



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής

**Διατροφικές συνήθειες και συμπεριφορές και εντερικός
μικροβιόκοσμος παιδιών με διαταραχές στο φάσμα του αυτισμού**

Μαργαρίτης Στράτος



Αθήνα 2018



ΧΑΡΟΚΟΠΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ

Σχολή Επιστημών Υγείας και Αγωγής

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας – Διατροφής

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γιαννακούλια Μαίρη

**Αναπληρώτρια καθηγήτρια Διατροφής και Διαιτητικής συμπεριφοράς,
τμήμα επιστήμης Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Κυριακού Αδαμαντία

**Αναπληρώτρια καθηγήτρια Βακτηριολογίας με έμφαση στις
βιοτεχνολογικές εφαρμογές, τμήμα επιστήμης Διαιτολογίας-
Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Τέντα Ρωξάνη

**Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας του Ανθρώπου, τμήμα επιστήμης
Διαιτολογίας-Διατροφής, Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο**

Ο Μαργαρίτης Στράτος

δηλώνω υπεύθυνα ότι:

- 1) Είμαι ο κάτοχος των πνευματικών δικαιωμάτων της πρωτότυπης αυτής εργασίας και από όσο γνωρίζω η εργασία μου δε συκοφαντεί πρόσωπα, ούτε προσβάλλει τα πνευματικά δικαιώματα τρίτων.
- 2) Αποδέχομαι ότι η ΒΚΠ μπορεί, χωρίς να αλλάξει το περιεχόμενο της εργασίας μου, να τη διαθέσει σε ηλεκτρονική μορφή μέσα από τη ψηφιακή Βιβλιοθήκη της, να την αντιγράψει σε οποιοδήποτε μέσο ή/και σε οποιοδήποτε μορφότυπο καθώς και να κρατά περισσότερα από ένα αντίγραφα για λόγους συντήρησης και ασφάλειας.

Αφιερωμένη στα παιδιά,
τα οποία γεννούν την ελπίδα

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα καθηγήτρια Μαίρη Γιαννακούλια, αναπληρώτρια καθηγήτρια Διατροφής και Διαιτητικής συμπεριφοράς του τμήματος της Διαιτολογίας του Χαροκόπειου πανεπιστημίου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και για την ευκαιρία που μου έδωσε να αποκτήσω τόσες καινούργιες γνώσεις και εμπειρίες, με τη συμμετοχή μου σε αυτή την έρευνα.

Ευχαριστώ επίσης θερμά την καθηγήτρια Αδαμαντίνη Κυριακού, αναπληρώτρια καθηγήτρια Βακτηριολογίας με έμφαση στις βιοτεχνολογικές εφαρμογές του τμήματος της Διαιτολογίας του Χαροκοπέιου πανεπιστημίου, και ιδιαιτέρως την Μήτσου Ευδοκία Διδάκτορα και διοικητικό προσωπικό του τμήματος, η οποία έχει την ψυχή Βιολόγου. Ελλείψει οποιασδήποτε εκ των δύο, το πειραματικό κομμάτι της ανάλυσης του μικροβιόκοσμου, θα είχε μείνει μια καλή ιδέα.

Ευχαριστώ, επίσης, τις παιδιάτρους του νοσοκομείου Παίδων Αγία Σοφία κυρία Παπανικολάου, της Παιδοψυχιατρικής κλινικής, και κυρία Περβανίδου, της κλινικής Ανάπτυξης. Τέλος, ευχαριστώ πολύ θερμά, κι οφείλω να πω ότι έμεινα κατάπληκτος με τον τρόπο που μαγεύει τα παιδιά, τον παιδίατρο κύριο Πετρόπουλο της κλινικής Ανάπτυξης του Παίδων Αγία Σοφία.

Περιεχόμενα

1	Περίληψη	1
1.1	Συντομογραφίες	3
2	Εισαγωγή	4
2.1	Διαταραχές αυτιστικού φάσματος (ΔΑΦ/ASD)	5
2.1.1	Επιπολασμός	6
2.1.2	Μη γενετικά αίτια	7
2.1.3	Γενετικά αίτια	8
2.2	ΔΑΦ και διατροφή	10
2.2.1	ΔΑΦ και μακροθρεπτικά συστατικά	10
2.2.2	ΔΑΦ και μικροθρεπτικά συστατικά	11
2.2.3	ΔΑΦ και διατροφικά πρότυπα	11
2.2.4	ΔΑΦ και παχυσαρκία	11
2.2.5	ΔΑΦ και διατροφικές συμπεριφορές	13
2.2.6	ΔΑΦ και διατροφικές προτάσεις	15
2.3	ΔΑΦ και μικροβιόκοσμος	18
2.3.1	Ο μικροβιόκοσμος του ανθρώπου	18
2.3.2	Άξονας εντέρου – εγκεφάλου	19
2.3.3	Ο μικροβιόκοσμος στη ΔΑΦ	20
2.3.4	Μικροβιόκοσμος και παθογένεια στις ΔΑΦ	22
2.3.5	Αλλαγές στον μικροβιόκοσμος στη ΔΑΦ	25
	Σκοπός	27
3	Μεθοδολογία	28
3.1	Το δείγμα της μελέτης	28
3.2	Συλλογή και επεξεργασία διατροφικών δεδομένων	28
3.3	Συλλογή και επεξεργασία μικροβιολογικών δεδομένων	29
3.3.1	Συλλογή δειγμάτων κοπράνων	29
3.3.2	Μοριακή μεθοδολογία	30
3.3.2.1	Απομόνωση ολικού DNA από κόπρανα	30
3.3.2.2	Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου - μέθοδος real-time PCR	31
3.3.2.3	Στατιστική επεξεργασία μικροβιολογικών στοιχείων	33
4	Αποτελέσματα	34
4.1	Χαρακτηριστικά του δείγματος	34
4.2	Διατροφικές συμπεριφορές και συνήθειες στα παιδιά με ΔΑΦ	34
4.3	Ο μικροβιόκοσμος στα παιδιά με ΔΑΦ	37
5	Συζήτηση	40
6	Βιβλιογραφία	45
	Παράρτημα	50

1. Περίληψη

Εισαγωγή και σκοπός: Οι ΔΑΦ είναι νευρο-αναπτυξιακές διαταραχές που επηρεάζουν έντονα τη συμπεριφορά του ατόμου, άρα και την διατροφική συμπεριφορά. Οι διατροφικές έρευνες που μελετούν το φάσμα, έχουν ποικιλία αποτελεσμάτων, κι αυτό αφήνει περιθώριο για περαιτέρω έρευνα. Ακόμα, ξέρουμε ότι υπάρχει επικοινωνία κι αλληλεπίδραση μεταξύ εντέρου και εγκεφάλου, αφήνοντας ανοιχτή την υπόθεση στο κατά πόσο το μικροβίωμα επηρεάζει πτυχές της συμπεριφοράς, σε ένα παιδί με ΔΑΦ. Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να διερευνήσει τη διατροφική πρόσληψη και τις διατροφικές συμπεριφορές στα παιδιά με αυτισμό, καθώς και να ερευνήσει αν υπάρχουν διαφορές στο επίπεδο του μικροβιόκοσμου στα παιδιά με ΔΑΦ.

Μεθοδολογία: Στη μελέτη εντάχθηκαν παιδιά δημοτικού που διαγνώστηκαν με ΔΑΦ, από το νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία, καθώς και παιδιά που είναι φυσιολογικά αναπτυσσόμενα. Μέσω ημερολογίων καταγραφής τροφίμων συλλέχθηκαν στοιχεία που αφορούσαν τη διαιτητική πρόσληψη των παιδιών και άλλες πληροφορίες στο πλαίσιο της διατροφής τους. Από κάθε παιδί συλλέχθηκε μια ολική κένωση, από την οποία έγινε απομόνωση DNA των βακτηρίων. Τέλος έγινε ποσοτικοποίηση μέσω ειδικών αλληλουχιών για κάθε ομάδα βακτηρίων που μελετήθηκε, με real-time PCR.

Αποτελέσματα: Το δείγμα αποτελείται από 46 παιδιά, εκ των οποίων τα 27 (58%) βρίσκονται στις ΔΑΦ και τα 19 (42%) είναι ΦΑ. Μετά από τη στατιστική επεξεργασία των δεδομένων μας, βρέθηκαν διαφορές μεταξύ των δυο ομάδων με τα παιδιά με ΔΑΦ να έχουν υψηλότερη πρόσληψη υδατανθράκων, μικρότερη λιπών και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, ελαφρά μικρότερη πρόσληψη ασβεστίου και ελαφρά μεγαλύτερη πρόσληψη βιταμίνης C. Όσον αφορά το μικροβιόκοσμο μεταξύ των δύο ομάδων, ερευνήθηκαν τα ολικά βακτήρια, τα *Bifidobacterium*, τα *C.perfringens*, τα *F.prausnitzii*, τα *Lactobacillus* group και τα *Prevotella* spp, αλλά δεν βρέθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά μεταξύ της ποσότητάς τους ανά γραμμάριο κοπράνων στις δύο ομάδες. Τέλος, βρέθηκε συσχέτιση μεταξύ της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης, της κατανάλωσης διαιτητικών ινών και του αριθμού των Λακτοβακίλλων ανά γραμμάριο κοπράνων.

Συζήτηση: Τα συμπεριφορικά χαρακτηριστικά του αυτισμού φαίνεται ότι δεν αφήνουν ανεπηρέαστη τη διαιτητική συμπεριφορά του παιδιού, και αυτό έχει επίδραση στην πρόσληψη μακρο- και μικρο-θρεπτικών συστατικών. Οι διαφορές που βρέθηκαν είναι σημαντικές για το μέγεθος του δείγματος, και δείχνουν μια απόκλιση, τουλάχιστον στο επίπεδο των μακροθρεπτικών συστατικών, μεταξύ των παιδιών με ΔΑΦ και των ΦΑ παιδιών. Στο επίπεδο του μικροβιώματος η έλλειψη διαφοράς στις ποσότητες των βακτηρίων μπορεί να οφείλεται στο μέγεθος του δείγματος. Τέλος, είναι απαραίτητη η μελέτη μεγαλύτερων δειγμάτων, κι η συλλογή εθελοντών από περισσότερες πόλεις, για να αποκτήσουμε καλύτερη εικόνα για τις διατροφικές συμπεριφορές και το προφίλ του μικροβιόκοσμου των ΔΑΦ στην Ελλάδα.

ΔΑΦ, νεύρο-αναπτυξιακές διαταραχές, διατροφικές συνήθειες, μικροβιόκοσμος

Abstract

Introduction and purpose: The ASD are neurodevelopmental disorders that strongly affect the person's behavior, hence eating habits. Nutritional studies that study the spectrum have a variety of results, and this leaves room for further research. Still, we know that there is communication and interaction between the bowel and the brain, leaving open the hypothesis on whether the microbe affects aspects of behavior in a child with ADI. The purpose of this study is to investigate nutritional intake and nutritional behaviors in children with autism, as well as to investigate whether there are differences in the level of microbes in children with ASD.

Methodology: In the study were included primary school children diagnosed with ASD, from the Children's Hospital of Hagia Sophia, as well as children who are naturally developing. Through record food diary we collect data on dietary intake of children and other nutrition information. From each child a total emptying was collected, from which DNA of the bacteria was isolated. Finally, quantification was performed through specific sequences for each group of bacteria studied, with real-time PCR.

Results: The sample consists of 46 children, of whom 27 (58%) are ASD and 19 (42%) are ND. After statistical processing of our data, differences were found between the two groups with children with ASDs to have higher carbohydrate intake, lower fat and monounsaturated fatty acids, slightly lower calcium intake, and slightly higher vitamin C intakes. As regards microbes between two groups, total bacteria, *Bifidobacterium*, *C. perfringens*, *F. prausnitzii*, *Lactobacillus* group and *Prevotella* spp were investigated, but no statistically significant difference was found between their amount per gram of stool in the two groups. Finally, a correlation was found between the total energy intake, the consumption of dietary fiber and the number of lactobacilli per gram of stool.

