statističkoj obradi podataka.

Dr Dijani Krstić Milošević, višem naučnom saradniku IBISS-a dugujem veliku zahvalnost što me je uvela u svet HPLC-a i velikodušno sa mnom podelila svoje znanje i iskustvo.

Takođe, zahvalila bih se dr Vanji Bugarski Stanojević, višem naučnom saradniku IBISS-a na velikoj pomoći pri kupljanju kontrolnih uzoraka.

Dr Gorani Stamenković, naučnom savetniku IBISS-a i dr Branki Zukić, višem naučnom saradniku IMGGI-a dugujem posebnu zahvalnost, jer su od samog početka verovala u ovaj istraživački rad i svojim savetima i zalaganjem omogućile da se on realizuje.

Zahvaljujem Ordinaciji iz psihijatrije “Dr Selaković”, pre svega dr Milijani Selaković, čiji je klinički rad još davno postavio temelje za nastanak ovog istraživanja, kao i Sretenu Selaković, na podršci i razumevanju, kao i pomoći pri prikupljanju uzoraka.

Zahvaljujem svim ljudima koji su pružali podršku i na bilo koji način učestvovali i doprineli izradi ove teze.

Beskrajno se zahvaljujem svojoj porodici, svom suprugu Jevremu i ćerki Ivi, koji su verovali u mene i iskreno i svakodnevno me podržavali.

Povezanost neurorazvojnih poremećaja sa varijantama gena za laktazu, humani antigen leukocita i receptor vitamina D, kao i sa prisustvom opioidnih peptida u urinu i crevnom disbiozom

Sažetak:

Nutritivne deficijencije, gastrointestinalne smetnje i intolerancija na hranu često su opisivane kod dece sa neurorazvojnim poremećajima (*eng.* neurodevelopmental disorder, NDD). Pretpostavljeno je da opioidni molekuli, poreklom od proteina kazeina i glutena mogu dovesti do nastanka nekih neuropsihijatrijskih simptoma. S obzirom da su do sada u literaturi povišene koncentracije ovih peptida u urinu opisivane kod pacijenata sa autizmom, ali ne i drugim formama NDD, prvi cilj ove teze bio je proveriti da li kod NDD pacijenata postoji povišen nivo kazo- i gluten egzorfinu u urinu metodom tačne hromatografije visokih performansi. Kako je glavni preduslov da navedeni peptidi dospeju u cirkulaciju povećana propustljivost crevnog epitela, istraživanje je dalje bilo usmereno na ispitivanje učestalosti genetičkih varijanti asociranih sa celijačnom bolešću (*HLA-DQ*) i laktoznom intolerancijom (*LCT-13910C>T*) metodama baziranim na PCR analizi i ispitivanju promena u sastavu crevne mikrobiote metodom gel elektroforeze u denaturišućem gradijentu. Kod većine pacijenata sa NDD detektovan je nedostatak vitamina D, zbog čega je metodama PCR analize ispitivana učestalost genetičke varijante *VDR FokI*, koja je u literaturi dovođena u vezu sa autizmom.

Rezultati istraživanja pokazali su povećanu koncentraciju analiziranih peptida u urinu NDD pacijenata koja nije bila asocirana sa genetičkim markerima za celijačnu bolest i laktoznu intoleranciju. Značajno viša učestalost genotipa *VDR FokI CC* ("FF") je pokazana kod pacijenata sa dečijim autizmom u odnosu na zdrave kontrole, ali i ostale grupe NDD pacijenata. U grupi pacijenata uočena je manja zastupljenost i smanjen diverzitet bakterija koje čine normalnu crevnu mikrobiotu, kao i veća zastupljenost potencijalno patogenih bakterija.

Ključne reči: neurorazvojni poremećaji, autizam, egzorfini, laktozna intolerancija, celijačna bolest, vitamin D deficijencija, crevna disbioza

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Genetika

The association of neurodevelopmental disorders with genetic variants linked with lactose intolerance, human leukocyte antigen and vitamin D receptor, as well as the presence of opioid peptides in the urine and intestinal dysbiosis

Abstract:

Nutritional deficiencies, gastrointestinal disturbances, and food intolerance are frequently observed in children with neurodevelopmental disorders (NDD). It was hypothesized that opioid molecules, originally derived from the protein of casein and gluten, may induce some of the neuropsychiatric symptoms. Since the elevated levels of these peptides in the urine have so far been described in medical literature in patients with autism, but not in other forms of NDD, the first goal of this thesis was to check whether the NDD patients have elevated levels of casein- and gluten exorphins in the urine using the method of High performance liquid chromatography. Since increased intestinal permeability is the main precondition for the presence of these peptides in circulation, the research was further directed to examine the frequency of genetic variants associated with celiac disease (HLA-DQ) and lactose intolerance (LCT-13910C) methods based on PCR analysis and to examine changes in the composition of gut microbiota. Given that the vitamin D deficiency was detected in most of the NDD patients, the frequency of the genetic variant *VDR* FokI, which has been linked to autism in the medical literature, was examined by methods based on PCR analysis.

Results indicated that increased concentrations of analyzed peptides observed in NDD patients were not associated with genetic predictors for celiac disease or lactose intolerance. A significantly higher incidence of the FokI CC (FF) genotype in patients with childhood autism was noted compared to healthy control and other groups of NDD patients. Within the patients group a lower incidence and diversity of common commensal bacteria was noted, as well as the higher incidence of potentially harmful bacteria.

Key words: neurodevelopmental disorders, autism, exorphins, genotyping, lactose intolerance, celiac disease, vitamin D deficiency, gut microbiota dysbiosis

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Genetics

Sadržaj

1. Uvod	1
1.1. Neurorazvojni poremećaji	3
1.1.1. Autizam	3
1.2. Etiologija neurorazvojnih poremećaja	4
1.2.1. Etiologija autizma	4
1.2.1.1. Genetička osnova autizma	4
1.2.1.2. Geni kandidati za nastanak autizma	5
1.2.1.3. Retke monogenske forme autizma - <i>de novo</i> mutacije	5
1.2.1.4. Genetičke varijante često zastupljene u populaciji asociirane sa nastankom autizma	5
1.2.1.5. Etiološka heterogenost autizma	5
1.2.2. Sredinski faktori u nastanku neurorazvojnih poremećaja	6
1.3. Komorbidna stanja neurorazvojnih poremećaja	6
1.3.1. Gastrointestinalne smetnje kod dece sa neurorazvojnim poremećajima	7
1.4. Opioidna teorija nastanka autizma	8
1.5. Celijačna bolest, osetljivost na gluten i laktozna intolerancija kao mogući uzroci povećane propustljivosti crevnog epitela u neurorazvojnim poremećajima	9
1.6. Disbioza kao mogući uzrok povećane propustljivosti crevnog epitela u neurorazvojnim poremećajima	10
1.6.1. Masne kiseline kratkih lanaca – bakterijski metaboliti sa plejotropnim efektima na nivou creva i CNS-a	11
1.7. Nutritivne deficijencije, deficijencija vitamina D i varijante u genu <i>VDR</i> u neurorazvojnim poremećajima	11
2. Ciljevi istraživanja	13
3. Materijal i metode	17
3.1. Ispitanici	19
3.2. Analiza nivoa vitamina D (25-OH) u serumu i testovi intolerancije na hranu	20
3.3. Priprema urina i analiza egzorfina tečnom hromatografijom visokih performansi	21
3.4. Izolacija DNK na koloni	22
3.5. Genotipizacija genetičkih varijanti asociiranih sa celijačnom bolesti i laktoznom intolerancijom, kao i varijante FokI u genu za receptor vitamina D	22
3.5.1. Identifikacija varijanti gena <i>HLA</i>	23
3.5.2. Identifikacija varijante - 13910 C> T uzvodno od gena za laktazu	25

3.5.3. Identifikacija varijante FokI u genu za receptor vitamina D	26
3.5.4. Analiza ispitivanih genetičkih varijanti agaroznom elektroforezom	28
3.6. Analiza specifičnosti u sastavu crevne mikrobiote dece sa neurorazvojnim poremećajima	28
3.6.1. Izolacija ukupne DNK iz fecesa	28
3.6.2. Umnožavanje DNK fragmenata PCR reakcijom	29
3.6.3. Elektroforeza molekula DNK	30
3.6.4. Gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu	30
3.6.5. Sekvenciranje dela gena za 16S rDNK i analiza dobijene sekvence	30
3.6.6. Priprema uzoraka fecesa za HPLC analizu	31
3.6.7. Pravljenje standardne krive za sirćetnu, propionsku i buternu kiselinu	32
3.6.8. HPLC – UV analiza masnih kiselina kratkog lanca iz fecesa	32
3.7. Statistička analiza rezultata	33
4. Rezultati	35
4.1. Demografski i klinički opis ispitanika uključenih u studiju	37
4.2. Ukupni sadržaj peptida i prisutnost opioidnih peptida u uzorcima urina	38
4.3. HLA-DQ genotipizacija	40
4.4. LCT-13910C> T i VDR FokI genotipizacija	41
4.5. Analiza Dice koeficijenta sličnosti crevne mikrobiote pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima i kontrolne grupe ispitanika	42
4.6. Poređenje diverziteta crevne mikrobiote	46
4.7. Identifikacija ključnih bakterijskih vrsta asociranih sa neurorazvojnim poremećajima	47
4.7.1. Veća učestalost uslovno patogenih bakterija u fekalnoj mikrobioti pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima	48
4.7.2. Manja zastupljenost bakterija roda Bifidobacterium, mlečnokiselinskih bakterija i bakterija koje proizvode buternu kiselinu u fekalnoj mikrobioti pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima	50
4.8. Prikaz slučaja	51
4.9. Analiza masnih kiselina kratkog lanca u uzorcima fecesa pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima i zdrave dece	51
5. Diskusija	55
5.1. Prisustvo povišenih nivoa opioidnih peptida u uzorcima urina dece sa neurorazvojnim poremećajima	57
5.2. HLA-DQ varijante povezane sa celijačnom bolešću kod dece sa neurorazvojnim poremećajima	60

5.3. Varijante asocirane sa laktoznom intolerancijom kod dece sa neurorazvojnim poremećajima	61
5.4. Intolerancija na hranu kod dece sa neurorazvojnim poremećajima	61
5.5. Specifičnosti sastava crevne mikrobiote dece sa neurorazvojnim poremećajima	62
5.5.1. Povećana učestalost bakterijskih vrsta srodnih sa rodom <i>Clostridium</i> kod dece sa neurorazvojnim poremećajima	62
5.5.2. Smanjen diverzitet mlečnokiselinskih bakterija, bakterija roda <i>Bifidobacterium</i> , kao i bakterija koje proizvode buternu kiselinu kod dece sa neurorazvojnim poremećajima	63
5.6. Nivo masnih kiselina kratkih lanaca u uzorcima fecesa dece sa neurorazvojnim poremećajima	64
5.7. Sličnosti bakterijskih profila između grupa pacijenata sa sličnom kliničkom slikom	65
5.8. Genetička varijanta FokI u genu <i>VDR</i> kod dece sa neurorazvojnim poremećajima	66
6. Zaključci	69
7. Literatura	73

1. ADHD - poremećaj pažnje sa hiperaktivnosti
2. ASD - autistični spektar poremećaja
3. BBB - krvno-moždana barijera
4. BB - bifidobakterije
5. BDNF - moždani neurotrofni faktor
6. BK - buterna kiselina
7. CB - celijačna bolest
8. CHA - dečiji autizam
9. CM - kazomorfin
10. CM3 - goveđi β -kazomorfin 1-3
11. CM4 - goveđi β -kazomorfin 1-4
12. CM4am - goveđi β -kazomorfin 1-4 amid
13. CNS - centralni nervni sistem
14. DGGE - gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu
15. DSMV - dijagnostički i statistički priručnik američkog psihijatrijskog udruženja, peto izdanje
16. ERLD - poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora
17. GE - gluten egzorfin
18. GEA5 - gluten egzorfin A5
19. GEB5 - gluten egzorfin B5
20. GEC - gluten egzorfin C
21. GI - gastrointestinalni
22. HCL - hlorovodonična kiselina
23. HLA - humani leukocitni antigen
24. HPLC - tečna hromatografija visokih performansi
25. IBS - sindrom iritabilnog creva
26. ICD - 10 - međunarodna klasifikacija bolesti, deseto izdanje
27. ICV - Intracerebroventrikularni
28. LB - laktobacili
29. LI - laktozna intolerancija
30. MSDD - mešoviti razvojni poremećaj
31. NDD - neurorazvojni poremećaji
32. PCR-RFLP - lančana reakcija polimeraze sa analizom polimorfizma dužine restrikcionih fragmenata
33. PCR-SSP - lančana reakcija polimeraze sa prajmerima specifičnim za sekvencu
34. PDD-NOS - pervazivni razvojni poremećaj, nespecifičan
35. PPK - propionska kiselina
36. SCFA - masne kiseline kratkog lanca
37. VDR - receptor vitamina D

1. Uvod

1.1. Neurorazvojni poremećaji

Neurorazvojni poremećaji (*eng.* neurodevelopmental disorders - NDD) (DSM-5) (Swedo et al., 2013) ili poremećaji psihološkog razvoja (ICD-10) (WHO, 2015) predstavljaju grupu razvojnih poremećaja čija se klinička slika ispoljava u ranom detinjstvu, obično pre polaska u školu. Ovi poremećaji mogu zahvatiti jednu ili više sfera razvoja (govorno-jezičku, senzomotornu, socioemocionalnu). Prema ICD-10 (*eng.* International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems 10th Revision) ovoj grupi pripadaju poremećaji ekspresivnog i receptivnog govora (razvojna disfazija), motorički poremećaji, poremećaji školskih veština čitanja, pisanja i računanja, mešoviti specifični poremećaji razvoja, drugi poremećaji psihološkog razvoja, nespecifični poremećaji psihološkog razvoja i grupa pervazivnih razvojnih poremećaja u okviru kojih se nalaze: dečiji autizam, atipični autizam, Aspergerov sindrom, pervazivni razvojni poremećaj nespecifičan, drugi dezintegrativni poremećaji detinjstva, hiperkinetički poremećaj sa mentalnom retardacijom i stereotipnim pokretima, drugi pervazivni poremećaj razvoja i Retov sindrom. Iako je klasifikacija ovih poremećaja suštinski ista u oba priručnika, prema poslednjem izdanju dijagnostičkog i statističkog priručnika američkog psihijatrijskog udruženja (*eng.* American Psychiatric Association's Diagnostic and Statistical Manual, Fifth Edition - DSM-5) grupi neurorazvojnih poremećaja pripadaju poremećaji komunikacije, razvojni intelektualni poremećaji, autistični spektar poremećaja, poremećaj pažnje sa hiperaktivnošću, specifični poremećaji učenja i motorički poremećaji. Dok prema DSM-5 priručniku poremećaj pažnje sa hiperaktivnošću (*eng.* attention deficit hyperactivity disorder – ADHD) pripada grupi neurorazvojnih poremećaja, u okviru ICD-10 ovaj poremećaj pripada grupi poremećaja ponašanja i emocija sa početkom u detinjstvu i adolescenciji i vodi se pod dijagnozom hiperkinetički poremećaj. Hiperkinetički poremećaj (ICD-10) karakteriše rani početak (obično u prvih pet godina života) nedostatak istrajnosti u aktivnostima koje zahtevaju kognitivno angažovanje, tendencija prelaska sa jedne aktivnosti na drugu bez okončanja bilo koje, dezorganizacija i preterana aktivnost (WHO, 1992). Ekvivalent ADHD u ICD-10 je poremećaj aktivnosti i pažnje koji se izdvaja kao podgrupa u okviru grupe hiperkinetički poremećaji. Jedina značajna razlika u definisanju ovih poremećaja u okviru oba priručnika jeste ta što u okviru ICD-10 dijagnoza hiperkinetički poremećaj isključuje pervazivni razvojni poremećaj, dok DSM-5 dozvoljava komorbidnu dijagnozu autističnog spektra poremećaja i pomera starosnu granicu za postavljanje dijagnoze na 7 do 12 godina (Doernberg et al., 2016).

1.1.1. Autizam

Autizam je najteža i najsloženija forma razvojnih poremećaja koja se prema ICD-10 manifestuje trijadom simptoma: 1) kvalitativnim oštećenjem verbalne i neverbalne komunikacije 2) kvalitativnim oštećenjem socijalne interakcije i 3) repetitivnim i stereotipnim obrascima ponašanja i interesovanja. Pored ovih specifičnih dijagnostičkih obeležja, deca sa autizmom često ispoljavaju i niz drugih, nespecifičnih problema kao što su strahovi, poremećaj u spavanju i ishrani, agresivno ponašanje. Prema DSM-5 u dijagnostičke kriterijume za autizam se ubraja i senzorna disfunkcija tako da se prema ovom priručniku smatra da autizam obuhvata dijadu simptoma: 1) poremećaj u razvoju govora i jezika sa poremećajem komunikacije i 2) repetitivni i stereotipni obrasci ponašanja i interesovanja sa senzornom disfunkcijom. Za razliku od ICD-10 gde u okviru pervazivnih razvojnih poremećaja postoje različiti podtipovi autizma (dečiji autizam, atipični autizam, Aspergerov sindrom, Retov sindrom...), kod DSM-5 su svi ovi podtipovi, osim Retovog sindroma, svedeni u jednu dijagnozu - autistični spektar poremećaja. Iako je DSM-5 najnovija verzija dijagnostičkog priručnika, i dalje se dosta primenjuje ICD-10 kako zbog veće specifičnosti i osetljivosti u vezi sa postavljanjem dijagnoze autizma, tako i zbog obezbeđivanja produktivnijeg plana rehabilitacije (Doernberg et al., 2016). U kliničkoj praksi se pri postavljanju dijagnoze neurorazvojnih poremećaja ili poremećaja psihološkog razvoja trenutno koriste oba priručnika. Primena novog priručnika ICD-11, koji je objavljen u junu 2018, bi trebala da obezbedi prevazilaženje postojećih nedoslednosti u naučnoj literaturi, kao i da pruži jedinstven medicinski sistem za dijagnostiku, prognozu i lečenje

neurorazvojnih poremećaja, koji će se istovremeno oslanjati na klasifikacioni sistem DSM-5 i koristiti fenomenološke opise i podtipove ICD-10 (Doernberg et al., 2016).

1.2. Etiologija neurorazvojnih poremećaja

Smatra se da većina neurorazvojnih poremećaja nastaje kao rezultat zajedničkog delovanja genetičkih i sredinskih faktora. Većina istraživanja odnosi se na ispitivanje mehanizama nastanka autizma i ADHD-a, dok su biološki aspekti manje ozbiljnih razvojnih poremećaja, kao što su teškoće u učenju ili poremećaji razvoja govora i jezika, slabo ispitivani do sada.

1.2.1. Etiologija autizma

Autizam je sindrom sa brojnim negenetičkim i genetičkim uzročnicima (Muhle et al., 2004). U samo oko 10% slučajeva autizma moguće je identifikovati etiološke, genetičke ili sredinske faktore (sindromski autizam), dok kod preostalih 90% slučajeva ne postoji jasan uzrok (nesindromski autizam). Ovim idiopatskim slučajevima se nakon isključivanja genetičkih i sredinskih faktora i upotrebom specifičnih procena pripisuje multifaktorijalna etiologija (Veenstra-Vanderweele et al., 2004). Dosadašnja istraživanja su pokazala da brojni genetički faktori učestvuju u formiranju genetičke predispozicije autizma, koja zajedno sa sredinskim faktorima dovodi do formiranja kliničke slike autizma (Fett-Conte et al., 2013).

1.2.1.1. Genetička osnova autizma

Pretpostavljeno je da je idiopatski autizam (bez poznatog uzroka) nasledni poremećaj (Muhle et al., 2004). Porodične studije i studije blizanaca ukazuju na visoku stopu pojavljivanja autizma kod monozigotnih blizanaca (60-90%), dok je kod dizigotnih znatno manja (oko 5-31%), kao i da je veći rizik za nasleđivanje kod rođaka prvog stepena srodstva (Bailey et al., 1995; Hallmayer et al., 2011; Rosenberg et al., 2009). Postoji značajno veći rizik za nastanak autizma kod dece roditelja sa autizmom ili onih sa porodičnom istorijom psihijatrijskih problema. Depresija i poremećaji ličnosti učestaliji su kod majki dece sa autizmom nego kod majki dece urednog razvoja (Constantino et al., 2010; Daniels et al., 2008). Ustanovljena je i asocijacija između šizofrenije i bipolarnih poremećaja kod roditelja ili braće i sestara i povećanog rizika za nastanak autizma (Sullivan et al., 2012).

Neke osobe iz različitih generacija u okviru iste porodice mogu ispoljavati diskretna oštećenja u kognitivnom, jezičkom ili socijalnom funkcionisanju, što se smatra poremećajima koji pripadaju širem fenotipu autističnog spektara. Rođaci prvog stepena srodstva osoba sa autizmom imaju povećanu učestalost kognitivnih poteškoća i poremećaja u ponašanju asociраних sa autizmom, kao što su socijalna ili jezička disfunkcija, u odnosu na prevalenciju ovih poremećaja u opštoj populaciji (Losh et al., 2009). Ovo se naziva "graničnim fenotipom" i uključuje restriktivna, reptitivna ponašanja i diskretne deficite u socijalnom funkcionisanju ili jezičku disfunkciju (Pickles et al., 2000; Warren et al., 2012). Kašnjenje u govorno-jezičkom razvoju uočeno je u značajnom procentu kod braće i sestara autističnih ispitanika (Ben-Yizhak et al., 2011; Gamliel et al., 2007), kao i deficit socijalnih veština sličan onom kakav se sreće kod pacijenata sa autizmom (Constantino et al., 2006).

Ova različitost u fenotipskom ispoljavanju autističnog poremećaja i psihijatrijskih manifestacija u porodicama pacijenata sa autizmom, ukazuje da na nastanak autizma utiče više različitih gena i genetičkih faktora koji svojim specifičnim kombinacijama i interakcijama u individualnom genomu dovode do široke fenotipske varijabilnosti kliničke slike autizma (Goldberg et al., 2005; Pickles et al., 2000).

1.2.1.2. Geni kandidati za nastanak autizma

Do sada je identifikovano nekoliko značajnih genetičkih faktora asociranih sa autizmom, dok je identitet i broj ostalih gena koji su uključeni u nastanak autizma i dalje nepoznat.

Mnogi lokusi u genomu dovedeni su u vezu sa etiologijom autističnog ponašanja. Međutim, procenjuje se da svi asocirani lokusi zajedno doprinose nastanku autizma kod manje od 1% slučajeva (Fett-Conte et al., 2013). Velike kolaborativne studije utvrdile su postojanje asocijacije između rizika za nastanak autizma sa varijacijama u genomu kao što su genetičke varijante često zastupljene u populaciji, novonastale genetičke varijante, varijante broja genskih kopija i retke nasledne varijante (Robinson et al., 2015).

Do sada je u literaturi navedeno više od 200 gena kandidata za autizam. Prema Swanwick i sar. (2011) (Swanwick et al., 2011) oni se mogu klasifikovati u 4 kategorije:

- 1) geni povezani sa retkim monogenским formama autizma (*NRXN1* i *SHANK3*);
- 2) geni povezani sa sindromima čije fenotipske manifestacije uključuju i simptome autizma kao što su Fragilni X i Retov sindrom (*FMRI* i *MECP2*);
- 3) geni koji sadrže varijante često zastupljene u populaciji asocirane sa malim, dodatnim rizikom za autizam, identifikovani na slučajevima nepoznate etiologije (*MET* i *GABRB1*);
- 4) geni asocirani sa mehanizmima nastanka autizma koji nisu uključeni u drugim kategorijama (*CASDP2* i *ALOX5AP*).

Geni koji pripadaju prvim dvema kategorijama su najjače asocirani sa patogenezom autizma (El-Fishawy et al., 2010).

1.2.1.3. Retke monogenske forme autizma - *de novo* mutacije

U prosečno 5-20% slučajeva pacijenata sa autizmom prisutne su *de novo* mutacije (O'Roak et al., 2011). Skorija istraživanja ukazala su da se većina ovih *de novo* mutacija, za koje se smatra da su odgovorne za nastanak nekih slučajeva autizma, nalaze u genima koji kodiraju ili regulišu ekspresiju gena uključenih u strukturu ili funkcionisanje sinapsi kao što su *NLGN3/4* (Neurologin 3/4), *SHANK3* (SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3), *NRXN1* (neurexin 1) (Daoud et al., 2009; Gauthier et al., 2009). Godine roditelja, pre svega očeva, u vreme začeća su asocirane sa povećanim rizikom za nastanak *de novo* mutacija i sa nastankom autizma (Croen et al., 2007). Prekonceptualna izloženost sredinskim faktorima rizika, kao što su npr. teški metali, takođe može doprineti nastanku *de novo* mutacija i povećanom riziku za nastanak autizma (Kinney et al., 2010).

1.2.1.4. Genetičke varijante često zastupljene u populaciji asocirane sa nastankom autizma

Slično drugim poremećajima sa genetičkom predispozicijom, smatra se da autizam odgovara modelu u kome brojne genetičke varijante često zastupljene u populaciji, svaka pojedinačno sa malim do umerenim efektom, interaguju jedna sa drugom i u nekim slučajevima sa sredinskim faktorima, dovodeći do nastanka genetički kompleksnog stanja, autizma (Abrahams et al., 2008). Pojedine genetičke varijante često prisutne u populaciji povećavaju verovatnoću za autizam, ali same po sebi nisu dovoljne da bi bile uzrok nastanka autizma. Ove varijante doprinose prisutnim varijacijama u kogniciji i ponašanju kod zdravih članova porodice, dok interakcija više njih može dovesti do nastanka autizma. Ovaj model objašnjava prisustvo nekih "graničnih" osobina kod ne-autističnih rođaka prvog stepena srodstva.

1.2.1.5. Etiološka heterogenost autizma

Najočigledniji generalni zaključak na osnovu objavljenih genetičkih studija je postojanje etiološke heterogenosti autizma. Različito ispoljavanje kliničkih slika kod monozigotnih blizanaca koji imaju identični genetički materijal ukazuje na to da i drugi faktori utiču na fenotip (Muhle et al., 2004). Specifične mutacije, delecije ili jedinstveni set genetičkih varijanti mogu da utiču na sklonost

ka autizmu, ali čak i tada sredinski faktori mogu da menjaju fenotipsko ispoljavanje ovog poremećaja (Cop et al., 2015). Razlike u fenotipovima monozigotnih blizanaca ukazuju na izloženost različitim pre-, peri- i postnatalnim sredinskim faktorima, tj. da višestruki uticaji na osetljivu genetičku osnovu i nasumični stresovi iz okoline mogu dovesti do pune ekspresije poremećaja.

1.2.2. Sredinski faktori u nastanku neurorazvojnih poremećaja

Opšte je prihvaćeno da je za nastanak autizma kao i ostalih formi NDD pored genetičke osnove neophodno i delovanje različitih sredinskih faktora koji deluju kao okidači dovodeći do pune ekspresije simptoma ovih poremećaja.

Mnoge studije ukazuju da infekcije majke u toku trudnoće, naročito virusne infekcije izazvane citomegalovirusom i virusom rubeole u prvom trimestru (Chess et al., 1978; Slawinski et al., 2018), predstavljaju značajni prenatalni faktor rizika za nastanak autizma i drugih neurorazvojnih poremećaja (Guinchat et al., 2012). Povećanom riziku za nastanak autizma doprinose i alergijska i autoimunska oboljenja majke u toku trudnoće (Lyall et al., 2014). Smatra se da povećana proizvodnja inflamatornih citokina kao posledica aktivacije imunskog odgovora majke verovatno predstavlja ključni mehanizam koji povezuje infekciju majke sa promenama u razvoju mozga fetusa i predispozicijom za mentalna oboljenja deteta kasnije u životu (Ratnayake et al., 2013; Zaretsky et al., 2004). Opšte je poznato i prihvaćeno da neuro-inflamacija i neuro-imunske abnormalnosti predstavljaju značajan faktor u patogenezi autizma (Siniscalco et al., 2018).

Konзумiranje određenih lekova (antikonvulzivni lekovi) u toku trudnoće, naročito u prvom trimestru (Christensen et al., 2013), konzumiranja alkohola i cigareta (Aronson et al., 1997; Hultman et al., 2002), intoksikacije teškim metalima, poput žive i olova (Mendola et al., 2002), kao i prenatalne nutritivne deficijencije, prevashodno vitamina D, čija deficijencija u prenatalnom i ranom postnatalnom periodu može negativno uticati na razvoj centralnog nervnog sistema (Cannell, 2008), predstavljaju značajne prenatalne faktore rizika za nastanak neurorazvojnih poremećaja.

Perinatalni faktori rizika (od 28. nedelje trudnoće do 6. dana nakon rođenja) koji se mogu dovesti u vezu sa nastankom autizma su mala telesna težina na rođenju, nizak Apgar skor u prvih pet minuta nakon rođenja, prevremeno rođenje deteta (Finegan et al., 1979; Hultman et al., 2002), asfiksija i respiratorni distress sindrom (Froehlich-Santino et al., 2014).

Od neonatalnih faktora rizika (od 7.-28. dana nakon rođenja) pominju se respiratorne infekcije, naročito one komplikovane upalom srednjeg uha (Hadjkacem et al., 2016). Primećeno je da deca sa autizmom znatno češće oboljevaju od upale srednjeg uha nego njihovi zdravi vršnjaci, kao i da deca kod koje su se upale uha razvile u prvoj godini života, odmah po rođenju ili nakon nekoliko meseci, imaju težu kliničku sliku od one dece kod koje su se upale javile u kasnijoj životnoj dobi (Konstantareas et al., 1987). Kako su ove infekcije najčešće praćene antibiotskom terapijom, primećena je i značajno veća upotreba oralnih antibiotika kod dece sa autizmom (Niehus et al., 2006).

Pored genetičkih i sredinskih faktora rizika koji se dovode u vezu sa nastankom autizma i drugih neurorazvojnih poremećaja, sve više se govori o komorbidnim stanjima kao potencijalnim faktorima rizika za nastanak ovih poremećaja.

1.3. Komorbidna stanja neurorazvojnih poremećaja

Komorbidna stanja značajno su češća kod dece sa autizmom u odnosu na opštu populaciju. U njih spadaju neuropsihijatrijski poremećaji kao što su anksioznost i bipolarni poremećaji (Lichtenstein et al., 2010; Munesue et al., 2008; Simonoff et al., 2008), neki retki genetički sindromi (Retov sindrom, fenilketonurija, Smith-Lemli-Opitz sindrom, tuberozna skleroza, sindrom fragilnog X hromozoma) (Robert et al., 2017) i epilepsija. Epilepsija se javlja kod čak 40% pacijenata sa autizmom, dok se procenjuje da je subklinička epileptiformna aktivnost prisutna kod još većeg broja pacijenata koji ne pokazuju kliničke znake epilepsije (Jensen, 2011).

Pored ovih komorbidnih stanja zapažena je i visoka učestalost ekcema, alergija, respiratornih infekcija, upala srednjeg uha i gastrointestinalnih problema kod dece i odraslih sa postavljenom

dijagnozom autizma (Adams et al., 2011; Konstantareas et al., 1987; Theoharides et al., 2016; Tonacci et al., 2017).

Različite alergijske manifestacije uključujući astmu, atopijske bolesti (atopijski dermatitis, alergijski rinitis, alergijska bronhijalna astma, spastični bronhitis, mukozni kolitis) i intoleranciju na neke namirnice (Chen et al., 2013; Khakzad et al., 2012; Theoharides et al., 2016; Xu et al., 2018) su česte kod pacijenata sa autizmom. Uočeno je da deca koja pate od alergija u prvoj godini života pokazuju niža socioemocionalna postignuća u kasnijoj dobi u poređenju sa decom koja nisu imala alergije (Meldrum et al., 2012). Predloženo je da alergije na hranu uzrokuju gastrointestinalne tegobe i pojavu različitih psiholoških, psihijatrijskih i neuroloških stanja (de Theije et al., 2014a) uključujući autizam (Jyonouchi, 2009) i ADHD (Pelsser et al., 2009). Eksperimenti na životinjama pokazali su da alergija na hranu može dovesti do nekih promena u ponašanju koje su prisutne kod pacijenata sa autizmom poput smanjene socijalne interakcije, oštećenja prostorne memorije i pojave stereotipnog ponašanja (de Theije et al., 2014b). U literaturi se mogu pronaći podaci da su serumski nivoi antitela (IgA, IgG, IgM, IgE), pre svega na kravlje mleko, povišeni kod dece sa autizmom u odnosu na grupu zdrave dece (Lucarelli et al., 1995). U grupi dece sa autizmom takođe je uočeno prisustvo većeg titra antitela na glijadin u odnosu na kontrolne ispitanike (Lau et al., 2013). Ukazano je na postojanje pozitivne koleracije između težine alergijskih manifestacija i nivoa funkcionalnosti osoba sa autizmom (Jyonouchi, 2010; Mostafa et al., 2008; Shibata et al., 2013), kao i da isključivanje pojedinih namirnica iz ishrane (poput glutena, mleka i mlečnih proizvoda) dovodi do poboljšanja simptoma autizma (Pennesi et al., 2012).

Posebna pažnja u poslednje vreme posvećuje se gastrointestinalnim (GI) smetnjama kao komorbidnim stanjima autizma, s obzirom na njihovu značajnu učestalost kod dece i odraslih sa autizmom (Buie et al., 2010; Coury et al., 2012).

1.3.1. Gastrointestinalne smetnje kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

U grupi pacijenata sa NDD često su prisutne GI smetnje kao što su dijareja, opstipacija, nadimanje, refluks i povraćanje (Gorrindo et al., 2012; Ibrahim et al., 2009; Molloy et al., 2003; Nikolov et al., 2009; Valicenti-McDermott et al., 2006; Wang et al., 2011b). Visoka učestalost GI smetnji u grupi dece sa autizmom, kao i zajednički početak ispoljavanja simptoma gastrointestinalnih i neurorazvojnih poremećaja, vodi ka pretpostavci da gastrointestinalna patologija može imati udela u nastanku NDD (Sekirov et al., 2010).

Učestalost dijareja i kolitisa kod dece sa autizmom i razvojnim teškoćama je sedam puta veća nego kod dece tipičnog razvoja (Chaidez et al., 2014). Primećeno je da postoji snažna korelacija između težine simptoma autizma i GI poremećaja (Adams et al., 2011; Gorrindo et al., 2012; Wang et al., 2011b). Zaključeno je da GI smetnje mogu uticati na probleme sa snom, senzornu disfunkciju, pojavu impulsivnog, agresivnog ponašanja kao i anksioznosti (Chaidez et al., 2014; Mazefsky et al., 2014; Mazurek et al., 2013; Peters et al., 2014; Prosperi et al., 2017; Schurman et al., 2012).

U poslednje vreme sve je prihvaćenija ideja da postoji veza između GI trakta i CNS-a (*eng.* gut brain axis) i da nju čini dvosmerni sistem komunikacije koji se ostvaruje kroz neuralne puteve (centralni, autonomni i enterički), neuroendokrini i neuroimunski sistem (Grenham et al., 2011). Jedna od teorija koja donekle objašnjava vezu između GI trakta i CNS-a je opioidna teorija. Ovom teorijom predložen je jedan od potencijalnih molekularnih mehanizama nastanka neurorazvojnih poremećaja, pre svega autizma.

1.4. Opioidna teorija nastanka autizma

Opioidnu teoriju nastanka autizma prvi put je opisao Panksepp 1979. godine koji je pretpostavio da osobe sa autizmom imaju povišen nivo endogenih opioidnih peptida na nivou CNS-a (Panksepp, 1979). Sprovodeći eksperimente na životinjama, on je u svojoj neurohemijskoj teoriji nastanka autizma izneo pretpostavku o postojanju veze između povišenog nivoa endogenih opioida i nekih simptoma autizma kao što su izmenjen osećaj za bol, smanjena potreba za socijalizacijom i insistiranju na istovetnosti (Panksepp, 1979). Nešto kasnije, na osnovu nalaza povišenih nivoa peptida u urinu dece sa autizmom, Reichelt KL je postulirao teoriju prema kojoj egzogeni opioidni molekuli, kazo-egzorfini (u literaturi češći pod nazivom kazomorfini, *eng.* casomorphin - CM) i gluten egzorfini (*eng.* gluten exorphin - GE), nastali nekompletnim varenjem proteina poreklom iz mleka (kazeina) i žitarica (glutena), dospevaju putem cirkulacije do CNS-a i tamo, reagujući sa opioidnim receptorima, izazivaju simptome kao što su stereotipije, hiperaktivnost i kašnjenje u govorno-jezičkom razvoju (Reichelt et al., 2012). Opioidna teorija potvrđena je rezultatima istraživanja na životinjama. Pokazano je da intraperitonealni tretman pacova sa CM 1-7 dovodi do uznemirenosti i hiperaktivnog ponašanja koje je praćeno povlačenjem iz socijalnih kontakata i burnim odbrambenim reakcijama (Sun et al., 1999a). Ovakva ponašanja se mogu dovesti u vezu sa simptomima koji su često opisivani kod dece sa autizmom. Takođe, pomenuti tretman ovim kazomorfinom utiče i na regulaciju spavanja (Taira et al., 1990) i izaziva analgetički efekat (Sun et al., 1999a). Intracerebroventrikularni tretman (ICV) CM-5 pokazuje umeren analgetički efekat (Matthies et al., 1984), što se može dovesti u vezu sa povišenim pragom za bol kod osoba sa autizmom. Takođe pokazano je da ICV primena gliadin egzorfina A5 ima antinociceptivni (analgetički) efekat, kao i da oralna primena ovog egzorfina utiče i na centralni i periferni nervni sistem dovodeći do pojave teškoća u učenju i anksioznog ponašanja (Takahashi et al., 2000). Potvrđeno je i da kazomorfini imaju značajan i dugoročan efekat na adaptabilno ponašanje i učenje kod mladih pacova (Dubynin et al., 2008).

Na osnovu ove teorije došlo je do razvoja novog terapijskog pristupa u rehabilitaciji dece sa autizmom koji se bazira na primeni dijetete bez glutena i kazeina (*eng.* gluten free casein free - GFCCF). Pozitivni efekti ovakvih dijetarnih intervencija evidentirani su na nivou različitih oblasti funkcionisanja osoba sa autizmom: jezik i komunikacija (Knivsberg et al., 2002; Knivsberg et al., 1999; Lucarelli et al., 1995; Whiteley et al., 2010), pažnja i koncentracija (Knivsberg et al., 2002; Lucarelli et al., 1995; Whiteley et al., 2010), socijalna interakcija (Knivsberg et al., 2002; Whiteley et al., 2010), samopovređivanje i izmenjena percepcija bola (Lucarelli et al., 1995; Whiteley et al., 2010), repetitivno, stereotipno ponašanje (Knivsberg et al., 2002; Whiteley et al., 2010) gruba motorika i koordinacija pokreta (Knivsberg et al., 2002), hiperaktivnost (Whiteley et al., 2010).

Povišen nivo peptida u cirkulaciji može biti posledica nekompletnog varenja proteina do kog može doći zbog smanjene aktivnosti peptidaza, bilo usled njihove inhibicije, genetičkog deficita ili nedostatka kofaktora (Bouras et al., 1996; Reichelt et al., 2009). Pored toga, smatra se da povećana propustljivost creva, tzv. sindrom propusnih creva (*eng.* leaky gut syndrome), koja je opisana u proseku kod četvrtine do trećine dece sa autizmom (Boukthir et al., 2010; D'Eufemia et al., 1996), može biti jedan od razloga povišene koncentracije opioidnih peptida u cirkulaciji. Povećana propustljivost creva je verovatno posledica oštećenja crevnog epitela koje je primećeno kod pacijenata sa autizmom (Horvath et al., 2002; Torrente et al., 2002). Do sada nije potpuno razjašnjeno da li je povećana propustljivost crevnog epitela u ovoj grupi pacijenata urođeni deficit crevne barijere ili je rezultat inflamacije crevne mukoze.

Kako je povišen nivo opioidnih peptida pronađen i u urinu pacijenata sa celijačnom bolesti pretpostavljeno je da inflamacija creva kakva se sreće kod ovih pacijenata može dovesti do smanjenja aktivnosti litičkih enzima i povećane propustljivosti crevnog epitela (Reichelt et al., 1998).

1.5. Celijačna bolest, osetljivost na gluten i laktozna intolerancija kao mogući uzroci povećane propustljivosti crevnog epitela u neurorazvojnim poremećajima

Visoka učestalost GI smetnji kod dece sa autizmom podstakla je istraživače na ispitivanje potencijalne veze između celijačne bolesti (CB) ili glutenske senzitivnosti i autizma. Podaci dobijeni u dosadašnjim istraživanjima koji su se odnosili na imunski odgovor na gluten u autizmu, kao i veze između autizma i CB, su često bili nedosledni i protivrečni.

Povezanost CB i/ili osetljivosti na gluten sa neurološkim i psihijatrijskim simptomima uočena je još pre 40 godina (Bender, 1953; Dohan, 1966). Podaci iz radova ukazuju da se kod 22% pacijenata sa CB primećuju neke neurološke ili psihijatrijske disfunkcije (Briani et al., 2008), kao i da 57% pacijenata sa neurološkim simptomima imaju antiglijadinska antitela u cirkulaciji (Hadjivassiliou et al., 1998). Neurološka i psihijatrijska stanja uočena kod imunološki posredovanog odgovora na gluten uključuju epilepsiju, ataksiju, cerebelarnu degeneraciju, anksioznost, poremećaj pažnje i hiperaktivnosti, depresiju i autizam (Jackson et al., 2012).

CB je imunološki posredovano oboljenje koje je prisutno kod 1% opšte populacije i koje se manifestuje GI smetnjama kao što su dijareja, povraćanje, umor, gubitak težine (Genuis et al., 2010). Dijagnoza se potvrđuje serološkim testiranjem antitela na tkivne transglutaminaze (tTG) i antiglijadinska antitela (AGA), histološkim nalazom sluznice tankog creva koji ukazuje na postojanje atrofije crevnih resica, kao i ispitivanjem genetičke osnove poremećaja koja uključuje varijante gena za sistem humanih leukocitnih antigena (*eng.* human leukocyte antigen – HLA) *HLA-DQ2* ili *HLA-DQ8*. HLA II obuhvata kompleks proteina na površini antigen prezentujućih ćelija (makrofagi, dendritske ćelije i B limfociti), čija je primarna uloga aktiviranje imunskog odgovora vezivanjem peptidnih fragmenata i njihove prezentacije T ćelijama (Wieczorek et al., 2017). Kod CB ove antigen prezentujuće ćelije eksprimiraju HLA DQ2 i DQ8 proteine koji pokazuju visok afinitet za glijadinske peptidne fragmente (Molberg et al., 1998). Vezivanjem ovih fragmeta i njihovom prezentacijom T ćelijama dolazi do aktiviranja imunskog i humoralnog odgovora koje vodi nastanku atrofije crevnih resica i razvoja CB (Megiorni et al., 2012). Više od 90% pacijenata sa CB eksprimira protein DQ2, dok je kod ostalih pacijenata prisutan DQ8 protein (Tollefsen et al., 2006). Ovi proteini kodirani su visokopolimorfnim genima *HLA-DQA1* i *HLA-DQB1* koji se nalaze u lokusu glavnog kompleksa histokompatibilnosti *MHC II* (*eng.* major histocompatibility complex - MHC) (Thorsby, 2009). Protein HLA-DQ2 kodiran je alelima *DQA1*05* i *DQB1*02* koji se mogu naslediti zajedno na istom hromozomu (*cis* konfiguracija) u okviru haplotipa *DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02* ili odvojeno na dva homologa hromozoma (*trans* konfiguracija), najčešće u okviru haplotipova *DRB1*11/12/13-DQA1*05-DQB1*03:01* i *DRB1*07-DQA1*02-DQB1*02* (Cizmarevic et al., 2015). Utvrđeno je da među nosiocima HLA-DQ2, homozigoti za alel *DQB1*02* imaju povećan rizik za razvoj CB (Clerget-Darpoux et al., 1994; Stankovic et al., 2014; Vader et al., 2003). Protein HLA-DQ8 kodiran je alelima *DQA1*03* i *DQB1*03:02* u okviru haplotipa *DRB1*04-DQA1*03-DQB1*03:02* (Karell et al., 2003). Za sve navedene rizične alele pacijenti mogu biti homozigoti ili heterozigoti, a jačina upalnog odgovora zavisi od broja alela asociiranih sa rizikom za nastanak CB (Cizmarevic et al., 2015).

Osetljivost na gluten je stanje koje se manifestuje pojavom GI smetnji kao što su bolovi u stomaku, nadutost, dijareja ili opstipacija, nakon konzumacije namirnica koje sadrže gluten i smatra se da je ovaj oblik nepodnošenja glutena dosta češći u odnosu na CB (Catassi et al., 2013). Osobe kod kojih je prisutna osetljivost na gluten nemaju atrofiju crevnih resica, kao ni antitela specifična za CB (Hadjivassiliou et al., 2004), dok su haplotipovi tipični za CB detekovani kod 50% ovih osoba (Bizzaro et al., 2012).

Kod nekih pacijenata sa dijagnostikovanom CB nisu prisutni simptomi CB i tada se govori o asimptomatskoj CB. Smatra se da klasične simptome CB kod ovih pacijenata maskira antinociceptivni efekat opioidnih peptida poreklom iz glutena, gluten egzorfina (Pruimboom et al., 2015).

CB može biti pogrešno dijagnostikovana kao laktozna intolerancija (LI) zbog sličnih GI simptoma (Samasca et al., 2011). Takođe ova dva GI poremećaja se često javljaju zajedno. Registrovana je visoka prevalenca CB kod pacijenata sa laktoznom intolerancijom (Ojetti et al.,

2005), ali i visoka učestalost laktozne intolerancije kod odojčadi sa tipičnim simptomima CB (Radlovic et al., 2009).

LI nastaje kao posledica smanjene aktivnosti enzima laktaze u sluznici tankog creva i karakteriše se GI simptomima kao što su dijareja, bol u stomaku, nadustost i mučnina (Matthews et al., 2005). LI može biti razvojna, kongenitalna, primarna i sekundarna. Razvojna LI se javlja kod prevremeno rođene dece kao posledica nezrelosti GI sistema. Kongenitalna LI je veoma retka i nastaje kao posledica mutacije u genu za laktazu. Gen za laktazu *LCT* nalazi se na dugom kraku 2. hromozoma na poziciji 21 (2q21) (Arroyo et al., 2010; Swallow, 2003). Uzvodna genetička varijanta *LCT*-13910 C>T, nalazi se u regulatornoj sekvenci gena za laktazu (Arroyo et al., 2010; Swallow, 2003). Pisustvo alela C na ovoj poziciji povezano je sa smanjenjem (Rasinpera et al., 2006), a varijante T sa očuvanjem ekspresije *LCT* gena (Swallow, 2003). Primarna laktozna intolerancija (ili adultna hipolaktazija) se javlja kao posledica postepenog smanjivanja ekspresije gena za laktazu sa početkom oko 2. godine života, da bi se u odrasloj dobi smanjila za 90%, kod osoba koje su homozigotni nosioci varijante sa C alelom (C/C varijanta) (Scaro, 2016). Osobe koje su heterozigotni nosioci ove varijante (C/T), imaju smanjenu laktaznu aktivnost, ali ne u meri u kojoj i homozigotni nosioci, i podložniji su laktoznoj intoleranciji u slučaju stresa ili nekog GI poremećaja (Matthews et al., 2005), dok su nosioci T/T varijante tolerantni na laktozu tokom celog života (laktaza perzistencija) (Swallow, 2003). Sekundarna laktozna intolerancija se javlja kao posledica oštećenja sluznice crevnog zida nastale kao posledica nekog GI oboljenja (Scaro, 2016). Kod odojčadi sa klinički jasnim simptomima CB, često dolazi do sekundarne LI kao posledica inflamacije tankog creva (Radlovic et al., 2009).

Na osnovu biopsije creva dece sa autizmom, zaključeno je da je smanjena enzimaska aktivnost laktaze, laktazna deficijencija, česta kod pacijenata sa autizmom i da može doprineti razvoju GI smetnji i nekih oblika izmenjenog ponašanja (Kushak et al., 2011). Nije poznato da li ova deficijencija kod autističnih pacijenata nastaje kao razvojna, primarna (genetički determinisana) ili sekundarna.

1.6. Disbioza kao mogući uzrok povećane propustljivosti crevnog epitela u neurorazvojnim poremećajima

Jedan od mogućih uzroka povećane propustljivost crevnog epitela koja je primećena kod pacijenata sa autizmom (de Magistris et al., 2010; Fiorentino et al., 2016; Quigley, 2016), mogao bi da bude inflamacija creva nastala usled poremećaja sastava crevne mikrobiote - disbioze (Brandl et al., 2015). Crevna mikrobiota predstavlja kompleksnu ekološku zajednicu mikroorganizama, koji žive u simbiozi sa svojim domaćinom i ima ključnu ulogu u očuvanju zdravlja. Mikrobiota i metabolički produkti enteričkih organizama imaju jak i dinamičan uticaj na funkcionisanje domaćina. Ona ima važnu ulogu u zaštiti od patogena (Ubeda et al., 2017), indukciji i modulaciji imunskog sistema (Maranduba et al., 2015), metabolizmu nutrijenata i lekova (Rowland et al., 2018; Wilkinson et al., 2018) sintezi vitamina i esencijalnih aminokiselina (Morowitz et al., 2011), ali i u modulaciji ekspresije gena u mnogim organima, među kojima su GI sistem i mozak (Camp et al., 2014; Carabotti et al., 2015). Promene u sastavu crevne mikrobiote mogu doprineti nastanku nekih bolesti kao što su alergije, gojaznost, dijabetes, Kronova bolest, sindrom iritabilnog creva (*eng.* irritable bowel syndrome - IBS) (Sekirov et al., 2010), ali i nekih neuropsihijatrijskih oboljenja kao što su depresija, bipolarni poremećaj i autizam (Mangiola et al., 2016).

Kako je primećeno da su GI simptomi česti kod dece sa autizmom, pretpostavljeno je da bi ovi poremećaji na nivou GI sistema mogli biti uzrokovani promenama u sastavu crevne mikrobiote (de Theije et al., 2011). Poslednjih godina veliki broj studija pokazao je da kod dece sa autizmom postoji disbalans u sastavu crevne mikrobiote. Rezultati nekoliko istraživanja pokazali su da je kod dece sa autizmom prisutan prekomeran rast uslovno patogenih bakterija kao što su pripadnici roda *Clostridium* (De Angelis et al., 2013; Finegold et al., 2002; Parracho et al., 2005; Song et al., 2004a) kao i nekih drugih bakterija među kojima su *Sutterella spp.* (Williams et al., 2012) i bakterija roda *Desulfovibrio* (De Angelis et al., 2013; Finegold et al., 2012). S druge strane, često je u uzorcima stolice dece sa autizmom zabeležen i disbalans u sastavu bakterija koje čine normalnu crevnu floru,

u vidu smanjenog broja bakterija roda *Bifidobacterium* (De Angelis et al., 2013; Finegold et al., 2010) i veće zastupljenosti bakterija roda *Lactobacillus* (Adams et al., 2011). Iako se podaci među studijama razlikuju, ukazujući na postojanje individualnih razlika u sastavu crevne mikrobiote, generalno je prihvaćeno da je kod pacijenata sa autizmom smanjen diverzitet crevne mikrobiote kao i narušen balans bakterija koje čine normalnu crevnu floru (Krajmalnik-Brown et al., 2015).

Veliki broj istraživanja ukazao je na značajnu ulogu mikrobiote na razvoj i funkcionisanje nervnog sistema (Bercik et al., 2011a; Gareau et al., 2011; Neufeld et al., 2011; Sudo et al., 2004), kao i na uske vremenske intervale u ranom postnatalnom periodu u kojima je za pravilan razvoj nervnog sistema neophodna pravilna kolonizacija creva. Zaključeno je da promene u sastavu mikrobiote u ranim fazama kolonizacije i razvoja mikrobiote mogu da utiču na razvoj CNS-a i imaju trajne posledice na neuralne funkcije i na kasnije mentalno zdravlje (Borre et al., 2014).

Promene u sastavu crevne mikrobiote dovode do promena na nivou različitih bakterijskih metabolita preko kojih se ostvaruje komunikacija između crevne mikrobiote i CNS-a. Regulacija funkcije CNS-a može se ostvarivati preko ograničavanja dostupnosti prekursora serotonina-triptofana (O'Mahony et al., 2015), preko neuroaktivnih ili imunomodulatornih molekula poput dopamina, gama-aminobuterne kiseline (*eng.* γ -aminobutyric acid - GABA), histamina i acetilholina, koje proizvode pojedine bakterije (Rogers et al., 2016) ili masnih kiselina kratkog lanca.

1.6.1. Masne kiseline kratkih lanaca - bakterijski metaboliti sa plejotropnim efektima na nivou creva i CNS-a

Masne kiseline kratkih lanaca (*eng.* short chain fatty acids - SCFA) su bioaktivni molekuli koji nastaju bakterijskom fermentacijom ugljenih hidrata. SCFA su zasićene alifatične organske kiseline koje se sastoje od jednog do šest ugljenika od kojih su sirćetna, propionska i buterna kiselina najzastupljenije (95%) (den Besten et al., 2013). One mogu uticati na brojne funkcije kako na nivou creva, tako i na nivou CNS-a.

Buterna kiselina (BK) ima širok spektar uticaja na intestinalnu funkciju (Hamer et al., 2008). Ona je koristan izvor energije za enterocite u debelom crevu i utiče na njihovu proliferaciju, diferencijaciju i apoptozu, ima antiinflamatorni efekat, ojačava odbrambenu barijeru creva tako što povećava produkciju mucina i smanjuje propustljivost crevnog epitela povećavajući ekspresiju proteina čvrstih veza (*eng.* "tight junction" proteins) među epitelijalnim ćelijama creva (Van Immerseel et al., 2010). Na nivou CNS-a, buterna kiselina doprinosi očuvanju stabilnosti krvno-moždane barijere (Braniste et al., 2014) i očuvanju moždanih funkcija kroz stimulaciju ekspresije grupe gena koji su uključeni u preživljavanje, plastičnost i regeneraciju neurona (Bourassa et al., 2016). Smanjena proizvodnja buterne kiseline mogla bi biti uzrok povećane propustljivost crevne i krvno-moždane barijere koja je opisivana kod dece sa autizmom (Fiorentino et al., 2016).

S druge strane, intraventrikularni tretman propionskom kiselinom (PPK) kod pacova izaziva poremećaje na nivou motorike, repetitivno ponašanje, elektrografske promene na mozgu, poremećaje kognicije, rigidnost u učenju i poremećaje socijalnih interakcija kao i neurohemijske promene koje se vezuju za autizam (Macfabe, 2012).

PPK i BK deluju na nivou epigenoma i na taj način utiču na promenu ekspresije gena unutar neurotransmiterskih sistema, nervnih adhezionih molekula, molekula uključenih u inflamatorne procese, oksidativni stres, lipidni metabolizam i mitohondrijsku funkciju (Nankova et al., 2014). Kako su promene u svim ovim sistemima karakteristične za autizam, jedna od pretpostavki je da i SCFA mogu imati važnu ulogu u patogenezi autizma (Macfabe, 2012).

1.7. Nutritivne deficijencije, deficijencija vitamina D i varijante u genu *VDR* u neurorazvojnim poremećajima

Inflamacija gornjih delova creva kakva se sreće kod pacijenata sa celijačnom bolesti, laktoznom intolerancijom ili disbiozom dovodi do poremećaja apsorptivnih mehanizama i narušavanja optimalnog unosa hranljivih materija. Nedostatak nutritijenata može negativno da utiče

na različite biološke procese neophodne za pravilno funkcionisanje CNS-a (Genuis et al., 2010). Jasan primer malapsorpcionog sindroma sa upadljivom disfunkcijom CNS-a jeste slučaj dečaka sa CB koji je pogrešno dijagnostikovao kao autizam (Genuis et al., 2010).

Nutritivne deficijencije su često opisivane kod pacijenata sa autizmom (Hyman, 2008) uključujući i upadljivu deficijenciju (vrednosti manje od 10 ng/ml (25nmol/l)) glavne cirkulišuće forme vitamina D – kalcidiola (25(OH)D₃) (Cannell et al., 2013; Mostafa et al., 2012). Kako je ekspresija brojnih gena regulisana vitaminom D, na osnovu rezultata istraživanja na životinjama zaključeno je da prolazna deficijencija vitamina D u toku trudnoće dovodi do smanjenja ekspresije mnogih gena uključenih u neuralnu strukturu i signalnu transmisiju, uzrokujući neurorazvojne poremećaje (Eyles et al., 2009). Takođe, pokazano je i da nedostatak vitamina D u ranom razvoju utiče na diferencijaciju neurona, aksonalnu povezanost, dopaminsku ontogenezu i formiranje moždanih struktura i funkcija (Eyles et al., 2013) usled čega dolazi do promena u strukturi i funkcionisanju mozga koje su opisane kod pacijenata sa autizmom (Schmidt et al., 2015). Stoga se nedostatak vitamina D smatra jednim od faktora rizika za nastanak neurorazvojnih poremećaja (Eyles et al., 2009).

Metabolizam vitamina D je kompleksan višestepeni proces, u kome učestvuju produkti različitih gena koji su uključeni u preciznu regulaciju metabolizma vitamina D. Uzimajući u obzir da izvesne genske varijante u tim genima mogu da imaju efekat na put sinteze aktivne forme vitamina D, postavlja se pitanje da li bi prisustvo gorepomenutih genskih varijanti, doprinoseći deficijenciji vitamina D, posledično mogle biti povezane sa rizikom za razvoj autizma. Iz tih razloga bilo bi značajno ispitati varijante u genima koji kodiraju proteine uključene u metabolizam vitamina D kako bi se bolje razumeo mehanizam nastanka autizma (Cannell, 2008).

U literaturi je često proučavan receptor vitamina D (*eng.* vitamin D receptor-VDR), član familije nukleusnih receptora koji pripada transkripcionim faktorima i utiče na transkripciju velikog broja različitih gena (Hewison et al., 2003; Verlinden et al., 2001). VDR ima značajnu ulogu u razvoju CNS-a i eksprimira se u različitim delovima mozga vrlo rano u embrionalnom razvoju (Eyles et al., 2005; McGrath et al., 2001). VDR se aktivira vezivanjem kalcitriola (aktivne forme vitamina D (1,25 (OH) D₃)) čime, nakon dimerizacije sa retinoid X receptorom (RXR), postaje aktivan transkripcioni faktor koji inteeaguje sa kofaktorima i tako utiče na ekspresiju brojnih gena koji sadrže elemente odgovora (*eng.* vitamin D responsive elements) (Dusso et al., 2005). Na taj način vitamin D aktivira ili suprimira ekspresiju ciljnih gena.

Gen koji kodira receptor za vitamin D (*VDR*) nalazi se na hromozomu 12q13.1. Do sada je opisano nekoliko varijanti u ovom genu koje su povezane sa autizmom – TaqI rs731236, BsmI rs1544410 i FokI rs2228570 (Coskun et al., 2016). Na osnovu poređenja nivoa kalcidiola u serumu kod pacijenata sa autizmom koji nose različite *VDR* genetičke varijante, utvrđeno je postojanje asocijacije FokI varijante i metabolizma vitamina D kod dece sa autizmom (Coskun et al., 2016).

Postoji mali broj podataka koji se odnose na ispitivanje *VDR* genetičkih varijanti kod autizma (Coskun et al., 2016; Schmidt et al., 2015) dok ove genetičke varijante nisu ispitivane kod dece sa nekom drugom formom neurorazvojnih poremećaja.

2. Ciljevi istraživanja

Cilj ove doktorske disertacije je da ispita genetičke varijante povezane sa intolerancijom na gluten, laktoznom intolerancijom i izmenjenom transkriptivnom aktivnošću receptora za vitamin D, kao i da ispita prisustvo crevne disbioze i opioidnih peptida u urinu dece sa razvojnim poremećajima.

Definisani su sledeći konkretni ciljevi:

1. Ispitivanje prisutva kazo- i gluten egzorfinu u urinu pacijenata i u kontrolnoj grupi;
2. Ispitivanje učestalosti varijanti gena u *HLA-DQ* lokusu (*DQA1*, *DQB1* i *DRB1* aleli) asociranih sa nastankom celijačne bolesti u grupi pacijenata i kontrolnoj grupi i ispitivanje njihove korelacije sa prisustvom kazo- i gluten egzorfinu u urinu;
3. Ispitivanje učestalosti genetičke varijante *LCT* -13910C>T, asocirane sa laktoznom intolerancijom, u grupi pacijenata i kontrolnoj grupi i ispitivanje njihove korelacije sa prisustvom kazo- i gluten egzorfinu u urinu;
4. Ispitivanje učestalosti genetičke varijante *VDR* FokI rs2228570, asocirane sa izmenjenom transkriptivnom aktivnošću ovog receptora, u grupi pacijenata i kontrolnoj grupi i ispitivanje asocijacije *VDR* FokI genotipa sa nivoom metabolički aktivne forme vitamina D – kalcidiola u serumu pacijenata;
5. Ispitivanje sastava crevne mikrobiote dece sa neurorazvojn timer poremećajima u odnosu na zdravu populaciju, njenog diverziteta i određivanje ključnih bakterija koje su u manjoj ili većoj meri zastupljene kod pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu dece;
6. Ispitivanje da li neki od testiranih faktora imaju potencijal dijagnostičkih, terapijskih ili prognostičkih biomarkera;

Očekuje se da će ova studija doprineti boljem razumevanju odnosa između analiziranih faktora i pojave neurorazvojn timer poremećaja kod dece sa ciljem efikasn timer diskriminacije između podtipova ove heterogene grupe poremećaja kao i unapređenja dijagnostičkih i terapijskih pristupa.

3. Materijal i metode

3.1. Ispitanici

U istraživanju je učestvovalo 100 dece iz Srbije i Hrvatske sa postavljenom nekom od dijagnoza neurorazvojnih poremećaja: 36 pacijenta sa dijagnozom mešovitog razvojnog poremećaja (*eng.* mixed specific developmental disorder - MSDD, F83.0), 4 sa dijagnozom poremećaj pažnje sa hiperaktivnosti (*eng.* attention deficit hyperactivity disorder ADHD, F90.0), 16 sa dijagnozom poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora (*eng.* expressive and receptive language disorder - ERLD, F80.1 et F80.2), 21 sa dijagnozom dečiji autizam (*eng.* childhood autism - CHA, F84), i 23 sa dijagnozom pervazivni razvojni poremećaj, nespecifičan (*eng.* pervasive developmental disorder-not otherwise specified - PDD-NOS, F84.9). Dijagnoza je postavljena od strane lekara specijaliste, dečijeg neuropsihijatra, a na osnovu opservacije kliničke slike i anamnestičkih podataka. Pri postavljanju dijagnoze lekar se služio ICD-10 kriterijumima za dijagnostikovanje mentalnih oboljenja. Uzorkom je bilo obuhvaćeno 79 dečaka i 21 devojčica (razlika u zastupljenosti polova sa odnosom 3,7) uzrasta između 18 meseci i 11 godina (medijana 4). Većina dece iz uzorka pacijenata je od ranog uzrasta bila podvrgnuta nekom obliku rehabilitacionog tretmana i imala je jednu ili više GI smetnji kao što su – dijareja, konstipacija, kašaste stolice, primese nesvarene hrane u stolici. Informacije o GI smetnjama dobijene su na osnovu intervju sa roditeljima u okviru koga je iskusni kliničar postavljao ciljana pitanja koja se odnose na prisustvo GI smetnji. Pored toga podaci su dobijeni i na osnovu rezultata obavljenih analiza stolica u kliničkim laboratorijama. Kontrolnu grupu činilo je 95 zdravih ispitanika, koji nisu imala nikakve GI smetnje, uključujući i odsustvo razvojnih smetnji, i koja nisu bila u srodstvu sa ispitanicima iz grupe pacijenata. Ovu grupu činilo je 73 dečaka i 22 devojčice (razlika u zastupljenosti polova sa odnosom 3,3) uzrasta između 1 i 15, 8 godina (medijana 5).

U okviru grupe od 100 ispitanika selektovana je podgrupa, koja je obuhvatila 36 dece sa neurorazvojnim poremećajima, kod kojih su uzimani uzorci fecesa u cilju ispitivanja specifičnosti sastava crevne mikrobiote. Devet pacijenata iz ove grupe imalo je dijagnozu ERLD, 12 pacijenata MSDD, 10 pacijenata PDD-NOS i 5 pacijenata dijagnozu CHA. Podgrupom je obuhvaćeno 28 dečaka i 8 devojčica (razlika u zastupljenosti polova sa odnosom 3,5) uzrasta između 2 i 9 godina (medijana 4.). Svi pacijenti selektovani su na prvim pregledima, pre bilo kakvih medicinskih ili nutricionističkih tretmana koji bi mogli da imaju uticaj na sastav crevne mikrobiote čime je podrazumevano da pacijenti nisu uzimali probiotike, prebiotike antibiotike/antimikotike i druge suplemente najmanje tri meseca pre davanja uzoraka fecesa. Kontrolnu grupu činilo je 28 zdrave dece, 19 dečaka i 9 devojčica (razlika u zastupljenosti polova sa odnosom 2,1), uzrasta između 2 i 11 godina (medijana 6) koja nisu bila u srodstvu sa ispitanicima iz grupe pacijenata i koji takođe nisu uzimali probiotike, prebiotike, antibiotike i antimikotike, niti primenjivali nijedan dijetetski režim ishrane tri meseca pre davanja uzoraka fecesa. Zbog teškoće u prikupljanju urina kod male dece, u okviru ove podgrupe posebno je selektovano 26 pacijenata sa NDD, 21 dečak i 5 devojčica (razlika u zastupljenosti polova sa odnosom 4,2), uzrasta između 2 i 7 godina (medijana 4) i 26 kontrola - 21 dečaka i 5 devojčica (razlika u zastupljenosti polova sa odnosom 4,2), uzrasta od od 2 do 7,5 godina (medijana 4) za analizu urina u cilju kvantifikacije ukupne količine peptida, kao i količine gluten egzorfina i goveđih kazomorfina. Pacijenti, kao i kontrole, za ovu posebnu podgrupu selektovani su po istim kriterijuma kao i pacijenti i kontrole iz prethodnih podgrupa. Svi ispitanici iz grupe pacijenata selektovani su iz Specijalističke ordinacije iz psihijatrije “Dr Selaković” u Beogradu.

Pisane forme saglasnosti potpisane su od strane roditelja pre uključivanja svakog ispitanika u studiju. Ova studija sprovedena je uz saglasnost Etičke komisije Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjersvo, Univerziteta u Beogradu (O-EO-002/2015). Studija je sprovedena u skladu sa Helsinškom deklaracijom Svetske medicinske asocijacije.

3.2. Analiza nivoa vitamina D (25-OH) u serumu i testovi intolerancije na hranu

Rezultati analize serumskog nivoa vitamina D (25-OH) - kalcidiola i testa intolerancije na hranu dobijeni su od roditelja pacijenata (81 pacijent je imao je rezultate testa intolerancije na hranu dok je 68 pacijenata imalo rezultate serumskog nivoa 25-OH). Analize su urađene u tri komercijalne medicinske laboratorije: "Konzilijum" i "Analiza" iz Beograda, Republika Srbija i "Synlab" iz Zagreba, Republika Hrvatska. Analize kalcidiola rađene su u različitim mesecima, tokom cele godine.

Sakupljena je kapilarna krv iz prsta (0,8 ml) uz pomoć *Greinerove Bio-One MiniCollect* sistema tuba za skupljanje kapilarne krvi. Krv je uzimana ujutro, pre prvog obroka. Preporučeno je da se hrana ne konzumira 12 sati pre uzimanja uzorka krvi. Nakon vađenja, krv je stajala na sobnoj temperaturi 30 min, zatim je centrifugirana na 3500 rpm 10 min, takođe na sobnoj temperaturi. Za određivanje vitamina D, serum je čuvan na hladnom (2-8 °C) i analiziran istog dana, dok je za određivanje IgG antitela čuvan na -20 °C do momenta analize (obično 3 do 4 dana).

Nivo vitamina D (25-OH) u serumu određen je automatizovanim testom-Vitamin D total test-electro-chemiluminescence binding assay (ECLIA, Roche, Mannheim, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, ovaj kompetitivni protein-vezujući esej za ispitivanje ukupnog vitamina D (25-OH) u humanom serumu (25-hidroksivitamin D₃ i D₂) sastoji se od tri koraka inkubacije (svaki traje 9 minuta, na 37 °C). U prvom koraku, u uzorku se denaturišu vitamin D vezujući protein (*eng.* vitamin D binding protein-VDBP) kako bi oslobodio vezani vitamin D (25-OH) inkubacijom uzorka (15 ul) sa denaturišućim reagensom 1 (ditiotritol 1 g/L, pH 5,5) i 2 (natrijum hidroksid 55 g/L). Uzorak se dalje inkubira sa rutenijumom obeleženim VDBP, pri čemu se formira kompleks sa vitaminom D (25-OH). U trećoj inkubaciji se dodaje vitamin D (25-OH) konjugovan sa biotinom, koji se kompetitivno vezuje za rutenijumom obeležen VDBP. Nakon dodavanja mikročestica obloženih streptavidinom, kompleks koji se sastoji od rutenijumom obeleženog VDBP-a i vitamina D (25-OH) konjugovanog sa biotinom, se vezuje za čvrstu fazu (usled interakcije biotina i streptavidina). Konačno, reakciona smesa se prebacuje u mernu ćeliju gde se mikročestice vezuju za površinu elektrode. Primena napona na elektrodu indukuje hemiluminescentnu emisiju koja se meri fotomultiplikatorom.

Deficijencija vitamina D definisana je kao serumski nivo 25-OH ≤ 50 nmol/L, dok je insuficijencija vitamina D definisana kao 50-75 nmol/L. Optimalni nivo vitamin D (25-OH) definisan je kao ≥ 75 nmol/L (Holick, 2009).

Test intolerancije na hranu podrazumeva kvantitativno određivanje specifičnih IgG antitela u humanom serumu na alergene iz hrane putem upotrebe tri komercijalna testa: Allerquant 90 Foods IgG - enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Biomerica, SAD), RIDASCREEN Spec. Foodscreen - enzyme immunoassay (EIA, R-biopharm AG, Nemačka) ili Food intolerance tests (FIT) (EIA, Synlab, Nemačka).

Svi testovi su sprovedeni prema uputstvu proizvođača. Svaki uzorak seruma (0,1 ml) je razblažen 1:100 u puferu za uzorke. Specifični alergeni (ekstrakti hrane) apsorbirani su na unutrašnjim površinama šupljina mikrotitarske ploče. Uzorci pacijenata, standardi i kontrolni serumi su pipetirani u odgovarajuće šupljine i inkubirani na sobnoj temperaturi. Tokom inkubacije, specifična IgG antitela se vezuju za odgovarajuće antigene hrane (apsorbiraju se na ploču). Prekomerni proteini u serumu uklanjaju se ispiranjem. Zatim se dodaje anti-humano IgG antitelo konjugovano sa alkalnom fosfatazom. Tokom druge inkubacije, ovaj konjugat antitela se veže sa humanim IgG antitelima iz uzorka ispitanika. Konačno, supstrat se dodaje i inkubira na sobnoj temperaturi, u mraku, 60 min. Supstrat se defosforiliše konjugovanim enzimom i boji u žuto. Intenzitet žute boje je proporcionalan količini antitela specifičnih za antigen u serumu i meri se fotometrijski na 405 nm.

3.3. Priprema urina i analiza egzorfini tečnom hromatografijom visokih performansi

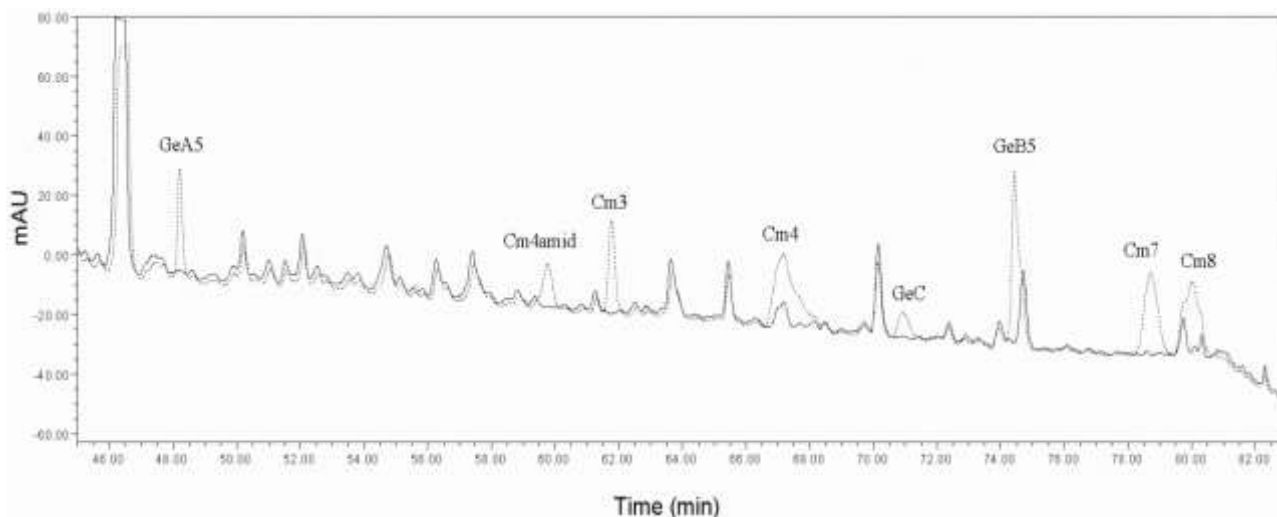
Grupa od 26 pacijenata selektovana je za analizu urina tečnom hromatografijom visokih performansi (*eng.* high-performance liquid chromatography-HPLC) u cilju određivanja količine ukupnih peptida (kao mere crevne propustljivosti), kao i količine gluten egzorfini i goveđih beta kazomorfini.

Prvi jutarnji urin je prikupljen kako je prethodno opisano (Reichelt et al., 2012). Uzorci urina prikupljeni su u epruветama sa stabilizatorom - limunskom kiselinom (finalno 1%) i zamrznuti što je pre moguće na -20 °C. U laboratoriji su uzorci urina ostavljeni da se tope tokom noći u hladnoj sobi na 4 °C. Kreatinin je određen Jaffeovom reakcijom (Toora et al., 2002). Ukratko: 50 ul standarda ili uzorka pomešano je sa 0,6 ml dH₂O i 0,1 ml alkalnog pikrata i ostavljeno na sobnoj temperaturi 45 minuta. Apsorbancija je izmerena na 505 nm.

Zapremina urina ekvivalentna 500 nmol kreatinina (ili 200, za vrlo razređene uzorke) analiziran je hromatografskom analizom na aparatu Agilent serije 1100 HPLC (Agilent technologies, Waldbronn, Nemačka) sa DAD detektorom, na reverznoj fazi peptid/protein analitičke kolone Zorbax 300 SB-C18 (250 mm x 4,6 mm id, veličina čestica 5 μm, Agilent, SAD) opremljenom sa zaštitnom kolonom (Zorbax 300SB-C18, 12,5 mm x 4,6 mm, 5 μm) na 29 °C. Pre HPLC analize, urin je filtriran kroz špric filtere (Phenex, RC Membrane 0.45 μm, 4 mm, Phenomenex, USA). Mobilna faza sastojala se od rastvora A (trifluorosirćetna kiselina, 10 mM) i rastvora B (acetonitril, JT Baker, Deventer, Nizozemska) koristeći elucioni gradijent: 95% A 0-20 min, 95-60% A 20 -75 min, 60-40% A 75-80 min, 40% A 80-89 min, 40-95% A 89-95 min. Na kolonu je nanošena zapremina uzoraka od 22-89 μm, zavisno od koncentracije kreatinina. Detekcija talasne dužine postavljena je na 215 nm (za peptidne veze), 280 nm (za aromatične grupe) i 325 nm (indolil grupe), a brzina protoka bila je 1 ml/min.

Peptidni standardi goveđeg β-kazomorfini 1-3 (YPF), β-kazomorfini 1-4 (YFPF), β-kazomorfini 1-4 amida, β-kazomorfini 1-7 (YFPFGP), β-kazomorfini 1-8 (YFPFGPI), gluten egzorfini A5 (GYYPT), gluten egzorfini B5 (YGGWL) i gluten egzorfini C (YPISL) i hipurinska kiselina (Pepmic, Kina), su pojedinačno rastvoreni u vodi HPLC čistoće sa 0,1% v/v trifluorosirćetne kiseline. Koncentracija osnovnih rastvora peptida bila je 1 mM.

Radi identifikacije jedinjenja u hromatogramima i određivanja njihovih retencionih vremena, uzorci urina bili su koinjektirani sa standardnim rastvorima peptida (20 μM). Za kvantifikaciju su korišćene kalibracione krive sa eksternim standardima. Standardni rastvori (opseg koncentracija od 0,625 do 20 μM) napravljeni su rastvaranjem osnovnih rastvora peptida u 0,1% v/v trifluorosirćetnoj kiselinu. Linearna regresiona analiza kalibracionih krivih peptidnih standarda pokazala je linearnu zavisnost sa korelacionim koeficijentom $r^2 = 0,9997 - 1,000$. Svi eksperimenti su ponovljeni najmanje dva puta. Preklapljeni hromatogram kontrolnog urina i kontrolnog urina koinjektiranog rastvorima standarda peptida je prikazan na slici 1.



Slika 1. Preklapljeni hromatogram kontrolnog urina (puna linija) i kontrolnog urina koinjektiranog sa rastvorima standarda peptida (isprekidana linija), detektovani na 215 nm. CM3- β -kazomorfin 1-3 (YPF), CM4- β -kazomorfin 1-4 (YFPF), CM4amid- β -kazomorfin 1-4 amid, CM7- β -kazomorfin 1-7 (YFPFGP), CM8- β - kazomorfin 1-8 (YFPFGPI), GEC-gluten egzorfin C (YPISL), gluten egzorfin GE A5 – gluten egzorfin A5 (GYYP T), GEB5-gluten-egzorfin B5 (YGGWL)

3.4. Izolacija DNK na koloni

Postupak izolacije DNK na koloni izvršen je prema proceduri predloženoj od strane proizvođača (QIAamp DNA Blood Mini Kit - Qiagen, Hilden, Nemačka).