Discussion: The behavioral characteristics of autism seem to leave the child's dietary behavior unaffected, and this has an effect on the intake of macro- and micro-nutrients. The differences found are significant for the size of the sample, and show a deviation, at least at the level of macronutrients, between children with DOS and children with FA. At the level of the microbe, the lack of difference in the amounts of the bacteria may be due to the size of the sample. Finally, it is necessary to study larger samples and to collect volunteers from several cities to get a better picture of the dietary behaviors and the profile of the ASD microbes in Greece.

ASD, neurodevelopmental disorders, dietary habits, microbiota

1.1 Συντομογραφίες

ΔΑΦ = διαταραχή αυτιστικού φάσματος

ASD = autistic spectrum disorders

ND = normally developed

WHO = world health organization

ΔΕΠ-Υ = διαταραχή ελλειμματικής προσοχής και υπερκινητικότητας

DSM = diagnostic and statistical manual

ICD = international statistical classification of diseases and related health problems

BAP = broader autistic phenotype

ΚΝΣ = κεντρικό νευρικό σύστημα

ΑΝΣ = αυτόνομο νευρικό σύστημα

ΕΝΣ = εντερικό νευρικό σύστημα

HPA = hypothalamic pituitary adrenal axis

SCFAs = short chain fatty acids

MUFAs = mono-unsaturated fatty acids

PUFAs = poly-unsaturated fatty acids

SFAs = saturated fatty acids

2.Εισαγωγή

Πρόλογος

Τα παιδιά είναι ίσως απ τις πληθυσμιακές ομάδες οι οποίες, αν θα μπορούσαμε να το πούμε αυτό, χρειάζονται περισσότερη προσοχή από κάθε άλλη της ανθρωπότητας. Ο λόγος που τολμάμε να το πούμε αυτό είναι ότι η μοίρα του κόσμου εξαρτάται από αυτά, και κάθε νέο παιδί, μεταφέρει με το που γεννιέται την ελπίδα αυτού του κόσμου για να αλλάξει ο κόσμος και να γίνεται ανά γενιά και λίγο καλύτερος. Τα παιδιά είναι πλαστελίνες, που δυστυχώς, απ όσο έχουμε δει μέχρι σήμερα, έχουν αναλάβει οι προηγούμενες γενιές να τις πλάσουν και να τις δώσουν μορφή. Το βάρος πέφτει δυσμενέστερα, σε παιδιά που για βιολογικούς λόγους, που δεν μπορούμε ακόμα να επηρεάσουμε, έχουν κάποιες ανάγκες παραπάνω απ τα διπλανά τους. Έχουν δυσκολίες και ιδιαιτερότητες, που απαιτούν χρόνο, χρήμα, υπομονή και παιδεία απ την κοινωνία για να τις αντιμετωπίσουν, να τις υπερβούν και να συμβάλλουν κι αυτά με τη σειρά τους στη γένεση της ελπίδας. Εδώ ερχόμαστε εμείς, και όλοι οι άλλοι ερευνητές που έχουν στο μυαλό τους τις παραπάνω ανάγκες που έχουν αυτά τα παιδιά για να μπορέσουν να εκτελέσουν και αυτά το χρέος τους, για έναν καλύτερο κόσμο στα επόμενα παιδιά που έπονται. Η μέχρι τώρα ιστορία μας, δείχνει την ανέξοδη λογική του Καιάδα. Δείχνει ότι ενώ ο κόσμος έβλεπε προβλήματα και απέβαλε τα παιδιά λόγω των θεωρητικών αυτών προβλημάτων, στην ουσία παρέβλεπε τρομακτικά χαρίσματα. Πίσω από την ταμπέλα του προβληματικού, υπήρχε ένα παιδί με ιδιαίτερες ανάγκες, αλλά και δυνατότητες που δεν μπορούσαμε να φανταστούμε ότι μπορεί να έχει ένας άνθρωπος, όπως τεράστια μνήμη και ασύγκριτο καλλιτεχνικό χάρισμα.

Έχοντας λοιπόν στο μυαλό μας τις δυνατότητες τέτοιων παιδιών, και τον ανθρωπισμό τόσων αιώνων ανθρώπινου πολιτισμού, ας αρχίσουμε να ξετυλίγουμε το κουβάρι της δικής μας προσπάθειας να συμβάλλουμε σε αυτό το πεδίο.

2.1 Διαταραχές αυτιστικού φάσματος (ΔΑΦ/ASD)

Ο όρος αυτισμός αναφέρεται για πρώτη φορά το 1943 από τον Leo Kanner και προέρχεται από την ελληνική λέξη “εαυτός”, η οποία ερμηνεύεται ως η εσωστρέφεια του παιδιού στον εαυτό του και η αδυναμία επικοινωνίας στο περιβάλλον. Συγκεκριμένα ο Kanner έγραψε: “ από το 1938, είχε περιέλθει στην αντίληψή μας ένας αριθμός παιδιών των οποίων η κατάσταση διαφέρει τόσο έντονα και ριζικά από οτιδήποτε γνωστό μέχρι τώρα, που η κάθε περίπτωση απαιτεί – και όπως τελικά ελπίζω αν της αποδοθεί – με λεπτομερή εξέταση των συναρπαστικών ιδιαιτεροτήτων της”. (1)

Οι ΔΑΦ είναι νευρο-αναπτυξιακές διαταραχές που επηρεάζουν όλα τα στάδια της ζωής και χαρακτηρίζονται από εμπόδια σε τρεις λειτουργικούς τομείς: την κοινωνική συμπεριφορά, τις ικανότητες επικοινωνίας και συμπεριφορές περιορισμού οι οποίες δημιουργούν επалаμβανόμενα και στερεοτυπικά μοτίβα συμπεριφοράς. (2)

Συλλέγοντας στοιχεία απ το site της ΜΚΟ “αυτισμός – ασπεργκερ Ελλάς” βλέπουμε ότι: ο αυτισμός διαγιγνώσκεται συγκρίνοντας τις συμπεριφορές του ατόμου με τα συμπτώματα που περιγράφονται σε καταλόγους επίσημων διαγνωστικών κριτηρίων. Τα διαγνωστικά κριτήρια ορίζουν και εξηγούν ποια συμπτώματα θα πρέπει να υπάρχουν για να δοθεί κάποια συγκεκριμένη διάγνωση. Αυτή τη στιγμή για το Φάσμα του Αυτισμού χρησιμοποιούνται 2 διαγνωστικά συστήματα: το DSM (Diagnostic and Statistical Manual) της Αμερικανικής Ψυχιατρικής Ένωσης (APA) και το ICD (International Classification of Diseases) του Διεθνούς Οργανισμού Υγείας (WHO). Το πρώτο, χρησιμοποιείται κυρίως στις ΗΠΑ , ενώ το δεύτερο είναι διαδεδομένο στην Ευρώπη. Και τα δύο συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλάξ. Η τρέχουσα έκδοση για το ICD είναι η 10η (ICD-10). Μέχρι πρόσφατα η τρέχουσα έκδοση του DSM ήταν η 4η (DSM-IV). Παρόλο που οι δύο λίστες διαγνωστικών κριτηρίων είχαν κάποιες διαφορές η συνολική διαγνωστική προσέγγιση τους ήταν παρόμοια. Και τα 2 διαγνωστικά συστήματα ορίζουν την ίδια τριάδα διαγνωστικών συμπτωμάτων για τα άτομα που βρίσκονται στο Φάσμα του Αυτισμού:

- Δυσκολίες στην κοινωνική αλληλεπίδραση
- Δυσκολίες στην επικοινωνία
- Στερεοτυπικές, επαναλαμβανόμενες συμπεριφορές, δραστηριότητες και ενδιαφέροντα.

Το Μάιο του 2013 δημοσιεύτηκε η αναθεωρημένη έκδοση 5 του DSM (DSM-V) η οποία περιλαμβάνει σημαντικές αλλαγές στα διαγνωστικά κριτήρια. Οι αλλαγές αυτές είναι οι εξής:

- Ο γενικός όρος «Διάχυτες Αναπτυξιακές Διαταραχές» (ΔΑΔ) αντικαταστάθηκε από τον όρο «Διαταραχή Αυτιστικού Φάσματος» (ΔΑΦ)
- Οι ΔΑΦ θεωρείται τώρα ως μία διαγνωστική κατηγορία με μία ομάδα συμπτωμάτων
- Οι διαγνωστικές υποκατηγορίες (Αυτισμός, Σύνδρομο Άσπεργκερ και ΔΑΔ-μη άλλως προσδιοριζόμενη) απαλείφθηκαν
- Η βαρύτητα εκδήλωσης των συμπτωμάτων χωρίζεται σε τρεις υποκατηγορίες (μετρούμενες με σχετικούς δείκτες):
 1. Επίπεδο 3 – «Ανάγκη ιδιαίτερης ενισχυμένης υποστήριξης» (σοβαρές δυσκολίες στην κοινωνικοποίηση και την ευελιξία)
 2. Επίπεδο 2 – «Ανάγκη ενισχυμένης υποστήριξης» (αξιοσημείωτες δυσκολίες)
 3. Επίπεδο 1 – «Ανάγκη υποστήριξης» (δυσκολίες στα παραπάνω).
- Όσον αφορά στη τριάδα συμπτωμάτων, οι δυσκολίες στην κοινωνική επαφή και στην επικοινωνία ενοποιήθηκαν σε μία ομάδα που τώρα ονομάζεται προβλήματα στην κοινωνική επικοινωνία. Έτσι η τριάδα των συμπτωμάτων που αναφέραμε παραπάνω έχει αντικατασταθεί από 2 ομάδες: κοινωνική επικοινωνία και στερεοτυπικές, επαναλαμβανόμενες συμπεριφορές, δραστηριότητες και ενδιαφέροντα. (3)

2.1.1 Επιπολασμός

Σύμφωνα με τα στοιχεία του WHO με τελευταία αναθεώρηση το 2017, υπολογίζεται ότι παγκοσμίως 1 στα 160 παιδιά έχουν ΔΑΦ. Αυτή η εκτίμηση αντιπροσωπεύει μια μέση εικόνα, καθώς ο αναφερόμενος επιπολασμός ποικίλει σημαντικά από μελέτη σε μελέτη. Κάποιες καλά ελεγμένες μελέτες έχουν παρολαυτά αναφέρει επίπεδα που είναι σημαντικά μεγαλύτερα. Επίσης, ο επιπολασμός του ΔΑΦ σε πολλές χώρες χαμηλού και μεσαίου οικονομικού επιπέδου, δεν είναι γνωστός. Σύμφωνα ακόμα με επιδημιολογικές μελέτες που έχουν διεξαχθεί τα τελευταία 50 χρόνια, παρατηρείται ότι ο επιπολασμός

του ΔΑΦ φαίνεται να αυξάνεται σε παγκόσμιο επίπεδο. Υπάρχουν πολλές πιθανές αιτίες για αυτή τη διαφαινόμενη αύξηση, συμπεριλαμβανομένου της αυξανουσας ευαισθησίας προς τον αυτισμό, της αύξησης των διαγνωστικών κριτηρίων, των καλύτερων διαγνωστικών εργαλείων και της βελτίωσης στο επίπεδο της έρευνας σε αυτό τον τομέα. (4)

Στην Ελλάδα τώρα, σύμφωνα με το site του autismegreece η συχνότητα είναι ίση με 1 στα 166 άτομα, ενώ περίπου το 70% των ατόμων με αυτισμό παρουσιάζει ταυτόχρονα διαφορετικής σοβαρότητας νοητική υστέρηση, το 20% νοητικές λειτουργίες σε φυσιολογικό επίπεδο και το υπόλοιπο 10% υψηλό επίπεδο νοητικών δεξιοτήτων. (5)

2.1.2 Μη γενετικά αίτια

Ο φαινότυπος του αυτισμού έχει από πίσω του μια πληθώρα αιτιών, γενετικών και περιβαλλοντικών, η κάθε μια απ τις οποίες συνεισφέρει με το δικό της πολύπλοκο τρόπο στο αποτέλεσμα. Όσον αφορά τα μη γενετικά αίτια, έχει υπάρξει αρκετή βιβλιογραφία, που ερευνώντας βρήκε σχέσεις και συσχετίσεις μερικές απ' τις οποίες παραθέτουμε παρακάτω:

Εκκινώντας από την ηλικία των γονιών, έχει βρεθεί ότι κάθε 10 χρόνια που αυξάνεται η ηλικία της μητέρας και του πατέρα, αυξάνεται η πιθανότητα στο νεογέννητο να έχει ΔΑΦ κατά 18-21%. (6)

Στοιχεία από μετα-αναλύσεις, επίσης, έδειξαν ότι υπάρχει σύνδεση μεταξύ των περιγεννητικών επιπλοκών και του να γεννηθεί παιδί με ΔΑΦ. Πιο συγκεκριμένα έχουν αναγνωριστεί αρκετοί παράγοντες κινδύνου αλλά με μικρή επίδραση, όπως η μη φυσιολογική γέννα, η γέννα που το παιδί βγαίνει με τα πόδια, οι επιπλοκές της νωτιαίας χορδής, η εμβρυϊκή δυσφορία, οι πολλαπλές κυήσεις, το χαμηλό βάρος γέννησης, το μικρό μέγεθος σώματος για το χρόνο κύησης, οι εκ γενετής δυσμορφίες, η υπερχολερυθριναιμία και το πρώτο σε σχέση με το επόμενο παιδί. (7-10)

Άλλες σχέσεις που αφορούσαν τις περιγεννητικές συνθήκες και τις ΔΑΦ, ήταν η καισαρική τομή, το διάστημα μεταξύ των γεννήσεων (<12 μήνες και >60μήνες), η παχυσαρκία της μητέρας, η βακτηριακή και η ιική λοίμωξη της μητέρας ιδιαίτερα του κόλπου. Επίσης, η ύπαρξη οικογενειακού ιστορικού για αυτοάνοση θυρεοειδοπάθεια, διαβήτη, ψωρίαση και ρευματοειδή αρθρίτιδα σχετίστηκε με την εμφάνιση ΔΑΦ στο παιδί κατά 49-64%. (11-14)

Όσον αφορά τη φαρμακευτική αγωγή της μητέρας και τη σχέση της με την εμφάνιση ΔΑΦ, ισχυρές ενδείξεις έχουν βρεθεί για το βαλπροϊκό οξύ, που χρησιμοποιείται σε επιληπτικά φάρμακα, και την εμφάνιση τόσο ΔΑΦ όσο και άλλων νευρο-αναπτυξιακών εκβάσεων με τη σχέση να φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη. (15)

Τέλος, δεν βρέθηκε σχέση ανάμεσα στο κάπνισμα της μητέρας και την εμφάνιση ΔΑΦ. (16)

2.1.3 Γενετικά αίτια

Τη σειρά τους παίρνουν τώρα τα αίτια που έχουν σύνδεση με το γενετικό υλικό, και επηρεάζονται σε μεγαλύτερο βαθμό απ την κληρονομησιμότητα του χαρακτηριστικού.

Η πιθανή γενετική συνεισφορά στις ΔΑΦ εξηγεί περισσότερο από 83% της ποικιλίας των ΔΑΦ στον πληθυσμό με τους πιθανούς γενετικούς μηχανισμούς να περιλαμβάνουν χρωμοσωμικές ανωμαλίες, σπάνια κληρονομούμενα γονίδια, παραλλαγές ενός αριθμού γονιδίων και σπάνια διεισδυτικά γονίδια. (17)

Η ανακάλυψη σπάνιων κληρονομούμενων ή de novo αλληλομόρφων είναι σημαντική στη γενετική των ΔΑΦ. Κάποιες μεντελικές γενετικές διαταραχές σχετίζονται ισχυρά με τα ΔΑΦ. Ανάμεσα τους είναι το σύνδρομο Rett, μεταξύ των οποίων το 40% διαγιγνώσκονται με ΔΑΦ, και το σύνδρομο του ευαίσθητου X χρωμοσώματος το οποίο σχετίζεται 25% με τα ΔΑΦ. Πολλές άλλες μονογονιδιακές διαταραχές σχετίζονται επίσης με τα ΔΑΦ, συμπεριλαμβανομένου της νευροινωμάτωσης, της σπονδυλικής σκλήρυνσης και του συνδρόμου Williams – Beuren. Παρόλο που αυτές οι ασθένειες είναι σπάνιες, αθροιστικά ευθύνονται για το 10% των ΔΑΦ. (18)

Με τη μέθοδο των μικροσυστοιχιών (microarrays), ανάμεσα σε άτομα με ΔΑΦ, έχουν περιγραφεί διπλασιασμοί ή ελλείψεις τμημάτων στο γονιδίωμα. Αυτές ποικίλουν στο μέγεθος από κυττογενετικά ορατές αλλαγές μέχρι περιοχές λίγων αλληλομόρφων (συνήθως περισσότερο από 1kb) ή μικρότερες περιοχές κοντά στα 1kb.

Έρευνες μικροσυστοιχιών συγκλίνουν σε μεγάλο βαθμό σε ενδείξεις για περισσότερες de novo μεταλλάξεις (ελλείψεις και διπλασιασμούς) σε οικογένειες με ΔΑΦ συγκριτικά με τις ομάδες ελέγχου, με 3 με 5 φορές υψηλότερες περιπτώσεις. (19-20)

Μέχρι πρόσφατα, η έρευνα για κοινά αλληλόμορφα, χρησιμοποιώντας της μελέτες συσχέτισης ολόκληρου του γονιδιώματος (GWAS), ήταν γενικώς αποτυχημένη. Πολλές

έρευνες βρήκαν δείκτες που όμως δεν έφταναν στο επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας. Παρόμοια, μια άλλη πρόσφατη έρευνα GWAS με ένα δείγμα 7387 περιπτώσεων ΔΑΦ απέτυχε να βρει αλληλόμορφα σε άτομα που να φτάνουν το κατώφλι. (21-23)

Όμως, μια μετα-ανάλυση με ένα ανεξάρτητο δείγμα (7783 περιπτώσεις ΔΑΦ) εντόπισε έναν στατιστικά σημαντικό δείκτη στο 10q24,32 (πολυμορφισμός re1409.13, odds ratio=1.12, $p=1.058e-08$). Παρόλο που αυτός ο δείκτης είναι εσωνίου, βρίσκεται σε σύνδεση ανισορροπίας με έναν αριθμό άλλων δεικτών που καλύπτουν μια πλούσια σε γονίδια περιοχή. (24)

Η πιο πρόσφατη μελέτη GWAS με 18381 περιπτώσεις αυτισμού και 27969 ελέγχου, εντόπισε πέντε στατιστικά σημαντικούς δείκτες GWAS, με επιπλέον επτά γενετικούς τόπους που έχουν να κάνουν με άλλα χαρακτηριστικά που επίσης έφτασαν παρόμοιο επίπεδο σημαντικότητας. (25)

Σε γενικούς όρους, παρόλο που αρκετά γονίδια έχουν ταυτοποιηθεί ως γονίδια ΔΑΦ, συμπεριλαμβανομένου του NRXN1, SHANK1, SHANK3, και PTCHD1, η διεισδυτικότητα των συγκεκριμένων μεταλλαγών δεν έχει περιγραφεί αρκετά καλά. Για παράδειγμα ελλείψεις στο NRXN1 είναι σχετικά κοινές σε κλινικά διαγνωσμένους ασθενείς με ΔΑΦ (0.45%) και νοητική στέρηση (0.12%), όπως και σε άλλες νευρο-αναπτυξιακές διαταραχές. Αντίθετα, η συχνότητα σε πληθυσμιακές μελέτες είναι πολύ μικρότερη (0.02%). Συνεπώς, μια εκτίμηση της διεισδυτικότητας των μεταλλαγών του NRXN1 για όλους τους φαινοτύπους νευρο-αναπτυξιακών διαταραχών είναι της τάξεως του 33%. (26)

Όσον αφορά μια άλλη γενετική θέση, ο γονότυπος CT και το αλληλόμορφο C του πολυμορφισμού rs731276 του VDR γονιδίου, που αφορά τον υποδοχέα της βιταμίνης D), βρέθηκαν να σχετίζονται σημαντικά με τον κίνδυνο για ΔΑΦ στην παιδική ηλικία, ενώ δε βρέθηκε σχέση με τη σοβαρότητα του αυτισμού. (27)

Πολλές φορές, ακόμα, ζητείται να υπολογιστεί η πιθανότητα εμφάνισης ΔΑΦ σε οικογένειες που έχουν ήδη παιδί διαγνωσμένο με ΔΑΦ. Ανάμεσα στα παιδιά που θεωρούνται ότι έχουν μεγαλύτερο κίνδυνο να εμφανίσουν ΔΑΦ, είναι τα παιδιά με ένα μεγαλύτερο αδερφό με ΔΑΦ κατά 18.7%, και τα παιδιά με δυο μεγαλύτερα αδέρφια διαγνωσμένα με ΔΑΦ κατά 33.2%. (28)

Έρευνες έχουν γίνει ακόμα και για τον ευρύτερο αυτιστικό φαινότυπο των γονιών. (29)

Σε οικογένειες παιδιών με ΔΑΦ η παρουσία υποκλινικών χαρακτηριστικών ΔΑΦ αναφέρεται ως ευρύτερος αυτιστικός φαινότυπος (BAP: broader autistic phenotype). (30)

Κοινά χαρακτηριστικά των BAP είναι οι πρακτικές δυσκολίες, οι ευρύτερα προσδιορισμένες επικοινωνιακές δυσκολίες, οι φτωχές κοινωνικές ικανότητες, η γνωσιακή δυσκαμψία, το άγχος, η επιφυλακτικότητα. (31)

Η ύπαρξη ενός γονιού με BAP χαρακτηριστικά, σχετίστηκε με αυξημένη πιθανότητα το παιδί να έχει δυσκολίες στις μη λεκτικές ικανότητες, προβλήματα όσον αφορά την καθυστέρηση της γλώσσας και της κίνησης και μια αυξημένη πιθανότητα να εμφανίσουν καταστάσεις όπως άγχος, κατάθλιψη, επιθετικότητα και προβλήματα προσοχής. (29)

2.2 ΔΑΦ και διατροφή

2.2.1 ΔΑΦ και μακροθρεπτικά συστατικά

Υπάρχει μια σχέση μεταξύ των συμπεριφορών και της διατροφικής πρόσληψης με τα επίπεδα των μακροθρεπτικών συστατικών στον οργανισμό των παιδιών με ΔΑΦ. Δίαιτες περιορισμού και ανεπαρκής πρόσληψη θρεπτικών συστατικών έχουν αναφερθεί σε παιδιά με ΔΑΦ. (32)

Αλλού βλέπουμε ότι χαμηλότερη μέση πρόσληψη ενέργειας παρατηρήθηκε στα παιδιά με αυτισμό (87,44% vs 119,89%), μέση πρόσληψη πρωτεΐνης (87,39% vs 115,67%), υδατανθράκων (84,09% vs 101,24%) και λιπών (87,60% vs 152,18%) σε σύγκριση με αυτά χωρίς αυτισμό. Συνολικά, μια σημαντικά μικρότερη πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών παρατηρήθηκε στα παιδιά με αυτισμό. Όλες αυτές οι συγκρίσεις βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές. (33)

2.2.2 ΔΑΦ και μικροθρεπτικά συστατικά

Όσον αφορά την ημερήσια πρόσληψη ενός σημαντικού μικροθρεπτικού συστατικού, της βιταμίνης Α υπολογίστηκε και στα παιδιά με αυτισμό βρέθηκε στο 53% της επαρκούς πρόσληψης σε αντίθεση με το 57% στα παιδιά χωρίς αυτισμό. (34)

Αποτελέσματα από μια έρευνα με 40 παιδιά νηπιαγωγείου έδειξαν ότι η πλειοψηφία των παιδιών κατανάλωνε μια δίαιτα με επαρκή θρεπτικά, ανεξαρτήτου αν το παιδί ήταν σε ΔΑΦ ή ήταν φυσιολογικά αναπτυσσόμενο. Παρόλο που το δείγμα της μελέτης ήταν μικρό, είναι μια ένδειξη για τους επαγγελματίες υγείας, ότι το παιδί νηπιαγωγείου που έχει ΔΑΦ είναι περισσότερο πιθανό, να μην αποκλίνει απ τα υπόλοιπα όσον αφορά τα θρεπτικά συστατικά. (35)