U mikrotube od 1,5 ml dodato je 400 μ l PBS-a. Kako bi se postiglo da ćelije difunduju, na dno mikrotuba stavljen je bukalni bris. Zatim je dodato 20 μ l Qiagen proteaze K i 400 μ l pufera AL. Smeša je vorteksovana, a nakon toga je inkubirana u vodenom kupatilu 1 sat na 56°C. Dodato je 400 μ l 100% etanola. Uzorak je promešan vorteksom, zatim nanošen na QIAamp Mini spin kolonu i centrifugiran na 6000 g, 1 min. Ovim postupkom DNK se vezala za kolonu, a eluat je odbačen. Da bi se DNK isprala od nečistoća na kolonu je nanošeno 500 μ l pufera AW1 i kolona je centrifugirana na 6000 g, 1min. Postupak ispiranja se ponovio sa istom količinom pufera, AW2, nakon čega je kolona centrifugirana na 10000 g, 3 min. Zatim je kolona je prebačena u novu mikrotubu i centrifugirana 1 min na 10000 g. Nakon centrifugiranja kolona je prebačena u čistu, 1.5 ml mikrotubu. Dodato je 100 μ l AE pufer za eluciju u cilju spiranja DNK sa kolone koja je zatim 1 min inkubirana na ST i centrifugirana na 6000 g, 1 min. Eluat sa rastvorenim DNK je skladišten na -20°C. Spektrofotometrom NanoVue (GE Healthcare Life sciences, Amersham, VB) su mereni prinosi i čistoća izolovane DNK prema uputstvu za rad na aparatu.

3.5. Genotipizacija genetičkih varijanti asociраних sa celijačnom bolesti i laktoznom intolerancijom, kao i varijante FokI u genu za receptor vitamina D

Svi ispitanici (100 NDD pacijenata i 95 zdravih kontrola) su genotipizirani za *HLA-DQA1*, -*DQB1* i -*DRB1* genetičke varijante asociране sa CB, metodom lančane reakcije polimeraze sa prajmerima specifičnim za sekvencu (*eng.* Sequence Specific Primer-Polymerase Chain Reaction - PCR-SSP) (Lavant et al., 2011; Stankovic et al., 2014). Određivanje *DRB1* genotipa bilo je niske rezolucije i ovaj gen je uključen samo kako bi se omogućila preciznija identifikacija *HLA-DQA1-DQB1* haplotipa. Kod svih ispitanika je urađena i genotipizacija varijante -13910 C> T uzvodno od gena za laktazu *LCT* (rs4988234) asociране sa laktoznom intolerancijom, kao i varijante FokI (rs2228570) u genu za receptor vitamina D *VDR*, asociране sa izmenjenom transkripcionom aktivnošću ovog receptora, metodom lančane reakcije polimeraze sa analizom polimorfizma dužine

restrikcionih fragmenata (*eng.* Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism – PCR-RFLP), metodom koja je prethodno opisana, ali sa malim modifikacijama (kako je detaljno opisano u poglavlju 3.5.3.)(Gross et al., 1996; Mulcare et al., 2004).

3.5.1. Identifikacija varijanti gena *HLA*

Genotipizacija *HLA-DQA1*, *HLA-DQB1* i *HLA-DRB1* vršena je PCR-SSP metodom, koja podrazumeva upotrebu prajmera specifičnih za svaku ispitivanu varijantu gena *HLA*. Korišćene su tri različite multipleks PCR reakcije. Svaki analizirani lokus je imao jedan prajmer specifično fluorescento obeležen (NED fluorofora za *DQA1*, VIC za *DQB1* i FAM za *DRB1*), dok drugi prajmeri specifični za pojedinačne allele nisu bili obeleženi. Diskriminacija različitih alela vršena je na osnovu dužine umnoženih DNK fragmenata. Ova metoda poznata je pod nazivom fragment analiza. Prajmeri korišćeni za genotipizaciju *HLA* prikazani su u tabeli 1.

Tabela 1. Prajmeri korišćeni u analizi varijanti gena *HLA* (Lavant et al., 2011)

Naziv prajmera	Sekvenca (5' - 3' smer)
DQA1*NED_F	NED-GCCTCTTCAGGTGTAACTTGTACCAGT
DQB1*05/*06 L*VIC_R	VIC-CGACGACGCTCACCTCTCCT
DQB1*05/*06 L*VIC_R	VIC-GTCGTGCGGAGCTCCAAC
DRB1*FAM_R	FAM-CTAAATGCTCACAGATGGCGCTCTCTCTC
DQA1*01_R	GCCATGTTTCTCAGTGCACC
DQA1*02_R	ATTGCGGGTCAAATCTAAGTCTGTG
DQA1*03_R	CAAATCTCCTAAATCTGCGGAACAG
DQA1*04/*05/*06_R	CTAAATTGTCTGAGAACAGGCAAACA
DQA1*05_R	CGCAGACTGTTCAAGTTATGTTTTAGG
DQB1*05_F	GTGCGGGGTGTGACCAGAC
DQB1*06_F	GGAGCGCGTGCCTTGTAA
DQB1*06:01_F	GACGGAGCGCGTGCCTTA
DQB1*02_F	CGTGCGTCTTGTGAGCAGAA
DQB1*04_F	GCGGGGTGTGACCAGATACA
DQB1*03:01/*03:03_F	GCTGGGGCCGCCTGA
DQB1*03:01/*03:04_F	GACAGCGACGTGGAGGTGTAC
DQB1*03:02/*03:03_F	GAGCGCATGCGTCTTGTGAC
DRB1*03/*11/*13/*14_F	CACGTTTCTTGGAGTACTCTACGTC
DRB1*04_F	CGGAGGCCGCTTCTGTA
DRB1*07_F	CACGTTTCCTGTGGCAGGG
DRB1*09_F	CGGTATCTGCACAGAGGCAT

Napomena: NED, VIC, FAM - fluorofore kojima su obeleženi prajmeri. Skraćenice: F – *forward*, uzvodni prajmer, R – *reverse*, nizvodni prajmer

U tabeli 2. prikazan je sastav smeša i volumen prajmera korišćenih za genotipizaciju *HLA* gena u tri multipleks PCR-SSP reakcije. Pored toga, prikazane su i očekivane dužine PCR fragmenata.

Tabela 2. Prajmeri korišćeni u *HLA* genotipizaciji i očekivane dužine dobijenih umnoženih DNK fragmenata

<i>HLA</i> smeše prajmera	Naziv prajmera	Dužina fragmenta (bp)	Volumen (µl)
Smeša prajmera 1 <i>DQA1/DQB1 *05/*06</i>	<i>DQA1 *NED F</i>	-	0,40
	<i>DQA1*01 R</i>	176	0,24
	<i>DQA1*02 R</i>	154	0,10
	<i>DQA1*03 R</i>	148	0,22
	<i>DQA1*04/*05/*06 R</i>	140	0,28
	<i>DQA1*05 R</i>	204	0,16
	<i>DQB1*05 F</i>	227	0,15
	<i>DQB1*06 F</i>	234	0,30
	<i>DQB1*06:01 F</i>	236	0,15
	<i>DQB1*05/*06 *VIC R</i>	-	0,40
Smeša prajmera 2 <i>DQB1 *02/*03/*04</i>	<i>DQB1*02 F</i>	201	0,32
	<i>DQB1*04 F</i>	198	0,16
	<i>DQB1*03:01/*03:03 F</i>	114	0,28
	<i>DQB1*03:01/*03:04 F</i>	149	0,10
	<i>DQB1*0302/*03:03 F</i>	206	0,36
	<i>DQB1*02/*03/*04 *VIC R</i>	-	0,80
Smeša prajmera 3 <i>DRB1</i>	<i>DRB1*03/*11/*13/*14 F</i>	407	0,40
	<i>DRB1*04 F</i>	454-475	0,40
	<i>DRB1*07 F</i>	375	0,40
	<i>DRB1*09 F</i>	345	0,30
	<i>DRB1 *FAM R</i>	-	0,80

Napomena: Koncentracija prikazanih prajmera bila je 2.5 mM. Skraćenice: F – *forward*, uzvodni prajmer, R – *reverse*, nizvodni prajmer

Sve tri multipleks PCR reakcije bile su konačnog volumena 6 µl i imale su identičan sastav komponenti, a razlikovale su se u dodatnoj smeši prajmera (1/2/3):

- 1 x PCR pufera (Qiagen)
- 1,25 mM MgCl₂ (Qiagen)
- 0,25 mM dNTPs (Thermo Scientific)
- 0,25 U HotStar *Taq* DNK polymeraze (Qiagen)
- 2 µl smeše prajmera 1 / 2 / 3
- 4 ng genomske DNK

Temperaturni profil prikazan je u tabeli 3 i bio je isti za sve tri PCR reakcije.

Tabela 3. Temperaturni profil PCR reakcija

Faze PCR reakcije	Temperatura (°C)	Vreme trajanja (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	10	1
Denaturacija	94	1	45
Hibridizacija	66	0,5	
Elongacija	72	1	
Finalna elongacija	72	10	1

Umnoženi PCR produkti su zatim razblaženi u de-mi vodi u zapreminskom odnosu 1:10 za smešu prajmera 1, 1:20 za smešu prajmera 2 i 1:5 za smešu prajmera 3. Nakon toga, 1 µl razblaženog PCR produkta se rastvarao u 9 µl pripremljenog 2,5% GeneScan500 LIZ standarda (Applied Biosystems) u HiDi formamidu (Applied Biosystems). GeneScan500 LIZ standard čine fluorescentno obeleženi DNK fragmenti poznate dužine koji su neophodni da bi se odredile dužine umnoženih PCR fragmenata. Denaturacija pripremljenog uzorka vršena je 5 min na 95 °C, nakon čega je uzorak analiziran kapilarnom elektroforezom na aparatu 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Kalifornija, SAD). Na osnovu boje pikova i njihove pozicije u odnosu na standard, vršila se identifikacija *HLA* varijanti korišćenjem GeneMapper v.4 softvera. S obzirom da se lokusi *DQA1*, *DQB1* i *DRB1* nalaze u jakoj gametskoj neravnoteži, prisustvo određenog *HLA-DQ* haplotipa se moglo pouzdano odrediti bez poznavanja roditeljskog genotipa (uz korišćenje elektronske baze podataka vezane za varijante *HLA* gena).

3.5.2. Identifikacija varijante - 13910 C> T uzvodno od gena za laktazu

Genotipizacija varijante -13910 C> T uzvodno od gena za laktazu *LCT* izvršena je pomoću PCR-RFLP metode. PCR reakcijom prvo je umnožen ciljni region koji sadrži pomenutu varijantu, a prajmeri korišćeni za umnožavanje su prikazani u tabeli 4.

Tabela 4. Prajmeri korišćeni za analizu genetičke varijante *LCT* -13910C>T

Naziv prajmera	Sekvenca 5'-3' smer	Reference
AC-C-M-U	GCTGGCAATACAGATAAGATAATGGA	(Mulcare et al., 2004)
LAC-C-L2	CTGCTTTGGTTGAAGCGAAGAT	

Temperaturni profil PCR reakcije za umnožavanje genetičke varijante *LCT* -13910C>T prikazan je u tabeli 5.

Tabela 5. Temperaturni profil PCR reakcije za umnožavanje varijante *LCT* - 13910 C> T

Faze PCR reakcije	Temperatura (°C)	Vreme trajanja (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	5	1
Denaturacija	94	0,5	35
Hibridizacija	58	0,5	
Elongacija	72	0,5	
Finalna elongacija	72	7	1

Dobijeni PCR fragment dužine 201 bp analiziran je na 2% agaroznom gelu, pri naponu od 110V, jačini struje od 110 mA i vremenu trajanja od 30 minuta.

Nakon toga umnoženi PCR produkt je tretiran enzimom *HinfI* (Thermo Fisher Scientific, SAD), prema uputstvu proizvođača. *HinfI* je restrikciona endonukleaza koja seče DNK na specifičnim prepoznatljivim nukleotidnim sekvencama koji se nazivaju restrikciona mesta i na taj način omogućava identifikaciju alela koji se međusobno razlikuju po prisustvu odnosno odsustvu restrikcioničkih mesta. U zavisnosti od prisustva (broja i položaja) restrikcioničkih mesta u analiziranom fragmentu, dobijaju se fragmenti različitih dužina. Smeša za digestiju volumena 15 µl finalno je sadržala:

- 150 ng PCR produkta (procenjeno denzitometrijski sa gela)
- 1x pufer R (Thermo Scientific, SAD)
- 0,2 µl *HinfI* enzim (Thermo Scientific, SAD)

Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C u trajanju od 16 sati, restrikcioni fragmenti su analizirani 50 minuta na 3% agaroznom gelu, u cilju određivanja genotipa ispitanika.

Fragment koji odgovara CC genotipu bio je dužine 200bp. Prisustvo T alela je uvelo restrikciono mesto za *HinfI* enzim tako da se kod nosioca CT genotipa na restrikcionom profilu uočavaju fragmenti od 201bp, 177bp i 24bp. Kod nosioca CC genotipa identifikivani su restrikcioni fragmenti dužine 177bp i 24bp.

3.5.3. Identifikacija varijante *FokI* u genu za receptor vitamina D

Genotipizacija *FokI* (rs2228570) varijante u genu *VDR* izvršena je pomoću PCR-RFLP metode. Prvo je PCR reakcijom umnožen ciljani region *VDR* gena koji sadrži pomenutu varijantu. Sekvence uzvodnog (*engl. forward*, F) i nizvodnog (*eng. reverse*, R) prajmera korišćene za umnožavanje željenog *VDR* regiona navedene su u tabeli 6.

Tabela 6. Prajmera korišćenih za dobijanje *VDR* regiona koji sadrži FokI varijantu

Gen	Genetička varijanta	Sekvence uzvodnog (F) i nizvodnog (R) prajmera	Reference
<i>VDR</i>	FokI (rs2228570)	F: 5'-AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGCTCT-3' R: 5'-ATGGAAACACCTTGCTTCTTCTCCCTC-3'	(Harris et al., 1997)

U finalnu PCR smešu od 25 μ l su dodavane sledeće komponente:

- 50 ng DNK
- 1x PCR pufer (sadrži 15 mM MgCl₂) (Qiagen, Nemačka)
- 1x Q solution (Qiagen, Nemačka)
- 0,2 mM dNTP
- 0.4 μ M F i R prajmera
- 1U KAPA Taq DNK polimeraze (Kapa Biosystems, SAD)

Temperaturni profil PCR reakcije za analizu *VDR* FokI varijante prikazan je u tabeli 7.

Tabela 7. Temperaturni profil PCR reakcije za umnožavanje *VDR* regiona koji sadrži FokI varijantu

Faze PCR reakcije	Temperatura (°C)	Vreme trajanja (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95	5	1
Denaturacija	94	0,5	35
Hibridizacija	57	0,5	
Elongacija	72	0,5	
Finalna elongacija	72	7	1

Dobijeni PCR produkti dužine 265bp provereni su horizontalnom elektroforezom na 2% agaroznom gelu, pri naponu od 110V i jačini struje od 110 mA i vremenu trajanja od 30 minuta.

Nakon toga PCR fragmenti su tretirani odgovarajućim restrikcionim FokI Fast digest (FD) enzimom (Thermo Scientific, SAD) prema uputstvu proizvođača. Genotip analizirane varijante je određen prema dužini restrikcionihih fragmenata. Prisustvo varijante C podrazumevala je odsustvo, a varijante T prisustvo restrikcionog mesta. Dobijeni genotipovi su obeleženi na sledeći način: genotip CC ("FF"), genotip CT ("Ff") i genotip TT ("ff"). U zagradama su navedeni nazivi ovih genotipova koji se često koriste u literaturi. Alelu C odgovara kraća F, a alelu T duža forma f *VDR*.

Smeša za digestiju volumena 15 μ l finalno je sadržala:

- 150ng PCR produkta (procenjeno denzitometrijski sa gela)
- 1x FokI FD pufer (Thermo Scientific, USA)
- 0,2 μ l FokI FD enzim (Thermo Scientific, USA)

Nakon inkubacije na temperaturi od 37 °C u trajanju od 3 sata, restrikcioni fragmenti su analizirani 40 minuta na 2% agaroznom gelu, u cilju određivanja genotipa ispitanika.

Fragment koja odgovara CC genotipu bio je dužine 265bp. Kod nosioca CT genotipa na restrikcionom profilu uočavaju fragmenti veličine od 265bp, 196bp i 69bp. Kod nosioca TT genotipa identifikovani su restrikcioni fragmenti dužine 196bp i 69bp.

3.5.4. Analiza ispitivanih genetičkih varijanti agaroznom elektroforezom

Razdvajanje produkata PCRa vršeno je elektroforezom na horizontalnom agaroznom gelu koncentracije 2 ili 3%. U gelove je dodavan etidijum bromid (finalne koncentracije 0,7 µg/mL) pre polimerizacije. Za elektroforezu koja je tekla pri naponu od 5 V/cm i amperaži od 5 A/cm korišćen je TAE pufer (40 mM Tris, 20 mM sirćetna kiselina, 1 mM Na₂EDTA). CCD kamerom sa *BioDocAnalyze* sistemom vršeno je osvetljavanje gela UV svetlom u cilju vizuelizacije DNK. Veličina fragmenata DNK određivana je korišćenjem DNK markera Gene ruler 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific, SAD).

3.6. Analiza specifičnosti u sastavu crevne mikrobiote dece sa neurorazvojnim poremećajima

U podgrupi od 36. dece sa neurorazvojnim poremećajima i 33 kontrolnih ispitanika analizirani su uzorci fecesa u cilju ispitivanja specifičnosti sastava crevne mikrobiote i njenog diverziteta, kao i određivanja zastupljenosti ključnih bakterija prisutnih kod dece sa NDD u odnosu na kontrolnu grupu pacijenata. Uzorci fecesa su prikupljeni i zamrznuti na -20 °C odmah nakon defekacije. Na temperaturi od -70 °C čuvani su do momenta analiziranja.

3.6.1. Izolacija ukupne DNK iz fecesa

Izolacija ukupne DNK iz uzoraka fecesa izvođena je korišćenjem komercijalnog kita ZR Fecal DNA MiniPrep™ (Zymo Research - The Epigenetic Company™, Irvin, SAD) prema uputstvu proizvođača:

1. U Fecal DNA Binding Buffer dodavan je β-merkaptioetanol u konačnoj koncentraciji od 0,5% (v/v).
2. Sa vrha Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filters kolona je otkinut vrh. Kolone su stavljene u odgovarajuće kolektorske tube i centrifugirane (Eppendorf 5424, 8000 x g 3 min).
3. 150 mg fekalnog uzorka sa 750 µL Lysis Solution je dodato u ZR BashingBead™ Lysis tubu i vorteksovano na maksimalnoj brzini 5 min;
4. Nakon toga uzorak je centrifugiran (Eppendorf 5424, 10000 x g 1 min);
5. 400 µL supernatanta je prebacivano u Zymo-Spin™ IV Spin Filter kolone i centrifugirano (Eppendorf 5424, 7000 x g 1 min);
6. U dobijene filtrate je zatim dodato 1200 µl Fecal DNA Binding Buffer;
7. 800 µl mešavine filtrata i Fecal DNA Binding Buffer je prebačeno u Zymo-Spin™ IIC kolone i centrifugirano (Eppendorf 5424, 10000 x g 1 min), a zatim je prethodni korak ponavljen sa preostalim 800 µl navedene mešavine.
8. Nakon toga je u Zymo-Spin™ IIC kolone dodato 200 µL DNA-Pre Wash Buffer i centrifugirano (Eppendorf 5424, 10000 x g 1 min), a zatim 500 µL Fecal DNA Wash Buffer i centrifugirano (Eppendorf 5424, 10000 x g 1 min).
9. Radi eluiranja DNK sa kolone 50 µL DNA Elution Buffer dodato je u Zymo-Spin™ IIC kolonu, a sama kolona je prebačena u čistu mikrotubu (Eppendorf) i centrifugirana (Eppendorf 5424, 10000 x g 30 s).
10. Eluirana DNK je prebacivana u pripremljene Zymo-Spin™ IV-HRC Spin Filter kolone koje su stavljana u mikrotube (Eppendorf) i centrifugirane (Eppendorf 5424, 8000 x g 1 min) radi prečišćavanja izolovane DNK.
11. Izolovana DNK je čuvana na -20 °C.

3.6.2. Umnožavanje DNK fragmenata PCR reakcijom

Izolovana DNK iz uzoraka fecesa korišćena je kao matrica za PCR reakcije. Korišćena su tri seta prajmera, pri čemu je po jedan prajmer iz para imao „CG-clamp“: univerzalni F-968-GC-f i R-1401-r specifični za V6-V8 region gena za 16S rRNK (Nubel et al., 1996), Lab-0159-f i Uni-0515-GC-r specifični za laktobacile (Heilig et al., 2002) i seta prajmera Bif 164-f i Bif 662-CG-r (Satokari et al., 2001) specifičnih za bifidobakterije. Sekvence prajmera navedene su u tabeli 8.

Tabela 8. Prajmeri korišćeni za umnožavanje selektovanih DNK fragmenata

Prajmeri	Sekvence (5' – 3 smer')	Metoda	Ciljani region	Reference
F-968-GC	CGC CCG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAA CGC GAA GAA CCT TAC	PCR	V6-V8 region 16S	(Nubel et al., 1996)
R-1401	CGG TGT GTA CAA GAC CC	PCR	V6-V8 region 16S	(Nubel et al., 1996)
Lab-0159f	GGA AAC AG (A/G) TGC TAA TAC CG	PCR	Lactobacillus 16S	(Heilig et al., 2002)
Uni-0515-GCr	ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA CGC CGG GGG CGC GCC CCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G	PCR	Lactobacillus 16S	(Heilig et al., 2002)
Bif 164-f	GGGTGGTAATGCCG GATG	PCR	Bifidobacterium 16S	(Satokari et al., 2001)
Bif 662-CG-r	CGCCCGCCGCGCGC GGCGGGCGGGGCGG GGGCACGGGGGGCC ACCGTTACACCGGG AA	PCR	Bifidobacterium 16S	(Satokari et al., 2001)
F-968	AA CGC GAA GAA CCT TA	Sekvenci ranje	V6-V8 region 16S	(Nubel et al., 1996)
Uni-0515r	ATC GTA TTA CCG CGG CTG CTG GCA	Sekvenci ranje	Lactobacillus 16S	(Heilig et al., 2002)
Bif 662	CCACCGTTACACCG GGAA	Sekvenci ranje	Bifidobacterium 16S	(Satokari et al., 2001)

Pripremana je reakciona smeša koja sadrži 1 X reakcioni pufer A (KAPA Taq Buffer A) sa 1,5 mM MgCl₂, dNTP smešu (svaki dNTP po 200 μM), prajmere (svaki po 10 pmol), 1 U KAPA Taq DNK polimeraze (Kapa Biosystems, Boston, Masačusets, SAD) i 100-500 ng DNK matrice. Umnožavanje je vršeno u GeneAmp 2700 PCR Cyler aparatu (Applied Biosystems, SAD). U tabeli 9 prikazan je temperaturni profil PCR reakcije.

Tabela 9. Temperaturni profil PCR reakcije.

Faze PCR reakcije	Temperatura (°C)	Vreme (min)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	95°C	5	1x
Denaturacija	95°C	0,5	35 x
Hibridizacija	56°C	0,33	35x
Elongacija	68°C	0,66	35x
Terminalna elongacija	68°C	7	1x

3.6.3. Elektroforeza molekula DNK

Elektroforeza ukupne DNK i PCR fragmenata izvođena je u 1% agaroznom gelu. Za pravljenje gelova agarozna je rastvarana u 1 X TAE puferu (40 mM Tris-acetat, 1 mM EDTA, finalno pH 8,0) uz dodatak etidijum bromida (0,5 µg/ml). Za elektroforezu koja je tekla pri naponu od 1-10 V/cm gela je korišćen isti pufer (1 X TAE). Veličine fragmenata su određivane poređenjem pređenog puta analiziranih DNK fragmenta sa dužinom pređenog puta fragmenata poznate veličine (standarda). Kao DNK standard korišćen je “Gene Ruler™ DNA 1kb Ladder Mix” (ThermoFisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD).

3.6.4. Gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu

Za analizu rDNK amplikona dobijenih PCR reakcijom korišćena je gel elektroforeza u denaturišućem gradijentu (*eng.* Denaturing Gradient Gel Electrophoresis – DGGE), prema Lukić i sar. (Lukic et al., 2013).

Nakon završene PCR reakcije, PCR produkti su pomešani sa bojom za nanošenje uzoraka 6 × Loading Dye Solution (Thermo Scientific) u odnosu 3:1 i 15 µl smeše nanošeno je na gel sa gradijentom denaturišućeg agensa. Gelovi su sadržali gradijent uree i formamida od 30 % do 60 % za Lab-0159-f i Uni-0515-GC-r set prajmera (Heilig et al., 2002), od 45 % do 55 % za Bif 164-f i Bif 662-CG-r set prajmera (Satokari et al., 2001) i od 40 % do 80 % za F-968-GC-f i R-1401-r set prajmera (Muyzer et al., 1993). 100% denaturišućeg agensa odgovaralo je 7 mol/l Uree i 40% (Vol/Vol) formamida. Uzorci na gelu su razdvajani 16 h pri konstantnoj voltaži od 85 V i pri temperaturi od 60 °C u 1 X TAE puferu u aparatu DGGE-2001 (C.B:S. Scientific, San Diego, SAD). Amplikoni su vizualizovani bojenjem i AgNO₃ kao što je prethodno opisano (Sanguinetti et al., 1994). Ukratko: gelovi su fiksirani 20 min u rastvoru 10 % etanola i 0,5 % glacijalne sirćetne kiseline. Zatim su 10 min bojani u rastvoru 0,1% AgNO₃. Razvijanje je vršeno sve do pojave vidljivih traka u 1,5 % rastvoru NaOH, 0,1 % natrijum borhidrida (NaBH₄) i 0,048 % formaldehida.

3.6.5. Sekvenciranje dela gena za 16S rDNK i analiza dobijene sekvence

Nakon završene PCR-DGGE analize, fragmenti koji su bili statistički različito zastupljeni u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu ($p \leq 0.05$), selektovani su za sekvenciranje.

Selektovani fragmenti su izrezani iz gela i usitnjeni u destilovanoj vodi, a suspenzija je inkubirana 10 min na 98°C (Lukic et al., 2013). Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana. Korišćen je supernatant (10 µl) za PCR umnožavanje univerzalnim prajmerima (UNI) F-968 i R-1401, prajmerima za laktobacile (LB) Lab-0159f i Uni-0515r i prajmerima specifičnim za bifidobakterije (BB) Bif164-f i Bif662-r (Tabela 8). Dobijeni PCR proizvodi prečišćeni su GeneJET

PCR kitom za prečišćavanje (ThermoFisher Scientific) i ligirani u pJET1.2/sistemu vektora prema uputstvu proizvođača (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD). Ligirani konstrukti su transformisani u rubidijumskim kompetentnim E. Coli DH5 α ćelijama (Hanahan, 1983). Ligacione smeša (20 μ l) dodata je pripremljenim kompetentnim DH5 α ćelijama (200 μ l), nakon čega su ćelije inkubirane na ledu 60 min uz povremeno blago mešanje. Zatim su ćelije izložene toplotnom šoku na 42°C u trajanju od 90 s i neposredno posle inkubirane na ledu. Posle 5 min inkubiranja na ledu, ćelijama je dodat medijum za regeneraciju (Luria Bertani - LB medijum: 5 g/L NaCl, ekstrakt kvasca 5 g/L (Torlak, Beograd, Srbija), bakto tripton 10 g/L (Torlak) nakon čega su ćelije regenerisane 1 h na 37°C uz kontinuirano mešanje. Nakon regeneracije bakterijska suspenzija je utrljana na čvrste selektivne LA (LB medijum sa dodatkom 17 g/L agara (Torlak) podloge sa 100 μ g/ml ampicilina. Transformanti sa rekombinantnom DNK su selektovani nakon 24 h aerobne inkubacije na 37°C kao bele kolonije u skladu sa uputstvima proizvođača *pJET1.2/blunt* vektora (ThermoFisher Scientific). Nakon toga kolonije su zasejavane u tečni LB medijum sa 100 μ g/ml ampicilina i gajene su preko noći na 37°C. Iz prekonocnih kultura su izolovani plazmidi pomoću GeneJET Plasmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific, MA, SAD) prema uputstvu proizvođača. Ukratko:

1. Prekonočne bakterijske kulture su centrifugirane (Eppendorf 5424, 6800 x g, 2 min);
2. U istaložene ćelije dodato je 250 μ L Resuspension Solution i vorteksovano;
3. Zatim je dodato 250 μ L Lysis Solution i lagano promešano 4 do 6 puta;
4. Nakon toga dodato je još 350 μ L Neutralization Solution i promešano 4-6 puta;
5. Uzorci su zatim centrifugirani (Eppendorf 5424 10000 x g, 5 minuta);
6. Supernatant je nakon toga prebačen u Thermo Scientific GeneJET Spin Column i centrifugiran (Eppendorf 5424, 10000 x g, 1 minut);
7. Dodato je 500 μ L Wash Solution i centrifugirano dva puta (Eppendorf 5424, 10000 x g, 1 min);
8. Nakon centrifugiranja kolona je prebačena u novu mikrotubu (Eppendorf) i dodato je 50 μ l pufera za eluciju;
9. Usledila je inkubacija 2 minuta, nakon čega je centrifugirano (Eppendorf 5424, 10000 x g, 2 min).

Izolovani plazmidi su sekvencirani korišćenjem pJET1.2 Forward/Reverse prajmera (Macrogen Europe Service, Amsterdam, Nizozemska). Anotacija sekvenci i pretraživanje baze podataka za utvrđivanje sličnosti među sekvencama urađeno je putem BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programa koji je dostupan na internetu (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.6.6. Priprema uzoraka fecesa za HPLC analizu

Svi postupci izolacije SCFA iz fekalnih uzoraka izvedeni su kao što je prethodno opisano (De Baere et al., 2013).

1. Do 250mg zamrznutih uzoraka fecesa je stavljeno u tubu od 1,5 ml, i dodato je 950 μ L H₂O i 50 μ L 0,2M sukcininske kiseline (SA), koji je koršten kao interni standard
2. Uzorci su vorteksovani 30 s
3. Dodato je 100 μ l koncentrovane hlorovodonične kiseline – HCl (3,8%)
4. Uzorci su zatim vorteksovani 30 s
5. Nakon vorteksovanja uzorci su ostavljeni na ledu 60 min
6. Nakon toga uzorci su centrifugirani 15 min na 1800 g
7. Supernatant je prebačen u 15 ml tube
8. U odvojeni supernatant je dodato je 5 ml dietiletra i mešano 20 min
9. Uzorak je centrifugiran 5 min na 3000 g
10. Supernatant (gornja etarska faza) je prebačen u novu tubu
11. U izdvojenu etarsku fazu je dodato 500 μ l 1M NaOH i lagano mešano 20 min
12. Uzorak je centrifugiran 5 min na 3000 g
13. Donja (vodena faza) je prebačena u novu 1,5 ml tubu
14. U uzorak je dodato 100 μ l koncentrovane HCl
15. Uzorak je vorteksovan 30 s

16. Za HPLC analizu je injektovano 10 µl uzorka

3.6.7. Pravljenje standardne krive za sirćetnu, propionsku i buternu kiselinu

Za kvantifikaciju SCFA korišćene su kalibracione krive sa eksternim standardima. Rastvori standarda: sirćetna, propionska, buterna i sukcininska kiselina (Sigma-Aldrich, SAD) su pripremljeni u rasponu koncentracija od 0,5 mM do 50 mM. Sukcininska kiselina je korišćena kao unutrašnji standard za efikasnost izolacije.

Za svaki dan merenja sveže su pripremljeni standardi u vodi HPLC čistoće. Za identifikaciju jedinjenja u hromatogramima, uzorci su bili koinjektirani sa standardima do finalne koncentracije od 25 mM. Sva merenja su ponovljena tri puta.

3.6.8. HPLC – UV analiza masnih kiselina kratkog lanca iz fecesa

Sve procedure izolacije SCFA iz uzoraka fecesa sprovedene su kako je prethodno opisano (De Baere et al., 2013). Kvantifikacija SCFA u fekalnim uzorcima urađena je primenom HPLC metode. HPLC–UV sistem za analizu činili su UltiMate™ 3000 LPG 3400 HPLC pumpa, UltiMate™ 3000 DAD 3000 detektor, UltiMate™ 3000 WPS 3000TSL auto-sempler, UltiMate™ 3000 TCC 3000 SD kompartment za kolonu, UltiMate™ 3000 SRD postolje za rastvore i UltiMate™ 3000 AFC frakcioni kolektora.

Hromatografsko razdvajanje urađeno je na Hypersil Gold aQ koloni (150 mm × 4,6 mm i.d.) sa veličinom čestica od 3 µm (Thermo Scientific, Voltam, MA, SAD). HPLC kolona bila je zaštićena predkolonom istog tipa. Temperatura kolone je bila podešena na 30°C. Mobilnu fazu činio je rastvor A (20 mM NaH₂PO₄ u HPLC vodi, pH = 2,2, koja je podešena pomoću H₃PO₄) (Merck, Darmstadt, Nemačka) i rastvor B (100% acetonitril) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Misuri, SAD).

Izvršeno je gradijentno ispiranje kao što je prikazano u tabeli 10. UV detektor je podešen na talasnu dužinu od 210 nm. Obrada podataka izvršena je upotrebom softvera Chromeleon verzije 6.8 (Thermo Fisher Scientific, MA, SAD).

Konačne koncentracije SCFA izračunavane su pomoću formule:

$$X = \frac{X_{hplc} \times 6 \times 10^{-3}}{SA_{hplc} \times m} \times 1000 \left[\frac{mmol}{kg} \right]$$

Gde X predstavlja koncentraciju SCFA, X_{hplc} – koncentraciju SCFA dobijenu HPLC analizom, SA_{hplc} – koncentraciju sukcininske kiseline dobijene HPLC analizom, m – početnu masu uzorka.

Tabela 10. HPLC – UV gradijent program za analizu SCFA iz humanog fecesa

Vreme (min)	MF A (%)	MF B (%)	Brzina protoka (ml/min)
0	100	0	0,8
3,5	100	0	0,8
4	92,5	7,5	0,4
7,5	92,5	7,5	0,4
8	85	15	0,4
10,5	85	15	0,4
11	80	20	0,4
13	80	20	0,4
13,5	80	20	0,4
20	75	25	0,4
20,5	100	0	1,2
23,5	100	0	1,2
24	100	0	0,8
25	100	0	0,8

Napomena: Mobilna faza (MF) A: 20 mM NaH₂PO₄; mobilna faza (MF) B: 100% acetonitril.

3.7. Statistička analiza rezultata

Razlike između ispitanika sa NDD i zdrave dece u nivou egzorfina i peptidurije procenjene su pomoću Mann-Whitney U testa. Korelacija između nivoa različitih egzorfina procenjena je korišćenjem Spirmanovog koeficijenta korelacije.

Razlike u zastupljenosti genetičkih varijanti između pacijenata sa NDD i kontrolnih ispitanika ispitane su pomoću Pirsonovog hi-kvadrat (χ^2) testa nezavisnosti i Fišerovog egzaktnog testa. Hardi-Vajnbergova ravnoteža ispitana je upotrebom χ^2 testa za ponašanje po distribuciji (*eng. goodness of fit*) (Wigginton et al., 2005). Benjamini-Hochberg korekcija za višestruko testiranje je primenjena kako bi se smanjila greška prvog reda, tj smanjila šansa za lažno otkriće (Benjamini et al., 1995). Sve statističke analize urađene su u IBM-ovom Statističkom paketu za društvene nauke (SPSS v.21) i R v.3.2.2 softveru.

U analizi specifičnosti sastava crevne mikrobiote rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm standardna greška (SEM) za kontinuirane varijable i u procentima za kategorijske varijable. Rezultati su smatrani statistički značajnim za vrednost $p < 0,05$, dok su vrednosti između 0,05 i 0,1 tretirane kao trend prema značajnoj razlici.

Statistička obrada rezultata urađena je pomoću softverskog paketa GraphPad Prism v5 Software (San Diego, Kalifornija, SAD).

Poređenja u koncentraciji SCFA u uzorcima fecesa između grupa su izvršena pomoću Studentovog t-testa i Pirsonovog χ^2 testa (sa Iates-ovom korekcijom za kontinuitet) za kvantitativne i kategorijske varijable. Za analizu razlika između grupa sa određenom NDD dijagnozom i kontrolne grupe korišćena je jednosmerna ANOVA praćena Tukey post-hoc testom.

Sličnost između bakterijskih zajednica kod različitih grupa analizirana je poređenjem DGGE profila pomoću Dajsovog koeficijenta sličnosti (*eng. Dice similarity coefficient*). Dajsov koeficijent sličnosti korišćen je radi poređenja DGGE profila među individuama unutar iste grupe, kao i radi poređenja profila među grupama NDD pacijenata i kontrola, za svaki par uzorka. Dajsov koeficijent meri sličnost između dva skupa binarnih podataka, i kreće se od 0 do 1. U skladu sa tim dva identična DGGE profila bi imala vrednost 1, dok bi profili koji nemaju ni jednu zajedničku traku-bend imali vrednost 0. Dice koeficijent sličnosti izračunat je pomoću formule: $Dsc = [2j / (a + b)] * 100$ (%), gde

je "a" broj DGGE traka u prvom uzorku, „b“ broj DGGE traka u drugom uzorku i "j" broj zajedničkih traka između prvog i drugog uzorka. $Dsc = 100\%$ predstavlja identične DGGE profile, dok se $Dsc = 0\%$ odnosi na potpuno različite DGGE profile.

4. Rezultati

4.1. Demografski i klinički opis ispitanika uključenih u studiju

Demografski i klinički opis analiziranih pacijenata sa NDD i kontrolne grupe zdravih ispitanika prikazani su u tabeli 11. Podaci su pokazali da su GI poremećaji prisutni kod 57,5% pacijenata sa NDD. Među NDD grupom pacijenata, podgrupa PDD-NOS pokazala je najveću učestalost gastrointestinalnih poremećaja (70,6%) i crevne disbioze (87,5%). Kod velikog broja pacijenata sa NDD (97,5%) otkrivena je intolerancija na neke namirnice. Značajno je da je kod svih ispitanika sa PDD-NOS utvrđena intolerancija na mlečne proizvode (100%). Najveća učestalost intolerancije na gluten uočena je u MSDD grupi (56%). Ispitivanje nivoa vitamina D u serumu pokazalo je da je kod 76,5% ispitanika sa NDD prisutna deficijencija ili insuficijencija vitamina D. Najniži nivo vitamina D je primećen kod ispitanika sa CHA, u poređenju sa drugim NDD grupama. Iako su ove razlike uočene, statistički značajnost nije pokazana.

Tabela 11. Demografski i klinički opis analiziranih pacijenata sa NDD i kontrolne grupe zdravih ispitanika

Karakteristike	Kontrole	NDD	MSDD	PDD-NOS	ADHD	ERLD	CHA
Broj, <i>n</i> (%)	95 (100,0)	100 (100,0)	36 (36,0)	23 (23,0)	4 (4,0)	16 (16,0)	21 (21,0)
Godine, medijana (opseg)	5 (1–15,8)	4 (1,5–11)	4 (1,7–9)	5 (2–11)	6 (4–11)	2.95 (1,5–4,5)	5 (2–9)
Pol, dečaci (%)	73 (76,8)	79 (79,0)	27 (75,0)	15 (65,2)	3 (75,0)	13 (81,3)	21 (100,0)
GI smetnje, <i>n</i> pozitivno/ <i>n</i> testiranih (%)*	/	46/80 (57,5)	16/27 (59,3)	12/17 (70,6)	2/3 (66,7)	5/13 (38,5)	11/20 (55,0)
Disbioza, <i>n</i> pozitivno/ <i>n</i> testiranih (%)#	/	57/70 (81,4)	20/24 (83,3)	14/16 (87,5)	2/3 (66,7)	9/12 (75,0)	12/15 (80,0)
Intolerancija na hranu, <i>n</i> pozitivno/ <i>n</i> testiranih (%)	/	79/81 (97,5)	24/25 (96,0)	19/19 (100,0)	4/4 (100,0)	14/14 (100,0)	18/19 (94,7)
Prisustvo IgG na gluten, <i>n</i> pozitivno/ <i>n</i> testiranih (%)	/	33/81 (40,7)	14/25 (56,0)	7/19 (36,8)	1/4 (25,0)	3/14 (21,4)	8/19 (42,1)
Prisustvo IgG na mleko, <i>n</i> pozitivno/ <i>n</i> testiranih (%)	/	68/81 (84,0)	20/25 (80,0)	19/19 (100,0)	3/4 (75,0)	12 (85,7)	14/19 (73,7)
Vitamin D deficijencija i insuficijencija, <i>n</i> pozitivno/ <i>n</i> testiranih (%)	/	52/68 (76,5)	19/24 (79,2)	10/14 (71,4)	1/3 (33,3)	7/10 (70,0)	15/17 (88,2)
Nivo vitamina D (25-OH), srednja vrednost ±SD (nmol/l)	/	58,90 ± 29,59	58,67 ± 35,40	64,54 ± 34,14	83,50 ± 3,54	68,63 ± 23,35	44,33 ± 15,58

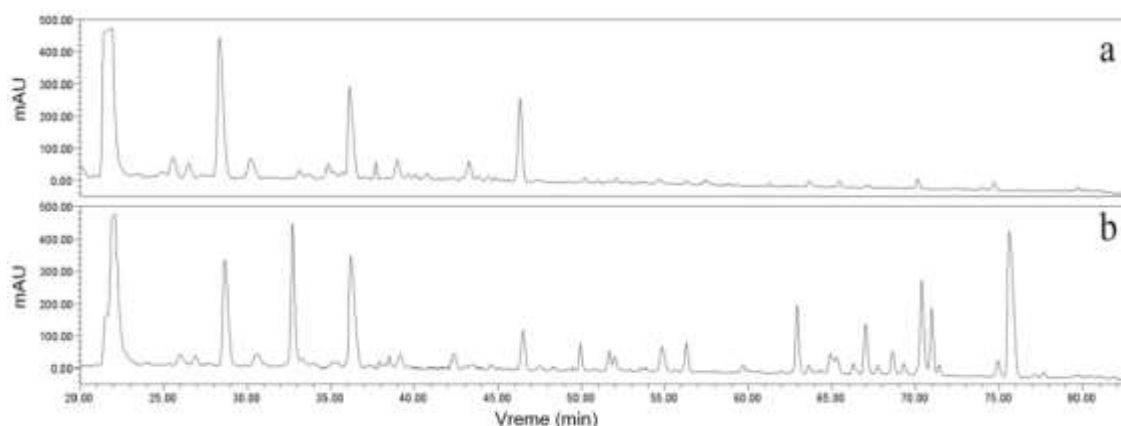
Napomena: Pacijenti sa GI smetnjama imali su sledeće Gi simptome: dijareja, opstipacija, gasovi, nadutost, neformirane stolice, prisustvo nesvarene hrane u stolici. Crevna dizbioza je evidentirana kod pacijenata na osnovu rezultata dobijenih iz komercijalnih medicinskih laboratorija (prisustvo patogenih ili uslovno patogenih bakterija, gljivica, parazita...). Pacijenti kod kojih je bila prisutna intoleranciju na hranu imali su detektovana IgG antitela na određenu hranu (osim prisustva IgG antitela na gluten i mleko, 6 pacijenata imalo je i IgG antitela na neke druge namirnice - jaja (4), šećer (1), med i soja (1)). S obzirom da nisu svi pacijenti imali urađene laboratorijske analize (mikrobiološka analiza stolice, test intolerancije na hranu, nivo vitamina D u serumu), kao i da nisu svi dali podatke o GI smetnjama, neki podaci nedostaju. Iz tih razloga za svaku kategoriju uzet je samo broj testiranih pacijenata. NDD –neurorazvojni poremećaji, MSDD – mešoviti specifični poremećaji razvoja, ADHD – poremećaj pažnje sa hiperaktivnosti, ERLD – poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora, CHA – dečiji autizam, PDD-NOS – pervazivni razvojni poremećaj, nespecifični, GI – gastrointestinalni, SD – standardna devijacija.

Veća zastupljenost dečaka u odnosu na devojčice bila je prisutna u osnovnoj NDD grupi (100 pacijenata), gde je ovaj odnos bio 3,7:1, ali je sličan odnos primećen i u podgrupi koju je činilo 36 pacijenata kod kojih je ispitivana specifičnost crevne mikrobiote (3,5:1) kao i u podgrupi od 26 pacijenata kod kojih je ispitivano prisustvo opioidnih peptida u urinu (4,2:1). Ova veća zastupljenost dečaka u odnosu na devojčice koja je primećena u grupi pacijenata je u skladu sa većom učestalošću autizma kod dečaka (4:1) (Scott et al., 2002) kao i veće zastupljenosti intelektualnih poteškoća i razvojnog kašnjenja kod dečaka u odnosu na devojčice (2:1) (Gillberg et al., 2006; Polyak et al., 2015; Ropers, 2008).

Takođe evidentirano je i da je udeo dece koja imaju jedan ili više GI simptoma sličan u osnovnoj grupi (57,5%) i u podgrupama u kojima je analizirana specifičnost mikrobiote (33%) i prisustvo opioidnih peptida u urinu (42%).

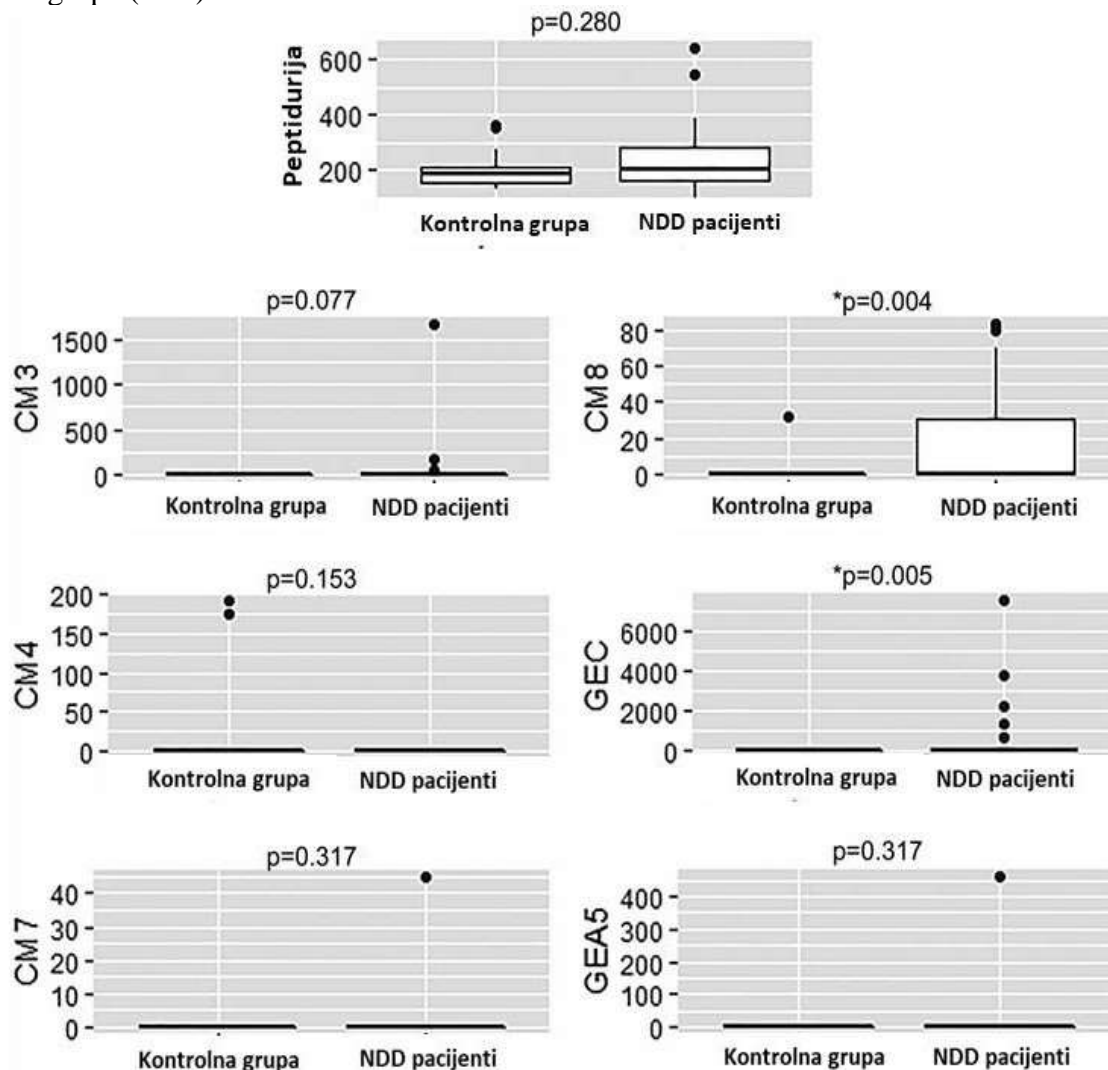
4.2. Ukupni sadržaj peptida i prisutnost opioidnih peptida u uzorcima urina

Ukupni sadržaj peptida eluiranih nakon primene hipurinske kiseline ($R_t = 22-83$ min) meren kao površina ispod 215 nm krive, prikazan je kao peptidurija u apsorpcionim jedinicama (AU). Većina jedinjenja koja se eluiraju nakon hipurinske kiseline i detektuju na talasnoj dužini od 215 nm su peptidi. Dokaz da su to peptidi jeste detekcija značajnog porasta nivoa amino kiselina nakon hidrolize ili enzimske razgradnje peptidazama uzoraka urina (Reichelt et al., 1998). Tipični HPLC elucioni profil osnovne peptidne zone iz urina pacijenata i kontrola prikazan je na slici 2.



Slika 2. Tipični HPLC elucioni profil osnovne peptidne zone ($R_t = 20 - 83$ min) iz uzorka kontrole (a) i pacijenta (b). Na reverznoj fazi C-18 kolone nanošena je zapremina urina ekvivalentna 500nmol kreatinina. Primenjen je elucioni gradijent koji se sastojao od trifluorosirćetne kiseline i acetonitrila u trajanju od 115 min pri protoku od 1 ml/min. Elucija je praćena na 215 nm za peptidne veze. Retenciono vreme hipurinske kiseline je $R_t = 22$ min.

Vrednosti peptidurije u kontrolnoj grupi bila je u opsegu 134-360 AU/nmol kreatinina. Kao gornja granica uzeta je vrednost od 272 AU /nmol kreatinina, koja je predstavljala najvišu vrednost u kontrolnoj grupi isključujući dve ekstremne vrednosti. Sve vrednosti veće od granične tretirane su kao povećanje. Nivo ukupnih peptida u grupi pacijenata nije bio značajno viši u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika ($p = 0,28$) (Slika 3). Međutim, primećeno je da 30,8% (8/26) pacijenata ima povišene vrednosti ukupnih peptida, dok je ovo povećanje primećeno kod samo 7,7% ispitanika iz kontrolne grupe (2/26).



Slika 3. Nivo ukupnih peptida, kazomorfina i gluten egzorfina kod NDD pacijenata ($n = 26$) i zdravih kontrola ($n = 26$). Ukupan sadržaj peptida prikazan je kao peptidurija u AU/nmol kreatinina, a količine selektovanih peptida su izražene kao pmol/nmol kreatinina. Razlike u nivoima analiziranih peptida obrađivane su Mann–Whitney U testom, a značajnim se smatralo $p < 0,05$. Nivoi peptida kazomorfina 4am (CM4am) i gluten egzorfina B5 (GEB5) nisu prikazani, s obzirom da nisu detektovani ni u grupi pacijenata ni u kontrolnoj grupi. CM – kazomorfin, GEC – gluten egzorfin C, GEA5– gluten egzorfin A5, NDD – neurorazvojni poremećaji.

Unutrašnja standardizacija uzoraka sa kreatininom bila je neophodna, s obzirom da je različito konzumiranje tečnosti (vode) imalo značajan uticaj na razređenost urina i koncentracije analiziranih peptida, posebno kod mlađe dece. Koncentracija kreatinina određena u uzorcima urina

kretala se od 296-2509 mg/L. Stoga su sve vrednosti izražene kao količine određenih peptida u odnosu na količinu internog standarda kreatinina.

Uzorci urina analizirani su pomoću HPLC metode za prisutnost pet goveđih β -kazomorfini: β -kazomorfin 1-3 (CM3), β -kazomorfin 1-4 (CM4), β -kazomorfin 1-4-amid (CM4am), β -kazomorfin 1-7 (CM7), β -kazomorfin 1-8 (CM8) i tri egzorfina glutena: gluten egzorfin A5 (GEA5), gluten egzorfin B5 (GEB5) i gluten egzorfin C (GEC).

U kontrolnoj grupi nisu otkriveni gluten egzorfini, kao ni CM3, CM4am i CM7. U kontrolnoj grupi detektovane su samo male količine CM4 (176–192 pmol/nmol kreatinina) i CM8 (32 pmol/nmol kreatinina). S obzirom da je CM4 detektovan samo kod dva ispitanika iz kontrole grupe, a CM8 kod tri druga ispitanika iz kontrolne grupe, ove vrednosti tretirane su kao ekstremne. Za sve opioidne peptide, vrednosti veće od 0 pmol/nmol kreatinina smatrane su povišenim. Povećanje jednog ili više egzorfina otkriveno je u uzorcima urina 77,7% pacijenata sa NDD (21/27). Nivoi kazomorfini bili su povišeni kod 61,5% pacijenata sa NDD u odnosu na 19,2 % kod zdrave dece. Gluten egzorfini bili su povišeni kod 30,8% pacijenata sa NDD i kod 0% zdrave dece. Značajno povećanje nivoa CM8 i GEC zabeleženo je u grupi pacijenata sa NDD u poređenju sa kontrolnom grupom (Mann-Whitney U test, $p = 0,004$ i $p = 0,005$, redom) (Slika 3). Treba naglasiti da je svaki pacijent imao specifičnu kombinaciju povišenih peptida u urinu.

Zabeležena je negativna korelacija između uzrasta pacijenata sa NDD i nivoa ukupnih peptida ($r_s = -0,44$, $p = 0,24$). Nije pronađena značajna korelacija između nivoa različitih peptida kako u grupi pacijenata, tako ni kod kontrola. Genetičke varijante povezane sa nastankom celijačne bolesti i laktoznom intolerancijom nisu bile asocirane sa nivoima peptida ni u grupi pacijenata ni u kontrolnoj grupi (podaci nisu grafički niti tabelarno prikazani).

4.3. HLA-DQ genotipizacija

Distribucija varijanti *HLA-DQ2* i *-DQ8* u grupi pacijenata i kontrola prikazana je u tabeli 12. Statistička analiza nije pokazala statistički značajnu povezanost *HLA* genetičkih varijanti koje nose rizik za nastanak celijačne bolesti i NDD. Ipak, u grupi ispitanika sa MSDD uočena je veća učestalost *HLA-DQ2* u poređenju sa kontrolnom grupom (36,1% prema 20,0%, χ^2 test, $df = 1$, $p = 0,05$, nije značajno nakon korekcije za višestruko testiranje). Nije utvrđena korelacija između *HLA-DQ* genetičkih varijanti i nivoa peptida u uzorcima urina NDD ispitanika.

Tabela 12. Distribucija *HLA-DQ2* i *-DQ8* varijanti asociranih sa celijačnom bolesti kod NDD pacijenata i zdravih kontrola

<i>HLA-DQ</i> genotip, n (%)	Kontrola $n=95$	NDD $n=100$	p	MSD $n=36$	p	PDD-NOS $n=23$	p	ADH $n=4$	p	ERL $n=16$	p	CHA $n=21$	p
<i>HLA-DQ2</i> Pozitivan	19 (20,0)	28 (28,0)	0,19	13 (36,1)	0,05	5 (22,0)	1,00	1 (25,0)	1,00	3 (18,8)	1,00	6 (28,6)	0,56
<i>HLA-DQ8</i> Pozitivan	12 (12,6)	9 (9,0)	0,41	3 (8,3)	0,56	1 (4,0)	0,31	0 (0,0)	1,00	2 (12,5)	1,00	3 (14,3)	1,00
<i>HLA-DQ2/-DQ8</i> Negativan	64 (67,4)	63 (63,0)	0,52	20 (55,6)	0,21	17 (74,0)	0,54	3 (75,0)	1,00	11 (68,7)	1,00	12 (57,1)	0,37

Napomena: *HLA-DQ2* pozitivna grupa uključuje nosioce *HLA* haplotipova koji dovode do *HLA-DQ2* fenotipa (homozigotni ili heterozigotni nosioci *DRB1*03-DQA1*05-DQB1*02* i nosioci *DRB1*07-DQA1*02-DQB1*02/DRB1*X-DQA1*05-DQB1*03:01*). *HLA-DQ8* pozitivna grupa uključuje nosioce *HLA* haplotipova koji dovode do *HLA-DQ8* fenotipa (homozigotni ili heterozigotni

nosioci *DRBI*04-DQAI*03-DQBI*03:02*). Statistička analiza sprovedena je upotrebom Pearson χ^2 testa ili Fišerovog egzaktnog testa. $p < 0,05$ se smatralo značajnim. NDD – neurorazvojni poremećaji, MSDD – mešoviti specifični poremećaji razvoja, ADHD – poremećaj pažnje sa hiperaktivnosti, ERLD – poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora, CHA – dečiji autizam, PDD-NOS – pervazivni razvojni poremećaj, nespecifični.

4.4. *LCT-13910C>T* i *VDR FokI* genotipizacija

Distribucija *LCT -13910 C>T* i *VDR FokI* varijanti u analiziranim grupama prikazana je u tabeli 13. Distribucije genotipova obe genetičke varijante bile su u Hardy-Vajnbergovoj ravnoteži za sve grupe pacijenta sa NDD i sve zdrave kontrole. Nije pronađena statistički značajna povezanost *LCT -13910 C>T* varijante sa NDD. Nije uočena korelacija između *LCT -13910 C>T* varijante povezane sa intolerancijom na laktozu i nivoa peptida u urinu ispitanika sa NDD. Kada su svi pacijenti sa NDD, bez obzira na dijagnozu, upoređeni sa kontrolnom grupom, nije zabeležena statistički značajna razlika u raspodeli genotipova analizirane genske varijante *VDR FokI*. Takođe nije pronađena ni asocijacija između *VDR FokI* genotipa sa nivoom vitamina D u serumu svih pacijenata (podaci nisu tabelarno ni grafički prikazani). Međutim, kod pacijenata sa CHA uočena je značajno veća učestalost FF genotipa u odnosu na kontrolnu grupu (61,9% nasuprot 33,7%, χ^2 test, $df = 1$, $p = 0,016$).

Tabela 13. Distribucija *LCT -13910C>T* i *VDR FokI* varijanti u analiziranim grupama

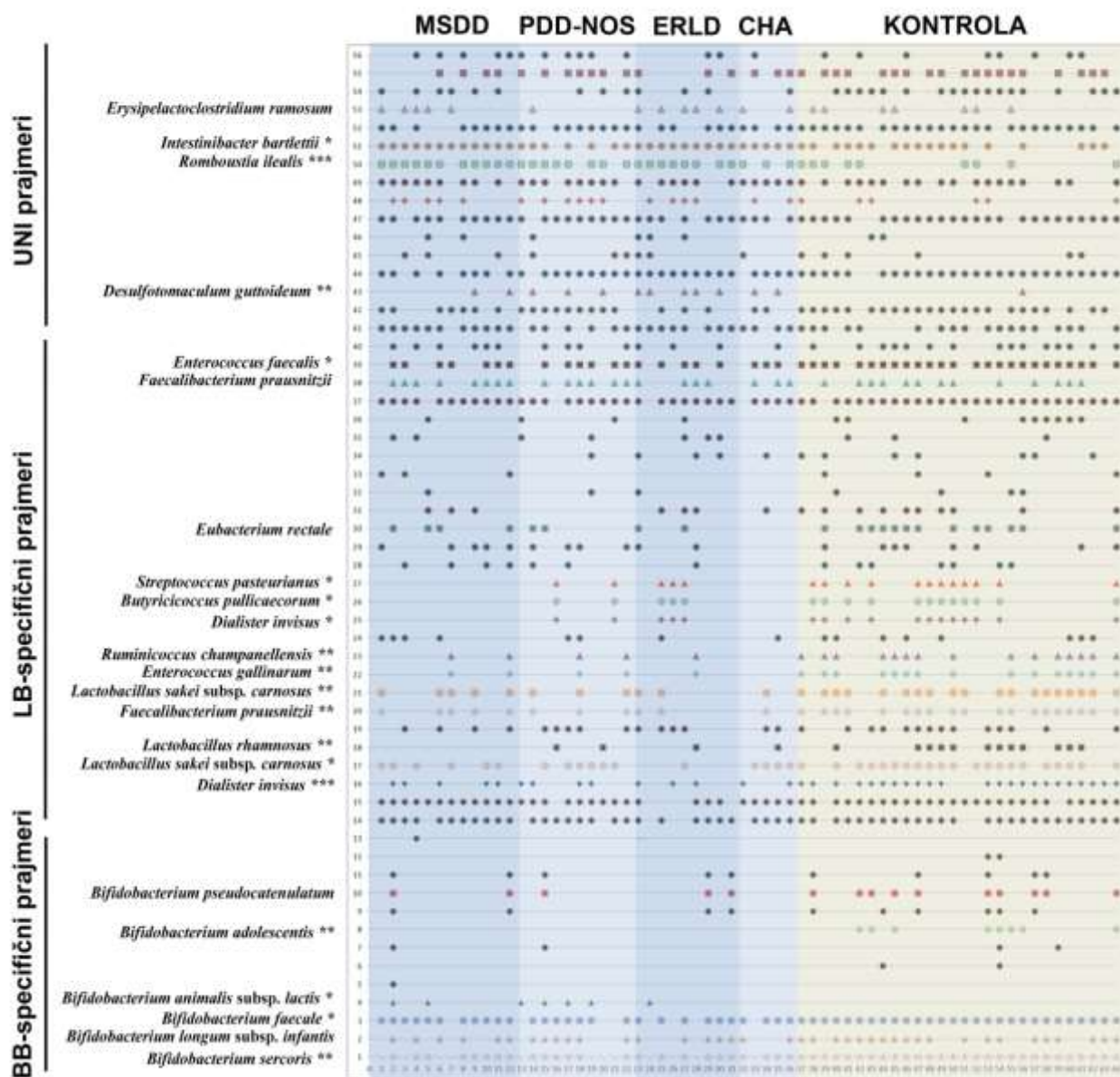
Grupe	<i>LCT -13910 C>T, n (%)</i>				<i>VDR FokI, n (%)</i>			
	CC	CT	TT	Pacijenti vs kontrole p	FF (CC)	Ff (CT)	ff (TT)	Pacijenti vs kontrole p
Kontrole (n=95)	62 (64,6)	29 (31,3)	4 (4,2)	–	32 (33,7)	49 (51,6)	14 (14,7)	–
NDD (n=100)	54 (54,0)	38 (38,0)	8 (8,0)	0,11	41 (41,0)	48 (48,0)	11 (11,0)	0,29
MSDD (n=36)	17 (47,2)	16 (44,4)	3 (8,3)	0,06	14 (38,9)	19 (52,8)	3 (8,3)	0,57
PDD-NOS (n=23)	12 (52,2)	9 (39,1)	2 (8,7)	0,38	9 (39,1)	10 (43,5)	4 (17,4)	0,62
ADHD (n=4)	2 (50,0)	1 (25,0)	1 (25,0)	0,62	1 (25,0)	2 (50,0)	1 (25,0)	1,00
ERLD (n=16)	11 (68,8)	4 (25,0)	1 (6,3)	0,78	4 (25,0)	11 (68,8)	1 (6,3)	0,49
CHA (n=21)	12 (57,1)	8 (38,1)	1 (4,8)	0,62	13 (61,9)	6 (28,6)	2 (9,5)	0,016

Napomena: Razlike u distribuciji genotipova između grupa analizirane su korišćenjem dominantnog genetičkog modela (FF vs Ff+ff tj. CC vs CT+TT). Istaknuta p vrednost smatra se značajnom nakon

Benjamini-Hochberg korekcije. U svakoj NDD grupi rađena su tri poređenja sa kontrolnom grupom (jedno za svaku testiranu genetičku varijantu: *LCT* -13910C>T i *VDR* FokI varijantu). U svim prikazanim poređenjima korigovana *p* vrednost je bila 0,017. NDD - neurorazvojni poremećaji, MSDD – mešoviti specifični poremećaji razvoja, ADHD – poremećaj pažnje sa hiperaktivnosti, ERLD – poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora, CHA – dečiji autizam, PDD-NOS – pervazivni razvojni poremećaj, nespecifičan.

4.5. Analiza Dice koeficijenta sličnosti crevne mikrobiote pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima i kontrolne grupe ispitanika

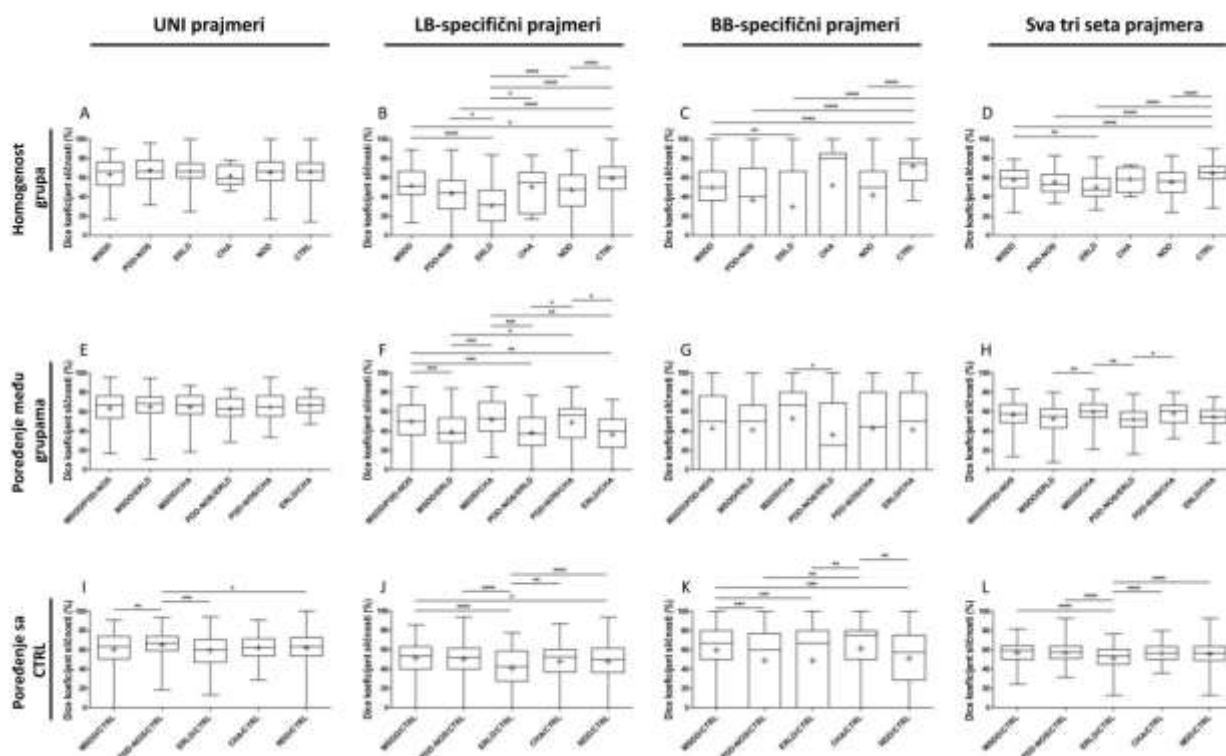
U cilju poređenja fekalne mikrobiote dece sa NDD i zdrave dece korišćena je DGGE analiza 16 rDNK amplikona dobijenih primenom tri seta prajmera (univerzalni (UNI), prajmeri specifični za *Lactobacillus* (LB) i prajmeri specifični za *Bifidobakterije* (BB)). (Slika 4)



Slika 4. Šematski prikaz diverziteta fekalne mikrobiote dece sa NDD i zdrave dece. Identifikacija bakterija je rađena sekvenciranjem PCR-DGGE rDNK odabranih amplikona za svakog pojedinačnog ispitanika (y-osa). Broj na y-osi odgovara broju uočenih rDNK amplikona. rDNK amplikoni čija se učestalost statistički značajno razlikovala između grupe NDD pacijenata i kontrola (ili je postojao

trend) bili su izolovani, klonirani i sekvencirani. Brojevi na x-osi predstavljaju uzorke pojedinačnih ispitanika. Analizirano je ukupno 64 ispitanika (36 NDD pacijenata i 28 zdravih kontrola). Svaki simbol predstavlja odgovarajuću traku (rDNK amplikon) na DGGE gelu. NDD – neurorazvojni poremećaji, MSDD – mešoviti specifični poremećaji razvoja, PDD-NOS – pervazivni razvojni poremećaj, nespecifični, ERLD – poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora, CHA – dečiji autizam.

DGGE profili dobijeni sa univerzalnim prajmerima pokazuju veliku individualnu raznovrsnost u svim ispitivanim grupama, usled čega Dice koeficijent sličnosti nije pokazao statistički značajnu razliku između ispitivanih grupa (Slika 5A).



Slika 5. Box-plot diagram baziran na Dice koeficijentu sličnosti. Ispitivanje homogenosti i sličnosti između grupa sprovedeno je Dice koeficijentom sličnosti (%). Homogenost grupa ispitivana je poređenjem DGGE profila dobijenih sa univerzalnim (UNI), prajmerima specifičnim za Lactobacillus (LB) i prajmerima specifičnim za Bifidobacteria (BB) i sva tri seta prajmera zajedno (A, B, C, D) unutar kontrolne grupe i određene NDD podgrupe pacijenata. Sličnost između NDD podgrupa kao i sličnosti NDD podgrupa sa kontrolnom grupom ispitivane su poređenjem DGGE profila određenih NDD podgrupa dobijenih univerzalnim, LB- specifičnim i BB- specifičnim prajmerima i sva tri seta prajmera zajedno, između NDD grupa (E, F, G, H), i sa DGGE profilima kontrolne grupe (I, J, K, L). Vrednosti dobijene Dice analizom prikazane su u tabeli 14. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

Tabela 14. Prikaz vrednosti dobijenih Dice analizom

	Sr. vrednost	SD
Uni prajmeri		
MSDD	63,55	17,67
PDD-NOS	67,56	14,94
ERLD	66,54	12,63
CHA	61,78	10,43
NDD	65,27	14,62
CTRL	65,82	15,46
LB-specifični prajmeri		
MSDD	51,77	18,74
PDD-NOS	43,60	19,35
ERLD	31,12	22,30
CHA	50,17	23,56
NDD	47,24	19,60
CTRL	59,30	15,21
BB- specifični prajmeri		
MSDD	49,88	28,56
PDD-NOS	36,85	39,15
ERLD	30,13	37,50
CHA	52,00	45,41
NDD	41,75	35,77
CTRL	71,88	16,16
Sva tri seta prajmera		
MSDD	57,80	12,52
PDD-NOS	55,65	12,47
ERLD	49,90	13,64
CHA	58,53	12,19
NDD	55,42	13,02
CTRL	64,57	9,353
Uni prajmeri		
MSDD/PDD-NOS	63,46	17,88
MSDD/ERLD	64,90	16,64
MSDD/CHA	64,71	15,15
PDD-NOS/ERLD	62,91	12,34
PDD-NOS/CHA	64,72	13,52
ERLD/CHA	66,55	10,02
LB-specifični prajmeri		
MSDD/PDD-NOS	49,49	20,50
MSDD/ERLD	38,95	22,07
MSDD/CHA	51,55	19,89
PDD-NOS/ERLD	38,25	20,43
PDD-NOS/CHA	48,94	20,94

ERLD/CHA	36,37	21,96
BB-specifični prajmeri		
MSDD/PDD-NOS	43,00	35,25
MSDD/ERLD	41,01	35,68
MSDD/CHA	52,85	35,89
PDD-NOS/ERLD	36,08	38,81
PDD-NOS/CHA	42,67	41,18
ERLD/CHA	41,14	40,90
Sva tri seta prajmera		
MSDD/PDD-NOS	56,84	14,17
MSDD/ERLD	52,74	14,50
MSDD/CHA	59,58	12,16
PDD-NOS/ERLD	51,90	11,20
PDD-NOS/CHA	58,29	11,55
ERLD/CHA	54,15	10,58
Uni prajmeri		
MSDD/CTRL	60,62	17,46
PDD-NOS/CTRL	64,89	13,03
ERLD/CTRL	59,29	15,76
CHA/CTRL	62,15	12,70
NDD/CTRL	61,84	15,43
LB-specifični prajmeri		
MSDD/CTRL	51,18	15,97
PDD-NOS/CTRL	50,32	16,94
ERLD/CTRL	40,64	20,99
CHA/CTRL	47,79	16,79
NDD/CTRL	47,83	18,21
BB-specifični prajmeri		
MSDD/CTRL	55,90	24,67
PDD-NOS/CTRL	46,09	34,65
ERLD/CTRL	46,16	35,38
CHA/CTRL	57,35	32,66
NDD/CTRL	50,94	31,95
Sva tri seta prajmera		
MSDD/CTRL	56,95	11,74
PDD-NOS/CTRL	57,00	8,827
ERLD/CTRL	50,88	14,32
CHA/CTRL	56,50	10,75
NDD/CTRL	55,38	10,59

Napomena: NDD – neurorazvojni poremećaji, CTRL – kontrola, MSDD – mešoviti specifični poremećaji razvoja, PDD-NOS – pervazivni razvojni poremećaj, nespecifični ERLD – poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora, CHA – dečiji autizam, Sr.vrednost – srednja vrednost, SD – standardna devijacija.

Kada su korišćeni LB-specifični i BB-specifični prajmeri dobijena je velika sličnost DGGE profila unutar kontrolne grupe (59,30±15,21 i 71,88±16,16), dok je najmanja sličnost zabeležena unutar ERLD grupe (31,12±22,3 i 30,13±37,50), (Slika 5B i 5C). Kada su analizirani amplikoni dobijeni LB-specifičnim prajmerima pokazalo se da je u grupi pacijenata najhomogenija MSDD grupa (51,77±18,74) i grupa dece sa CHA (50,17±23,56) (Slika 5B). Među DGGE profilima dobijenim BB-specifičnim prajmerima, najhomogenija među NDD podgrupama bila je CHA grupa (52,00±45,41) (Slika 5C). Kada su analizirani amplikoni dobijeni sa sva tri seta prajmera, najveća sličnost DGGE profila uočena je unutar kontrolne grupe (64,57±9,35), dok je najmanja sličnost uočena unutar grupe ERLD pacijenata (49,90±13,64). Manji stepen homogenosti u odnosu na kontrolnu grupu zabeležen je u ostalim grupama pacijenata, koje su imale sličan nivo homogenosti (MSDD, 57,80±12,54; PDD-NOS, 55,65±12,47, i CHA 58,53±12,59) (Slika 5D).

Dice koeficijent sličnosti pokazao je da su DGGE profili MSDD i CHA grupa, dobijeni LB-specifičnim i BB-specifičnim prajmerima bili slični (51,55±19,89 i 52,85±11,55) (Slika 5F i 5G). Analizom sa sva tri seta prajmera zajedno, uočeno je da su MSDD i CHA grupe pacijenata slične (59,58±12,16), kao i PDD-NOS i CHA grupe (58,29±11,55) i MSDD i PDD-NOS (56,84±14,17), dok je sličnost između MSDD, PDD-NOS i CHA grupa sa ERLD grupom bila niža (52,74±14,50, 51,90±11,20 i 54,15±10,58) (Slika 5H).

Prema analizi DGGE profila dobijenih univerzalnim, LB-specifičnim i BB-specifičnim prajmerima, kao i sa sva tri seta prajmera zajedno, analiza Dice-ovog koeficijenta sličnosti pokazala je da je ERLD najmanje slična kontrolnoj grupi (59,29±15,76; 40,64±20,99; 46,16±35,38; 50,88±14,32) (Slika 5I, 5J, 5K i 5L). Kada su korišćeni univerzalni prajmeri, Dice analizom utvrđeno je da je PDD-NOS grupa najbližija kontrolnoj grupi (64,89±13,03) (Slika 5I), dok je za LB-specifične prajmere najveću sličnost pokazana između MSDD grupe pacijenata i kontrolne grupe (51,18±15,97) (Slika 5J). DGGE profili dobijeni BB-specifičnim prajmerima pokazali su da je CHA grupa najbližija kontrolnoj grupi (57,35±32,66) (Slika 5K). I na kraju, sa sva tri seta prajmera zajedno, Dice analizom je pokazano da su MSDD (56,95±10,59) i PDD-NOS (57,00±10,75) najbližije kontrolnoj grupi (Slika 5L).

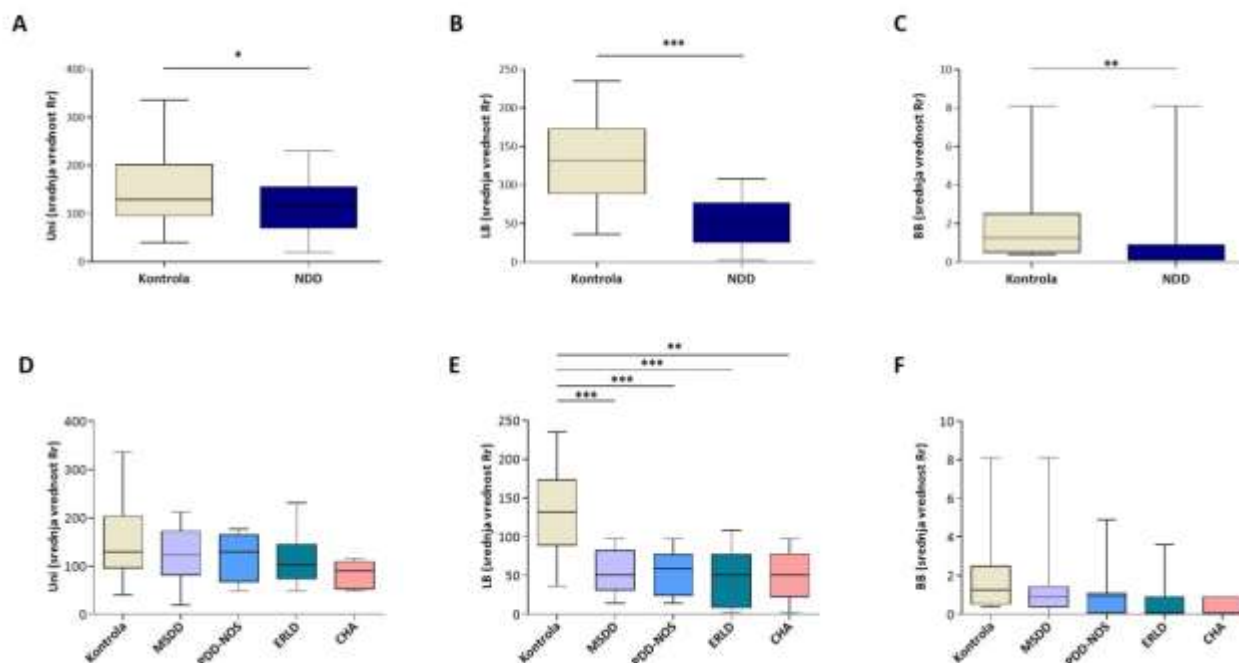
4.6. Poređenje diverziteta crevne mikrobiote

Diverzitet crevne mikrobiote je procenjivan prema indeksu diverziteta (R_r) (*eng.* Range-weighted richness indeks) koji predstavlja ukupan broj rDNK amplikona dobijenih PCR-DGGE analizom pomnožen procentom denaturišućeg gradijenta. Indeks diverziteta analiziranog uzorka izračunava se prema sledećoj formuli:

$$R_r = N^2 \times D_g$$

gde N predstavlja ukupan broj rDNK amplikona u DGGE profilu, a D_g denaturišući gradijent između prve i poslednje trake u profilu. Veće R_r vrednosti predstavljaju veći diverzitet. Rađeno je poređenje između kontrolne grupe i grupe NDD pacijenata.