Τα παιδιά με ΔΑΦ βρέθηκε να έχουν μικρότερη από τη συνιστώμενη πρόσληψη σε βιταμίνη Α, D και Κ όπως και σε ασβέστιο, χολίνη, φυτικές ίνες, μαγνήσιο, φώσφορο και κάλιο από πηγές τροφίμων. Αυτό δεν σημαίνει ότι βρέθηκαν μεγάλες διαφορές από την πρόσληψη θρεπτικών συγκριτικά με τα φυσιολογικά αναπτυσσόμενα παιδιά. Συγκεκριμένα βρέθηκαν διαφορές μόνο για τις ηλικίες 4-8 χρονών, κυρίως στην πρόσληψη βιταμίνης Α, βιταμίνης C και ψευδαργύρου. (36)

2.2.3 ΔΑΦ και διατροφικά πρότυπα

Τα παιδιά με ΔΑΦ έχουν υψηλότερα επίπεδα κατανάλωσης ενεργειακά πυκνών τροφίμων από τα φυσιολογικά αναπτυσσόμενα. Αυτό οφείλεται στην μεγαλύτερη ημερήσια κατανάλωση σε μερίδες χυμών και σε μερίδες αναψυκτικών με ζάχαρη (2.6 vs 1.7), σε μερίδες ενεργειακά πυκνών σνακ (4 vs 3) και σε χαμηλότερη ημερήσια κατανάλωση λαχανικών (1.3 vs 2.1). Παρολαυτά δεν υπήρξε συσχέτιση με το BMI στις δυο ομάδες των παιδιών. (37)

2.2.4 ΔΑΦ και ανάπτυξη παχυσαρκίας

Από έρευνες που εμβαθύνουν στο βάρος του παιδιού (38) και κατ' επέκταση στην ανάπτυξη παχυσαρκίας βλέπουμε ότι πολλοί απ τους παράγοντες κινδύνου ανάπτυξης της παχυσαρκίας είναι ίδιοι στα παιδιά με ΔΑΦ συγκριτικά με τα φυσιολογικά αναπτυσσόμενα, ιδιαίτερα όσον αφορά το περιβάλλον του παιδιού, που προκαλεί ανάπτυξη παχυσαρκίας. Όμως, οι μοναδικές ανάγκες και οι προκλήσεις που έχουν τα παιδιά με ΔΑΦ, τα οδηγούν να είναι πιο επιρρεπή στους παράγοντες αυτούς ή ακόμα και να είναι ανοιχτά σε άλλους παράγοντες κινδύνου συγκριτικά με το γενικό πληθυσμό. Η ψυχο-φαρμακευτική αγωγή, η γενετική, οι διαταραχές ύπνου, τα μη τυπικά πρότυπα

διατροφής και οι προκλήσεις που αφορούν την επαρκή φυσική δραστηριότητα μπορούν να σχετίζονται ανεξάρτητα με την ανάπτυξη παχυσαρκίας στα παιδιά με ΔΑΦ.

Τα ευρήματα μέχρι τώρα δείχνουν ότι τα παιδιά με ΔΑΦ βρίσκονται στο ίδιο ή και πιο αυξημένο επίπεδο κινδύνου για ανάπτυξη παχυσαρκίας με τα παιδιά γενικότερα. (38)

Όσον αφορά τη γενετική, οι διπλασιασμοί και οι ελλείψεις του 16p11.2 είναι απ τους πιο κοινούς που σχετίζονται με τις ΔΑΦ, και οι ελλείψεις σε αυτή την περιοχή πρόσφατα βρέθηκε ότι παίζουν ένα ρόλο στην πρώιμη εμφάνιση παιδικής παχυσαρκίας. (39)

Άλλες γενετικές θέσεις έχουν επίσης κατηγορηθεί, όπως η 11p14.1 που εμπλέκεται και στην παχυσαρκία και στις ΔΑΦ (40), και οι διπλασιασμοί στη θέση 15q11.2. (41)

Όσον αφορά τη ψυχο-φαρμακευτική αγωγή, έχει υπολογιστεί ότι 30-60% των παιδιών με ΔΑΦ παίρνουν τουλάχιστον ένα ψυχοτροπικό φάρμακο, και 10% περισσότερα από τρία φάρμακα. Τα διεγερτικά, αντικαταθλιπτικά και αντιψυχωτικά είναι ανάμεσα στα πιο συχνά συνταγογραφούμενα φάρμακα. (38)

Μέσα από αλληλεπιδράσεις με πολλαπλούς νευρωνικούς υποδοχείς, τόσο τα τυπικά όσο και τα μη τυπικά αντιψυχωτικά φάρμακα έχουν τη ροπή να επηρεάζουν σημαντικά το βάρος και το μεταβολισμό του ασθενούς. (42)

Όσον αφορά τα προβλήματα ύπνου, υπάρχουν επιδημιολογικές αποδείξεις ότι υπάρχει σχέση μεταξύ της μικρής διάρκειας ύπνου και του βάρους σώματος. (43)

Τα προβλήματα ύπνου είναι συχνά στα παιδιά με ΔΑΦ και είναι παρόντας σε παρόμοια συχνότητα σε αυτά με ή χωρίς συνύπαρξη νοητικής στέρησης. (44)

Παιδιά με ΔΑΦ, ηλικίας 5-16, μελετήθηκαν με πολυσομνογραφία βρέθηκε να έχουν λιγότερο χρονικά ύπνο κατά μέσο όρο 43 λεπτά συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά αναπτυσσόμενα, κατά αντιστοιχία στην ηλικία και το φύλο. (45)

Σε μια έρευνα όπου τα διατροφικά προβλήματα ορίστηκαν ως αναφερόμενη από γονείς απώλεια βάρους ή διακοπή πρόσληψης βάρους συνδυασμένη με φόβο για απόκτηση βάρους στο παιδί.

Τα αποτελέσματα ήταν ως εξής:

1. Το ποσοστό τους ήταν χαμηλό, κάτω από 1%, σε παιδιά ανάμεσα σε 9 και 12 χρονών.
2. Το ποσοστό τους ήταν σημαντικά υψηλότερο σε παιδιά που διαγνώστηκαν θετικά για ΔΕΠ-Υ ή/και ΔΑΦ, με το υψηλότερο ποσοστό, σχεδόν 10%, βρέθηκε σε κορίτσια που διαγνώστηκαν και με ΔΕΠ-Υ και με ΔΑΦ.
3. Τα προβλήματα στις κοινωνικές συναναστροφές σχετίστηκαν ισχυρά με τα διατροφικά προβλήματα στα κορίτσια, και τα προβλήματα παρορμητικότητας και στη δραστηριότητα σχετίστηκαν ισχυρά με διατροφικά προβλήματα στα αγόρια.
4. Στην παιδική ηλικία, τα προβλήματα διατροφής φαίνεται να αιτιολογούνται σε ίσιο βαθμό από γενετικούς και περιβαλλοντικούς παράγοντες. (46)

2.2.5 ΔΑΦ και διατροφικές συμπεριφορές

Επιλεκτικότητα στο φαγητό

Τα παιδιά με ΔΑΦ βιώνουν σημαντικά περισσότερα προβλήματα σίτισης από τα παιδιά χωρίς αναπτυξιακές δυσκολίες (47), και η επιλεκτικότητα στα φαγητά είναι ιδιαιτέρως προβληματική. Η επιλεκτικότητα ανάμεσα σε παιδιά με ΔΑΦ είναι ένα σύνθετο και σημαντικό θέμα καθώς έχει σχετιστεί με μη επαρκή διαιτητική πρόσληψη. (48)

Συγκρινόμενα με τα φυσιολογικά αναπτυσσόμενα, τα παιδιά με ΔΑΦ παρουσιάζουν έναν αριθμό διατροφικών παραγόντων κινδύνου που αφορούν μη επαρκή πρόσληψη θρεπτικών συστατικών, η οποία σχετίζεται με την επιλεκτική διατροφή, συμπεριλαμβανομένης της έλλειψης διατροφικής ποικιλίας (49), με την προτίμηση για ενεργειακά πυκνά ή φτωχά φαγητά (50), την κατανάλωση λιγότερων φρούτων και λαχανικών, και την υψηλότερη κατανάλωση αναψυκτικών που είναι πλούσια σε ζάχαρη. (51)

Η ακριβής αιτιολογία της επιλεκτικότητας στα φαγητά είναι πολύπλοκη και δύσκολο να εξακριβωθεί. Σε περιγραφικές μελέτες, γονείς με παιδιά με ΔΑΦ έχουν αναφέρει χαρακτηριστικά όπως η υφή, η εμφάνιση, η μάρκα, το πακέτο, η θερμοκρασία, η παρουσίαση του τροφίμου, το χρώμα και η γεύση και οσμή ως χαρακτηριστικά που επηρεάζουν τις επιλογές των παιδιών τους. (52-55)

Στον πίνακα 1 γίνεται σύγκριση της άρνησης σε φαγητά με βάση τα χαρακτηριστικά των τροφίμων ανάμεσα σε παιδιά με ΔΑΦ και χωρίς (56):

Πίνακας 1: Αναφερόμενη άρνηση του τροφίμου βασισμένη στα χαρακτηριστικά του μεταξύ παιδιών με ΔΑΦ και ΦΑ παιδιών				
Χαρακτηριστικά του τροφίμου	Παιδιά με ΔΑΦ	Παιδιά χωρίς ΔΑΦ	P-value	
Σύσταση/υφή	41 (77%)	21 (36%)	<0,0001	
Αναμεμιγμένα φαγητά	24 (45%)	15 (26%)	0,03	
Θερμοκρασία	16 (30%)	15 (26%)	0,47	
Τα φαγητά να ακουμπάνε άλλα φαγητά	11 (21%)	10 (17%)	0,64	
Χρώμα	8 (15%)	7 (12%)	0,64	
Μάρκα	8 (15%)	1 (2%)	0,01	
Σχήμα	6 (11%)	1 (2%)	0,05	
3 ή παραπάνω απ τα από πάνω	19 (36%)	9 (16%)	0,01	
Κανένα απ τα παραπάνω	5 (9%)	23 (40%)	0,0003	

Επίσης το 49% των παιδιών με ΔΑΦ ανέφεραν την αποφυγή τροφίμων λόγω οσμής ή γεύσης σε αντίθεση με το 5% απ αυτά που δεν είχανε.

Η άρνηση στα τρόφιμα που βασίζεται στα χαρακτηριστικά τους μπορεί να σχετίζεται σε εμπόδια στη αισθητηριακή διαδικασία, τη γεύση ή την αφή, ή συμπεριφορική ακαμψία

(behavioral rigidity). Οι δυσκολίες στην αισθητηριακή διαδικασία υπολογίζεται ότι επηρεάζουν ένα 40-88% των παιδιών με αναπηρία και έχουν βρεθεί σε ποσοστό μέχρι και 95% σε μικρά δείγματα με παιδιά με ΔΑΦ. Το να τρώς απαιτεί την ικανότητα της ταυτόχρονης επεξεργασίας πληροφοριών από ένα εύρος από αισθητήρια, συμπεριλαμβανομένης της όρασης, της αφής και της γεύσης. Έτσι είναι πιθανό τα παιδιά που έχουν δυσκολίες στη διαδικασία αυτή να παρουσιάζουν και περισσότερη άρνηση σε φαγητά λόγω των χαρακτηριστικών τους. (56)

2.2.6 ΔΑΦ και διατροφικές προτάσεις

Είναι πολύ σημαντικό να κάνουμε διαιτολογική παρέμβαση όταν διαχειριζόμαστε τον αυτισμό (57). Μια ορθή διαιτολογική παρέμβαση επιτρέπει μια γρήγορη ανακούφιση κάποιων συμπτωμάτων της ασθένειας και πρέπει να ναι συμπληρωματική της φαρμακοθεραπείας και της συμπεριφορικής θεραπείας. Η μείωση της κατανάλωσης συγκεκριμένων προϊόντων φαγητού και πιάτων έχει σχετιστεί με μειωμένα περιστατικά γαστρεντερικών διαταραχών σε ασθενείς όπως: οι ιδιοπαθείς φλεγμονώδεις νόσοι του εντέρου, η τροφική δυσανεξία και οι αλλεργίες, οι μολύνσεις μαζί με βιολογικές και ιικές μολύνσεις.

Από τις δίαιτες που έχουν προταθεί, οι πιο συχνά αναφερόμενες είναι οι παρακάτω:

Δίαιτες αποκλεισμού

Βασίζονται στη μείωση ή στην ολοκληρωτική απομάκρυνση συγκεκριμένων φαγητών απ τη δίαιτα που επηρεάζουν δυσμενώς ασθενείς με ΔΑΦ. Πιο συχνά, είναι αυτά που προκαλούν τροφικές δυσανεξίες και αλλεργίες. Αυτός ο αποκλεισμός αφορά και όλα τα συστατικά που βρίσκονται στα τρόφιμα και έχουν βρεθεί να είναι αλλεργιογόνα.

Κετογονική δίαιτα

Αυτή είναι μια υψηλή σε λίπος και χαμηλή σε πρωτεΐνη και υδατάνθρακες δίαιτα, με το 90% περίπου της ενέργειας να προέρχεται από λίπη. Κατά της διάρκεια της δίαιτας, το σώμα βρίσκεται σε κατάσταση κέτωσης καθώς η οι κετόνες, που σχηματίζονται απ τα λιπαρά οξέα, αντικαθιστούν τη γλυκόζη ως κύρια πηγή ενέργειας στο αίμα. (57)

Μια μελέτη από το 2003 προτείνει ότι η κετογονική δίαιτα μπορεί να ανακουφίσει από κάποια συμπτώματα του ΔΑΦ, όταν η επίδρασή της μελετήθηκε μετά από 6 μήνες σε

30 παιδιά με ΔΑΦ, ηλικίας 4-10 ετών. Μια πολύ σημαντική βελτίωση στις κοινωνικές και επικοινωνιακές ικανότητες παρατηρήθηκε σε 18 περιπτώσεις ενώ σημαντικά συμπτώματα χαρακτηριστικά των ΔΑΦ εμφανίστηκαν στην ομάδα που δεν ακολουθούσε τη δίαιτα. (58)

Όσον αφορά οι δίαιτες ελεύθερες γλουτένης και καζεΐνης δεν βρέθηκαν να είναι βοηθητικές για τα συμπτώματα των παιδιών με ΔΑΦ. (59)

Κι άλλες δίαιτες έχουν προταθεί όπως η specific carbohydrate diet (SCD) (60), και η χαμηλή σε οξαλοξικό δίαιτα. (61)

Αρκετές έρευνες προτείνουν ότι μια εξατομικευμένη συμπληρωματική χορήγηση βιταμινών και μετάλλων μπορεί να είναι βοηθητική σε παιδιά με ΔΑΦ. (62,63)

Τα παιδιά με ΔΑΦ έχουν εμποδισμένη μεθυλίωση, μειωμένη γλουταθειόνη και αυξημένο οξειδωτικό στρες. Έχειδειχθεί ότι διατροφικά συμπληρώματα με μεθυλο-B12, φυλλικό οξύ και τριμεθυλο-γλυκίνη είναι ευεργετικά. (64)

Πολλές στατιστικώς σημαντικές διαφορές έχουν βρεθεί ανάμεσα σε παιδιά με ΔΑΦ και σε αυτά χωρίς συμπεριλαμβανομένου: χαμηλά επίπεδα βιοτίνης, της γλουταθειόνης, της κατάστασης μεθυλίωσης (S-αδενυλο-μεθειονίνης (SAM) και ουριδίνης), του ATP, του NADH, του NADPH, του θείου (ελεύθερου και συνολικού), της τρυπτοφάνης, του GABA, διάφορων δεικτών του οξειδωτικού στρες και των επιπέδων στο πλάσμα του γλουταμινικού. (65)

Χορήγηση εξατομικευμένων συμπληρωμάτων βιταμινών και μετάλλων έδειξε να βελτίωσε τα επίπεδα των παραπάνω ακόμα και στο πλαίσιο των φυσιολογικών τιμών, ειδικά όσον αφορά την κατάσταση μεθυλίωσης του SAM, της γλουταθειόνης, του λόγου οξειδωμένης γλουταθειόνης προς μειωμένη γλουταθειόνη (GSSG:GSH), της αμινοτυροσίνης, του ATP, NADH και NADPH. (66)

Τα παιδιά με ΔΑΦ έχουν βρεθεί σε έρευνες να έχουν χαμηλότερα επίπεδα εικοσαπεντανοϊκού οξέος (EPA), δοκοσαεχανοϊκού οξέος (DHA), και αραχιδονικού οξέος (AA), και χαμηλότερο λόγο συνολικών ω-3 προς συνολικά ω-6 λιπαρά οξέα. Η συμπληρωματική χορήγηση με ω-3 φαίνεται να είναι επωφελής, ιδιαίτερα σε μεγαλύτερες δόσεις και μεγαλύτερο διάστημα χορήγησης. Τα πεδία στα οποία ήταν επωφελής φαίνεται να είναι η κοινωνική απόσυρση και τα περιορισμένα ενδιαφέροντα και συμπεριφορές, ενώ δεν φάνηκε επίδραση στον πεδίο της επικοινωνίας. (67,68)

Όπως έχει ειπωθεί σε παιδιά με ΔΑΦ έχει βρεθεί χαμηλότερο ελεύθερο θείο καθώς συνολικό θείο πλάσματος. Έχει βρεθεί ότι αυτά τα παιδιά έχουν σημαντικά μειωμένη χωρητικότητα θείου που οφείλεται στη μειωμένη ικανότητα να αποτοξινώσουν την παρακεταμόλη. (69)

Έχει βρεθεί ότι σε μερικές περιπτώσεις, η συμπληρωματική χορήγηση μολυβδένιου, πιθανά βοηθάει στην αύξηση των επιπέδων του θείου. Αυτό οφείλεται στο ότι το ένζυμο θειική οξειδάση, η οποία μετατρέπει τα θειώδη σε θειικά, εξαρτάται από το μολυβδένιο. (70)

Στα παιδιά με ΔΑΦ είναι κοινές οι μιτοχονδριακές διαταραχές ιδιαίτερα όσον αφορά την δράση την καρνιτίνης. Συγκεκριμένες έρευνες έχουν δείξει ότι συμπληρωματική χορήγηση με καρνιτίνη ήταν επωφελής όσον αφορά τις διαταραχές αυτές, καθώς η θεραπεία με L-καρνιτίνη αύξησε σημαντικά τις συγκεντρώσεις καρνιτίνης στο πλάσμα. Η καρνιτίνη είναι ένα σημαντικό θρεπτικό, που έχει ζωτικό ρόλο στον ενεργειακό μεταβολισμό και στο μεταβολισμό των λιπαρών οξέων. (71)

Τα γαστρεντερικά προβλήματα είναι συχνά σε παιδιά με ΔΑΦ, ειδικά η χρόνια δυσκοιλιότητα, η διάρροια, ο κοιλιακός πόνος και οι γαστρεντερικές λοιμώξεις. (72).

Τα παραπάνω προβλήματα συσχετίζονται ισχυρά με την σοβαρότητα του αυτισμού. (73)

Οι γαστρεντερικές διαταραχές στα παιδιά με ΔΑΦ, εμφανίζονται μερικώς λόγω ανεπάρκειας πεπτικών ενζύμων, μερικώς λόγω διατροφικών ευαισθησιών και πιθανώς λόγω χαμηλών επιπέδων ω-3 λιπαρών οξέων, τα οποία με τη σειρά τους μπορεί να είναι αίτιο εμφάνισης μη φυσιολογικών εντεροβακτηριδίων. (74)

Έρευνες δείχνουν ότι τα παιδιά με ΔΑΦ συχνά έχουν έλλειψη λακτάσης και άλλων πεπτικών ενζύμων, μπορεί να έχουν φτωχές δίαιτες, διατροφικές ευαισθησίες, ειδικά στη γλουτένη και στην κασεΐνη και άρα μπορεί να επωφεληθούνε από συμπληρωματική χορήγηση πεπτικών ενζύμων, ειδικό σχεδιασμό διαιτών, και/ή δίαιτες ελεύθερες γλουτένης και καζεΐνης. (75,76)

2.3 ΔΑΦ και μικροβιόκοσμος

2.3.1 Ο μικροβιόκοσμος του ανθρώπου

Τα ανθρώπινα όντα, συμπεριλαμβανομένου άλλων θηλαστικών (και όχι μόνο), ζουν σε μια συμβιωτική κι εξελικτική σχέση με έναν τεράστιο αριθμό μικροοργανισμών που κατοικούν στις εσωτερικές κι εξωτερικές επιφάνειες του σώματός μας. Το σύνολο των μικροβίων και των γενετικών υλικών τους ονομάζεται μικροβίωμα (77). Ο ανθρώπινος γαστρεντερικός σωλήνας περιέχει περίπου 10 εις την 14^η βακτήρια που ανήκουν σε περίπου 1000 είδη (78). Συγκεκριμένα, εκτιμάται ότι το βακτηριακό μικροβίωμα είναι τουλάχιστον 100 φορές περισσότερο από το σωματικό γονιδίωμα (79). Ο υγιής ενήλικος γαστρεντερικός σωλήνας κυριαρχείται περισσότερο από φύλα *Bacteroidetes* και *Firmicutes* (και τα δύο είναι μέχρι και το 70-90% των συνολικών βακτηρίων), ακολουθούμενα από τα *Actinobacteria*, *Proteobacteria* και *Verrucomicrobia*. (80)

Αυτός ο συμβιωτικός μικροβιόκοσμος που κατοικεί στο έντερο έχει εδώ και καιρό αξιολογηθεί για τις ποικίλες θετικές επιδράσεις που προσφέρει στον ξενιστή συμπεριλαμβανομένης της διαχείρισης των άπεπτων συστατικών της τροφής, της άμυνας απέναντι την δημιουργία αποικιών από ευκαιριακούς παθογόνους μικροοργανισμούς με το να ανταγωνίζονται τα θρεπτικά συστατικά και με την παραγωγή αντί-μικροβιακών ουσιών, και με το να συμβάλουν στο φραγμό του εντερικού επιθηλίου. Τέλος ο εποικισμός του εντέρου από το μικροβιόκοσμο μπορεί να οδηγεί στην ωρίμανση και τη λειτουργικότητα του προσαρμοζόμενου ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή (77). Αυτός ο επωφελής συνεταιρισμός μεταξύ του εντερικού μικροβιώματος και του ανοσοποιητικού συστήματος του ξενιστή συνεισφέρει σε μεγάλο βαθμό στη φυσιολογική ομοιόσταση του ξενιστή κατά τη διάρκεια της ζωής του. (81)

Οι αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο επηρεάζουν τα προϊόντα που παράγονται, συμπεριλαμβανομένου των προ- και αντί-φλεγμονωδών υλικών, τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη ή/και τη σύσταση του εντερικού μικροβιώματος (82). Παρόλα αυτά κάποια προβιοτικά όπως τα *Bifidobacteria* και οι *Lactobacilli*, μπορούν να επαναφέρουν τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου και να παράγουν οφέλη για τις μικροβιακές κοινότητες, οδηγώντας στη βελτίωση ή πρόληψη της εντερικής φλεγμονής και άλλων εντερικών ή συστηματικών ασθενειών. (83)

2.3.2 Άξονας εντέρου – εγκεφάλου

Από τότε που προτάθηκε ο όρος “άξονας εντέρου-εγκεφάλου” και έγινε η πρώτη δημοσίευση προ-κλινικών ερευνών που αποκάλυψαν την επικοινωνία μεταξύ του εντερικού μικροβιόκοσμου, του εντέρου και του εγκεφάλου, υπάρχουν γρήγορα αναπτυσσόμενες έρευνες που επικεντρώνουν σε αυτό το πεδίο και βαθαίνουν περισσότερο την κατανόησή μας σε αυτές τις σχέσεις (84). Ο άξονας εντέρου-εγκεφάλου αναφέρεται στις αμφίδρομες βιοχημικές επικοινωνίες μεταξύ του γαστρεντερικού σωλήνα και του νευρικού συστήματος. Το αμοιβαία αλληλεπιδρών δίκτυο αποτελείται από το κεντρικό νευρικό σύστημα (ΚΝΣ), το αυτόνομο νευρικό σύστημα (ΑΝΣ), το εντερικό νευρικό σύστημα (ΕΝΣ), τον άξονα υποθαλάμου-επινεφριδίων (HPA, hypothalamic pituitary adrenal axis), τον εντερικό μικροβιόκοσμο, όσο και τα κρανιακά νεύρα που είναι ένα μείζον μονοπάτι στη σύνδεση μεταξύ των σπλάχνων και του ΚΝΣ. (85)