Uočeno je da među analiziranim grupama postoji značajna razlika u vrednostima R_r između DGGE profila dobijenih univerzalnim prajmerima ($p < 0,05$) (Slika 6A), LB-specifičnim prajmerima ($p < 0,001$) (Slika 6B) i BB-specifičnim prajmerima ($p < 0,01$) (Slika 6C).



Slika 6. Poređenje diverziteta crevne mikrobiote. Korišćen je Studentov t test u cilju poređenja srednjih vrednosti Rr izvedenih na osnovu DGGE profila dobijenih sa univerzalnim (Uni) prajmerima (A) i *Lactobacillus* (LB)-specifičnim prajmerima (B) između NDD pacijenata i kontrolne grupe. Zbog odsustva normalne raspodele Rr izvedene na osnovu DGGE profila dobijenih sa *Bifidobacteria* (BB)-specifičnim prajmerima, razlika između grupa je procenjena neparametrijskim Mann – Whitney U testom (C). Poređenje srednje vrednosti Rr izvedenih na osnovu DGGE profila dobijenih sa univerzalnim (Uni) prajmerima (D) i *Lactobacillus* (LB)-specifičnim prajmerima (E) između određenih NDD grupa i kontrolne grupe izvedeno je one-way ANOVA praćenog Tukey post-hoc testom, dok je poređenje vrednosti Rr izvedene na osnovu DGGE profila dobijenih sa *Bifidobacteria* (BB)-specifičnim prajmerima, rađeno Kruskal-Wallis testom (F). NDD – neurorazvojni poremećaji, MSDD – mešoviti specifični poremećaji razvoja, PDD-NOS – pervazivni razvojni poremećaj, nespecifični, ERLD – poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora, CHA – dečiji autizam, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

One-way ANOVA-om su utvrđene statistički značajne razlike između grupa u srednjim Rr vrednostima DGGE profila dobijenih LB-specifičnim prajmerima ($p < 0,001$). *Post hoc* analiza Rr vrednosti izvedenih na osnovu DGGE profila dobijenih LB-specifičnim prajmerima pokazala je postojanje značajnih razlika u vrednostima Rr između sledećih grupa: MSDD ($54,60 \pm 8,26$, $p < 0,001$), PDD-NOS ($52,98 \pm 8,92$, $p < 0,001$), ERLD ($45,93 \pm 12,25$, $p < 0,001$) i CHA ($50,52 \pm 15,15$, $p < 0,01$) (Slika 6E), ukazujući na značajno niži diverzitet kod pacijenata iz NDD grupe u poređenju sa kontrolnom grupom. Nije uočena značajna razlika u vrednostima Rr izvedenih na osnovu DGGE profila dobijenih univerzalnim prajmerima između grupe pacijenata sa NDD i kontrolne grupe, dok je, sa druge strane, zabeležen trend za vrednosti Rr izvedenih na osnovu DGGE profila dobijenih BB-specifičnim prajmerima ($p = 0,08$) (Slika 6D i 6F).

4.7. Identifikacija ključnih bakterijskih vrsta asociраних sa neurorazvojnим poremećajima

Za sekvenciranje su selektovani oni rDNK amplikoni čija je zastupljenost bila statistički značajno različita između grupe pacijenata sa NDD i kontrolne grupe ispitanika (ili ako je postojao trend). Rezultati sekvenciranja i p vrednosti su prikazane u tabeli 15. Rezultati su pokazali smanjen diverzitet bakterija koje su uobičajeni deo crevne mikrobiote i veću zastupljenost nekoliko uslovno patogenih bakterija u uzorcima NDD pacijenata.

Tabela 15. Identifikacija bakterijskih vrsta na osnovu sekvenciranja rDNK amplikona

Broj rDNK amplikona	Bakterijska vrsta	p
Bakterijske vrste dobijene univerzalnim prajmerima		
53	<i>Erysipelatoclostridium ramosum</i> soj JCM 1298	nz
51	<i>Intestinibacter bartlettii</i> soj WAL 16138	<0,05
50	<i>Romboutsia ilealis</i> soj CRIB (2)	<0,001
43	<i>Desulfotomaculum guttoideum</i> soj DSM 402	<0,01
Bakterijske vrste dobijene LB specifičnim prajmerima		
39	<i>Enterococcus faecalis</i> soj NBRC 100480	<0,05
30	<i>Eubacterium rectale</i> soj ATCC 33656	0,07
27	<i>Streptococcus pasteurianus</i>	<0,05
26	<i>Butyricoccus pullicaecorum</i> soj 25-3	<0,05
25	<i>Dialister invisus</i> soj JCM 17566 (1)	<0,05
23	<i>Ruminococcus champanellensis</i> soj 18P13	<0,01
22	<i>Enterococcus gallinarum</i> soj LMG 13129	<0,01
21	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i> soj CCUG 31331	<0,01
38	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> soj ATCC 27768	<0,01
18	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> soj NBRC 3425	<0,01
17	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>carneus</i> soj CCUG 31331 (2)	<0,05
16	<i>Dialister invisus</i> soj JCM 17566 (2)	<0,001
Bakterijske vrste dobijene BB-specifičnim prajmerima		
10	<i>Bifidobacterium pseudocatenulatum</i> soj B1279	0,08
8	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> soj ATCC 15703	<0,01
4	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> soj YIT 4121	<0,05
3	<i>Bifidobacterium faecale</i>	<0,05
2	<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i> soj ATCC 15697	nz
1	<i>Bifidobacterium stercoris</i> soj Eg1 16S ribozomalna	<0,01

Napomena: DGGE analiza rDNK amplikona dobijenih korišćenjem DNK izolovane iz iz uzoraka fecesa 36 dece sa NDD i 28 zdravih kontrola, kao templat, i tri seta prajmera (univerzalni, LB- i BB- specifični prajmeri) komplementarnih 16S rDNK regionima. Brojevi u tabeli odgovaraju brojevima rDNK amplikonima na slici 4. Poređenje između NDD grupe i kontrolne grupe sprovedeno je Pirsonovim χ^2 test. Statistički značajnim smatrani su rezultati sa $p < 0,05$, nz-nema značajnosti.

4.7.1. Veća učestalost uslovno patogenih bakterija u fekalnoj mikrobioti pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima

Nekoliko bakterijskih vrsta bilo je značajno više zastupljeno u uzorcima grupe pacijenata u odnosu na uzorke kontrolnih ispitanika: *Desulfotomaculum guttoideum* ($p < 0,01$), *Intestinibacter bartlettii* (prethodno poznata kao *Clostridium bartlettii*) ($p < 0,05$) i *Romboutsia ilealis* ($p < 0,001$) (Tabela 15). *D. guttoideum* je u najvećem procentu bila prisutna u uzorcima ERLD pacijenata (55.56%, $p < 0,01$), kod 40% ($p = 0,08$) CHA pacijenata i 30% ($p = 0,08$) PDD-NOS pacijenata u poređenju sa veoma malom zastupljenošću u kontrolnim uzorcima (3,6%) (Tabela 16).

Tabela 16. Zastupljenost identifikovanih bakterijskih sojeva u podgrupama NDD pacijenata (različite dijagnoze) i kontrolne grupe.

Bakterijske vrste dobijene Univerzalnim prajmerima	MSDD (%)	PDD-NOS (%)	ERLD (%)	CHA (%)	CTRL (%)
<i>E. ramosum</i> soj JCM 1298	41,7	10	55,6	40	25
<i>I. bartlettii</i> soj WAL 16138	100*	70	100	100	64,3
<i>R. ilealis</i> soj CRIB (2)	91,7**	80*	88,9*	60	32,1
<i>D. guttoideum</i> soj DSM 402	16,7	30	55,6**	40	3,6
Bakterijske vrste dobijene LB-specifičnim prajmerima	MSDD	PDD-NOS	ERLD	CHA	CTRL
<i>E. faecalis</i> soj NBRC 100480	58,3	60	55,6	60	89,3
<i>E. rectale</i> soj ATCC 33656	33,3	20	22,2	/	46,4
<i>S. pasteurianus</i>	/*	20	33,3	/	42,9
<i>B. pullicaecorum</i> soj 25-3	/*	20	33,3	/	42,9
<i>D. invisus</i> soj JCM 17566	/*	20	33,3	/	42,9
<i>R. champanellensis</i> soj 18P13	16,7	20	11,1	/	53,6
<i>E. gallinarum</i> soj LMG 13129	16,7	20	11,1	/	53,6
<i>L. sakei</i> subsp. <i>carneus</i> soj CCUG 31331	41,7	30	22,2*	20	67,9
<i>F. prausnitzii</i> soj ATCC 27768	41,7	30	22,2*	20	67,9
<i>L. rhamnosus</i> soj NBRC 3425	/**	20	11,1	20	42,9
<i>L. sakei</i> (2)	50	60	11,1**	80	75
<i>D. invisus</i> soj JCM 17566 (2)	41,7*	40*	33,3*	40	82,1
Bakterijske vrste dobijene BB-specifičnim prajmerima	MSDD	PDD-NOS	ERLD	CHA	CTRL
<i>B. pseudocatenuatum</i> soj B1279	16,7	10	22,2	/	35,7
<i>B. adolescentis</i> soj ATCC 15703	/	/	/	/	28,6
<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> soj YIT 4121	16,7	40**	11,1	/	/
<i>B. faecale</i>	91,7	70*	66,7*	80	100
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i> soj ATCC 15697	50	60	55,6	40	71,4
<i>B. stercoris</i> soj Eg1 16S ribozomalna	66,7**	60**	66,7*	80	100

Napomena: Poređenje između podgrupa pacijenata (različite dijagnoze) i kontrolne grupe za svaki bakterijski soj sprovedeno je pomoću Pirsonovog χ^2 testa. Statistički značajnim smatrani su rezultati sa $p < 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. MSDD – mešoviti specifični poremećaji razvoja, PDD-NOS –

pervazivni razvojni poremećaj, nespecifični, ERLD – poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora, CHA – dečiji autizam, CTRL – kontrola.

I. bartlettii bila je prisutna u uzorcima svih pacijenata (100%) sa MSDD ($p < 0,05$), ERLD ($p = 0,09$) i CHA (nema značajnost – nz), dok je kod kontrola bila prisutna u samo 64,3% uzorka. *R. ilealis* je bila prisutna kod 91,7% ($p < 0,01$) pacijenata sa MSDD, 88,9% ($p = 0,01$) pacijenata sa ERLD, 80% ($p < 0,05$) pacijenata sa PDD-NOS i 60% (nz) pacijenata sa CHA. U uzorcima kontrolne grupe ispitanika ova bakterija bila je zastupljena samo u 32% uzoraka. Visoka zastupljenost *Erysipelatoclostridium ramosum* (prethodno poznata kao *Clostridium ramosum*) nađena je kod pacijenata sa ERLD (55,6%, nz), MSDD (41,7%, nz) i CHA (40%, nz), dok je u kontrolnoj grupi nađena samo u 25% uzoraka.

Uočeno je i da su *I. bartlettii* (100%, $p < 0,05$) i *R. ilealis* (91,7%, $p < 0,01$) zastupljene u većem broju kod pacijenata sa MSDD u poređenju sa kontrolnom grupom, dok je veća zastupljenost *R. ilealis* (80%, $p < 0,05$) i *D. guttoideum* (30%, $p = 0,08$) zabeležena kod pacijenata sa PDD-NOS. Velika zastupljenost svih identifikovanih vrsta sličnih rodu *Clostridium* (*D. guttoideum* (55,6%, $p < 0,01$), *R. ilealis* (88,9%, $p < 0,05$), *I. bartlettii* (100%, $p = 0,09$) i *E. ramosum* (55,6%, nz) uočena je u grupi ERLD pacijenata. Iako u grupi pacijenata sa CHA, verovatno zbog malog broja uzoraka u toj grupi, nije uočena značajna razlika u poređenju sa kontrolnom grupom, primećena je veća zastupljenost *D. guttoideum* (40%, $p = 0,08$), *R. ilealis* (60%, nz), *I. bartlettii* (100%, nz) i *E. ramosum* (40%, nz).

4.7.2. Manja zastupljenost bakterija roda *Bifidobacterium*, mlečnokiselinskih bakterija i bakterija koje proizvode buternu kiselinu u fekalnoj mikrobioti pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima

Enterococcus faecalis bio je prisutan kod 89,3% kontrolnih uzoraka i samo kod 58,3% ($p < 0,05$) uzoraka NDD pacijenata, tačnije 58,3% ($p = 0,07$) uzoraka pacijenta sa MSDD i 55,6% ($p = 0,08$) uzoraka pacijenta sa ERLD. *Enterococcus gallinarum* nije detektovan u uzorcima pacijenta sa CHA ($p = 0,08$), dok je kod ERLD pacijenata bio prisutan samo u 11,1% uzoraka ($p = 0,06$) i u 16,7% uzoraka pacijenta sa MSDD ($p = 0,07$). U grupi kontrolnih ispitanika *Enterococcus gallinarum* je bio prisutan u 53,6% uzoraka. *Streptococcus pasteurianus* je bio manje zastupljen u grupi pacijenata ($p < 0,05$), i to potpuno odsutan u uzorcima pacijenata sa MSDD i CHA ($p < 0,05$ i nz). Među bakterijama iz roda *Lactobacillus*, manja zastupljenost *Lactobacillus rhamnosus* ($p < 0,01$) i *L. sakei* ($p < 0,01$) uočena je u grupi pacijenata sa NDD. Uočeno je potpuno odsustvo *L. rhamnosus* u uzorcima pacijenata sa MSDD ($p < 0,01$) i veoma mala zastupljenost u uzorcima pacijenata sa ERLD (11,1%), CHA i PDD-NOS (20%). S druge strane bio je prisutan u 42,9% uzoraka kontrolne grupe ispitanika.

Kompletno odsustvo bakterijskih vrsta roda *Bifidobacterium* zabeleženo je kod 12% pacijenata, dok takav apsolutni deficit nije uočen ni u jednom kontrolnom uzorku. *B. faecale* ($p < 0,05$) je detektovan u svim kontrolnim uzorcima, dok kod 22,2% pacijenata nije bio prisutan. *B. adolescentis*, koji je bio prisutan kod 28,6% uzoraka iz kontrolne grupe ispitanika ($p < 0,01$), nije detektovan ni u jednom uzorku NDD. Takođe i *B. stercoris* ($p < 0,01$) i *B. pseudocatenulatum* ($p = 0,08$) su bili manje zastupljeni u grupi pacijenata. Iako je *B. pseudocatenulatum* bio prisutan u 35,7% uzoraka ispitanika iz kontrolne grupe, njegovo potpuno odsustvo uočeno je kod svih pacijenata sa CHA, dok je samo kod 10% of PDD-NOS pacijenata bio prisutan. Mada ne statistički značajna, manja zastupljenost *B. longum* subsp. *infantis* uočena je u grupi pacijenata. Nasuprot tome, detektovano je prisustvo *B. animalis* subsp. *Lactis* u svim grupama pacijenata osim u grupi pacijenta sa CHA i to u najvećem procentu u uzorcima pacijenata sa PDD-NOS (40%, $p < 0,01$), dok u uzorcima kontrola *B. animalis* subsp. *Lactis* nije bio prisutan (Tabela 16).

Slično tome, bakterije koje proizvode buternu kiselinu: *Faecalibacterium prausnitzii* ($p < 0,01$), *Butyricoccus pullicaecorum* ($p < 0,05$) i *Eubacterium rectale* ($p = 0,07$) bile su manje zastupljene u grupi pacijenata (Tabela 15). *F. prausnitzii* je bio prisutan samo kod 20% (nz) uzoraka pacijenata sa CHA i 22,2% ($p < 0,05$) uzoraka pacijenata sa ERLD, dok je detektovan kod 67,9%

kontrolnih uzoraka. Potpuno odsustvo *B. pullicaecorum* zabeleženo je u uzorcima pacijenata sa CHA (nz) i MSDD ($p < 0,05$), dok je kod 42,9% kontrolnih uzoraka bio prisutan. *E. rectale* nije detektovan ni u jednom uzorku pacijenata sa CHA (nz), i detektovan je u samo 20% uzoraka pacijenata sa PDD-NOS dok je s druge strane bio detektovan kod 46,4% kontrolnih uzoraka.

Ruminococcus champanellensis ($p < 0,01$) i *Dialister invisus* ($p = 0,001$) takođe su bile manje zastupljene u grupi pacijenata. Za razliku od kontrolne grupe ispitanika kod kojih je *R. champanellensis* bio prisutan kod 53,6% uzoraka, u grupi pacijenata detektovan je samo kod 11,1% ($p = 0,06$) uzoraka pacijenata sa ERLD, dok u grupi CHA ($p = 0,08$) pacijenata ni u jednom uzorku nije utvrđeno prisustvo ove bakterije. *D. invisus* je bila prisutna kod 41,7% ($p < 0,05$) uzoraka pacijenata sa MSDD, 40% uzoraka pacijenata sa PDD-NOS i CHA ($p < 0,05$, nz, redom) i 33,3% ($p < 0,05$) uzoraka pacijenata sa ERLD. S druge strane *D. invisus* detektovana je kod 82,1% kontrolnih uzoraka (Tabela 16).

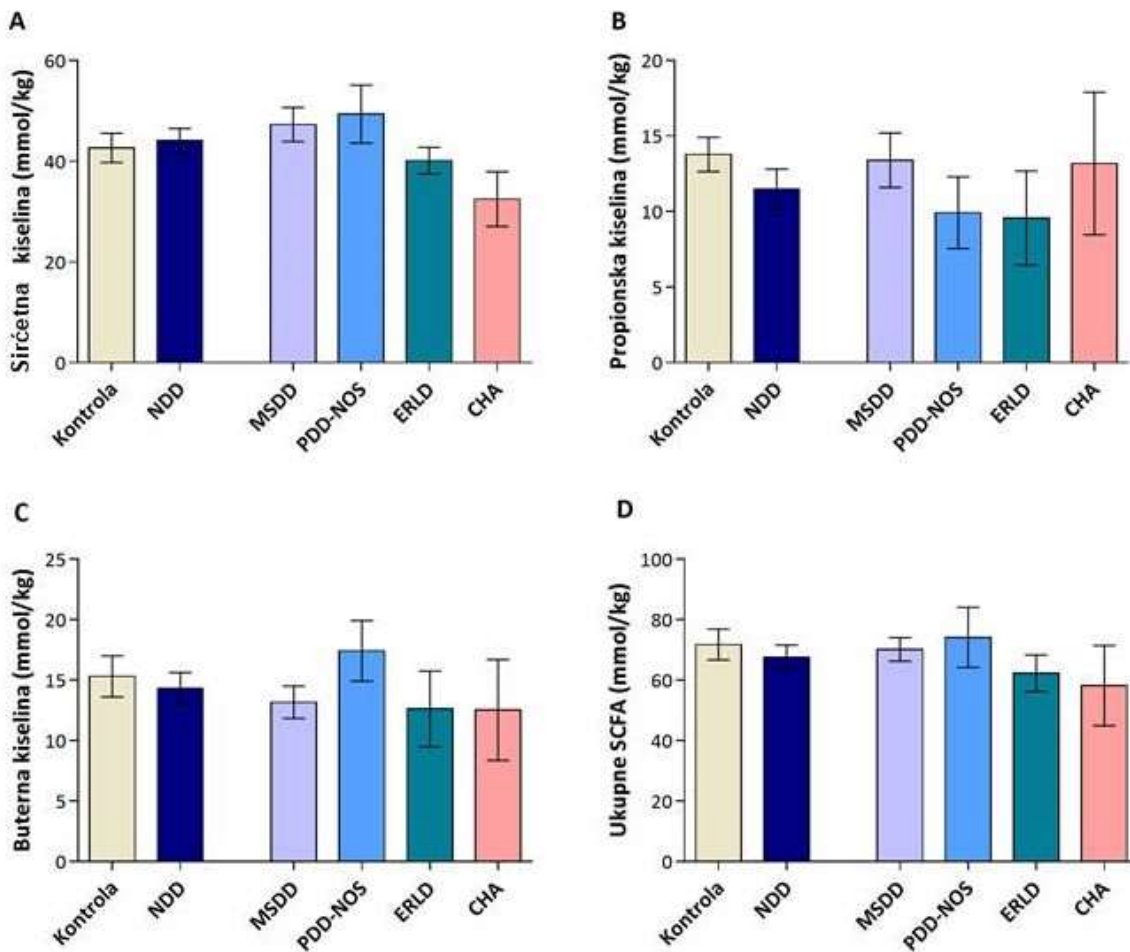
Iako značajna razlika između CHA i kontrolne grupe nije uočena, primećen je nedostatak svih identifikovanih bakterijskih vrsta koje čine normalnu crevnu mikrobiotu. Najupadljivije je bilo potpuno odsustvo: *E. rectale*, *S. pasteurianus*, *B. pullicaecorum*, *R. champanellensis*, *E. gallinarum*, *B. pseudocatenulatum* i *B. adolescentis*. Takođe, potpuno odsustvo *S. pasteurianus*, *B. pullicaecorum*, *L. rhamnosus* i *B. adolescentis* zabeleženo je u grupi pacijenata sa MSDD.

4.8. Prikaz slučaja

Najupečatljiviji primer narušenog diverziteta crevne mikrobiote udruženog sa NDD u našem istraživanju bio je slučaj dvogodišnjeg dečaka, dijagnostikovanog kao MSDD (Slika 4: pacijent pod rednim brojem 7), čiji je DGGE profil dobijen univerzalnim prajmerima pokazao upadljivo smanjenje diverziteta bakterijskih vrsta u poređenju sa uzorcima ostalih pacijenata i kontrola. Dva soja koja su kod ovog pacijenta bila najviše zastupljena bili su bakterijski sojevi slični rodu *Clostridium*: *I. bartlettii* i *E. ramosum*. PCR-DGGE analiza uzorka ovog pacijenta pokazala je kompletno odsustvo bakterijskih vrsta iz roda *Bifidobacterium*, kao i potpuno odsustvo *L. rhamnosus*, *E. rectale*, *B. pullicaecorum* i *D. invisus*. Roditelji ovog pacijenta ukazali su na postojanje GI smetnji u vidu periodičnih opstipacija, dok su kašnjenje u psihomotornom razvoju, prisustvo hipotonije i uznemirenost bili uočeni tokom kliničkog pregleda.

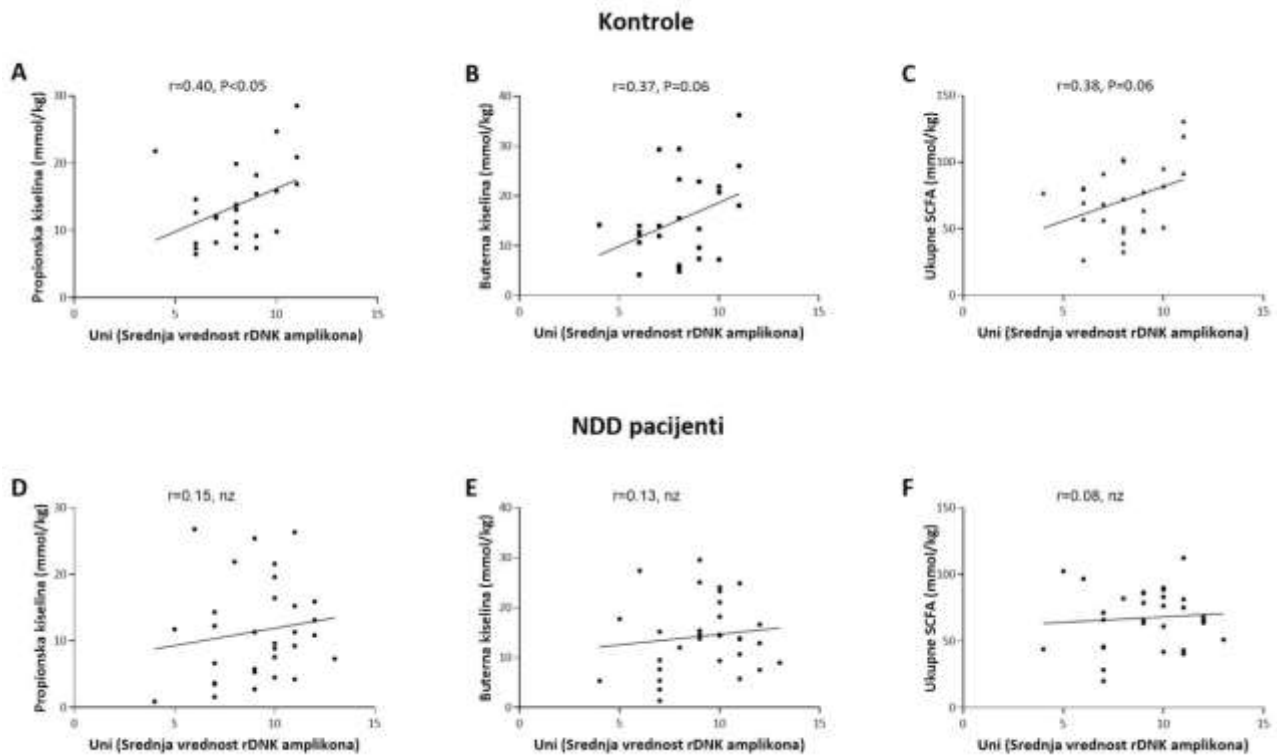
4.9. Analiza masnih kiselina kratkog lanca u uzorcima fecesa pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima i zdrave dece

Analizirana je količina SCFA u uzorcima fecesa uključujući sirćetnu, propionsku i buternu kiselinu. Rezultati su pokazali da sadržaj SCFA varira unutar grupa. Iako razlike između pacijenata i kontrola nisu statistički značajne, pretpostavlja se zbog malog broja CHA pacijenta, uočeno je da su vrednosti ukupnih SCFA, kao i nivoi buterne i sirćetne kiseline, niže u grupi pacijenata sa CHA (Slika 7).



Slika 7. Količina SCFA u fekalnim uzorcima NDD pacijenata i zdrave dece. Količina sirćetne kiseline (A), propionske kiseline (B), buterne kiseline (C) i ukupnih SCFA (D) kod NDD pacijenata, kontrola i određenih NDD dijagnostičkih podgrupa prikazana je kao mmol/kg fecesa. Kvantifikacija SCFA u uzorcima fecesa izvedena je HPLC analizom. Rezultati su prikazani kao srednja vrednost \pm SEM. NDD – neurorazvojni poremećaji, MSDD – mešoviti specifični poremećaji razvoja, PDD-NOS – pervazivni razvojni poremećaj, nespecifični ERLD – poremećaj u razvoju receptivnog i ekspresivnog govora, CHA – dečiji autizam.

Korelaciona analiza ukazala je na postojanje značajne pozitivne korelacije između broja rDNK amplikona dobijenih univerzalnim prajmerima i nivoa propionske kiseline ($r=0,40$, $p<0,05$), kao i prisustva trenda za nivo ukupnih SCFA ($r=0,38$, $p=0,06$) i buterne kiseline ($r=0,37$, $p=0,06$) u kontrolnoj grupi. Ova korelacija se gubi u grupi pacijenata ukazujući da se mikrobiota NDD pacijenata razlikuje od mikrobiote zdrave dece u prisustvu i/ili broju bakterija koje su jaki proizvođači SCFA (Slika 8).



Slika 8. Korelacija između prosečnog broja rDNK amplikona i količine SCFA u kontrolnoj gupi i grupi NDD pacijenata. Prosečan broj rDNK amplikona dobijenih univerzalnim prajmerima korelisan je sa količinom propionske kiseline (A), buterne kiseline (B) i ukupnih SCFA (C) u kontrolnoj grupi i u NDD gupi (D, E, F). Svaka tačka odgovara jednom ispitaniku. Linija označava linearnu regresiju pojedinačnih podataka. R označava Pirsonov korelacioni koeficijent. $p<0,05$ je smatrano statistički značajnim. NDD - neurorazvojni poremećaj, nz- nema značajnost.

5. Diskusija

Tokom poslednjih godina značajnu pažnju naučne i medicinske javnosti privukla su istraživanja čiji cilj je bio utvrđivanje uzroka nastanka razvojnih poremećaja. Dok su se ranije ona bazirala na genetičkim istraživanjima koja su prevashodno bila fokusirana na najozbiljniji razvojni poremećaj, autizam, u poslednjoj deceniji sve više se ispituje uticaj spoljnih faktora i udruženih komorbidnih stanja, naročito gastrointestinalnih poremećaja koja se u ovoj grupi dece javljaju značajno češće nego kod zdrave dece.

U predhodnom periodu veliki broj nezavisnih istraživanja ukazao je na postojanje tesne veze između GI sistema i CNS-a, u literaturi poznatog kao "gut-brain axis" (Farmer et al., 2014; Luna et al., 2016; Wang et al., 2014). U okviru ovog pravca istraživanja postulirana je i opioidna teorija u okviru koje se nastanak nekih neuroloških simptoma dovodi u vezu sa povišenim nivoom opioidnih peptida poreklom iz hrane (proteina kazeina iz mleka i glutena iz žitarica), tzv. egzorfina, u cirkulaciji. Ova teorija je postulirana na osnovu istraživanja na grupi dece sa autizmom (Cade et al., 2000; Reichelt et al., 1986; Shattock et al., 2004; Shattock et al., 2002), ali i odraslih sa šizofrenijom (Tveiten et al., 2012) i depresijom (Liu et al., 2007b; Reichelt et al., 1985) kod kojih je pokazano prisustvo povišenih nivoa ovih peptida u urinu.

Iskustva iz kliničke prakse ukazala su na pozitivan efekat primene restriktivnih dijetetskih intervencija na brzinu rehabilitacije dece iz širokog spektra razvojnih poremećaja. Imajući ovo u vidu, i s obzirom da se neki od simptoma autizma javljaju i kod drugih razvojnih poremećaja, a da se o uzrocima nastanka drugih razvojnih poremećaja malo zna, u ovom radu ispitivano je da li u cirkulaciji dece iz širokog spektra razvojnih poremećaja postoji povišen nivo egzorfina, kao i da li je ova pojava posledica prisustva nekog naslednog faktora ili je izazvana spoljnim uticajem. Dva genetički determinisana stanja koja uzrokuju netolerisanje žitarica sa glutenom i mleka i mlečnih proizvoda jesu celijačna bolest i laktozna intolerancija. Zbog toga su u ovoj studiji po prvi put ispitane genetičke varijante asocirane sa povećanim rizikom za nastanak celijačne bolesti i laktoznom intolerancijom, koje bi mogle dovesti do inflamacije i povećane propustljivosti crevnog epitela kod pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima. Od spoljnih faktora koji bi mogli doprineti ovoj povećanoj propustljivosti, ispitivano je da li je u ovoj grupi pacijenata povećana učestalost disbioze (poremećaja u sastavu crevne mikrobiote). Kako se tokom uzimanja anamnestičkih podataka pacijenata pokazalo da je kod značajnog broja dece prisutna deficijencija ili insuficijencija vitamina D, otvoren je još jedan pravac istraživanja u okviru koga je ispitana učestalost genetičke varijante FokI u genu za receptor za vitamin D (*VDR*) koja se u literaturi dovodi u vezu sa razvojem CNS-a, ali i epilepsijom i autoimunskim bolestima koja su česta komorbidna stanja sa autizmom.

5.1. Prisustvo povišenih nivoa opioidnih peptida u uzorcima urina dece sa neurorazvojnim poremećajima

U poslednjih nekoliko decenija postepeno se razvijala ideja o mogućem uticaju pojedinih komponenti hrane na nastanak neuropsihijatrijskih bolesti. Još 1966, godine F.C. Dohan je primetivši da postoji veza između celijačne bolesti i pojave simptoma šizofrenije predložio da bi šizofrenija mogla nastati kao posledica unosa glutena iz žitarica kod osoba koja imaju genetički poremećaj u metabolizmu peptida (Dohan, 1966). Nešto kasnije, 1979. godine, Jaak Panksepp je na osnovu eksperimenta sa životinjama izneo neurohemijsku hipotezu o nastanku autizma prema kojoj autizam nastaje usled prekomerne opioidne aktivnosti u CNS-u. Panksepp je smatrao da kod dece sa autizmom ne dolazi do normalnog sazrevanja mozga tokom koga se inicijalno visoke koncentracije endogenih opioida postepeno smanjuju (Panksepp, 1979). Te godine grupa norveških istraživača izolovala je peptidnu komponentu iz urina obolelih od šizofrenije koja je pokazala jak stimulatorni efekat na opioidnim receptorima (Hole et al., 1979). Iste godine, nezavisna grupa istraživača u Americi pokazala je da se digestijom proteina kao što su gluten i kazein dobijaju supstance koje poseduju opioidnu aktivnost (Zioudrou et al., 1979). Pokazalo se da se ovi peptidi mogu naći u serumu odojčadi (Wasilewska et al., 2011) i plazmi mladih životinja (Singh et al., 1989), kao i u specifičnim regionima mozga dece (Pasi et al., 1993) što je ukazalo na to da molekuli poreklom iz hrane mogu da prođu kroz

intestinalnu barijeru, ali i krvno moždanu barijeru, i da na nivou CNS-a ostvare svoju fiziološku funkciju posredstvom opioidnih receptora.

Za razliku od endogenih, „tipičnih“ opioidnih peptida (enkefalin, endorfin i dinorfin) koji se proizvode u samom telu, egzogeni, „atipični“ opioidni peptidi nastaju nepotpunim varenjem peptida iz hrane i poznati su kao egzorfina (Zioudrou et al., 1979). S obzirom da ovi molekuli pokazuju farmakološke odlike slične opijumu (morfinu) (Meisel et al., 1990), u literaturi se mogu naći i pod imenom gluteomorfini i beta kazomorfini (GM i BCM) (De Noni et al., 2009). Postoji više gluten egzorfina (GE) i beta kazomorfini različite dužine, što zavisi od mesta na kome je izvršeno enzimsko raskidanje petidnog lanca. Broj u nazivu označava broj aminokiselina koje ulaze u njihov sastav.

Goveđi beta kazomorfini nastaju nepotpunim varenjem A1 beta-kazeina koji je dominantna genetička varijanta beta-kazeina kod goveda evropskog porekla. Ova varijanta nastala je tačkastom mutacijom Pro₆₇→His₆₇ originalne A2 varijante beta kazeina, koja dominira kod čistokrvnih azijskih i afričkih goveda (Ng-Kwai-Hang et al., 2002). Humani beta kazomorfini imaju sličnu aminokiselinsku sekvencu sa goveđim (Wada et al., 2015), ali pokazuju značajno nižu opioidnu aktivnost (Koch et al., 1985). Prisustvo goveđeg BCM-5 pokazano je u serumu dece koja su dojena i čije su majke konzumirale kravlje mleko (Wasilewska et al., 2011). Utvrđeno je da se nivoi goveđih i humanih BCM-5 i BCM-7 u majčinom mleku smanjuje u kasnijim fazama dojenja (Jarmolowska et al., 2007). Pošto se opioidni receptori nalaze u nervnom, endokrinom, imunskom i gastrointestinalnom sistemu (Korhonen et al., 2006), pretpostavljeno je da bi prirodna uloga humanih beta kazomorfini u ranim fazama razvoja kod odojčadi mogla biti u emotivnom vezivanju za majku, regulaciji GI funkcije i stimulaciji sna. Međutim, kod odojčadi koja su bila hranjena adaptiranom formulom pokazano je da je povišen nivo goveđeg BCM-7 u plazmi bio pozitivno korelisan sa stepenom kašnjenja u psihomotornom razvoju, što je vodilo ka zaključku da povišeni nivoi goveđeg BCM-7 u cirkulaciji odojčadi mogu predstavljati faktor rizika za pojavu neurorazvojnih poremećaja poput autizma (Kost et al., 2009). Ovakav negativan efekat goveđih, ali ne i humanih BCM, verovatno potiče od toga što goveđi BCM imaju 3-30 puta jaču opioidnu aktivnost u odnosu na humane (Koch et al., 1985).

Enzimskom digestijom glijadina (komponenta glutena) dobija se nekoliko opioidnih peptida, gluten (gliadin) egzorfina. Izolovano je i identifikovano nekoliko gluten egzorfina: A5, A4, B5, B4 (Fukudome et al., 1992) i C (Fukudome et al., 1993). Prisustvo GE B4 i B5 u krvi primećeno je kod pacijenata sa celijačnom bolesti kod kojih je narušena intestinalna barijera (Pennington et al., 2007), ali je merljiva količina GEB5 detektovana i kod zdravih osoba nakon prekomerne konzumacije glutena (Reichelt et al., 2012).

Dok je intestinalna barijera odojčadi i mladih životinja propustljiva za egzorfine, usled nezrelosti crevnog epitela, smatra se da intaktni peptidi ne mogu biti apsorbovani kod odraslih životinja (Singh et al., 1989) i ljudi sa zdravom intestinalnom barijerom (Miner-Williams et al., 2014). S druge strane, povišen nivo egzorfina pronađen je u urinu obolelih od šizofrenije (Tveiten et al., 2012), depresije (Liu et al., 2007a) i autizma (Cade et al., 2000; Reichelt et al., 1986; Shattock et al., 2004; Shattock et al., 2002). Takođe, povišen titar IgG antitela na gliadin i kazein pronađen je u serumu preko 80% testiranih pacijenata sa autizmom i šizofrenijom (Cade et al., 2000). Kako aktivacija opioidnih receptora na nivou CNS-a izaziva brojne efekte među kojima su analgezija, sedacija, kontrola raspoloženja i apetita itd, pretpostavljeno je da povišen nivo opioidnih peptida u cirkulaciji može uticati na pojavu nekih od simptoma u ovim neuropsihijatrijskim poremećajima poput socijalne ravnodušnosti, loše prilagodljivosti, stereotipnog i repetitivnog ponašanja, pojavu epilepsije, sniženog praga za bol, poremećaja sna i problema u govoru (Reichelt et al., 2003).

Ova hipoteza je potkrepljena eksperimentima na životinjama. Pokazano je da se perifernim uvođenjem humanog BCM-7 (intravenskom infuzijom) mogu izazvati promene u regionima mozga pacova koji su izmenjeni kod obolelih od šizofrenije i autizma, što je potvrdilo da ovi peptidi mogu da prođu krvno-moždanu barijeru. Da su ove promene posredovane opioidnim receptorima dokazano je time što su efekti izostali ukoliko su životinje pretretirane opioidnim antagonistom naloksonom (Sun et al., 1999b). Takođe, pokazano je i da intraperitonealni tretman sa BCM-7 izaziva analgetički efekat i dovodi do promena u ponašanju (hiperaktivnosti, uznemirenosti i socijalnoj izolaciji) (Sun et

al., 1999a) kao i promene u adaptaciji i učenju kod mladih životinja (Dubynin et al., 2008). Gluten-egzorfin A5 izaziva različite efekte na nivou perifernog i centralnog nervnog sistema. Analgetski (antinociceptivni) efekat GEA-5 pokazan je nakon intracerebroventrikularnog tretmana kod miševa dok je oralni tretman imao anksiolitički efekat (Takahashi et al., 2000).

Pošto je pokazano da neki pacijenti sa šizofrenijom i autizmom imaju povećanu apsorpciju kazo- i gluten egzorfina poreklom od nepotpunog varenja proteina glutena i kazeina u crevima, sugerisano je da bi restriktivne dijetete, koje bi podrazumevale uklanjanje ovih proteina iz ishrane, mogle imati pozitivne efekte na simptome obolelih. Nekoliko studija je ukazalo da ishrana bez glutena i mlečnih proizvoda (*eng.* gluten-free-casein-free diet - GFCF) dovodi do poboljšanja simptoma kod dece sa autizmom (Klaveness et al., 2013; Pennesi et al., 2012) i obolelih od šizofrenije (Cade et al., 1990) što se može smatrati i kliničkom potvrdom opioidne teorije. Ovde treba istaći da prisustvo opioidnih peptida kao ni efikasnost GFCF dijetete (Johnson et al., 2011) nije evidentirana u svim studijama. Velika fenotipska raznolikost u autističnom spektru poremećaja kao i veliki broj faktora koji potencijalno utiču na nastanak razvojnih poremećaja navelo je na konceptualnu promenu i izdvajanje posebnog fenotipa autizma koji je reaktivan na promene u ishrani (Whiteley et al., 2012) u odnosu na autizam kod koga su genetički faktori dominantni i kod koga efekat GFCF dijetete nije uočljiv.

Do sada su ispitivanja bila prevashodno fokusirana na pacijente sa autizmom, međutim iskustva iz kliničke prakse ukazala su da primena GFCF dijetete pokazuje pozitivne efekte i u tretmanu dece iz širokog spektra neurorazvojnih poremećaja. Stoga je prvi cilj ove studije bio ispitati da li u grupi NDD pacijenata postoji povišen nivo egzorfina u cirkulaciji, što je posredno mereno nivoom ovih molekula u urinu.

Kod većine pacijenata je uočeno povećanje nivoa jednog ili više analiziranih opioidnih peptida iako nije primećeno značajno povećanje nivoa ukupnih peptida u uzorcima urina pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima. Ovaj nalaz je u skladu sa rezultatima drugih autora koji su pronašli povećan nivo gluten egzorfina i kazomorfina u uzorcima urina pacijenata sa autizmom (Cade et al., 2000; Reichelt et al., 1986; Shattock et al., 2004; Shattock et al., 2002). U nekim istraživačkim grupama nije primećen povišen nivo peptida u urinu dece sa autizmom (Dettmer et al., 2007). S obzirom da se peptidi brzo razgrađuju na sobnoj temperaturi, mogući uzrok za ovakav rezultat može biti neadekvatno prikupljanje uzoraka u tim studijama (Reichelt et al., 2012). U našem istraživanju stabilizacija peptida je postignuta inaktivacijom proteolitičkih enzima promenom pH (dodavanjem limunske kiseline) i brzim zamrzavanjem. Takođe, mora se imati u vidu i mogućnost da se u različitim grupama na kojima je ispitivanje obavljano razlikuje udeo pacijenata kod kojih je autizam dominantno genetički determinisan i kod kojih opioidni peptidi u urinu verovatno nisu prisutni, i pacijenata sa fenotipom koji je reaktivan na GFCF dijetetu, kod kojih se može detektovati povišen nivo ovih molekula.

Kako se prema opioidnoj teoriji pojava velikog broja simptoma autističnog poremećaja objašnjava interakcijom egzorfina sa opioidnim receptorima u CNS-u, na osnovu naših rezultata može se zaključiti da slični mehanizmi verovatno postoje i kod dece iz šireg spektra neurorazvojnih poremećaja. Ovaj rezultat objašnjava i zapažanja iz kliničke prakse o poboljšanju kliničke slike i ubrzanju rehabilitaciji ovih pacijenata nakon uvođenja GFCF dijetete.

Do povišenog nivoa peptida u cirkulaciji može doći usled deficijencije nekog enzima (peptidaza) ili usled povećane propustljivosti crevnog epitela. U našoj studiji se dužina opioidnih lanaca razlikuje između pacijenata. Slično opažanje imali su i drugi autori koji su zaključili da smanjene aktivnosti različitih peptidaza dovode do nastanka različitih dužina lanaca opioidnih peptida detektovanih u urinu pacijenata (Reichelt et al., 2003). Smanjena aktivnost peptidaza može biti uzrokovana prisustvom različitih genetičkih varijanti u genima koji kodiraju ove enzime.

Jedan od enzima koji se u literaturi u poslednje vreme najčešće dovodi u vezu sa povišenim nivoom opioidnih peptida i nastankom autizma jeste dipeptidil peptidaza-4 (DPPIV) (Bashir et al., 2014; Hunter et al., 2003; Jarmolowska et al., 2019). DPPIV je enzim koji igra ključnu ulogu u digestiji malih peptida. Niža ekspresija ovog enzima ili njegova niža aktivnost zajedno sa sindromom propusnih creva može da rezultuje akumulacijom aktivnih opioidnih peptida u cirkulaciji. Dok je u

nekim studijama pokazano da je nivo DPPIV u plazmi dece sa autizmom niži (Bashir et al., 2014), rezultati drugih autora su ukazivali na to da je nivo DPPIV enzima kod dece sa autizmom viši iako njegova aktivnost nije korelirala sa njegovom količinom. Iz ovoga je zaključeno da je viši nivo enzima DPPIV kompenzatorni mehanizam za njegovu nižu enzimsku aktivnost kod dece sa autizmom (Jarmolowska et al., 2019). Istraživanja su pokazala da dečaci sa autizmom imaju veću učestalost G alela rs7608798 varijante u genu koji kodira DPPIV peptidazu, što je ukazalo na vezu DPPIV i nastanka autizma (Cupic et al., 2012).

Drugi preduslov za povećanu apsorpciju peptida je povećana crevna propustljivost, do koje može doći usled sistemske inflamacije crevnog epitela (Hietbrink et al., 2009). Mnoge studije su pokazale da deca iz autističnog spektra imaju oštećenje sluznice creva (Horvath et al., 2002; Torrente et al., 2002) što predstavlja osnovu ovog sindroma (D'Eufemia et al., 1996). Inflamaciju crevnog epitela može izazvati netolerisanje neke komponente hrane ili promena u sastavu mikrobiote (disbioza).

5.2. HLA-DQ varijante povezane sa celijačnom bolesti kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Celijačna bolest je genetički determinisana autoimunska bolest koju karakteriše netolerisanje glutena i hronična inflamacija creva, koja može biti uzrok povećane propustljivosti crevnog epitela i povišenog nivoa GE u cirkulaciji (Pennington et al., 2007). Hronična inflamacija creva kakva se sreće kod pacijenata sa CB dovodi do smanjene aktivnosti digestivnih enzima i povećane apsorpcije proteina i peptida (Reichelt et al., 1998). Slučaj deteta sa CB koje je pogrešno dijagnostikovano kao dete sa autizmom, kod koga su se svi neurološki simptomi povukli nakon primene dijeta bez glutena, predstavlja potvrdu da inflamacija na nivou creva izazvana CB može drastično uticati na disfunkciju centralnog nervnog sistema (Genuis et al., 2010). Osim klasičnog ispoljavanja CB koje podrazumeva prisustvo GI smetnji kao što su dijareja i povraćanje, kod velikog broja pacijenata sa potvrđenom CB nema klasičnih GI simptoma glutenske intolerancije (Pruimboom et al., 2015). U radu Pruumboom-a i Punder-a (Pruimboom et al., 2015) postulirana je "tiha opioidna hipoteza" u kojoj je predložen mehanizam kojim gluten egzorzini, ispoljavajući svoj analgetski efekat na nivou creva, mogu maskirati GI simptome CB. Kod ovih pacijenata se vrlo često razvijaju poremećaji i bolesti koji su uzrokovani unošenjem glutena. Rezultati velikih populacionih studija potvrdili su da su deca sa CB u većem riziku za nastanak psihijatrijskih oboljenja, uključujući i autizam (Butwicka et al., 2017). Iako je zabeležen niz psihijatrijskih i neuroloških simptoma kod pacijenata sa senzitivšću na gluten i CB (Jackson et al., 2012) značaj i uloga osetljivosti na gluten u razvoju psihijatrijskih i neuroloških poremećaja nije u potpunosti prihvaćena.

Uzimajući sve navedeno u obzir, u ovoj studiji kod pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima ispitano je prisustvo genetičkih varijanti *HLA-DQ* (*HLA-DQ2*, *-DQ8*) za koje se zna da su povezane sa CB. Nisu utvrđene razlike u distribuciji analiziranih genetičkih varijanti između grupe pacijenata i kontrolne grupe kao ni veza između povišenih nivoa opioidnih peptida i analiziranih *HLA-DQ* varijanti. Iz toga je zaključeno da CB nije uzročnik povećane crevne propustljivosti i povišenih nivoa egzorzina u urinu dece sa neurorazvojnim poremećajima.

Naši rezultati su u saglasnosti sa rezultatima dobijenih iz studije sprovedene na 37 pedijatrijskih pacijenata sa autizmom kod kojih je urađena genotipizacija *HLA-DQ2* i *-DQ8* genetičkih varijanti asociiranih sa CB i ispitana antitela na tkivne transglutaminaze i antiglijadinska antitela. U ovoj grupi pacijenata nivo antitela na glijadin je bio značajno viši u odnosu na zdravu grupu, međutim nije uočena asocijacija između nivoa antitela i prisustva genetičkih markera za CB što je ukazalo na to da je kod ovih pacijenata imunski odgovor na gluten drugačiji u odnosu na CB (Lau et al., 2013).

Iako u našoj studiji nismo pronašli povezanost varijanti *HLA-DQ* sa neurorazvojnim poremećajima, dalja istraživanja gena *HLA* bila bi poželjna s obzirom da je u istraživanjima drugih autora uočena asocijacija autizma sa celim *HLA* regionom i istaknuto da varijabilnost u ovom regionu nosi najveći genetički rizik za nastanak autizma. Pretpostavlja se da *HLA* regija nosi deo naslednog rizika za nastanak autizma, kako u klasičnim tako i nespecifičnim *HLA* genima (Torres et al., 2012).

5.3. Varijante asocirane sa laktoznom intolerancijom kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Nepotpunom razgradnjom proteinske komponente mlečnih proizvoda (kazeina), nastaju kazomorfini, za koje se smatra da mogu da izazovu neke od simptoma autizma. Gastrointestinalne tegobe, inflamacija creva i povećana crevna propustljivost koji su česti kod ovih pacijenata, mogli bi biti posledica netolerisanja mleka i mlečnih proizvoda. Jedan od potencijalnih uzročnika intolerancije mleka jeste intolerancija na mlečni šećer-laktozu.

Kušak i sar (2001.) su u istraživanju aktivnosti disaharidaze u crevima sprovedenom na 199 osoba sa autizmom, uočili da je učestalost deficijencije laktaze prisutna u duodenalnoj biopsiji kod 58% dece mlađe od 5 godina sa dijagnozom autizma. Zaključeno je da nedostatak laktaze dosta čest kod dece sa autizmom i da kod većine autistične dece intolerancija na laktozu nije identifikovana u medicinskoj dokumentaciji (Kushak et al., 2011).

Iz tih razloga ispitivali smo učestalost genetičke varijante -13910 C> T uzvodno od gena *LCT* povezane sa primarnom laktoznom intolerancijom. U našem istraživanju nisu utvrđene razlike u distribuciji analiziranih genetičkih varijanti među ispitivanim grupama, kao ni postojanje njihove korelacije sa nivoom opioidnih peptida. Prema našim rezultatima možemo zaključiti da primarna LI nije povezana sa GI tegobama kod pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima, te da ukoliko je laktozna deficijencija prisutna kod tih pacijenata, ona nastaje usled oštećenja sluznice tankog creva, što predstavlja sekundarnu intoleranciju na laktozu (Radlovic et al., 2009).

Novija istraživanja ukazuju na to da je laktozna intolerancija mnogo ređe uzročnik netolerisanja mleka nego što se to ranije smatralo, i da je A1 beta kazein češći uzročnik ove intolerancije (Pal et al., 2015). Pokazano je da unos A1, ali ne i A2, beta kazeina ima proinflamatorne efekte u crevima pacova i miševa (Barnett et al., 2014; Ul Haq et al., 2014b) kao i da je ovaj efekat izazivaju BCM 7 i 5 (Ul Haq et al., 2014a).

Imajući ovo u vidu, može se pretpostaviti da inflamacija izazvana konzumacijom mleka sa A1 polimorfizmom beta kazeina može da izazove GI poremećaje kao i sekundarnu intoleranciju na laktozu, koja je verovatno posredovana kazomorfinitima, kod genetički predisponiranih individua koji su nosioci polimorfizama peptidaza sa nižom enzimskom aktivnošću.

5.4. Intolerancija na hranu kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Slično kao u studiji Lau i sar. (Lau et al., 2013) kod koje je u grupi dece sa autizmom primećen viši nivo IgG antitela na gliadin, u ovoj studiji je tokom uzimanja anamnestičkih podataka evidentiran povišen nivo IgG antitela na gluten kod 40,7% (33/81) pacijenata, kao i povišen nivo IgG antitela na mleko kod 84% (68/81) pacijenata. Pacijenti sa nespecifičnim pervazivnim razvojnim poremećajem, imali su veću učestalost intolerancije na mleko (100%) u poređenju sa ispitanicima iz ostalih grupa pacijenata kao i najveću učestalost GI tegoba i registrovanih poremećaja u sastavu crevne mikrobiote (87,5%). S druge strane, pacijenti sa mešovitim razvojnim poremećajima imali su najveću učestalost intolerancije na gluten (56%) ali i visoku učestalost disbioze (83,3%). Čak 97,5% ispitanika sa neurorazvojnim poremećajima imalo je podstaknut humoralni imunski odgovor na neku komponentu hrane.

Na osnovu analiziranih podataka izveli smo zaključak do koga su došli Lau i sar. (Lau et al., 2013) da imunska reakcija na gluten (ili neku drugu komponentu hrane) može biti uzročnik upalnog procesa koja vodi ka povećanoj crevnoj propustljivosti. Kako u našoj grupi NDD pacijenata nisu identifikovani genetički markeri za CB i laktoznu intoleranciju, a registrovani su povišeni nivoi antitela na gluten i mleko, može se zaključiti da GI simptomi kod NDD pacijenata mogu delimično poticati i od "ne-celijske osetljivosti na gluten" ili osetljivosti na druge komponente hrane.

Iako je većina pacijenata kod kojih je uočen povišen nivo nekog od analiziranih opioidnih peptida takođe imao i povišen nivo IgG antitela na neku komponentu hrane (90,5%), kod četiri pacijenata sa povišenim nivoima IgG antitela nisu identifikovani opioidni peptidi u urinu (podaci nisu prikazani). Iz ovoga se može zaključiti da stimulacija humoralnog imunskog odgovora na neku

komponentu hrane može biti potreban, ali ne i dovoljan preduslov za povećanje nivoa opioidnih peptida u uzorcima urina. S druge strane kod dva pacijenta sa povišenim nivoima opioidnih peptida nisu nađeni povišeni nivoi IgG antitela, što može da ukaže da su neki drugi mehanizmi, kao što je inflamacija crevnog zida uzrokovana disbiozom, odgovorni za narušavanje permeabilnosti crevnog zida i nastanak crevne propustljivosti kod ovih pacijenata.

5.5. Specifičnosti sastava crevne mikrobiote dece sa neurorazvojnim poremećajima

Poslednjih decenija intenzivno su proučavane razlike u sastavu crevne mikrobiote između dece sa autizmom i zdrave dece (Hughes et al., 2018). Međutim, u literaturi se ne mogu naći podaci o sastavu mikrobiote dece sa drugim formama NDD. Prema našim saznanjima ovo je prva studija kojom se ispituje specifičnost sastava crevne mikrobiote kod šireg spektra NDD pacijenata. Rezultati ovog ispitivanja pokazali su da je raznovrsnost bakterija koje su sastavni deo mikrobiote zdravih ljudi, u grupi pacijenata bio značajno niži u odnosu na kontrolnu grupu, dok je zastupljenost nekoliko potencijalno štetnih bakterijskih vrsta bila značajno viša.

5.5.1. Povećana učestalost bakterijskih vrsta srodnih sa rodom *Clostridium* kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Među uslovnim patogenima koji su bili značajnije zastupljeni u grupi pacijenata uočene su tri vrste koje su srodne sa bakterijama iz roda *Clostridium*: *Desulfotomaculum guttoideum*, *Intestinibacter bartlettii* i *Romboutsia ilealis* (Stackebrandt et al., 1997). *D. guttoideum*, čija 16S rDNK sekvenca pokazuje visok stepen homologije sa odgovarajućim nukleotidnim sekvencama vrsta iz roda *Clostridium* (Castro et al., 2000; Stackebrandt et al., 1997), je sulfat-redukujuća bakterija, kao i *Desulfovibrio*, čija je veća zastupljenost kod dece sa autizmom pokazana u ranijim studijama (Finegold et al., 2010; Finegold et al., 2012; Tomova et al., 2015). Pretpostavljeno je da organizmi koji redukuju sulfat mogu značajno doprineti nastanku poremećaja metabolizma sulfata koji postoji kod pacijenata sa autizmom, i koga karakterišu nizak nivo sulfata u krvi, pojačana urinarna ekskrecija, smanjeni kapacitet metilacije i hronični oksidativni stres (Finegold et al., 2012). S obzirom na veću zastupljenost vrsta iz rodova *Desulfovibrio* i *Clostridium* u mikrobioti dece sa autizmom u prethodnim studijama, pretpostavljeno je da ove bakterije doprinose pojavi nekih simptoma autizma (Tomova et al., 2015). Nekoliko grupa istraživača koja se bavila ispitivanjem crevne mikrobiote dece sa autizmom uočila je prekomeran rast bakterijskih vrsta srodnih sa rodom *Clostridium* (De Angelis et al., 2013; Finegold et al., 2002; Parracho et al., 2005; Song et al., 2004a). Pretpostavljeno je da jedna forma autizma, tzv regresivni autizam, kod koga se dete u početku razvija normalno, a zatim počinje da gubi socijalne veštine i govor u uzrastu od oko 18 meseci, može nastati kao posledica crevne dizbioze uzrokovane antibiotskom terapijom. Elen Bolte je 1998. godine postavila hipotezu prema kojoj bi *Clostridium tetani* (ili neka druga bakterija u crevima) mogla imati udela u nastanku regresivnog autizma (Bolte, 1998). Prema ovoj hipotezi, prekomeran rast mikroorganizama otpornih na antibiotsku terapiju, kao što je *Clostridium tetani* (ili *Clostridium difficile*) (Passmore et al., 2018) dovodi do povećanog stvaranja neurotoksina *p*-krezol (fenolno jedinjenje sa bakteriostatskim osobinama) ili nekih drugih toksičnih fenolnih i indolnih metabolita, koji mogu da uzrokuju pojavu anksioznog ponašanja. (Bolte, 1998; Finegold et al., 2012; Hsiao et al., 2013). U skladu sa tim, rezultati nekih studija su pokazali da nakon terapije vankomicinom, antibiotikom koji se koristi kod infekcija izazvanih bakterijom *C. difficile*, dolazi do poboljšanja kognitivnog i socijalnog funkcionisanja osoba sa autizmom (Sandler et al., 2000). Snažan proizvođač indolnog jedinjenja, trans-3-indolil akrilne kiseline (*eng.* indolylacrylic acid, IAA), koja glicinskom konjugacijom može biti transformisana u indolil-3-akriloliglicin (*eng.* indolyl-3-acryloylglycine, IAG) (Clayton, 2012) je bakterijska vrsta *I. bartlettii* (Russell et al., 2013). Ova bakterija, koja je pre reklasifikacije bila poznata kao *Clostridium bartlettii*, prvobitno je izolovana iz fecesa dva autistična dečaka (Song et al., 2004b). Povišeni nivoi IAG pronađeni su u urinu pacijenata sa autizmom te se IAG smatra potencijalnim dijagnostičkim markerom za poremećaje iz autističnog spektra (Bull et al., 2003;

Shattock et al., 2002). *Erysipelatoclostridium ramosum* (prethodno poznat kao *Clostridium ramosum*) koji je u našoj studiji bio zastupljeniji kod ERLD, MSDD i CHA pacijenta u poređenju sa zdravim kontrolama, takođe je izolovan i u uzorcima fecesa dece sa autizmom u okviru istraživanja drugih autora (Finegold et al., 2002).

5.5.2. Smanjen diverzitet mlečnokiselinskih bakterija, bakterija roda *Bifidobacterium*, kao i bakterija koje proizvode buternu kiselinu kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Iako unutar grupa i pacijenata i kontrola postoji velika raznovrsnost, značajno smanjenje diverziteta mlečnokiselinskih bakterija uočeno je u grupi pacijenata sa NDD. Identifikovani bakterijski sojevi koji su bili u većoj meri zastupljeni u kontrolnim uzorcima u odnosu na pacijente, predstavljaju sastavni deo mikrobiote zdravih osoba uključujući i bakterije koje proizvode buternu kiselinu. Vrste *En. faecalis*, *En. gallinarum* i *S. pasteurianus* koje su deo normalne crevne mikrobiote (Alex et al., 2013; Layton et al., 2010; Rajilic-Stojanovic et al., 2007), otkrivene su u niskom broju ili su čak bile potpuno odsutne u nekim grupama pacijenata sa NDD. Ovi rezultati su u skladu sa podacima drugih autora koji su takođe pronašli nižu zastupljenost mlečnokiselinskih bakterija (*Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp., i *Lactococcus* sp.) u uzorcima fecesa dece sa autizmom i PDD-NOS. Među bakterijama iz roda *Lactobacillus*, pronađeno je da je *Lactobacillus rhamnosus*, manje zastupljen u grupi NDD pacijenata. Pokazano je da unos *L. rhamnosus* JB-1 ima uticaj na regulaciju emocionalnih ponašanja povezanih sa anksioznošću i depresijom kod zdravih miševa, putem regulacije ekspresije centralnog GABA receptora (Bravo et al., 2011).

U grupi pacijenata sa NDD, uočena je i smanjena zastupljenost *Dialister invisus*. Iako su vrste *D. invisus* tipično prisutne u usnoj duplji, takođe su bile detektovane i u uzorcima normalne GI mikrobiote (Rajilic-Stojanovic et al., 2007). Smanjen broj *D. invisus* uočen je kod dece sa autizmom, a predloženo je da ova bakterija može imati značaj u autizmu kao deo zaštitne mikrobiote (Finegold et al., 2010). Takođe uočeno je i značajno smanjenje *Bifidobacteria*, uključujući kompletno odsustvo *Bifidobacteria* kod 12% ispitanika iz grupe NDD pacijenata, dok sa druge strana takav upadljiv nedostatak nije detektovan ni u jednom od kontrolnih uzoraka. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima drugih autora koji su takođe detektovali manju zastupljenost bakterija iz roda *Bifidobacterium* u uzorcima dece sa autizmom (Adams et al., 2011; De Angelis et al., 2013; Wang et al., 2011a). *Bifidobacteria* čine važnu grupu bakterija koje su deo normalne crevne mikrobiote i koje prve kolonizuju creva odmah po rođenju (Turroni et al., 2012). Ove bakterije predstavljaju dominantni bakterijski rod dečije crevne mikrobiote (Harmsen et al., 2000; Matamoros et al., 2013) i značajan su deo crevne mikrobiote odraslog čoveka (Chaplin et al., 2015; Ringel-Kulka et al., 2013). *Bifidobacteria* imaju niz pozitivnih uloga u očuvanju zdravlja čoveka. Među njima je digestija polisaharida koji su nesvarljivi za domaćina (Lee et al., 2010; Sonnenburg et al., 2006), proizvodnja vitamina B grupe (Deguchi Y i sur. 1985), inhibicija patogenih bakterija kroz kompetitivno isključivanje i/ili proizvodnju antimikrobnih agenasa (Mulle et al., 2013) i imunska regulacija supresijom upalnih odgovora (Miyachi et al., 2013; Turroni et al., 2014). Zabeleženo je da deca sa autizmom često imaju probleme sa varenjem (Wasilewska et al., 2015), nedostatak vitamina B12 (Zhang et al., 2016), imunsku disregulaciju/upalu creva (Rossignol et al., 2012) i svi ovi problemi bi mogli biti povezani sa smanjenim prisustvom *Bifidobacteria* u crevima.

Pretpostavlja se i da određeni sojevi iz roda *Bifidobacterium* mogu biti od značaja u lečenju nekih psihijatrijskih oboljenja kao što su depresija i anksioznost. Pokazano je da tretman *B. infantis* može biti koristan u lečenju depresije tako što dovodi do povećanja prekursora serotonina – triptofana (Desbonnet et al., 2008), kao i da može da poboljša odgovor na stres posredovan hipotalamus-hipofiznom osom (eng. hypothalamic-pituitary axis, HPA) (Sudo et al., 2004). Sa druge strane pokazano je da tretman *B. longum* dovodi do anksiolitičkog efekta (Bercik et al., 2011b). Primena antibiotske terapije u prvim godinama života mogla bi biti odgovorna za snižen diverzitet *Bifidobacteria*. Značajno veća oralna upotreba antibiotika kod dece sa autizmom u odnosu na zdravu decu (Konstantareas et al., 1987; Niehus et al., 2006) verovatno dovodi do smanjenje raznovrsnosti

bakterijskih vrsta iz roda *Bifidobacterium*, kakva je registrovana kod novorođenčadi koja su tretirana antibioticima (Hussey et al., 2011).

Prema rezultatima naše studije *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* je visoko zastupljen kod svih NDD grupa pacijenata, osim kod pacijenata iz grupe CHA, dok s druge strane nije detektovan ni u jednom uzorku fecesa ispitanika iz kontrolne grupe što je u skladu sa rezultatima istraživanja drugih autora (Finegold et al., 2010). S obzirom da se različiti sojevi ove bakterijske vrste koriste kao probiotici (Merenstein et al., 2015), veća zastupljenost *B. animalis* može biti posledica učestalije upotrebe probiotika u grupi NDD pacijenata, koji često imaju GI tegobe.

Tri bakterijske vrste koje proizvode buternu kiselinu: *Faecalibacterium prausnitzii*, *Butyricoccus pullicaecorum* i *Eubacterium rectale* bile su takođe manje zastupljene u grupi pacijenata. *F. prausnitzii* je jedna od najzastupljenijih bakterija u crevnoj mikrobioti čoveka (Khan et al., 2012). *F. prausnitzii* i *B. pullicaecorum* su glavni proizvođači buterne kiseline koja je neophodna za normalno funkcionisanje crevnog epitela i njihov nedostatak doveden je u vezu sa nastankom sindroma iritabilnog creva (Steppe et al., 2014). Pokazano je da *B. pullicaecorum* jača epitelnu barijeru creva (Eeckhaut et al., 2013), za koju je pokazano da je narušena kod neke dece sa autizmom (Boukthir et al., 2010; D'Eufemia et al., 1996; de Magistris et al., 2010). Neamiloički član porodice *Ruminococcaceae*, vrsta *Ruminococcus champanellensis*, blisko srodna vrsti *F. prausnitzii* (Ze et al., 2015), manje je zastupljena u grupi pacijenata, pre svega u uzorcima pacijenata sa CHA i ERLD. *R. champanellensis* je jedina bakterijska vrsta u debelom crevu čoveka koja može da razgradi kristalnu celulozu i izvrši fermentaciju nesvarljivih ugljenih hidrata. Na taj način ona obezbeđuje značajan deo energije i podržava rast mikroorganizama u crevima, te stoga ima veliki uticaj na zdravlje putem modulacije sastava mikrobiote (Ben David et al., 2015; Chassard et al., 2010). Istraživanje sprovedeno na uzorcima fecesa dece sa autizmom pokazalo je da su *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* i *Eubacteriaceae* u najmanjoj meri zastupljeni u fekalnoj mikrobioti dece sa autizmom (De Angelis et al., 2013), što je u skladu sa našim rezultatima.

5.6. Nivo masnih kiselina kratkih lanaca u uzorcima fecesa dece sa neurorazvojnim poremećajima

Usled toga što je pokazano da SCFA mogu uticati na brojne funkcije kako na nivou creva, tako i na nivou CNS-a, pretpostavljeno je da SCFA mogu biti važni molekularni medijatori u komunikaciji između mikrobiote i CNS-a, kao i da mogu imati udela u nastanku nekih simptoma autizma (Rogers et al., 2016).

Iako u ovom istraživanju nisu otkrivene značajne razlike u nivoima SCFA između ispitivanih grupa, uočeno je da su vrednosti ukupnog nivoa SCFA, kao i nivoa buterne kiseline bile najniže u grupi pacijenata sa CHA. Neke grupe istraživača su uočile da je nivo SCFA bio značajno niži kod pacijenta sa autizmom i PDD-NOS (Adams et al., 2011; De Angelis et al., 2013). Naša pretpostavka je da značajna razlika u nivoima SCFA između CHA podgrupe i kontrolne grupe u našoj studiji nije otkrivena usled malog broja CHA pacijenata. Odnos CHA pacijenta u ovoj podgrupi ispitanika sa NDD bio je 1: 7,2 (5:36), što je u skladu sa procenom Nacionalnog istraživanja dečijeg zdravlja (*eng.* National Survey of Children's Health - NSCH) u Sjedinjenim Državama 2007. godine, prema kojoj 1,1% dece u uzrastu između 3 i 17 godina ima razvijenu kliničku sliku autizma, dok je 15% bilo pogođeno neurorazvojnim poremećajima (odnos 1:15). Ova procena uključivala je i druge oblike poremećaja u ranom detinjstvu kao što su: intelektualna ometenost, cerebralna paraliza, epilepsija, mucanje, umereno do teško oštećenje sluha, slepilo (Boyle et al., 2011; Kogan et al., 2009), koji nisu obuhvaćeni ovom studijom.

Prema podacima iz literature pozitivna korelacija nađena je između ukupnog nivoa SCFA i zastupljenosti vrsta *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* i *Bifidobacterium* (De Angelis et al., 2013), što je u skladu sa našim zapažanjima da su *F. prausnitzii* i *R. champanellensis*, kao i nekoliko bakterijskih vrsta roda *Bifidobacterium*, manje zastupljeni u grupi pacijenata. Iako bakterije koje pripadaju vrsti *Ruminococcus* ili rodu *Bifidobacterium* ne proizvode butirat, one mogu da stimulišu produkciju SCFA

zahvaljujući njihovoj sposobnosti da razgrade nesvarljive ugljene hidrate, i na taj način obezbede supstrat za bakterije koje proizvode buternu kiselinu (Belenguer et al., 2006).

Uočena pozitivna korelacija između broja rDNK amplikona dobijenih univerzalnim prajmerima i ukupnog nivoa SCFA u kontrolnoj grupi, koja je izgubljena u grupi pacijenata, vodi ka pretpostavci da je mikrobiota pacijenata sa NDD slabiji proizvođač SCFA.

5.7. Sličnosti bakterijskih profila između grupa pacijenata sa sličnom kliničkom slikom

Sličnost bakterijskih profila među grupama kao i homogenost profila u okviru grupa bila je procenjena prema Dajsovom koeficijentu sličnosti. Pokazalo se da je mikrobiota kontrolne grupe i CHA grupe ispitanika bila najhomogenija, dok je najveći stepen heterogenosti dobijen za mikrobiotu ERLD grupe pacijenata ukazujući na postojanje značajnih individualnih razlika u ovoj grupi pacijenata.

Mikrobiota ERLD pacijenata pokazala je najmanji stepen sličnosti sa mikrobiotom ispitanika kontrolne grupe. Ovaj rezultat ukazuje na to da su promene na nivou crevne mikrobiote dece sa manje ozbiljnim formama NDD, kao što je ERLD, potencijalno veoma važne. Ova pretpostavka je u saglasnosti sa klinički uočenim napretkom u rehabilitaciji ERLD pacijenata u vidu gubitka ili značajnog smanjenja simptoma tipičnih za autizam nakon lečenja crevne disbioze.

Analiza DGGE profila dobijenih univerzalnim prajmerima pokazala je da je mikrobiota pacijenata sa PDD-NOS najviše slična mikrobioti kontrolne grupe, što može ukazivati na to da promene u sastavu mikrobiote kod ovih pacijenata ne predstavljaju značajan faktor rizika za nastanak poremećaja. Međutim, *R. ilealis* (80%, $p < 0,05$) je bila značajno više prisutna u ovoj grupi pacijenata u poređenju sa kontrolnom grupom. Dalje, DGGE profili dobijeni LB- specifičnim prajmerima pokazali su da je MSDD grupa najbližnja kontrolnoj grupi, iako je zabeleženo potpuno odsustvo *S. pasteurianus*, *B. pullicaecorum*, *L. rhamnosus*, kao i niža zastupljenost *D. invisus* u ovoj grupi pacijenata. Iako je analiza DGGE profila dobijenim BB- specifičnim prajmerima pokazala da je CHA grupa najbližnja kontrolnoj grupi, najmanji broj *Bifidobacteria*, kao i potpuno odsustvo *B. pseudocatenulatum* i *B. adolescentis*, je zabeležen u ovoj grupi pacijenata. Pretpostavljamo da je ovako visoka sličnost dobijena zbog odsustva *B. animalis* u CHA i u kontrolnoj grupi ispitanika, koja je bila prisutna u svim drugim NDD grupama.

Visoka sličnost uočena je između grupe pacijenata sa CHA i PDD-NOS (poznatog i kao "atipični autizam") (Volkmar et al., 2013) koje su i prema kliničkoj slici najbližnje grupe pacijenata unutar NDD. Visoka sličnost uočena je među MSDD i PDD-NOS, kao i MSDD i CHA grupama. S druge strane, sličnost sve tri pomenute grupe pacijenata (CHA, PDD-NOS i MSDD) sa ERLD bila je veoma mala. Ovo je u skladu i sa sličnošću koju MSDD, CHA i PDD-NOS imaju na nivou kliničkih simptoma, koje karakterišu teži simptomi i niži nivo funkcionisanja u odnosu na pacijente sa ERLD (WHO, 2015). Postojanje sličnosti u sastavu crevne mikrobiote kod pacijenata koji imaju slične neurološke i bihejvioralne simptome vodi ka pretpostavci da crevna mikrobiota ima značajnu ulogu u patogenezi NDD.

Do sada je otkriveno nekoliko molekularnih mehanizama koji bi mogli da objasne uticaj mikrobiote na CNS i koji bi mogli da budu uključeni u mehanizam nastanka autizma, ali i drugih NDD. Mikrobiota ostvaruje komunikaciju sa CNS-om putem nervnog sistema (preko enteričkih nerava i vagus nerva) ili putem sistemske (humoralne) cirkulacije u koju dospevaju bakterijski metaboliti i toksini.

Predloženo je da kolonizacija creva mikrobiotom utiče na razvoj mozga sisara kao i na ponašanje u odraslom dobu, tako što menja ekspresiju nekih gena za koje se zna da su uključeni u transmisiju signala u nervnom sistemu i sinaptičku dugotrajnu potencijaciju (jačanje veza između dva neurona, mehanizam koji leži u osnovi učenja i pamćenja) u regionima mozga odgovornim za motoričku kontrolu i anksiozno ponašanje (Diaz Heijtz et al., 2011). Pokazano je da produkti mikrobiote kao što su propionska i buterna kiselina, imaju jak epigenetički potencijal i da mogu izazvati promene u ekspresiji velikog broja gena, koji su već dovođeni u vezu sa autizmom (Nankova et al., 2014).

Nedavno je prihvaćeno da mikrobiota ima značajnu ulogu u neurorazvoju, te da perturbacije u početnoj kolonizaciji mikrobiote u ranom uzrastu mogu dovesti do mentalnih poremećaja kasnije u životu (Borre et al., 2014; de Theije et al., 2014b; Diaz Heijtz et al., 2011). Pretpostavlja se da promene u sastavu crevne mikrobiote mogu imati uticaj na razvoj mozga u prvim godinama života i na taj način doprineti nastanku simptoma autizma (Sajdel-Sulkowska et al., 2013). Razvoj mikrobiote odvija se paralelno sa neurorazvojem, gde su prenatalni i rani postnatalni periodi prepoznati kao najvažniji za razvoj mozga i sazrevanje mikrobiote. (O'Mahony et al., 2017). Ono što je značajno je da korekcija sastava mikrobiote u preadultnom periodu kod eksperimentalnih životinja može dovesti do normalizacije ponašanja (Desbonnet et al., 2014; Diaz Heijtz et al., 2011; Neufeld et al., 2011; Sudo et al., 2004) dok korekcija sastava mikrobiote nakon ovog kritičnog perioda ne može dovesti do normalizacije ponašanja kao ni neurohemijskih poremećaja koji su nastali u ranim razvojnim periodima (Clarke et al., 2013).

Rezultati ovog istraživanja otvaraju mogućnost i za dalja ispitivanja promena u sastavu crevne mikrobiote kod NDD pacijenata, kao i razjašnjenje mogućih patogenih načina delovanja specifičnih bakterija.

Prema našim rezultatima i podacima iz literature možemo zaključiti da analiza mikrobiote u ranom razvojnom periodu može biti korisna za prevenciju i lečenje kako GI poremećaja, tako i pratećih poremećaja u ponašanju koji su često deo kliničke slike autističnog spektra poremećaja, ali i drugih formi NDD.

Važno je istaći da potencijalna korekcija sastava mikrobiote primenom ciljanih probiotika može biti korišćena kao dodatna terapija u lečenju neurorazvojnih poremećaja.

5.8. Genetička varijanta FokI u genu *VDR* kod dece sa neurorazvojnim poremećajima

Dugotrajna upala sluznice creva povezana sa njenom povećanom propustljivošću, bez obzira na uzrok inflamacije, dovodi do nutritivnih deficijencija koje su često primećene kod pacijenata sa autizmom (Hyman, 2008). Među njima, posebno je upadljiv nedostatak vitamina D, kako kod pacijenata sa autizmom (Mostafa et al., 2012) tako i kod pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima i intelektualnom ometenošću (Grant et al., 2015).

U skladu sa ovim podacima iz literature, kod većine analiziranih pacijenata (76,5%) iz naše studije, zapažena je deficijencija ili insuficijencija vitamina D. Deficijencija vitamina D je registrovana kod 40,9%, a insuficijencija kod 35,6% pacijenata. Deficijencija vitamina D je bila posebno upadljiva u grupi pacijenata sa dijagnozom dečijeg autizma u kojoj je 64,3% pacijenata imalo deficijenciju i u kojoj je nivo vitamina D (25-OH) bio najniži.

Do sada je više puta istaknut značaj vitamina D u autizmu i njegova potencijalna uloga u patogenezi autizma (Cannell, 2008; Grant et al., 2015; Mostafa et al., 2012). Smatra se da bi geni uključeni u metabolizam, transport ili vezivanje vitamina D bili potencijalni geni kandidati za nastanak autizma (Cannell, 2008). U našem istraživanju pažnja je bila usmerena na varijantu FokI (rs2228570) *VDR* gena koja je asociirana sa stanjima koja su često udružena sa autizmom poput epilepsije (Jiang et al., 2015) i autoimunih oboljenja (van Etten et al., 2007). Rezultati drugih autora do sada su pokazali da FokI varijanta, kao i *VDR* GTTT haplotip (BsmI, TaqI, FokI, ApaI) nose povećan rizik za nastanak autizma (Coskun et al., 2016).

Pokazano je da FokI ima značajan uticaj na metabolizam vitamina D kod dece sa autizmom (Coskun et al., 2016) i kod pacijenata sa multiplom sklerozom (Smolders et al., 2009). U studiji o metabolizmu vitamina D kod ispitanika sa multiplom sklerozom, uočeno je da je F alel povezan sa niskim nivoom vitamina D (25-OH) kod ispitanika sa multiplom sklerozom kao i kod kontrola. Metabolizam vitamina D reguliše se mehanizmom negativne povratne sprege putem *VDR*. Varijanta FokI "F" kodira kraću proteinsku formu *VDR* koji ima jači inhibitoryni uticaj na ekspresiju gena uključenih u metabolizam vitamina D u odnosu na "f" varijantu koja kodira duži protein (Uitterlinden et al., 2004). Zbog svog funkcionalnog efekta *VDR* FokI varijanta je potencijalno relevantna za razvoj autizma, ali i drugih bolesti povezanih sa vitaminom D.