Οι κύριες κατηγορίες μηχανισμών με τις οποίες το έντερο ρυθμίζει τις λειτουργίες του εγκεφάλου συνοψίζονται παρακάτω. Αρχικά, ο εντερικός μικροβιόκοσμος μπορεί να επηρεάζει την παραγωγή, έκφραση και τον κύκλο των νευροδιαβιβαστών, όπως της σεροτονίνης και του Γ-άμινο-βουτυρικού οξέως (GABA), και του νευροτροφικού παράγοντα εγκεφαλικής προέλευσης (BDNF), ο οποίος είναι ένας σημαντικός παράγοντας για τη μνήμη. Δεύτερον, ο εντερικός μικροβιόκοσμος συνεισφέρει στον εντερικό φραγμό και την ακεραιότητα των στενών συνδέσμων, έτσι βοηθάει στον άξονα HPA και στις λειτουργίες του ΑΝΣ. Τρίτον, κάποια είδη προβιοτικών ρυθμίζουν την ευαισθησία των εντερικών προσαγωγών και την ενεργότητα του ΕΝΣ. Τέταρτον, ο εντερικός μικροβιόκοσμος μπορεί να επιδρά στον εγκέφαλο, μέσω ουσιών που παράγονται από τα βακτήρια, συμπεριλαμβανομένου των λιπαρών οξέων βραχείας αλύσου (SCFAs), της παραγωγής σεροτονίνης και κυνουρενίνης. Τέλος, τα ανοσοποιητικά μονοπάτια (τα συστηματικά και αυτά του βλεννογόνου) επίσης παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση του άξονα εντέρου-εγκεφάλου από τον εντερικό μικροβιόκοσμο. (77)

Ενδείξεις, επιπλέον, από πειράματα με ζωικά πρότυπα έχουν δείξει ότι διάφοροι τύποι κοινωνικών στρεσογόνων έχουν επίδραση στην παραγωγή του βλεννογόνου, και τόσο στη σύσταση όσο και στη βιομάζα του εντερικού μικροβιόκοσμου. (86)

Το ΚΝΣ, επιπροσθέτως, ασκεί απευθείας έλεγχο στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου μέσω πεπτιδίων τα οποία στέλνονται με τον κορεσμό και έτσι επηρεάζουν την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών. Η απελευθέρωση μορίων αγγελιοφόρων από νευρώνες, ανοσοποιητικά κύτταρα και κύτταρα enterocromaffin (είδος εντεροεκκριτικών και νευροενδοκρινικών κυττάρων) υπό τον έλεγχο του εγκεφάλου μπορεί να επηρεάζει ευθέως το εντερικό μικροβιόκοσμο (87). Ακόμα, ο εγκέφαλος μπορεί να ρυθμίσει τις εντερικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της εντερικής κινητικότητας, της παραγωγής οξέων και μουκινών (mucins), και να χειρίζεται τα εντερικά υγρά, όλα κρίσιμα για την διατήρηση του επιθηλιακού βιοφίλμ στο οποίο αναπτύσσονται τα βακτήρια (88). Υπάρχουν ακόμα αποδείξεις από έρευνες σε ποντίκια ότι το στρες στις μητέρες κατά τη διάρκεια της εμβρυικής ανάπτυξης μπορεί να προκαλέσει μακροχρόνιες αλλαγές στον εντερικό μικροβιόκοσμο, και το γεγονός αυτό έχει αντίκτυπο και σε άλλα κύρια φυσιολογικά συστήματα στο νεογνό (89). Τέλος ο HPA ρυθμίζει την παραγωγή κορτιζόλης, και η κορτιζόλη μπορεί να επηρεάζει την λειτουργία του ανοσοποιητικού συστήματος. Η κορτιζόλη επίσης μπορεί να επηρεάσει την εντερική διαπερατότητα και τις λειτουργίες του φραγμού, όπως επίσης και την αλλαγή της σύστασης εντερικού μικροβιόκοσμου. Για παράδειγμα, μια έρευνα σε ποντίκια έδειξε ότι η αφαίρεση του οσφρητικού βολβού, (μιας νευρικής κατασκευής του σπονδυλωτού προφυλακίου) προκαλεί χρόνια κατάθλιψη που αυξάνει την έκφραση της ορμόνης έκλυσης κορτικοτροπίνης και τα επίπεδα της σεροτονίνης, τα οποία σχετίζονται με αλλαγές στην κινητικότητα και το προφίλ των μικροβίων στο κόλον πιθανότατα μέσω της ενεργοποίησης του HPA. (90)

2.3.3 Ο μικροβιόκοσμος στη ΔΑΦ

Υπάρχουν αρκετές πληθυσμιακές έρευνες που μελετούν τον επιπολασμό των γαστρεντερολογικών παθήσεων στα παιδιά με ΔΑΦ. Οι αναφερόμενες παθήσεις περιλαμβάνουν τη χρόνια διάρροια, τη δυσκοιλιότητα, το μη φυσιολογικό φούσκωμα, και την αναγωγή. Έχει υπολογιστεί ότι περίπου το 46-76% των παιδιών με ΔΑΦ έχουν εμφανή γαστρεντερολογικά συμπτώματα συγκρινόμενα με το 10-30% των φυσιολογικά αναπτυσσόμενων παιδιών (91). Βέβαια αυτή η διαφορά δεν φαίνεται σε όλες τις έρευνες που μελετούν τα γαστρεντερολογικά συμπτώματα μεταξύ ΔΑΦ και φυσιολογικά αναπτυσσόμενων παιδιών όπως φαίνεται κι από τα ευρήματα των Black et al., 2002 (92)

Υπάρχουν κάποιες έρευνες, ακόμα, που επικεντρώνουν στην ιστοπαθολογία του γαστρεντερικού σωλήνα σε παιδιά με ΔΑΦ (πίνακας 2). Αυτές οι έρευνες φαίνεται να υποστηρίζουν την παρουσία χρόνιας φλεγμονής στον γαστρεντερικό σωλήνα με την πιθανότητα μιας αυτοάνοσης διαδικασίας να συνεισφέρει στην ανοσολογική απάντηση. Ενδείξεις για αυτό βασίζονται σε περιορισμένο αριθμό μελετών. (93)

Στον πίνακα 2 αποτυπώνονται διάφορες έρευνες που έχουν μελετήσει την ιστοπαθολογία του γαστρεντερικού σωλήνα παιδιών με ΔΑΦ, και τα αποτελέσματά τους.

Πίνακας 2: Μελέτες ιστοπαθολογίας του ΓΣ σε παιδιά με ΔΑΦ			
Ερευνητές	Έτος	Δείγμα και δοκιμασία	Αποτελέσματα
Wakefield et al.	1998	N = 12 με ΔΑΦ	10/12 με λεμφοειδής οζιδιακή υπερπλασία (LNH), απώλεια αγγειακού μοτίβου και κολίτιδας στην ενδοσκόπηση.
Wakefield et al.	2000	N = 60 (συμπεριλαμβανομένων των 12 από το 1998)	93% με LNH vs 14% φυσιολογικά της ομάδας ελέγχου. 8% με ειλείτιδα και 88% με κολίτιδα στην ενδοσκόπηση.
Horvath et al.	1999	N = 36 με ΔΑΦ	25/36 (69%) με οισοφαγίτιδα επαναρροής, 15/36 (42%) με χρόνια γαστρίτιδα, 21/36 (58%) με χαμηλή ενεργότητα δισακχαριτών, και 27/36 (75%) με αυξημένη έκκριση του παγκρεατικού-χολικού υγρού μετά από σεκρετίνη IV.
D' Eufemia et al.	1996	Λακτουλόζη/μανιτόλη (L/M) (δοκιμασία για εντερική διαπερατότητα) n = 25	9/21 (43%) με αυξημένη λακτουλόζη που αντανάκλα την αυξημένη εντερική διαπερατότητα
Horvath et al.	2000	επαναλαμβανόμενα L/M test n = 25	76% είχαν λόγο L/M πάνω απ' το κατώφλι, το οποίο δείχνει αυξημένη εντερική διαπερατότητα.
Torrente et al.	2002	N = 25	Εναπόθεση IgG σε βαζολατρική επιφάνεια εντερικών επιθηλιακών κυττάρων σε 23/25 ασθενείς. Οι αποθέσεις IgG συν-

εντοπίστηκαν με το συμπλήρωμα C1q.			
Weizman et al.	1982	N = 17	Κυτταρομεσολαβούμενη ανοσολογική απόκριση περιφερικών λεμφοκυττάρων στη βασική πρωτεΐνη μυελίνης εγκεφάλου σε 13/17 παιδιά με αυτισμό. Αντισώματα στις βασικές πρωτεΐνες μυελίνης που υπάρχουν σε ορούς αυτιστικών ασθενών.
Singh et al.	1998		Οι κυτταρικές διαδρομές Μ είναι εξειδικευμένες για τη μεταφορά αντιγόνων και μικροοργανισμών διακυτταρικά από τον εντερικό αυλό σε υποεπιθηλιακό χώρο όπου τα βακτήρια και τα αντιγόνα αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα Β κύτταρα παράγουν τότε ανοσοσφαιρίνες. Τα επίπεδα IgA και IgG για διατροφική καζεΐνη και γλουτένη είναι αυξημένα σε αυτιστικά παιδιά. (94-102)
Kerneis et al.	1997		
Reichelt et al.	1990		

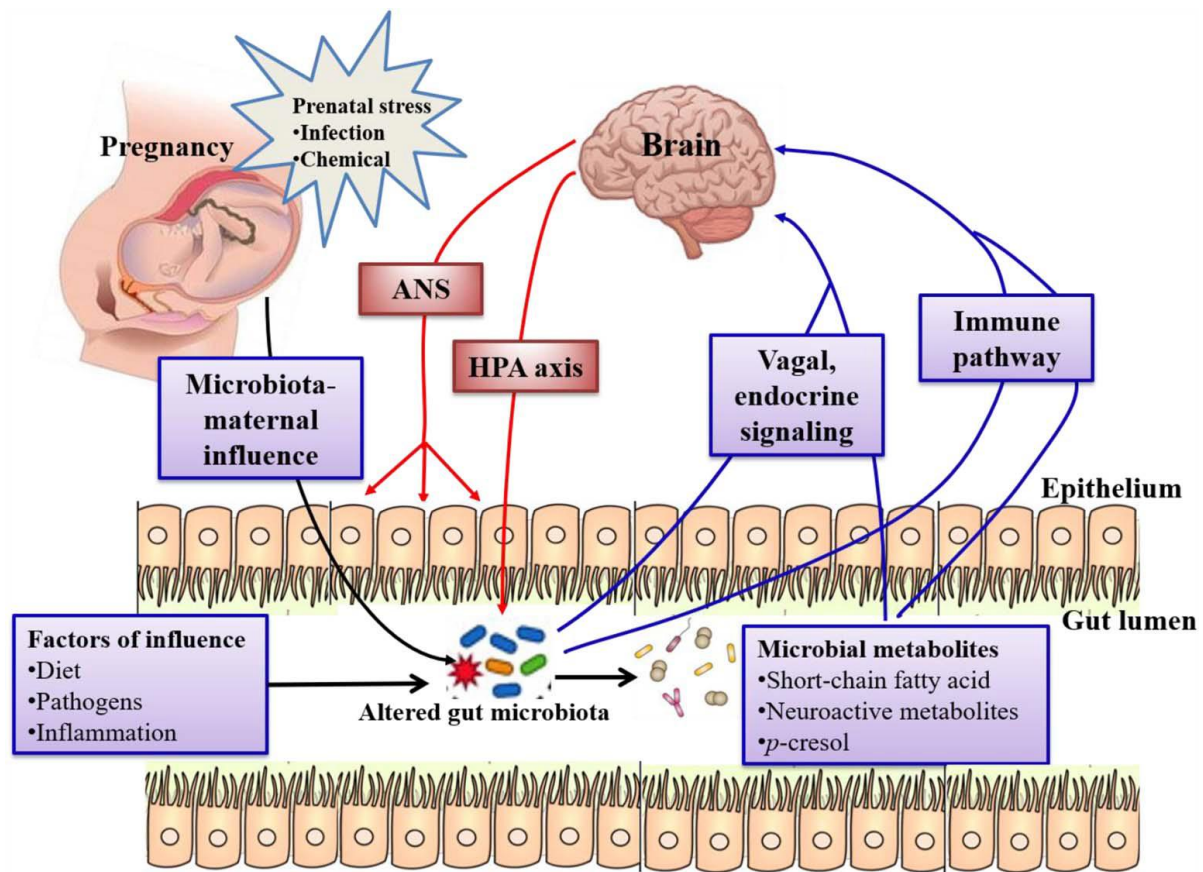
2.3.4 Μικροβιόκοσμος και παθογένεια στις ΔΑΦ