Varijanta *VDR* FokI je povezana i sa regulacijom imunskog sistema. Tačnije, pokazana je značajna uloga kraće "F" *VDR* varijante u imunskim bolestima zbog veće aktivnosti ove forme receptora i time jače aktivacije imunskih ćelija (van Etten et al., 2007). Postoje brojni podaci o imunskim abnormalnostima kod autizma i visokoj učestalosti autoimunih poremećaja u porodicama dece sa autizmom (Comi et al., 1999) kao što su reumatoidni artritis, celijakija (Atladottir et al., 2009) i sindrom iritabilnog creva (Valicenti-McDermott et al., 2008).

U ovoj studiji je utvrđeno da je učestalost genotipa FokI CC ("FF") značajno veća kod pacijenata iz CHA podgrupe u poređenju sa zdravim kontrolama, kao i da je nivo vitamina D (25-OH) u ovoj podgrupi pacijenata bio značajno niži u odnosu na pacijente sa drugim formama NDD. Suprotni rezultati dobijeni su od strane druge grupe autora koja je pokazala da je učestalost genotipa TT ("ff") FokI bila veća kod ispitanika sa autizmom u poređenju sa zdravim kontrolama i da su nivoi seruma vitamina D (25-OH) značajno viši kod dece sa autizmom (Coskun et al., 2016). Pomenutom studijom bio je obuhvaćen sličan broj ispitanika (85 pacijenata sa autizmom uzrasta između 2 i 15 godina i 85 zdravih kontrola) koji nisu uzimali vitamine i minerale pre davanja uzoraka. Međutim ispitanici u ovoj studiji su iz jugoističnih delova Turske, područja koja karakterišu više temperature i veći broj sunčanih dana u odnosu na naš region. Ovim podatkom se može objasniti uočena diskrepanca između rezultata navedene studije i našeg istraživanja.

Naši rezultati su pokazali da nivo vitamina D i *VDR* FokI varijante mogu imati uticaj na razvoj dečijeg autizma, ali ne i na druge oblike NDD. U cilju podržavanja naše pretpostavke, u budućim istraživanjima bilo bi poželjno proveriti učestalost ostalih varijanti u *VDR* genu (BsmI, ApaI, TaqI i GTTT haplotip) na većoj grupi pacijenata sa NDD.

6. Zaključci

Na osnovu dobijenih rezultata ove doktorske disertacije, izvedeni su sledeći zaključci:

1. Kod većine pacijenata uočeno je povećanje nivoa jednog ili više analiziranih opioidnih peptida, iako nivo ukupnih peptida u uzorcima urina pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima nije bio statistički značajno povišen u odnosu na kontrolnu grupu ispitanika.
2. Nije utvrđena razlika u distribuciji varijanti gena u *HLA-DQ* lokusu (*DQA1*, *DQB1* i *DRB1*) asociranih sa celijačnom bolešću, između grupe pacijenata i kontrolnih ispitanika. Nije pokazana veza između povišenih nivoa kazeomorfina i gluten egzorfina i analiziranih *HLA-DQ* varijanti. Iz toga je zaključeno da celijačna bolest nije uzročnik povećane crevne propustljivosti i povišenih nivoa egzorfina u urinu dece sa neurorazvojnim poremećajima.
3. Nisu utvrđene razlike u distribuciji analiziranih genetičkih varijanti *LCT* -13910 C>T, asociranih sa laktoznom intolerancijom između grupe pacijenata i kontrolnih ispitanika, na osnovu čega možemo da pretpostavimo da primarna LI nije povezana sa GI tegobama kod pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima. Takođe povišen nivo kazomorfina i gluten egzorfina u urinu dece sa neurorazvojnim poremećajima nije asociran sa genetičkim markerima za laktoznu intoleranciju. Iz toga se može zaključiti da primarna LI nije uzročnik povećane crevne propustljivosti i povišenih nivoa egzorfina u urinu dece sa neurorazvojnim poremećajima.
4. Rezultati istraživanja nisu pokazali značajne razlike u zastupljenosti *VDR* FokI (rs2228570) između celokupne grupe pacijenata sa neurorazvojnim poremećajima i kontrola, kao ni postojanje asocijacije između *VDR* FokI genotipa sa nivoom vitamina D u serumu svih pacijenata. Međutim, uočena je značajno veća zastupljenost genotipa FokI CC ("FF") kod pacijenata sa dijagnozom dečijeg autizma u poređenju sa grupom zdrave dece, kao i grupama pacijenta sa drugim formama neurorazvojnih poremećaja. Takođe je zabeleženo da je serumski nivo vitamina D (25-OH) značajno niži kod ispitanika sa dečijim autizmom u poređenju sa ostalim grupama pacijenata. Na osnovu ovoga možemo da pretpostavimo da nivo vitamina D i *VDR* FokI varijanta mogu biti od značaja u patogenezi autizma, ali ne i ostalih formi neurorazvojnih poremećaja.
5. Naše istraživanje je pokazalo da se mikrobiota dece sa neurorazvojnim poremećajima razlikuje od mikrobiote dece tipičnog razvoja. U grupi pacijenata uočen je smanjen diverzitet bakterija koje čine normalnu crevnu mikrobiotu. Uočena je manja zastupljenosti mlečnokiselinskih bakterija, bakterija roda *Bifidobacterium*, kao i bakterija koje su jaki producenti buterne kiseline. Primećena je veća zastupljenost potencijalno patogenih bakterija srodnih sa *Clostridium* spp. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da poremećaji u sastavu crevne mikrobiote mogu imati uticaja ne samo na pojavu GI simptoma kod dece sa neurorazvojnim poremećajima, već i na formiranje nekih kliničkih simptoma.

Iako rezultati istraživanja nisu pokazali značajne razlike u nivoima masnih kiselina kratkog lanca između ispitivanih grupa, uočeno je da su vrednosti ukupnog nivoa masnih kiselina kratkog lanca, kao i nivoa buterne i sirćetne kiseline bile najniže u grupi pacijenata sa CHA. Korelaciona analiza ukazala je na postojanje značajne pozitivne korelacije između broja rDNK amplikona dobijenih univerzalnim prajmerima i nivoa propionske kiseline, kao i prisustva trenda za nivo ukupnih SCFA i buterne kiseline u kontrolnoj grupi. Ova korelacija se gubi u grupi pacijenata ukazujući da se mikrobiota NDD pacijenata razlikuje od mikrobiote zdrave dece u prisustvu i/ili broju bakterija koje su jaki proizvođači SCFA produkujućih bakterija.
6. Rezultati ovog istraživanja pokazali su da ispitivanje prisustva opioidnih peptida u urinu, identifikacija genetičke varijante *VDR* FokI zajedno sa određivanjem serumskog nivoa vitamina D, kao i analiza sastava crevne mikrobiote može imati terapijski potencijal u rehabilitaciji dece sa neurorazvojnim poremećajima. Može se pretpostaviti da primena individualizovanih nutritivnih tretmana i korekcija sastava crevna mikrobiote može značajno doprineti, ne samo poboljšanju GI

smetnji dece sa dijagnozom neurorazvojnih poremećaja, već i saniranju nekih neuroloških i psihijatrijskih simptoma tipičnih za autizam. Pored toga navedeni parametri mogu biti i značajni dijagnostički i prognostički markeri koji bi omogućili detekciju posebnih kliničkih entiteta razvojnih poremećaja kod kojih bi pomenuti tretmani mogli da dovedu do povlačenja simptoma i brže rehabilitacije. Rezultati ove studije bi mogli imati značajan uticaj na unapređenje dijagnostike, prevencije i tretmana razvojnih poremećaja kod dece.

7. Literatura

- Abrahams, B.S., and Geschwind, D.H. (2008). Advances in autism genetics: on the threshold of a new neurobiology. *Nat Rev Genet* 9, 341-355.
- Adams, J.B., Johansen, L.J., Powell, L.D., Quig, D., and Rubin, R.A. (2011). Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity. *BMC Gastroenterol* 11, 22.
- Alex, D., Garvin, D.F., and Peters, S.M. (2013). *Streptococcus pasteurianus* septicemia. *Indian J Med Microbiol* 31, 310-312.
- Aronson, M., Hagberg, B., and Gillberg, C. (1997). Attention deficits and autistic spectrum problems in children exposed to alcohol during gestation: a follow-up study. *Dev Med Child Neurol* 39, 583-587.
- Arroyo, M.A.S., Lopes, A.P., Piatto, V.B., and Maniglia, J.V. (2010). Perspectives for Early Genetic Screening of Lactose Intolerance: 13910C/T Polymorphism Tracking in the MCM6 Gene *The Open Biology Journal* 3, 66-71.
- Atladdottir, H.O., Pedersen, M.G., Thorsen, P., Mortensen, P.B., Deleuran, B., Eaton, W.W., and Parner, E.T. (2009). Association of family history of autoimmune diseases and autism spectrum disorders. *Pediatrics* 124, 687-694.
- Bailey, A., Le Couteur, A., Gottesman, I., Bolton, P., Simonoff, E., Yuzda, E., and Rutter, M. (1995). Autism as a strongly genetic disorder: evidence from a British twin study. *Psychol Med* 25, 63-77.
- Barnett, M.P., McNabb, W.C., Roy, N.C., Woodford, K.B., and Clarke, A.J. (2014). Dietary A1 beta-casein affects gastrointestinal transit time, dipeptidyl peptidase-4 activity, and inflammatory status relative to A2 beta-casein in Wistar rats. *Int J Food Sci Nutr* 65, 720-727.
- Bashir, S., and AL-Ayadhi, L. (2014). Alterations in plasma dipeptidyl peptidase IV in autism: A pilot study. *Neurology, Psychiatry and Brain Research* 20.
- Belenguer, A., Duncan, S.H., Calder, A.G., Holtrop, G., Louis, P., Lobley, G.E., and Flint, H.J. (2006). Two routes of metabolic cross-feeding between *Bifidobacterium adolescentis* and butyrate-producing anaerobes from the human gut. *Appl Environ Microbiol* 72, 3593-3599.
- Ben-Yizhak, N., Yirmiya, N., Seidman, I., Alon, R., Lord, C., and Sigman, M. (2011). Pragmatic language and school related linguistic abilities in siblings of children with autism. *J Autism Dev Disord* 41, 750-760.
- Ben David, Y., Dassa, B., Borovok, I., Lamed, R., Koropatkin, N.M., Martens, E.C., White, B.A., Bernalier-Donadille, A., Duncan, S.H., Flint, H.J., et al. (2015). Ruminococcal cellulosome systems from rumen to human. *Environ Microbiol* 17, 3407-3426.
- Bender, L. (1953). Childhood schizophrenia. *Psychiatr Q* 27, 663-681.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc Ser B* 57, 289-300.
- Bercik, P., Denou, E., Collins, J., Jackson, W., Lu, J., Jury, J., Deng, Y., Blennerhassett, P., Macri, J., McCoy, K.D., et al. (2011a). The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 141, 599-609, 609 e591-593.
- Bercik, P., Park, A.J., Sinclair, D., Khoshdel, A., Lu, J., Huang, X., Deng, Y., Blennerhassett, P.A., Fahnestock, M., Moine, D., et al. (2011b). The anxiolytic effect of *Bifidobacterium longum* NCC3001 involves vagal pathways for gut-brain communication. *Neurogastroenterology and motility : the official journal of the European Gastrointestinal Motility Society* 23, 1132-1139.
- Bizzaro, N., Tozzoli, R., Villalta, D., Fabris, M., and Tonutti, E. (2012). Cutting-edge issues in celiac disease and in gluten intolerance. *Clin Rev Allergy Immunol* 42, 279-287.
- Bolte, E.R. (1998). Autism and *Clostridium tetani*. *Medical hypotheses* 51, 133-144.
- Borre, Y.E., O'Keefe, G.W., Clarke, G., Stanton, C., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014). Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med* 20, 509-518.
- Boukthir, S., Matoussi, N., Belhadj, A., Mammou, S., Dlala, S.B., Helayem, M., Rocchiccioli, F., Bouzaidi, S., and Abdennebi, M. (2010). [Abnormal intestinal permeability in children with autism]. *Tunis Med* 88, 685-686.

- Bouras, M., Huneau, J.F., and Tome, D. (1996). The inhibition of intestinal dipeptidylaminopeptidase-IV promotes the absorption of enterostatin and des-arginine-enterostatin across rat jejunum in vitro. *Life Sci* 59, 2147-2155.
- Bourassa, M.W., Alim, I., Bultman, S.J., and Ratan, R.R. (2016). Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health? *Neurosci Lett* 625, 56-63.
- Boyle, C.A., Boulet, S., Schieve, L.A., Cohen, R.A., Blumberg, S.J., Yeargin-Allsopp, M., Visser, S., and Kogan, M.D. (2011). Trends in the prevalence of developmental disabilities in US children, 1997-2008. *Pediatrics* 127, 1034-1042.
- Brandl, K., and Schnabl, B. (2015). Is intestinal inflammation linking dysbiosis to gut barrier dysfunction during liver disease? *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* 9, 1069-1076.
- Braniste, V., Al-Asmakh, M., Kowal, C., Anuar, F., Abbaspour, A., Toth, M., Korecka, A., Bakocevic, N., Ng, L.G., Kundu, P., et al. (2014). The gut microbiota influences blood-brain barrier permeability in mice. *Sci Transl Med* 6, 263ra158.
- Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., Dinan, T.G., Bienenstock, J., and Cryan, J.F. (2011). Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 16050-16055.
- Briani, C., Zara, G., Alaedini, A., Grassivaro, F., Ruggero, S., Toffanin, E., Albergoni, M.P., Luca, M., Giometto, B., Ermani, M., et al. (2008). Neurological complications of celiac disease and autoimmune mechanisms: a prospective study. *J Neuroimmunol* 195, 171-175.
- Buie, T., Campbell, D.B., Fuchs, G.J., 3rd, Furuta, G.T., Levy, J., Vandewater, J., Whitaker, A.H., Atkins, D., Bauman, M.L., Beaudet, A.L., et al. (2010). Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: a consensus report. *Pediatrics* 125 Suppl 1, S1-18.
- Bull, G., Shattock, P., Whiteley, P., Anderson, R., Groundwater, P.W., Lough, J.W., and Lees, G. (2003). Indolyl-3-acryloylglycine (IAG) is a putative diagnostic urinary marker for autism spectrum disorders. *Med Sci Monit* 9, CR422-425.
- Butwicka, A., Lichtenstein, P., Frisen, L., Almquist, C., Larsson, H., and Ludvigsson, J.F. (2017). Celiac Disease Is Associated with Childhood Psychiatric Disorders: A Population-Based Study. *J Pediatr* 184, 87-93 e81.
- Cade, R., Privette, M., Fregly, M., Rowland, N., Sun, Z., Zele, V., Wagemaker, H., and Edelstein, C. (2000). Autism and Schizophrenia: Intestinal Disorders. *Nutr Neurosci* 3, 57-72.
- Cade, R., Wagemaker, H., Privette, R.M., Fregly, M.J., Rogers, J., and Orlando, J. (1990). Effect of dialysis and diet in schizophrenia. *Psychiatry: A World Perspective* 3, 494-500.
- Camp, J.G., Frank, C.L., Lickwar, C.R., Guturu, H., Rube, T., Wenger, A.M., Chen, J., Bejerano, G., Crawford, G.E., and Rawls, J.F. (2014). Microbiota modulate transcription in the intestinal epithelium without remodeling the accessible chromatin landscape. *Genome Res* 24, 1504-1516.
- Cannell, J.J. (2008). Autism and vitamin D. *Med Hypotheses* 70, 750-759.
- Cannell, J.J., and Grant, W.B. (2013). What is the role of vitamin D in autism? *Dermatoendocrinol* 5, 199-204.
- Carabotti, M., Scirocco, A., Maselli, M.A., and Severi, C. (2015). The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol* 28, 203-209.
- Castro, H.F., Williams, N.H., and Ogram, A. (2000). Phylogeny of sulfate-reducing bacteria(1). *FEMS Microbiol Ecol* 31, 1-9.
- Catassi, C., Bai, J.C., Bonaz, B., Bouma, G., Calabro, A., Carroccio, A., Castillejo, G., Ciacci, C., Cristofori, F., Dolinsek, J., et al. (2013). Non-Celiac Gluten sensitivity: the new frontier of gluten related disorders. *Nutrients* 5, 3839-3853.
- Chaidez, V., Hansen, R.L., and Hertz-Picciotto, I. (2014). Gastrointestinal problems in children with autism, developmental delays or typical development. *J Autism Dev Disord* 44, 1117-1127.
- Chaplin, A.V., Efimov, B.A., Smeianov, V.V., Kafarskaia, L.I., Pikina, A.P., and Shkoporov, A.N. (2015). Intraspecies Genomic Diversity and Long-Term Persistence of *Bifidobacterium longum*. *PLoS One* 10, e0135658.

Chassard, C., Delmas, E., Robert, C., and Bernalier-Donadille, A. (2010). The cellulose-degrading microbial community of the human gut varies according to the presence or absence of methanogens. *FEMS Microbiol Ecol* 74, 205-213.

Chen, M.-H., Su, T.-P., Chen, Y.-S., Hsu, J.-W., Huang, K.-L., Chang, W.-H., Chen, T.-J., and Bai, Y.-M. (2013). Comorbidity of allergic and autoimmune diseases in patients with autism spectrum disorder: A nationwide population-based study. *Research in autism spectrum disorders* 7, 205–212.

Chess, S., Fernandez, P., and Korn, S. (1978). Behavioral consequences of congenital rubella. *J Pediatr* 93, 699-703.

Christensen, J., Gronborg, T.K., Sorensen, M.J., Schendel, D., Parner, E.T., Pedersen, L.H., and Vestergaard, M. (2013). Prenatal valproate exposure and risk of autism spectrum disorders and childhood autism. *JAMA* 309, 1696-1703.

Cizmarevic, N.S., Mijandrusic-Sincic, B., Licul, V., Kapovic, M., and Ristic, S. (2015). Geni i celijakija. *Paediatr Croat.* 59, 88-94.

Clarke, G., Grenham, S., Scully, P., Fitzgerald, P., Moloney, R.D., Shanahan, F., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2013). The microbiome-gut-brain axis during early life regulates the hippocampal serotonergic system in a sex-dependent manner. *Mol Psychiatry* 18, 666-673.

Clayton, T.A. (2012). Metabolic differences underlying two distinct rat urinary phenotypes, a suggested role for gut microbial metabolism of phenylalanine and a possible connection to autism. *FEBS letters* 586, 956-961.

Clerget-Darpoux, F., Bouguerra, F., Kastally, R., Semana, G., Babron, M.C., Debbabi, A., Bennaceur, B., and Eliaou, J.F. (1994). High risk genotypes for celiac disease. *C R Acad Sci III* 317, 931-936.

Comi, A.M., Zimmerman, A.W., Frye, V.H., Law, P.A., and Peeden, J.N. (1999). Familial clustering of autoimmune disorders and evaluation of medical risk factors in autism. *J Child Neurol* 14, 388-394.

Constantino, J.N., Lajonchere, C., Lutz, M., Gray, T., Abbacchi, A., McKenna, K., Singh, D., and Todd, R.D. (2006). Autistic social impairment in the siblings of children with pervasive developmental disorders. *Am J Psychiatry* 163, 294-296.

Constantino, J.N., Zhang, Y., Frazier, T., Abbacchi, A.M., and Law, P. (2010). Sibling recurrence and the genetic epidemiology of autism. *Am J Psychiatry* 167, 1349-1356.

Cop, E., Yurtbasi, P., Oner, O., and Munir, K.M. (2015). Genetic testing in children with autism spectrum disorders. *Anadolu Psikiyatri Derg* 16, 426-432.

Coskun, S., Simsek, S., Camkurt, M.A., Cim, A., and Celik, S.B. (2016). Association of polymorphisms in the vitamin D receptor gene and serum 25-hydroxyvitamin D levels in children with autism spectrum disorder. *Gene* 588, 109-114.

Coury, D.L., Ashwood, P., Fasano, A., Fuchs, G., Geraghty, M., Kaul, A., Mawe, G., Patterson, P., and Jones, N.E. (2012). Gastrointestinal conditions in children with autism spectrum disorder: developing a research agenda. *Pediatrics* 130 Suppl 2, S160-168.

Croen, L.A., Najjar, D.V., Fireman, B., and Grether, J.K. (2007). Maternal and paternal age and risk of autism spectrum disorders. *Arch Pediatr Adolesc Med* 161, 334-340.

Cupic, B., Hranilovic, D., Jernej, B., and Gabrilovac, J. (2012). Association study of genes regulating opioid system in autism. *Psychiatry Res* 198, 169-170.

D'Eufemia, P., Celli, M., Finocchiaro, R., Pacifico, L., Viozzi, L., Zaccagnini, M., Cardi, E., and Giardini, O. (1996). Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatr* 85, 1076-1079.

Daniels, J.L., Forssen, U., Hultman, C.M., Cnattingius, S., Savitz, D.A., Feychting, M., and Sparen, P. (2008). Parental psychiatric disorders associated with autism spectrum disorders in the offspring. *Pediatrics* 121, e1357-1362.

Daoud, H., Bonnet-Brilhault, F., Vedrine, S., Demattei, M.V., Vourc'h, P., Bayou, N., Andres, C.R., Barthelemy, C., Laumonnier, F., and Briault, S. (2009). Autism and nonsyndromic mental retardation associated with a de novo mutation in the NLGN4X gene promoter causing an increased expression level. *Biol Psychiatry* 66, 906-910.

De Angelis, M., Piccolo, M., Vannini, L., Siragusa, S., De Giacomo, A., Serrazzanetti, D.I., Cristofori, F., Guerzoni, M.E., Gobetti, M., and Francavilla, R. (2013). Fecal microbiota and metabolome of children with autism and pervasive developmental disorder not otherwise specified. *PLoS One* 8, e76993.

De Baere, S., Eeckhaut, V., Steppe, M., De Maesschalck, C., De Backer, P., Van Immerseel, F., and Croubels, S. (2013). Development of a HPLC-UV method for the quantitative determination of four short-chain fatty acids and lactic acid produced by intestinal bacteria during in vitro fermentation. *J Pharm Biomed Anal* 80, 107-115.

de Magistris, L., Familiari, V., Pascotto, A., Sapone, A., Froli, A., Iardino, P., Carteni, M., De Rosa, M., Francavilla, R., Riegler, G., et al. (2010). Alterations of the intestinal barrier in patients with autism spectrum disorders and in their first-degree relatives. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 51, 418-424.

De Noni, I., FitzGerald, R.J., Korhonen, H.J.T., Roux, Y.L., Livesey, C.T., Thorsdottir, I., Tomé, D., and Witkamp, R. (2009). Review of the potential health impact of β -casomorphins and related peptides. *EFSA Scientific Report* 231, 1-107.

de Theije, C.G., Bavelaar, B.M., Lopes da Silva, S., Korte, S.M., Olivier, B., Garssen, J., and Kraneveld, A.D. (2014a). Food allergy and food-based therapies in neurodevelopmental disorders. *Pediatr Allergy Immunol* 25, 218-226.

de Theije, C.G., Wu, J., da Silva, S.L., Kamphuis, P.J., Garssen, J., Korte, S.M., and Kraneveld, A.D. (2011). Pathways underlying the gut-to-brain connection in autism spectrum disorders as future targets for disease management. *Eur J Pharmacol* 668 Suppl 1, S70-80.

de Theije, C.G., Wu, J., Koelink, P.J., Korte-Bouws, G.A., Borre, Y., Kas, M.J., Lopes da Silva, S., Korte, S.M., Olivier, B., Garssen, J., et al. (2014b). Autistic-like behavioural and neurochemical changes in a mouse model of food allergy. *Behav Brain Res* 261, 265-274.

den Besten, G., van Eunen, K., Groen, A.K., Venema, K., Reijngoud, D.J., and Bakker, B.M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 54, 2325-2340.

Desbonnet, L., Clarke, G., Shanahan, F., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2014). Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry* 19, 146-148.

Desbonnet, L., Garrett, L., Clarke, G., Bienenstock, J., and Dinan, T.G. (2008). The probiotic *Bifidobacteria infantis*: An assessment of potential antidepressant properties in the rat. *Journal of psychiatric research* 43, 164-174.

Dettmer, K., Hanna, D., Whetstone, P., Hansen, R., and Hammock, B.D. (2007). Autism and urinary exogenous neuropeptides: development of an on-line SPE-HPLC-tandem mass spectrometry method to test the opioid excess theory. *Anal Bioanal Chem* 388, 1643-1651.

Diaz Heijtz, R., Wang, S., Anuar, F., Qian, Y., Bjorkholm, B., Samuelsson, A., Hibberd, M.L., Forsberg, H., and Pettersson, S. (2011). Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 3047-3052.

Doernberg, E., and Hollander, E. (2016). Neurodevelopmental Disorders (ASD and ADHD): DSM-5, ICD-10, and ICD-11. *CNS Spectr* 21, 295-299.

Dohan, F.C. (1966). Wheat "consumption" and hospital admissions for schizophrenia during World War II. A preliminary report. *Am J Clin Nutr* 18, 7-10.

Dubynin, V.A., Malinovskaia, I.V., Beliaeva Iu, A., Stovolosov, I.S., Bepalova Zh, D., Andreeva, L.A., Kamenskii, A.A., and Miasoedov, N.F. (2008). [Delayed effect of exorphins on learning of albino rat pups]. *Izv Akad Nauk Ser Biol*, 53-60.

Dusso, A.S., Brown, A.J., and Slatopolsky, E. (2005). Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F8-28.

Eeckhaut, V., Machiels, K., Perrier, C., Romero, C., Maes, S., Flahou, B., Steppe, M., Haesebrouck, F., Sas, B., Ducatelle, R., et al. (2013). *Butyrivibrio pullificus* in inflammatory bowel disease. *Gut* 62, 1745-1752.

El-Fishawy, P., and State, M.W. (2010). The genetics of autism: key issues, recent findings, and clinical implications. *Psychiatr Clin North Am* 33, 83-105.

- Eyles, D.W., Burne, T.H., and McGrath, J.J. (2013). Vitamin D, effects on brain development, adult brain function and the links between low levels of vitamin D and neuropsychiatric disease. *Front Neuroendocrinol* 34, 47-64.
- Eyles, D.W., Feron, F., Cui, X., Kesby, J.P., Harms, L.H., Ko, P., McGrath, J.J., and Burne, T.H. (2009). Developmental vitamin D deficiency causes abnormal brain development. *Psychoneuroendocrinology* 34 Suppl 1, S247-257.
- Eyles, D.W., Smith, S., Kinobe, R., Hewison, M., and McGrath, J.J. (2005). Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. *J Chem Neuroanat* 29, 21-30.
- Farmer, A.D., Randall, H.A., and Aziz, Q. (2014). It's a gut feeling: how the gut microbiota affects the state of mind. *J Physiol* 592, 2981-2988.
- Fett-Conte, A.C., Bossolani-Martins, A.L., and Pereira-Nascimento, P. (2013). Genetic Etiology of Autism. In *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I*, M. Fitzgerald, ed. (IntechOpen).
- Finegan, J.A., and Quarrington, B. (1979). Pre-, peri-, and neonatal factors and infantile autism. *J Child Psychol Psychiatry* 20, 119-128.
- Finegold, S.M., Dowd, S.E., Gontcharova, V., Liu, C., Henley, K.E., Wolcott, R.D., Youn, E., Summanen, P.H., Granpeesheh, D., Dixon, D., et al. (2010). Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children. *Anaerobe* 16, 444-453.
- Finegold, S.M., Downes, J., and Summanen, P.H. (2012). Microbiology of regressive autism. *Anaerobe* 18, 260-262.
- Finegold, S.M., Molitoris, D., Song, Y., Liu, C., Vaisanen, M.L., Bolte, E., McTeague, M., Sandler, R., Wexler, H., Marlowe, E.M., et al. (2002). Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism. *Clin Infect Dis* 35, S6-S16.
- Fiorentino, M., Sapone, A., Senger, S., Camhi, S.S., Kadzielski, S.M., Buie, T.M., Kelly, D.L., Cascella, N., and Fasano, A. (2016). Blood-brain barrier and intestinal epithelial barrier alterations in autism spectrum disorders. *Mol Autism* 7, 49.
- Froehlich-Santino, W., Londono Tobon, A., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., et al. (2014). Prenatal and perinatal risk factors in a twin study of autism spectrum disorders. *J Psychiatr Res* 54, 100-108.
- Fukudome, S., and Yoshikawa, M. (1992). Opioid peptides derived from wheat gluten: their isolation and characterization. *FEBS Lett* 296, 107-111.
- Fukudome, S., and Yoshikawa, M. (1993). Gluten exorphin C. A novel opioid peptide derived from wheat gluten. *FEBS Lett* 316, 17-19.
- Gamliel, I., Yirmiya, N., and Sigman, M. (2007). The development of young siblings of children with autism from 4 to 54 months. *J Autism Dev Disord* 37, 171-183.
- Gareau, M.G., Wine, E., Rodrigues, D.M., Cho, J.H., Whary, M.T., Philpott, D.J., Macqueen, G., and Sherman, P.M. (2011). Bacterial infection causes stress-induced memory dysfunction in mice. *Gut* 60, 307-317.
- Gauthier, J., Spiegelman, D., Piton, A., Lafreniere, R.G., Laurent, S., St-Onge, J., Lapointe, L., Hamdan, F.F., Cossette, P., Mottron, L., et al. (2009). Novel de novo SHANK3 mutation in autistic patients. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 150B, 421-424.
- Genius, S.J., and Bouchard, T.P. (2010). Celiac disease presenting as autism. *J Child Neurol* 25, 114-119.
- Gillberg, C., Cederlund, M., Lamberg, K., and Zeijlon, L. (2006). Brief report: "the autism epidemic". The registered prevalence of autism in a Swedish urban area. *J Autism Dev Disord* 36, 429-435.
- Goldberg, W.A., Jarvis, K.L., Osann, K., Laulhere, T.M., Straub, C., Thomas, E., Filipek, P., and Spence, M.A. (2005). Brief report: early social communication behaviors in the younger siblings of children with autism. *J Autism Dev Disord* 35, 657-664.
- Gorrindo, P., Williams, K.C., Lee, E.B., Walker, L.S., McGrew, S.G., and Levitt, P. (2012). Gastrointestinal dysfunction in autism: parental report, clinical evaluation, and associated factors. *Autism Res* 5, 101-108.

Grant, W.B., Wimalawansa, S.J., Holick, M.F., Cannell, J.J., Pludowski, P., Lappe, J.M., Pittaway, M., and May, P. (2015). Emphasizing the health benefits of vitamin D for those with neurodevelopmental disorders and intellectual disabilities. *Nutrients* 7, 1538-1564.

Grenham, S., Clarke, G., Cryan, J.F., and Dinan, T.G. (2011). Brain-gut-microbe communication in health and disease. *Front Physiol* 2, 94.

Gross, C., Eccleshall, T.R., Malloy, P.J., Villa, M.L., Marcus, R., and Feldman, D. (1996). The presence of a polymorphism at the translation initiation site of the vitamin D receptor gene is associated with low bone mineral density in postmenopausal Mexican-American women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 11, 1850-1855.

Guinchat, V., Thorsen, P., Laurent, C., Cans, C., Bodeau, N., and Cohen, D. (2012). Pre-, peri- and neonatal risk factors for autism. *Acta Obstet Gynecol Scand* 91, 287-300.

Hadjivassiliou, M., Grunewald, R.A., Chattopadhyay, A.K., Davies-Jones, G.A., Gibson, A., Jarratt, J.A., Kandler, R.H., Lobo, A., Powell, T., and Smith, C.M. (1998). Clinical, radiological, neurophysiological, and neuropathological characteristics of gluten ataxia. *Lancet* 352, 1582-1585.

Hadjivassiliou, M., Williamson, C.A., and Woodroffe, N. (2004). The immunology of gluten sensitivity: beyond the gut. *Trends Immunol* 25, 578-582.

Hadjkacem, I., Ayadi, H., Turki, M., Yaich, S., Khemekhem, K., Walha, A., Cherif, L., Moalla, Y., and Ghribi, F. (2016). Prenatal, perinatal and postnatal factors associated with autism spectrum disorder. *J Pediatr (Rio J)* 92, 595-601.

Hallmayer, J., Cleveland, S., Torres, A., Phillips, J., Cohen, B., Torigoe, T., Miller, J., Fedele, A., Collins, J., Smith, K., et al. (2011). Genetic heritability and shared environmental factors among twin pairs with autism. *Arch Gen Psychiatry* 68, 1095-1102.

Hamer, H.M., Jonkers, D., Venema, K., Vanhoutvin, S., Troost, F.J., and Brummer, R.J. (2008). Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 27, 104-119.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.

Harmsen, H.J., Wildeboer-Veloo, A.C., Raangs, G.C., Wagendorp, A.A., Klijn, N., Bindels, J.G., and Welling, G.W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 30, 61-67.

Harris, S.S., Eccleshall, T.R., Gross, C., Dawson-Hughes, B., and Feldman, D. (1997). The vitamin D receptor start codon polymorphism (FokI) and bone mineral density in premenopausal American black and white women. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 12, 1043-1048.

Heilig, H.G., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D., and de Vos, W.M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 68, 114-123.

Hewison, M., Freeman, L., Hughes, S.V., Evans, K.N., Bland, R., Eliopoulos, A.G., Kilby, M.D., Moss, P.A., and Chakraverty, R. (2003). Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 170, 5382-5390.

Hietbrink, F., Besselink, M.G., Renooij, W., de Smet, M.B., Draisma, A., van der Hoeven, H., and Pickkers, P. (2009). Systemic inflammation increases intestinal permeability during experimental human endotoxemia. *Shock* 32, 374-378.

Hole, K., Bergslien, H., Jorgensen, H.A., Berge, O.G., Reichelt, K.L., and Trygstad, O.E. (1979). A peptide-containing fraction in the urine of schizophrenic patients which stimulates opiate receptors and inhibits dopamine uptake. *Neuroscience* 4, 1883-1893.

Holick, M.F. (2009). Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 19, 73-78.

Horvath, K., and Perman, J.A. (2002). Autism and gastrointestinal symptoms. *Curr Gastroenterol Rep* 4, 251-258.

- Hsiao, E.Y., McBride, S.W., Hsien, S., Sharon, G., Hyde, E.R., McCue, T., Codelli, J.A., Chow, J., Reisman, S.E., Petrosino, J.F., et al. (2013). Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell* 155, 1451-1463.
- Hughes, H.K., Rose, D., and Ashwood, P. (2018). The Gut Microbiota and Dysbiosis in Autism Spectrum Disorders. *Curr Neurol Neurosci Rep* 18, 81.
- Hultman, C.M., Sparen, P., and Cnattingius, S. (2002). Perinatal risk factors for infantile autism. *Epidemiology* 13, 417-423.
- Hunter, L.C., O'Hare, A., Herron, W.J., Fisher, L.A., and Jones, G.E. (2003). Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Dev Med Child Neurol* 45, 121-128.
- Hussey, S., Wall, R., Gruffman, E., O'Sullivan, L., Ryan, C.A., Murphy, B., Fitzgerald, G., Stanton, C., and Ross, R.P. (2011). Parenteral antibiotics reduce bifidobacteria colonization and diversity in neonates. *Int J Microbiol* 2011.
- Hyman, M.A. (2008). Autism: is it all in the head? *Altern Ther Health Med* 14, 12-15.
- Ibrahim, S.H., Voigt, R.G., Katusic, S.K., Weaver, A.L., and Barbaresi, W.J. (2009). Incidence of gastrointestinal symptoms in children with autism: a population-based study. *Pediatrics* 124, 680-686.
- Jackson, J.R., Eaton, W.W., Cascella, N.G., Fasano, A., and Kelly, D.L. (2012). Neurologic and psychiatric manifestations of celiac disease and gluten sensitivity. *Psychiatr Q* 83, 91-102.
- Jarmolowska, B., Bukalo, M., Fiedorowicz, E., Cieslinska, A., Kordulewska, N.K., Moszynska, M., Swiatecki, A., and Kostyra, E. (2019). Role of Milk-Derived Opioid Peptides and Proline Dipeptidyl Peptidase-4 in Autism Spectrum Disorders. *Nutrients* 11.
- Jarmolowska, B., Sidor, K., Iwan, M., Bielikowicz, K., Kaczmarek, M., Kostyra, E., and Kostyra, H. (2007). Changes of beta-casomorphin content in human milk during lactation. *Peptides* 28, 1982-1986.
- Jensen, F.E. (2011). Epilepsy as a spectrum disorder: Implications from novel clinical and basic neuroscience. *Epilepsia* 52 Suppl 1, 1-6.
- Jiang, P., Zhu, W.Y., He, X., Tang, M.M., Dang, R.L., Li, H.D., Xue, Y., Zhang, L.H., Wu, Y.Q., and Cao, L.J. (2015). Association between Vitamin D Receptor Gene Polymorphisms with Childhood Temporal Lobe Epilepsy. *Int J Environ Res Public Health* 12, 13913-13922.
- Johnson, C.R., Handen, B.L., Zimmer, M., Sacco, K., and Turner, K. (2011). Effects of gluten free/casein free diet in young children with autism: a pilot study. *J Dev Phys Disabil* 23, 213-225.
- Jyonouchi, H. (2009). Food allergy and autism spectrum disorders: is there a link? *Curr Allergy Asthma Rep* 9, 194-201.
- Jyonouchi, H. (2010). Autism spectrum disorders and allergy: observation from a pediatric allergy/immunology clinic. *Expert Rev Clin Immunol* 6, 397-411.
- Karell, K., Louka, A.S., Moodie, S.J., Ascher, H., Clot, F., Greco, L., Ciclitira, P.J., Sollid, L.M., Partanen, J., and European Genetics Cluster on Celiac, D. (2003). HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1*05-DQB1*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum Immunol* 64, 469-477.
- Khakzad, M.R., Javanbakht, M., Soltanifar, A., Hojati, M., Delgosha, M., and Meshkat, M. (2012). The evaluation of food allergy on behavior in autistic children. *Rep Biochem Mol Biol* 1, 37-42.
- Khan, M.T., Duncan, S.H., Stams, A.J., van Dijk, J.M., Flint, H.J., and Harmsen, H.J. (2012). The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic-anoxic interphases. *The ISME journal* 6, 1578-1585.
- Kinney, D.K., Barch, D.H., Chayka, B., Napoleon, S., and Munir, K.M. (2010). Environmental risk factors for autism: do they help cause de novo genetic mutations that contribute to the disorder? *Med Hypotheses* 74, 102-106.
- Klaveness, J., Bigam, J., and Reichelt, K.L. (2013). The varied rate of response to dietary intervention in autistic children. *Open Journal of Psychiatry* 3, 56-60.
- Knivsberg, A.M., Reichelt, K.L., Høien, T., and Nodland, M. (2002). A randomised, controlled study of dietary intervention in autistic syndromes. *Nutr Neurosci* 5, 251-261.