Παρόλο που υπάρχει αρκετή έρευνα σχετικά με την πιθανή παθογένεση των ΔΑΦ, οι ακριβείς αιτίες της ασθένειας δεν έχουν αποσαφηνιστεί και τα μέχρι σήμερα δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι ΔΑΦ πρέπει να είναι το αποτέλεσμα ενός συνδυασμού που περιλαμβάνει πολλούς περιβαλλοντικούς και γενετικούς παράγοντες. Συγκεκριμένα, μεγάλος αριθμός μελετών υποδεικνύει τον πιθανό ρόλο των περιβαλλοντικών παραγόντων κινδύνου και της σχετιζόμενης συννοσηρότητας στην επίδρασή τους στα κεντρικά νεύρο-συμπεριφορικά συμπτώματα των ΔΑΦ. Ο εποικισμός του μικροβιώματος στο σώμα είναι αρκετά γνωστός για τις λειτουργίες του και τις αλληλεπιδράσεις του μεταξύ των γονιδίων και του περιβάλλοντος. Με την αυξανόμενη γνώση του μικροβιώματος, πιστεύεται ότι οι αλλαγές στο εντερικό μικροβίωμα που σχετίζονται με τις ΔΑΦ και οι μεταβολίτες που παράγονται μπορούν είτε ευθέως είτε εμμέσως να διαμορφώσουν τις αντίστοιχες ανοσοποιητικές και γαστρεντερικές διαταραχές, και μπορούν να παίξουν ένα πιθανό ρόλο στην αιτιολογία των ΔΑΦ. (77)

Υπάρχουν ισχυρές ενδείξεις από πολλές επιδημιολογικές, κλινικές και ζωικών προτύπων έρευνες που υποδεικνύουν τις μητρικές μολύνσεις ως πρωταρχική επιρροή

στην ανάπτυξη των συμπτωμάτων ΔΑΦ (103-106). Επιπλέον, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις από έρευνες σε ζωικά πρότυπα και επιδημιολογικές έρευνες που προτείνουν ότι μια δίαιτα (της μητέρας) με πολύ υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια και αρκετές μεταβολικές καταστάσεις μπορούν να αυξήσουν τον κίνδυνο ανάπτυξης νευρο-αναπτυξιακών και συμπεριφορικών διαταραχών στα νεογνά (107). Η μητρική ανοσοποιητική ενεργοποίηση (MIA) είναι ένα χρήσιμο μοντέλο για να ερευνήσουμε τις επιδράσεις των μολύνσεων της μητέρας στο νεογνό όσον αφορά την παθογένεση νευρο-αναπτυξιακών διαταραχών συμπεριλαμβανομένου των ΔΑΦ. Παράγοντες κινδύνου που αφορούν τις ΔΑΦ και τη μητέρα οι οποίοι αυξάνουν την πιθανότητα εμφάνισης συμπεριφορών τύπου αυτισμού στο νεογνό μπορεί να περιλαμβάνουν πολλά άλλα μονοπάτια, συμπεριλαμβανομένης της διαφορετικής ρύθμισης του πλακούντα, επιγενετικών τροποποιήσεων, όπως και απορρύθμισης του ανοσοποιητικού συστήματος. (108)

Από τους Yang et al., 2018 (77), που μελέτησαν τους παθοφυσιολογικούς μηχανισμούς και το εντερικό μικροβίωμα σε παιδιά με ΔΑΦ, παίρνουμε μια ενδιαφέρουσα εικόνα, που αποτυπώνει τα διαφορετικά φυσιολογικά μονοπάτια με τα οποία επηρεάζεται ο μικροβιόκοσμος.



Εικόνα 1: οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους το εντερικό μικροβίωμα εμπλέκεται στις ΔΑΦ. Οι μολύνσεις της μητέρας, όπως η μητρική βακτηριακή δυσβίωση, πιστεύεται ότι είναι η πρώτη αιτία που προκαλεί αλλαγές στη σύσταση και στη λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου στο νεογνό. Το αλλαγμένο εντερικό μικροβίωμα και οι επακόλουθα αλλαγμένοι μεταβολίτες του είναι ικανά να προκαλέσουν προβλήματα στο έντερο, όπως και να επηρεάσουν τη λειτουργία του εγκεφάλου μέσω μηνυματοφόρων μονοπατιών του ενδοκρινικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Τα αλλαγμένα αυτά μονοπάτια που σχετίζονται με τις αλλαγές στο μικροβίωμα μπορεί να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των ΔΑΦ. Αντιστρόφως, ο εγκέφαλος κυρίως επηρεάζει τις γαστρεντερικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας, του εντερικού φραγμού και της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου, μέσω των μονοπατιών του ΑΝΣ. Επιπλέον, ο εγκέφαλος είναι πιθανό να ασκεί μια από τις κύριες επιρροές στη σύσταση και στη λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου ρυθμίζοντας τον άξονα HPA, ASD: Διαταραχές αυτιστικού φάσματος, ANS: αυτόνομο νευρικό σύστημα, GI: γαστρεντερικό σύστημα, HPA: άξονας υποθαλάμου υπόφυσης επινεφριδίων. (77)

2.3.5 Αλλαγές στον μικροβιόκοσμο στις ΔΑΦ

Οι ασθενείς με ΔΑΦ έχει παρατηρηθεί ότι έχουν αλλαγές στη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου συγκρινόμενοι με υγιή άτομα ως ομάδα ελέγχου. Με τη χρήση πυρο-αλληλούχησης (μέθοδος με χρήση πυροφωσφορικού) σε εντερικό μικροβίωμα από δείγματα DNA από κόπρανα, οι Kang et al., (109) βρήκαν διαφορετική και με λιγότερη ποικιλία σύσταση στον εντερικό μικροβιόκοσμο, καθώς και μειωμένα επίπεδα αρκετών γενών σε παιδιά με ΔΑΦ, συμπεριλαμβανομένου των *Prevotella*, *Corprococcus*, και *Veilonellaceae*, τα οποία είναι υπεύθυνα για την κατάποση και ζύμωση των υδατανθράκων. Στο επίπεδο των φύλων, η ανάλυση της μικροβιόκοσμου από παιδιά με καταθλιπτικό αυτισμό (regressive autism) έχει δείξει αυξημένη αφθονία των *Firmicutes*, και σχετικά μικρότερη αφθονία από άλλα φύλα, συμπεριλαμβανομένων των *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, και *Proteobacteria* (110). Τα παιδιά με ΔΑΦ επίσης έδειξαν αυξημένο λόγο *Firmicutes/Bacteroidetes*, όπως και αυξημένα επίπεδα *Lactobacillus* και ειδών *Desulfovibrio*. Ειδικό ενδιαφέρον παρουσιάζει η ένδειξη ότι η αφθονία *Desulfovibrio* σχετίζεται θετικά με τη σοβαρότητα των ΔΑΦ (111,112). Το γένος *Sutterella*, το οποίο σχετίζεται με το μεταβολισμό του βλεννογόνου, βρέθηκε σε αυξημένη αφθονία σε βιοψίες που είχαν παρθεί από γαστρεντερικό σωλήνα ασθενών με ΔΑΦ οι οποίοι είχαν γαστρεντερικές διαταραχές σε σύγκριση πάντα με την ομάδα ελέγχου που είχε και αυτή γαστρεντερικές διαταραχές. (113)

Το γένος *Clostridium* περιλαμβάνει κοινά βακτήρια στο γαστρεντερικό σύστημα, είναι μια καλά καταγεγραμμένη και η πιο πιθανή αιτία για κάποιες περιπτώσεις ΔΑΦ (114,115). Αρκετές έρευνες έχουν δείξει μια σημαντικά υψηλότερη επικράτηση του γένους *Clostridium* σε ασθενείς με ΔΑΦ (116,117). Σύμφωνα με την πολύ στενή σχέση των συμπτωμάτων των ΔΑΦ και της χρόνιας φλεγμονής του τετάνου στο γαστρεντερικό σύστημα, ο Bolte πρότεινε τον πιθανό ρόλο στελεχών του γένους *Clostridium* στην αιτιολογία των ΔΑΦ. Το *Clostridium tetani*, ένας πανταχού παρών αναερόβιος βάκιλλος, παράγει μια ισχυρή νευροτοξίνη η οποία εμποδίζει την απελευθέρωση των νευροδιαβιβαστών, και έχει προταθεί ότι σχετίζεται με συμπεριφορικές διαταραχές στα ΔΑΦ. (118)

Τα Clostridia περιέχουν μια ετερογενή ομάδα από σποριοφόρους και gram θετικούς βακίλους, με κάποια είδη που ανήκουν σε αυτό το γένος να πιστεύεται ότι αποφέρουν όφελος στον ξενιστή, όπως το *Faecalibacterium prausnitzii* και *Ruminococcus*. Παρολα αυτά, αρκετά είδη του γένους *Clostridium*, συμπεριλαμβανομένου του *C. perfringens*,

του *C.difficile*, και του *C.botulinum* παράγουν πολλές τοξίνες και υποκατάστατα αυτών που προκαλούν γαστρεντερικές διαταραχές ή άλλες οφειλόμενες σε τοξίνες ασθένειες (119,120). Επιπροσθέτως, αρκετά δεδομένα από αναλύσεις σε είδη από κόπρανά τόσο από παιδιά με ΔΑΦ όσο και από υγιώς αναπτυσσόμενα, δείχνουν μεγάλη αφθονία σε στελέχη από τις ομάδες *Clostridium* I και IX (τα οποία περιέχουν τα τοξικοπαραγωγά *C.perfringens* και *C.difficile*), με μειωμένα επίπεδα του στελέχους XIVab (θεωρείται ότι ανήκει στα επωφελή βακτήρια) (116). Κάποιες δημοσιεύσεις προτείνουν, επίσης, ότι στελέχη από το γένος *Clostridium* λειτουργεί ως ένας από τους κύριους παράγοντες στην αιτιολογία των ΔΑΦ επειδή τα παιδιά με ΔΑΦ παρουσιάζουν βελτιωμένη συμπεριφορά, επικοινωνία, και κοινωνικές ικανότητες στις γαστρεντερικές εκδηλώσεις των ασθενειών τους έπειτα από του στόματος χορήγηση vancomycin, ενός αντιβιοτικού γνωστού κυρίως εναντίων των clostridia. (121) Παρόλα αυτά, τις γαστρεντερικές διαταραχές και τα κεντρικά συμπεριφορικά συμπτώματα επανεμφανίζονται μετά τη διακοπή της χορήγησης του vancomycin. Η επανεμφάνιση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι τα σπόρια του *Clostridium*, τα οποία σκοτώνονται πολύ δύσκολα από τα αντιβιοτικά, μπορούν να μεγαλώσουν σε μολυσματικές μορφές αργότερα (118). Συνεπώς με την παραπάνω υπόθεση ο Finegold et al., αναφέρει μεγάλο αριθμό από μη σποριοφόρα αναερόβια και μικρο-αερόφιλα βακτήρια σε παιδιά με ΔΑΦ, αλλά όχι σε υγιή αναπτυσσόμενα παιδιά. (110)