- Knivsberg, A.M., Reichelt, K.L., and Nodland, M. (1999). Dietary Intervention for a Seven Year Old Girl with Autistic Behaviour. *Nutr Neurosci* 2, 435-439.
- Koch, G., Wiedemann, K., and Teschemacher, H. (1985). Opioid activities of human beta-casomorphins. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 331, 351-354.
- Kogan, M.D., Blumberg, S.J., Schieve, L.A., Boyle, C.A., Perrin, J.M., Ghandour, R.M., Singh, G.K., Strickland, B.B., Trevathan, E., and van Dyck, P.C. (2009). Prevalence of parent-reported diagnosis of autism spectrum disorder among children in the US, 2007. *Pediatrics* 124, 1395-1403.
- Konstantareas, M.M., and Homatidis, S. (1987). Ear infections in autistic and normal children. *J Autism Dev Disord* 17, 585-594.
- Korhonen, H., and Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16, 945-960.
- Kost, N.V., Sokolov, O.Y., Kurasova, O.B., Dmitriev, A.D., Tarakanova, J.N., Gabaeva, M.V., Zolotarev, Y.A., Dadayan, A.K., Grachev, S.A., Korneeva, E.V., et al. (2009). Beta-casomorphins-7 in infants on different type of feeding and different levels of psychomotor development. *Peptides* 30, 1854-1860.
- Krajmalnik-Brown, R., Lozupone, C., Kang, D.W., and Adams, J.B. (2015). Gut bacteria in children with autism spectrum disorders: challenges and promise of studying how a complex community influences a complex disease. *Microb Ecol Health Dis* 26, 26914.
- Kushak, R.I., Lauwers, G.Y., Winter, H.S., and Buie, T.M. (2011). Intestinal disaccharidase activity in patients with autism: effect of age, gender, and intestinal inflammation. *Autism* 15, 285-294.
- Lau, N.M., Green, P.H., Taylor, A.K., Hellberg, D., Ajamian, M., Tan, C.Z., Kosofsky, B.E., Higgins, J.J., Rajadhyaksha, A.M., and Alaedini, A. (2013). Markers of Celiac Disease and Gluten Sensitivity in Children with Autism. *PLoS One* 8, e66155.
- Lavant, E.H., Agardh, D.J., Nilsson, A., and Carlson, J.A. (2011). A new PCR-SSP method for HLA DR-DQ risk assessment for celiac disease. *Clin Chim Acta* 412, 782-784.
- Layton, B.A., Walters, S.P., Lam, L.H., and Boehm, A.B. (2010). Enterococcus species distribution among human and animal hosts using multiplex PCR. *J Appl Microbiol* 109, 539-547.
- Lee, J.H., and O'Sullivan, D.J. (2010). Genomic insights into bifidobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 378-416.
- Lichtenstein, P., Carlstrom, E., Rastam, M., Gillberg, C., and Anckarsater, H. (2010). The genetics of autism spectrum disorders and related neuropsychiatric disorders in childhood. *Am J Psychiatry* 167, 1357-1363.
- Liu, Y., Heiberg, T., and Reichelt, K.L. (2007a). Towards a possible aetiology for depressions? *Behav Brain Funct* 3, 47.
- Liu, Y., Heiberg, T., and Reichelt, K.L. (2007b). Towards a possible aetiology for depressions? *Behavioral and Brain Functions* 3.
- Losh, M., Adolphs, R., Poe, M.D., Couture, S., Penn, D., Baranek, G.T., and Piven, J. (2009). Neuropsychological profile of autism and the broad autism phenotype. *Arch Gen Psychiatry* 66, 518-526.
- Lucarelli, S., Frediani, T., Zingoni, A.M., Ferruzzi, F., Giardini, O., Quintieri, F., Barbato, M., D'Eufemia, P., and Cardi, E. (1995). Food allergy and infantile autism. *Panminerva Med* 37, 137-141.
- Lukic, J., Strahinic, I., Milenkovic, M., Golic, N., Kojic, M., Topisirovic, L., and Begovic, J. (2013). Interaction of *Lactobacillus fermentum* BGHI14 with rat colonic mucosa: implications for colitis induction. *Appl Environ Microbiol* 79, 5735-5744.
- Luna, R.A., Savidge, T.C., and Williams, K.C. (2016). The Brain-Gut-Microbiome Axis: What Role Does It Play in Autism Spectrum Disorder? *Curr Dev Disord Rep* 3, 75-81.
- Lyall, K., Ashwood, P., Van de Water, J., and Hertz-Picciotto, I. (2014). Maternal immune-mediated conditions, autism spectrum disorders, and developmental delay. *J Autism Dev Disord* 44, 1546-1555.

- Macfabe, D.F. (2012). Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders. *Microb Ecol Health Dis* 23.
- Mangiola, F., Ianiro, G., Franceschi, F., Fagioli, S., Gasbarrini, G., and Gasbarrini, A. (2016). Gut microbiota in autism and mood disorders. *World J Gastroenterol* 22, 361-368.
- Maranduba, C.M., De Castro, S.B., de Souza, G.T., Rossato, C., da Guia, F.C., Valente, M.A., Rettore, J.V., Maranduba, C.P., de Souza, C.M., do Carmo, A.M., et al. (2015). Intestinal microbiota as modulators of the immune system and neuroimmune system: impact on the host health and homeostasis. *J Immunol Res* 2015, 931574.
- Matamoros, S., Gras-Leguen, C., Le Vacon, F., Potel, G., and de La Cochetiere, M.F. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol* 21, 167-173.
- Matthews, S.B., Waud, J.P., Roberts, A.G., and Campbell, A.K. (2005). Systemic lactose intolerance: a new perspective on an old problem. *Postgrad Med J* 81, 167-173.
- Matthies, H., Stark, H., Hartrodt, B., Ruethrich, H.L., Spieler, H.T., Barth, A., and Neubert, K. (1984). Derivatives of beta-casomorphins with high analgesic potency. *Peptides* 5, 463-470.
- Mazefsky, C.A., Schreiber, D.R., Olino, T.M., and Minshew, N.J. (2014). The association between emotional and behavioral problems and gastrointestinal symptoms among children with high-functioning autism. *Autism* 18, 493-501.
- Mazurek, M.O., Vasa, R.A., Kalb, L.G., Kanne, S.M., Rosenberg, D., Keefer, A., Murray, D.S., Freedman, B., and Lowery, L.A. (2013). Anxiety, sensory over-responsivity, and gastrointestinal problems in children with autism spectrum disorders. *J Abnorm Child Psychol* 41, 165-176.
- McGrath, J., Feron, F., Eyles, D., and Mackay-Sim, A. (2001). Vitamin D: the neglected neurosteroid? *Trends Neurosci* 24, 570-572.
- Megiorni, F., and Pizzuti, A. (2012). HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci* 19, 88.
- Meisel, H., and Schlimme, E. (1990). Milk proteins: precursors of bioactive peptides. *Trends Food Sci Technol* 1, 41-43.
- Meldrum, S.J., D'Vaz, N., Dunstan, J.A., Mori, T.A., Hird, K., Simmer, K., and Prescott, S.L. (2012). Allergic disease in the first year of life is associated with differences in subsequent neurodevelopment and behaviour. *Early Hum Dev* 88, 567-573.
- Mendola, P., Selevan, S.G., Gutter, S., and Rice, D. (2002). Environmental factors associated with a spectrum of neurodevelopmental deficits. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev* 8, 188-197.
- Merenstein, D.J., Tan, T.P., Molokin, A., Smith, K.H., Roberts, R.F., Shara, N.M., Mete, M., Sanders, M.E., and Solano-Aguilar, G. (2015). Safety of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (B. lactis) strain BB-12-supplemented yogurt in healthy adults on antibiotics: a phase I safety study. *Gut microbes* 6, 66-77.
- Miner-Williams, W.M., Stevens, B.R., and Moughan, P.J. (2014). Are intact peptides absorbed from the healthy gut in the adult human? *Nutr Res Rev* 27, 308-329.
- Miyauchi, E., Ogita, T., Miyamoto, J., Kawamoto, S., Morita, H., Ohno, H., Suzuki, T., and Tanabe, S. (2013). *Bifidobacterium longum* alleviates dextran sulfate sodium-induced colitis by suppressing IL-17A response: involvement of intestinal epithelial costimulatory molecules. *PLoS One* 8, e79735.
- Molberg, O., McAdam, S.N., Korner, R., Quarsten, H., Kristiansen, C., Madsen, L., Fugger, L., Scott, H., Noren, O., Roepstorff, P., et al. (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nat Med* 4, 713-717.
- Molloy, C.A., and Manning-Courtney, P. (2003). Prevalence of chronic gastrointestinal symptoms in children with autism and autistic spectrum disorders. *Autism* 7, 165-171.
- Morowitz, M.J., Carlisle, E.M., and Alverdy, J.C. (2011). Contributions of intestinal bacteria to nutrition and metabolism in the critically ill. *Surg Clin North Am* 91, 771-785, viii.
- Mostafa, G.A., and Al-Ayadhi, L.Y. (2012). Reduced serum concentrations of 25-hydroxy vitamin D in children with autism: relation to autoimmunity. *J Neuroinflammation* 9, 201.

- Mostafa, G.A., Hamza, R.T., and El-Shahawi, H.H. (2008). Allergic manifestations in autistic children: relation to disease severity. *Journal of Pediatric Neurology* 6, 115–123.
- Muhle, R., Trentacoste, S.V., and Rapin, I. (2004). The genetics of autism. *Pediatrics* 113, e472-486.
- Mulcare, C.A., Weale, M.E., Jones, A.L., Connell, B., Zeitlyn, D., Tarekegn, A., Swallow, D.M., Bradman, N., and Thomas, M.G. (2004). The T allele of a single-nucleotide polymorphism 13.9 kb upstream of the lactase gene (LCT) (C-13.9kbT) does not predict or cause the lactase-persistence phenotype in Africans. *Am J Hum Genet* 74, 1102-1110.
- Mulle, J.G., Sharp, W.G., and Cubells, J.F. (2013). The gut microbiome: a new frontier in autism research. *Curr Psychiatry Rep* 15, 337.
- Munesue, T., Ono, Y., Mutoh, K., Shimoda, K., Nakatani, H., and Kikuchi, M. (2008). High prevalence of bipolar disorder comorbidity in adolescents and young adults with high-functioning autism spectrum disorder: a preliminary study of 44 outpatients. *J Affect Disord* 111, 170-175.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., and Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59, 695-700.
- Nankova, B.B., Agarwal, R., MacFabe, D.F., and La Gamma, E.F. (2014). Enteric bacterial metabolites propionic and butyric acid modulate gene expression, including CREB-dependent catecholaminergic neurotransmission, in PC12 cells--possible relevance to autism spectrum disorders. *PLoS One* 9, e103740.
- Neufeld, K.A., Kang, N., Bienenstock, J., and Foster, J.A. (2011). Effects of intestinal microbiota on anxiety-like behavior. *Commun Integr Biol* 4, 492-494.
- Ng-Kwai-Hang, K.F., and Grosclaude, F. (2002). Genetic Polymorphism of Milk Proteins In *Advanced Dairy Chemistry: Volume 1: Proteins, Parts A & B*, P.F. Fox, and L.H. McSweeney, eds. (Kluwer Academic/Plenum Publishers; New York, NY, USA), pp. 739-816.
- Niehus, R., and Lord, C. (2006). Early medical history of children with autism spectrum disorders. *J Dev Behav Pediatr* 27, S120-127.
- Nikolov, R.N., Bearss, K.E., Lettinga, J., Erickson, C., Rodowski, M., Aman, M.G., McCracken, J.T., McDougle, C.J., Tierney, E., Vitiello, B., et al. (2009). Gastrointestinal symptoms in a sample of children with pervasive developmental disorders. *J Autism Dev Disord* 39, 405-413.
- Nubel, U., Engelen, B., Felske, A., Snaidr, J., Wieshuber, A., Amann, R.I., Ludwig, W., and Backhaus, H. (1996). Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymyxa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. *J Bacteriol* 178, 5636-5643.
- O'Mahony, S.M., Clarke, G., Borre, Y.E., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2015). Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res* 277, 32-48.
- O'Mahony, S.M., Clarke, G., Dinan, T.G., and Cryan, J.F. (2017). Early-life adversity and brain development: Is the microbiome a missing piece of the puzzle? *Neuroscience* 342, 37-54.
- O'Roak, B.J., Deriziotis, P., Lee, C., Vives, L., Schwartz, J.J., Girirajan, S., Karakoc, E., Mackenzie, A.P., Ng, S.B., Baker, C., et al. (2011). Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations. *Nat Genet* 43, 585-589.
- Ojetti, V., Nucera, G., Migneco, A., Gabrielli, M., Lauritano, C., Danese, S., Zocco, M.A., Nista, E.C., Cammarota, G., De Lorenzo, A., et al. (2005). High prevalence of celiac disease in patients with lactose intolerance. *Digestion* 71, 106-110.
- Pal, S., Woodford, K., Kukuljan, S., and Ho, S. (2015). Milk Intolerance, Beta-Casein and Lactose. *Nutrients* 7, 7285-7297.
- Panskepp, J. (1979). A neurochemical theory of autism. *Trends in neurosciences* 2, 174-177.
- Parracho, H.M., Bingham, M.O., Gibson, G.R., and McCartney, A.L. (2005). Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children. *J Med Microbiol* 54, 987-991.
- Pasi, A., Mahler, H., Lansel, N., Bernasconi, C., and Messiha, F.S. (1993). beta-Casomorphin-immunoreactivity in the brain stem of the human infant. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 80, 305-322.

- Passmore, I.J., Letertre, M.P.M., Preston, M.D., Bianconi, I., Harrison, M.A., Nasher, F., Kaur, H., Hong, H.A., Baines, S.D., Cutting, S.M., et al. (2018). Para-cresol production by *Clostridium difficile* affects microbial diversity and membrane integrity of Gram-negative bacteria. *PLoS Pathog* 14, e1007191.
- Pelsser, L.M., Buitelaar, J.K., and Savelkoul, H.F. (2009). ADHD as a (non) allergic hypersensitivity disorder: a hypothesis. *Pediatr Allergy Immunol* 20, 107-112.
- Pennesi, C.M., and Klein, L.C. (2012). Effectiveness of the gluten-free, casein-free diet for children diagnosed with autism spectrum disorder: based on parental report. *Nutr Neurosci* 15, 85-91.
- Pennington, C., Dufresne, C., Fanciulli, G., and Wood, T. (2007). Detection of Gluten Exorphin B4 and B5 in Human Blood by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry/Mass Spectrometry The Open Spectroscopy Journal 1, 9-16.
- Peters, B., Williams, K.C., Gorrindo, P., Rosenberg, D., Lee, E.B., Levitt, P., and Veenstra-VanderWeele, J. (2014). Rigid-compulsive behaviors are associated with mixed bowel symptoms in autism spectrum disorder. *J Autism Dev Disord* 44, 1425-1432.
- Pickles, A., Starr, E., Kazak, S., Bolton, P., Papanikolaou, K., Bailey, A., Goodman, R., and Rutter, M. (2000). Variable expression of the autism broader phenotype: findings from extended pedigrees. *J Child Psychol Psychiatry* 41, 491-502.
- Polyak, A., Rosenfeld, J.A., and Girirajan, S. (2015). An assessment of sex bias in neurodevelopmental disorders. *Genome Med* 7, 94.
- Prosperi, M., Santocchi, E., Balboni, G., Narzisi, A., Bozza, M., Fulceri, F., Apicella, F., Iglizzo, R., Cosenza, A., Tancredi, R., et al. (2017). Behavioral Phenotype of ASD Preschoolers with Gastrointestinal Symptoms or Food Selectivity. *J Autism Dev Disord* 47, 3574-3588.
- Pruimboom, L., and de Punder, K. (2015). The opioid effects of gluten exorphins: asymptomatic celiac disease. *J Health Popul Nutr* 33, 24.
- Quigley, E.M. (2016). Leaky gut - concept or clinical entity? *Curr Opin Gastroenterol* 32, 74-79.
- Radlovic, N., Mladenovic, M., Lekovic, Z., Ristic, D., Pavlovic, M., Stojisic, Z., Vuletic, B., Radlovic, V., Nikolic, D., Djurdjevid, J., et al. (2009). Lactose intolerance in infants with gluten-sensitive enteropathy: frequency and clinical characteristics. *Srp Arh Celok Lek* 137, 33-37.
- Rajilic-Stojanovic, M., Smidt, H., and de Vos, W.M. (2007). Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol* 9, 2125-2136.
- Rasinpera, H., Saarinen, K., Pelkonen, A., Jarvela, I., Savilahti, E., and Kolho, K.L. (2006). Molecularly defined adult-type hypolactasia in school-aged children with a previous history of cow's milk allergy. *World J Gastroenterol* 12, 2264-2268.
- Ratnayake, U., Quinn, T., Walker, D.W., and Dickinson, H. (2013). Cytokines and the neurodevelopmental basis of mental illness. *Front Neurosci* 7, 180.
- Reichelt, K.L., Edminson, P.D., and Toft, K.G. (1985). Urinary Peptides in Schizophrenia and Depression. *Stress Medicine* 1, 169-181.
- Reichelt, K.L., and Knivsberg, A.M. (2003). Can the pathophysiology of autism be explained by the nature of the discovered urine peptides? *Nutr Neurosci* 6, 19-28.
- Reichelt, K.L., and Knivsberg, A.M. (2009). The possibility and probability of a gut-to-brain connection in autism. *Ann Clin Psychiatry* 21, 205-211.
- Reichelt, K.L., Saelid, G., Lindback, T., and Boler, J.B. (1986). Childhood autism: a complex disorder. *Biol Psychiatry* 21, 1279-1290.
- Reichelt, K.L., Tveiten, D., Knivsberg, A.M., and Bronstad, G. (2012). Peptides' role in autism with emphasis on exorphins. *Microb Ecol Health Dis* 23.
- Reichelt, W.H., Ek, J., Stensrud, M., and Reichelt, K.L. (1998). Peptide excretion in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 26, 305-309.
- Ringel-Kulka, T., Cheng, J., Ringel, Y., Salojarvi, J., Carroll, I., Palva, A., de Vos, W.M., and Satokari, R. (2013). Intestinal microbiota in healthy U.S. young children and adults--a high throughput microarray analysis. *PLoS One* 8, e64315.

- Robert, C., Pasquier, L., Cohen, D., Fradin, M., Canitano, R., Damaj, L., Odent, S., and Tordjman, S. (2017). Role of Genetics in the Etiology of Autistic Spectrum Disorder: Towards a Hierarchical Diagnostic Strategy. *Int J Mol Sci* 18.
- Robinson, E., Neale, B., and Hyman, S. (2015). Genetic research in autism spectrum disorders. *Curr Opin Pediatr* 27, 685–691.
- Rogers, G.B., Keating, D.J., Young, R.L., Wong, M.L., Licinio, J., and Wesselingh, S. (2016). From gut dysbiosis to altered brain function and mental illness: mechanisms and pathways. *Mol Psychiatry* 21, 738-748.
- Ropers, H.H. (2008). Genetics of intellectual disability. *Curr Opin Genet Dev* 18, 241-250.
- Rosenberg, R.E., Law, J.K., Yenokyan, G., McGready, J., Kaufmann, W.E., and Law, P.A. (2009). Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med* 163, 907-914.
- Rossignol, D.A., and Frye, R.E. (2012). A review of research trends in physiological abnormalities in autism spectrum disorders: immune dysregulation, inflammation, oxidative stress, mitochondrial dysfunction and environmental toxicant exposures. *Mol Psychiatry* 17, 389-401.
- Rowland, I., Gibson, G., Heinken, A., Scott, K., Swann, J., Thiele, I., and Tuohy, K. (2018). Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur J Nutr* 57, 1-24.
- Russell, W.R., Duncan, S.H., Scobbie, L., Duncan, G., Cantlay, L., Calder, A.G., Anderson, S.E., and Flint, H.J. (2013). Major phenylpropanoid-derived metabolites in the human gut can arise from microbial fermentation of protein. *Molecular nutrition & food research* 57, 523-535.
- Sajdel-Sulkowska, E.M., and Zabielski, R. (2013). Gut Microbiome and Brain-Gut Axis in Autism — Aberrant Development of Gut-Brain Communication and Reward Circuitry. In *Recent Advances in Autism Spectrum Disorders - Volume I*, M. Fitzgerald, ed. (IntechOpen).
- Samasca, G., Bruchental, M., Butnariu, A., Pirvan, A., Andreica, M., Cristea, V., and Dejica, D. (2011). Difficulties in Celiac Disease Diagnosis in Children - A case report. *Maedica (Buchar)* 6, 32-35.
- Sandler, R.H., Finegold, S.M., Bolte, E.R., Buchanan, C.P., Maxwell, A.P., Vaisanen, M.L., Nelson, M.N., and Wexler, H.M. (2000). Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *Journal of child neurology* 15, 429-435.
- Sanguinetti, C.J., Dias Neto, E., and Simpson, A.J. (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17, 914-921.
- Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D., Saarela, M., and de Vos, W.M. (2001). Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 67, 504-513.
- Scaro, V. (2016). Genetička predispozicija za nepodnošenje laktoze. *Paediatr Croat.* 60 (Supl 1), 100-104.
- Schmidt, R.J., Hansen, R.L., Hartiala, J., Allayee, H., Sconberg, J.L., Schmidt, L.C., Volk, H.E., and Tassone, F. (2015). Selected vitamin D metabolic gene variants and risk for autism spectrum disorder in the CHARGE Study. *Early Hum Dev* 91, 483-489.
- Schurman, J.V., Friesen, C.A., Dai, H., Danda, C.E., Hyman, P.E., and Cocjin, J.T. (2012). Sleep problems and functional disability in children with functional gastrointestinal disorders: an examination of the potential mediating effects of physical and emotional symptoms. *BMC Gastroenterol* 12, 142.
- Scott, F.J., Baron-Cohen, S., Bolton, P., and Brayne, C. (2002). Brief report: prevalence of autism spectrum conditions in children aged 5-11 years in Cambridgeshire, UK. *Autism* 6, 231-237.
- Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C., and Finlay, B.B. (2010). Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 90, 859-904.
- Shattock, P., Hooper, M., and Waring, R. (2004). Opioid peptides and dipeptidyl peptidase in autism. *Dev Med Child Neurol* 46, 357; author reply 357-358.
- Shattock, P., and Whiteley, P. (2002). Biochemical aspects in autism spectrum disorders: updating the opioid-excess theory and presenting new opportunities for biomedical intervention. *Expert Opin Ther Targets* 6, 175-183.

Shibata, A., Hitomi, Y., Kambayashi, Y., Hibino, Y., Yamazaki, M., Mitoma, J., Asakura, H., Hayashi, K., Otaki, N., Sagara, T., et al. (2013). Epidemiological study on the involvements of environmental factors and allergy in child mental health using the Autism Screening Research in Autism Spectrum Disorders 7, 132-140.

Simonoff, E., Pickles, A., Charman, T., Chandler, S., Loucas, T., and Baird, G. (2008). Psychiatric disorders in children with autism spectrum disorders: prevalence, comorbidity, and associated factors in a population-derived sample. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry* 47, 921-929.

Singh, M., Rosen, C.L., Chang, K.J., and Haddad, G.G. (1989). Plasma beta-casomorphin-7 immunoreactive peptide increases after milk intake in newborn but not in adult dogs. *Pediatr Res* 26, 34-38.

Siniscalco, D., Schultz, S., Brigida, A.L., and Antonucci, N. (2018). Inflammation and Neuro-Immune Dysregulations in Autism Spectrum Disorders. *Pharmaceuticals (Basel)* 11.

Slawinski, B.L., Talge, N., Ingersoll, B., Smith, A., Glazier, A., Kerver, J., Paneth, N., and Racicot, K. (2018). Maternal cytomegalovirus sero-positivity and autism symptoms in children. *Am J Reprod Immunol* 79, e12840.

Smolders, J., Damoiseaux, J., Menheere, P., Tervaert, J.W., and Hupperts, R. (2009). Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 207, 117-121.

Song, Y., Liu, C., and Finegold, S.M. (2004a). Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children. *Appl Environ Microbiol* 70, 6459-6465.

Song, Y.L., Liu, C.X., McTeague, M., Summanen, P., and Finegold, S.M. (2004b). *Clostridium bartlettii* sp. nov., isolated from human faeces. *Anaerobe* 10, 179-184.

Sonnenburg, J.L., Chen, C.T., and Gordon, J.I. (2006). Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol* 4, e413.

Stackebrandt, E., Sproer, C., Rainey, F.A., Burghardt, J., Pauker, O., and Hippe, H. (1997). Phylogenetic analysis of the genus *Desulfotomaculum*: evidence for the misclassification of *Desulfotomaculum guttoideum* and description of *Desulfotomaculum orientis* as *Desulfosporosinus orientis* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 47, 1134-1139.

Stankovic, B., Radlovic, N., Lekovic, Z., Ristic, D., Radlovic, V., Nikcevic, G., Kotur, N., Vucicevic, K., Kostic, T., Pavlovic, S., et al. (2014). HLA genotyping in pediatric celiac disease patients. *Bosn J Basic Med Sci* 14, 171-176.

Steppe, M., Van Nieuwerburgh, F., Vercauteren, G., Boyen, F., Eeckhaut, V., Deforce, D., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., and Van Immerseel, F. (2014). Safety assessment of the butyrate-producing *Butyrivibrio pullicaecorum* strain 25-3(T), a potential probiotic for patients with inflammatory bowel disease, based on oral toxicity tests and whole genome sequencing. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 72, 129-137.

Sudo, N., Chida, Y., Aiba, Y., Sonoda, J., Oyama, N., Yu, X.N., Kubo, C., and Koga, Y. (2004). Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol* 558, 263-275.

Sullivan, P.F., Magnusson, C., Reichenberg, A., Boman, M., Dalman, C., Davidson, M., Fruchter, E., Hultman, C.M., Lundberg, M., Langstrom, N., et al. (2012). Family history of schizophrenia and bipolar disorder as risk factors for autism. *Arch Gen Psychiatry* 69, 1099-1103.

Sun, Z., and Cade, R. (1999a). A Peptide Found in Schizophrenia and Autism Causes Behavioral Changes in Rats *Autism* 3, 85-95.

Sun, Z., Cade, R., Fregly, M., and Privette, M. (1999b). β -Casomorphin Induces Fos-Like Immunoreactivity in Discrete Brain Regions Relevant to Schizophrenia and Autism. *Autism* 3, 67-83.

Swallow, D.M. (2003). Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. *Annu Rev Genet* 37, 197-219.

- Swanwick, C.C., Larsen, E., and Banerjee-Basu, S. (2011). Genetic Heterogeneity of Autism Spectrum Disorders. In *Autism Spectrum Disorders: The Role of Genetics in Diagnosis and Treatment*, S. Deutsch, ed. (IntechOpen).
- Swedo, S.E., Baird, G., Cook, E.H., Happe, F.G., Harris, J.C., and Kaufmann, W.E., et al. (2013). "Neurodevelopmental disorders," In *American Psychiatric Association: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders*, S.K. Schultz, and E.A. Kuhl, eds. (Washington, DC: American Psychiatric Association), pp. 31-87.
- Taira, T., Hilakivi, L.A., Aalto, J., and Hilakivi, I. (1990). Effect of beta-casomorphin on neonatal sleep in rats. *Peptides* 11, 1-4.
- Takahashi, M., Fukunaga, H., Kaneto, H., Fukudome, S., and Yoshikawa, M. (2000). Behavioral and pharmacological studies on gluten exorphin A5, a newly isolated bioactive food protein fragment, in mice. *Jpn J Pharmacol* 84, 259-265.
- Theoharides, T.C., Tsilioni, I., Patel, A.B., and Doyle, R. (2016). Atopic diseases and inflammation of the brain in the pathogenesis of autism spectrum disorders. *Transl Psychiatry* 6, e844.
- Thorsby, E. (2009). A short history of HLA. *Tissue Antigens* 74, 101-116.
- Tollefsen, S., Arentz-Hansen, H., Fleckenstein, B., Molberg, O., Raki, M., Kwok, W.W., Jung, G., Lundin, K.E., and Sollid, L.M. (2006). HLA-DQ2 and -DQ8 signatures of gluten T cell epitopes in celiac disease. *J Clin Invest* 116, 2226-2236.
- Tomova, A., Husarova, V., Lakatosova, S., Bakos, J., Vlkova, B., Babinska, K., and Ostatnikova, D. (2015). Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiol Behav* 138, 179-187.
- Tonacci, A., Billeci, L., Ruta, L., Tartarisco, G., Pioggia, G., and Gangemi, S. (2017). A systematic review of the association between allergic asthma and autism. *Minerva Pediatr* 69, 538-550.
- Toora, B.D., and Rajagopal, G. (2002). Measurement of creatinine by Jaffe's reaction--determination of concentration of sodium hydroxide required for maximum color development in standard, urine and protein free filtrate of serum. *Indian J Exp Biol* 40, 352-354.
- Torrente, F., Ashwood, P., Day, R., Machado, N., Furlano, R.I., Anthony, A., Davies, S.E., Wakefield, A.J., Thomson, M.A., Walker-Smith, J.A., et al. (2002). Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Mol Psychiatry* 7, 375-382, 334.
- Torres, A.R., Westover, J.B., and Rosenspire, A.J. (2012). HLA Immune Function Genes in Autism. *Autism Res Treat* 2012, 959073.
- Turrone, F., Peano, C., Pass, D.A., Foroni, E., Severgnini, M., Claesson, M.J., Kerr, C., Hourihane, J., Murray, D., Fuligni, F., et al. (2012). Diversity of bifidobacteria within the infant gut microbiota. *PLoS One* 7, e36957.
- Turrone, F., Taverniti, V., Ruas-Madiedo, P., Duranti, S., Guglielmetti, S., Lugli, G.A., Gioiosa, L., Palanza, P., Margolles, A., van Sinderen, D., et al. (2014). *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 modulates the host innate immune response. *Appl Environ Microbiol* 80, 730-740.
- Tveiten, D., and Reichelt, K.L. (2012). Exorphins in urine from schizoaffective psychotics. *Open Journal of Psychiatry* 2, 220-227
- Ubeda, C., Djukovic, A., and Isaac, S. (2017). Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clin Transl Immunology* 6, e128.
- Uitterlinden, A.G., Fang, Y., van Meurs, J.B., van Leeuwen, H., and Pols, H.A. (2004). Vitamin D receptor gene polymorphisms in relation to Vitamin D related disease states. *J Steroid Biochem Mol Biol* 89-90, 187-193.
- Ul Haq, M.R., Kapila, R., and Saliganti, V. (2014a). Consumption of β -casomorphins-7/5 induce inflammatory immune response in mice gut through Th2 pathway. *J Funct Foods* 8, 150-160.
- Ul Haq, M.R., Kapila, R., Sharma, R., Saliganti, V., and Kapila, S. (2014b). Comparative evaluation of cow beta-casein variants (A1/A2) consumption on Th2-mediated inflammatory response in mouse gut. *Eur J Nutr* 53, 1039-1049.
- Vader, W., Stepniak, D., Kooy, Y., Mearin, L., Thompson, A., van Rood, J.J., Spaenij, L., and Koning, F. (2003). The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the

magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12390-12395.

Valicenti-McDermott, M., McVicar, K., Rapin, I., Wershil, B.K., Cohen, H., and Shinnar, S. (2006). Frequency of gastrointestinal symptoms in children with autistic spectrum disorders and association with family history of autoimmune disease. *J Dev Behav Pediatr* 27, S128-136.

Valicenti-McDermott, M.D., McVicar, K., Cohen, H.J., Wershil, B.K., and Shinnar, S. (2008). Gastrointestinal symptoms in children with an autism spectrum disorder and language regression. *Pediatr Neurol* 39, 392-398.

van Etten, E., Verlinden, L., Giulietti, A., Ramos-Lopez, E., Branisteanu, D.D., Ferreira, G.B., Overbergh, L., Verstuyf, A., Bouillon, R., Roep, B.O., et al. (2007). The vitamin D receptor gene FokI polymorphism: functional impact on the immune system. *Eur J Immunol* 37, 395-405.

Van Immerseel, F., Ducatelle, R., De Vos, M., Boon, N., Van De Wiele, T., Verbeke, K., Rutgeerts, P., Sas, B., Louis, P., and Flint, H.J. (2010). Butyric acid-producing anaerobic bacteria as a novel probiotic treatment approach for inflammatory bowel disease. *J Med Microbiol* 59, 141-143.

Veenstra-Vanderweele, J., Christian, S.L., and Cook, E.H., Jr. (2004). Autism as a paradigmatic complex genetic disorder. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5, 379-405.

Verlinden, L., Verstuyf, A., Quack, M., Van Camp, M., Van Etten, E., De Clercq, P., Vandewalle, M., Carlberg, C., and Bouillon, R. (2001). Interaction of two novel 14-epivitamin D3 analogs with vitamin D3 receptor-retinoid X receptor heterodimers on vitamin D3 responsive elements. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* 16, 625-638.

Volkmar, F.R., and Reichow, B. (2013). Autism in DSM-5: progress and challenges. *Mol Autism* 4, 13.

Wada, Y., and Lonnerdal, B. (2015). Bioactive peptides released from in vitro digestion of human milk with or without pasteurization. *Pediatr Res* 77, 546-553.

Wang, L., Christophersen, C.T., Sorich, M.J., Gerber, J.P., Angley, M.T., and Conlon, M.A. (2011a). Low relative abundances of the mucolytic bacterium *Akkermansia muciniphila* and *Bifidobacterium* spp. in feces of children with autism. *Applied and environmental microbiology* 77, 6718-6721.

Wang, L.W., Tancredi, D.J., and Thomas, D.W. (2011b). The prevalence of gastrointestinal problems in children across the United States with autism spectrum disorders from families with multiple affected members. *J Dev Behav Pediatr* 32, 351-360.

Wang, Y., and Kasper, L.H. (2014). The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behav Immun* 38, 1-12.

Warren, Z.E., Foss-Feig, J.H., Malesa, E.E., Lee, E.B., Taylor, J.L., Newsom, C.R., Crittendon, J., and Stone, W.L. (2012). Neurocognitive and behavioral outcomes of younger siblings of children with autism spectrum disorder at age five. *J Autism Dev Disord* 42, 409-418.

Wasilewska, J., Kaczmarek, M., Kostyra, E., and Iwan, M. (2011). Cow's-milk-induced infant apnoea with increased serum content of bovine beta-casomorphin-5. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 52, 772-775.

Wasilewska, J., and Klukowski, M. (2015). Gastrointestinal symptoms and autism spectrum disorder: links and risks - a possible new overlap syndrome. *Pediatric Health Med Ther* 6, 153-166.

Whiteley, P., Haracopos, D., Knivsberg, A.M., Reichelt, K.L., Parlar, S., Jacobsen, J., Seim, A., Pedersen, L., Schondel, M., and Shattock, P. (2010). The ScanBrit randomised, controlled, single-blind study of a gluten- and casein-free dietary intervention for children with autism spectrum disorders. *Nutr Neurosci* 13, 87-100.

Whiteley, P., Shattock, P., Knivsberg, A.M., Seim, A., Reichelt, K.L., Todd, L., Carr, K., and Hooper, M. (2012). Gluten- and casein-free dietary intervention for autism spectrum conditions. *Front Hum Neurosci* 6, 344.

WHO (1992). Classification of Mental and Behavioural Disorders: Clinical Descriptions and Diagnostic Guidelines. In *International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD10)*, 10th revision (Geneva: World Health Organization).

- WHO (2015). "Mental and behavioural disorders" In International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems (ICD10), 10th revision (Geneva: World Health Organization).
- Wieczorek, M., Abualrous, E.T., Sticht, J., Álvaro-Benito, m., Stolzenberg, S., Noé, F., and Freund, C. (2017). Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class II Proteins: Conformational Plasticity in Antigen Presentation. *Front Immunol* 8, 292.
- Wigginton, J.E., Cutler, D.J., and Abecasis, G.R. (2005). A note on exact tests of Hardy-Weinberg equilibrium. *Am J Hum Genet* 76, 887-893.
- Wilkinson, E.M., Ilhan, Z.E., and Herbst-Kralovetz, M.M. (2018). Microbiota-drug interactions: Impact on metabolism and efficacy of therapeutics. *Maturitas* 112, 53-63.
- Williams, B.L., Hornig, M., Parekh, T., and Lipkin, W.I. (2012). 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.
- Xu, G., Snetselaar, L.G., Jing, J., Liu, B., Strathearn, L., and Bao, W. (2018). Association of Food Allergy and Other Allergic Conditions With Autism Spectrum Disorder in Children. *JAMA Netw Open* 1, e180279.
- Zaretsky, M.V., Alexander, J.M., Byrd, W., and Bawdon, R.E. (2004). Transfer of inflammatory cytokines across the placenta. *Obstet Gynecol* 103, 546-550.
- Ze, X., Ben David, Y., Laverde-Gomez, J.A., Dassa, B., Sheridan, P.O., Duncan, S.H., Louis, P., Henrissat, B., Juge, N., Koropatkin, N.M., et al. (2015). Unique Organization of Extracellular Amylases into Amyloosomes in the Resistant Starch-Utilizing Human Colonic Firmicutes Bacterium *Ruminococcus bromii*. *mBio* 6, e01058-01015.
- Zhang, Y., Hodgson, N.W., Trivedi, M.S., Abdolmaleky, H.M., Fournier, M., Cuenod, M., Do, K.Q., and Deth, R.C. (2016). Decreased Brain Levels of Vitamin B12 in Aging, Autism and Schizophrenia. *PLoS One* 11, e0146797.
- Zioudrou, C., Streaty, R.A., and Klee, W.A. (1979). Opioid peptides derived from food proteins. The exorphins. *J Biol Chem* 254, 2446-2449.

Elektronske baze podataka:

Basic Local Alignment Search Tool - BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

National Marrow Donor Program Bioinformatics (<http://bioinformatics.nmdp.org/>)

Biografija autora

Katarina Bojović, rođena Nešić, rođena je 12.08.1982. godine u Beogradu. Fakultet za specijalnu edukaciju i rehabilitaciju Univerziteta u Beogradu, smer logopedija, upisala je školske 2001/2002. godine, a diplomirala je 2006. godine sa prosečnom ocenom 9.36. Reupis na doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerzitet u Beogradu izvršen je školske 2017/2018., studijski program genetika. U periodu između 2008 i 2010. godine bila je zaposlena na Institutu za eksperimentalnu fonetiku i patologiju govora kao audiolingvista-logoped. Od 2010. godine zaposlena je u Ordinaciji iz psihijatrije „Dr Selaković” na mestu logopeda. 2008. godine je u okviru Kraljevske pedijatrijske klinike u Oslu bila na obuci za rad na HPLC aparatu u cilju detekcije urinarnih peptida kao faktora rizika u nastanku poremećaja iz autističnog spektra. Između 2009-2011 godine učestvovala je na projektu “Protokol prevencije i lečenja poremećaja verbalne komunikacije ponašanja i učenja dece od 0 do 3 godine”, Inovacioni projekat br 391-00-00027/2009-02/175, Ministarstvo za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Katarina Bojović je do sada objavila 2 rada časopisima međunarodnog značaja i učestvovala je na 14 skupova međunarodnog značaja.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Катарина Бојовић

број индекса Б3039/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Повезаност неуроразвојних поремећаја са варијантама гена за лактазу, хумани антиген леукоцита и рецептор витамина Д, као и са присуством опиоидних пептида у урину и цревном дисбиозом

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Катарина Бојовић

Број индекса Б3039/2017

Студијски програм Генетика

Наслов рада Повезаност неуроразвојних поремећаја са варијантама гена за лактазу, хумани антиген леукоцита и рецептор витамина Д, као и са присуством опиоидних пептида у урину и цревном дисбиозом

Ментори Проф. др Душанка Савић Павићевић, редовни професор, Универзитет у Београду - Биолошки факултет и др Ђурђица Игањтовић, виши научни сарадник Института за биолошка истраживања "Синиша Станковић"

Потписани/а _____

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Повезаност неуроразвојних поремећаја са варијантама гена за лактазу, хумани антиген леукоцита и рецептор витамина Д, као и са присуством опиоидних пептида у урину и цревном дисбиозом која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

2. Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.