Παρόλο που πολλές έρευνες αναφέρουν αλλαγές στο εντερικό μικροβίωμα σε ασθενείς με ΔΑΦ, υπάρχει μικρή ομοφωνία όσον αφορά τα συγκεκριμένα είδη βακτηρίων που αλλάζουν και σε ποιό βαθμό. Σήμερα ξέρουμε ότι οι φυσιολογικές λειτουργίες πολλών βακτηριακών ειδών δεν έχουν πλήρως κατανοηθεί. Πολλοί παράγοντες, συμπεριλαμβανομένου των συνηθειών διατροφής και τρόπου ζωής, την μικροβιακής μόλυνσης, και των ξενοβιοτικών, μπορεί να επηρεάσουν το προφίλ του φυσιολογικού μικροβιόκοσμου και έπειτα να προκαλέσουν λειτουργικές αλλαγές. Οπότε, όχι μόνο οι αλλαγές στους βακτηριακούς πληθυσμούς δεν μπορούν να εκτιμηθούν, αλλά ούτε και οι αλλαγές στις βακτηριακές λειτουργίες που αλληλεπιδρώντας με άλλους παράγοντες κινδύνου, μπορεί να συνεισφέρουν στην παθογένεση κάποιων ΔΑΦ. (122)

Σε μια άλλη έρευνα των Sandhu et al., που έγινε το 2009 και μελέτησε τα πρώιμα κόπρανα σε παιδιά με ΔΑΦ (123), προέκυψαν τα εξής ευρήματα: Από 78 παιδιά με ΔΑΦ που συγκρίθηκαν με 12.905 παιδιά ελέγχου: όσον αφορά τη συχνότητα των κενώσεων, ηλικίας 4-42 εβδομάδων, δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στις κενώσεις στις 4 εβδομάδες ή στους 6 με 18 μήνες. Στους 30 μήνες και στους 42 μήνες τα παιδιά με

ΔΑΦ ήταν πιο πιθανό να αφοδεύουν πιο συχνά από την ομάδα ελέγχου, συγκεκριμένα κατά 2 φορές τη μέρα περισσότερο. Μόνο 5% των παιδιών με ΔΑΦ αφόδευαν περισσότερες από 4 φορές τη μέρα, ενώ το ποσοστό των παιδιών που αφόδευαν λιγότερο από 1 φορά τη μέρα ήταν παρόμοιες στις δυο ομάδες. Όταν συγκρίθηκε το χρώμα των κοπράνων, στις 19 συγκρίσεις της συχνότητας των πράσινων, καφέ, κίτρινων και μαύρων κοπράνων δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στους 4 βδομάδες ή στους 6 ή στους 18 μήνες. Η μόνη διαφορά βρέθηκε στους 30 και 42 μήνες όταν τα παιδιά με ΔΑΦ έκαναν πιο συχνά κίτρινα κόπρανα από τα παιδιά χωρίς ΔΑΦ. Στους 42 μήνες περισσότερα από 90% των παιδιών και στις δυο ομάδες έκαναν συνήθως καφέ κόπρανα. Όσον αφορά τη συνοχή των κοπράνων, δεν υπήρχε σημαντική διαφορά μεταξύ των ομάδων στις 4 βδομάδες και στους 6, 18 και 30 μήνες. Τα κόπρανα γινόντουσαν πιο σφιχτά με την ηλικία με το 20-28% των παιδιών συνήθως να κάνουν σκληρά κόπρανα στην ηλικία 30-42 μήνες. Η συχνότητα της διάρροιας αυξανόταν με την ηλικία, από περίπου 3% στην ηλικία των 4 βδομάδων σε πάνω από 30% στους 6 μήνες και πάνω από 50% μετά. Δεν υπήρχε σημαντική διαφορά στην επικράτηση της διάρροιας στις δυο ομάδες στις 4 βδομάδες, στους 6, 18 και 30 μήνες. Μετά τους 30 μήνες ηλικίας, τα παιδιά με ΔΑΦ ήταν πιο πιθανό να έχουν διάρροια (58%) συγκρινόμενα με την ομάδα ελέγχου (44%). Δεν υπήρχε διαφορά όσον αφορά το αίμα στα κόπρανα και τον μη φυσιολογικό πόνο. Στους 57 μήνες τα παιδιά με ΔΑΦ ήταν 6 φορές πιο πιθανό να φορούν πάνα (11.7% συγκριτικά με το 1.8%). Επαναλαμβάνοντας την ανάλυση μόνο στις περιπτώσεις που διαγνώστηκαν ως ο κλασσικός παιδικός αυτισμός (βγάζοντας τον μη τυπικό αυτισμό και το σύνδρομο Asperger) βρέθηκαν πολύ παρόμοια ευρήματα. (123)

Σκοπός

Σκοπός αυτής της μελέτης είναι να διερευνήσει το κατά πόσο υπάρχουν διαφορές στην διατροφική πρόσληψη, όσον αφορά κυριότερα τα μακροθρεπτικά συστατικά, ανάμεσα στα παιδιά που βρίσκονται στις διαταραχές αυτιστικού φάσματος και στα φυσιολογικά αναπτυσσόμενα παιδιά. Επίσης, διερευνά αν υπάρχουν ποσοτικές διαφορές στον μικροβιόκοσμο των παιδιών με ΔΑΦ, και σε ποια είδη ή γένη εντοπίζονται αυτές.

3. Μεθοδολογία

3.1 Το δείγμα της μελέτης

Το δείγμα της μελέτης αποτελείται από 46 παιδιά, εκ των οποίων η συλλογή των 10 έγινε αυτό το ακαδημαϊκό έτος (2017-2018), ενώ των υπολοίπων 36 τις χρονιές 2011-2013. Η συλλογή του δείγματος έγινε από οικογένειες που επισκέφτηκαν το νοσοκομείο Παίδων Αγία Σοφία, στο δήμο Ζωγράφου, στην περιοχή Γουδή. Συγκεκριμένα οι οικογένειες επισκέφτηκαν είτε την Παιδοψυχιατρική Κλινική είτε το ιατρείο Ανάπτυξης. Η συλλογή των εθελοντών στην έρευνα ήταν εθελοντική ύστερα από ενυπόγραφη συναίνεσή τους. Ο σχεδιασμός και η διεξαγωγή της συγκεκριμένης μελέτης είχε την έγκριση της επιτροπής Βιοηθικής του Χαροκοπείου Πανεπιστημίου. Από αυτά τα παιδιά, τα 24 είχαν διαγνωστεί από τους παιδιάτρους του Αγία Σοφία, σύμφωνα με το DSM-V, ότι ανήκουν στις Διαταραχές Αυτιστικού Φάσματος.

3.2 Συλλογή και επεξεργασία διατροφικών δεδομένων

Τα στοιχεία συλλέχθηκαν μέσω ενός τριήμερου ημερολόγιου καταγραφής τροφίμων, στο οποίο οι γονείς του παιδιού συμπληρώνανε εκτός απ το είδος του τροφίμου, την ποσότητά του καθώς και το μέρος και την ώρα κατανάλωσής του. Στο πλαίσιο μιας βδομάδας, οι γονείς καλούνταν να συμπληρώσουν την κατανάλωση του παιδιού τους σε δυο καθημερινές μέρες και μια απ τις μέρες του σαββατοκύριακου, έτσι ώστε να έχουμε την εικόνα της συνήθους πρόσληψης του παιδιού.

Η επεξεργασία των τριήμερων ημερολογίων καταγραφής των εθελοντών έγινε με το πρόγραμμα Nutritionist Pro. Για την ακριβή σύσταση των τροφίμων σε μακρο και μικροθρεπτικά συστατικά χρησιμοποιήθηκε η βάση δεδομένων USDA. Επίσης, όσον αφορά τα ελληνικά τρόφιμα που δεν υπήρχαν στις λίστες του Nutritionist Pro, καθώς είναι αμερικάνικο πρόγραμμα, έγιναν ακριβείς προσομοιώσεις με βάση τα επιμέρους συστατικά του τροφίμου. Για ένα σύνθετο τρόφιμο, υπολογίστηκαν οι ποσότητες στα επιμέρους συστατικά του (πχ πατάτες, κρέμα γάλακτος, κιμάς κλπ), και περαστήκανε στο πρόγραμμα ξεχωριστά. Αφού εισήχθησαν οι τρεις μέρες που είχαν καταγράψει οι

εθελοντές μας, έγινε ανάλυση των θρεπτικών συστατικών (nutrient analysis) και βγήκε το μέσο όρο ανά ημέρα σε κάθε μακρο-μικρο θρεπτικό συστατικό.

Έπειτα από την εισαγωγή των δεδομένων στο πρόγραμμα, συλλέξαμε τα συγκεντρωτικά δεδομένα για:

- Την ενεργειακή πρόσληψη
- Την πρόσληψη μακροθρεπτικών συστατικών (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λιπίδια, διαιτητικές ίνες)
- Την πρόσληψη των διαφορετικών ειδών λιπαρών οξέων (κορεσμένων, μονοακόρεστων και πολυακόρεστων)
- Την πρόσληψη βιταμίνης C και του ασβεστίου
- Την κατανάλωση ζάχαρης

Στη συνέχεια επεξεργαστήκαμε τα δεδομένα αυτά για να βρούμε την επί της εκατό ενεργειακή πρόσληψη των διαφορετικών μακροθρεπτικών στοιχείων, για να βρούμε το ποσοστό της ενέργειας των παιδιών προέρχεται από υδατάνθρακες, πρωτεΐνες, λίπη, τα διάφορα είδη λιπών και τη ζάχαρη. Τα ευρήματα από την επεξεργασία αυτή, τα χρησιμοποιήσαμε στα αποτελέσματά μας, για να συγκρίνουμε τη δίαιτα των παιδιών με ΔΑΦ και των ΦΑ παιδιών.

3.3 Συλλογή και επεξεργασία μικροβιολογικών δεδομένων

3.3.1 Συλλογή δείγματος κοπράνων

Η συλλογή των κοπράνων πραγματοποιήθηκε εντός πλαστικού συλλέκτη μιας χρήσης και η κένωση μεταφέρθηκε εντός χρονικού διαστήματος δύο ωρών στο Εργαστήριο Βιολογίας Βιοχημείας Φυσιολογίας του Ανθρώπου και των Μικροοργανισμών (Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ.) προς επεξεργασία. Σε περίπτωση αδυναμίας έγκαιρης μεταφοράς στο Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ., το δείγμα κοπράνων διατηρείται υπό ψύξη (4°C) μέχρι την επεξεργασία του. Στο Ε.Β.ΒΙ.Φ.Α.Μ., η πλήρης κένωση ζυγίζεται και διανέμεται σε αποστειρωμένους σωλήνες, προκειμένου να αποθηκευτεί στους -80°C μέχρι την ημέρα

της απομόνωσης του DNA. Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε και προσδιορισμός του pH των φρέσκων κοπράνων, με διαλυτοποίηση 1.0g κοπράνων σε 10ml αποστειρωμένου, απιονισμένου νερού. (124)

3.3.2 Μοριακή μεθοδολογία

3.3.2.1 Απομόνωση ολικού DNA από κόπρανα

Η απομόνωση του ολικού μικροβιακού DNA από τα δείγματα κοπράνων πραγματοποιήθηκε βάσει της μεθόδου RBB+C (Repeated Bead Beating plus Column) (125), κατόπιν τροποποιήσεων της για εφαρμογές στον ανθρώπινο εντερικό μικροβιόκοσμο (126). Το πρωτόκολλο στηρίζεται στη συνδυαστική χρήση εμπορικών στηλών απομόνωσης DNA από κόπρανα (QIAamp® DNA Mini Kit; QIAGEN GmbH, Germany) και μηχανικής λύσης.

Η αναλυτική πορεία της απομόνωσης μικροβιακού DNA από δείγματα κοπράνων περιλαμβάνει 3 ενότητες. Αρχικά κάνουμε κυτταρική λύση, διαρρηγνύεται η κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων, έτσι ώστε να έχουμε πρόσβαση στα εσωτερικά μακρομόρια που μας ενδιαφέρουν. Έπειτα προκαλείται κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων. Τέλος απομακρύνεται το RNA, οι πρωτεΐνες και οι άλλες περιττές προσμίξεις για να μας μείνει μόνο το DNA που μας ενδιαφέρει.

Στο στάδιο της κυτταρικής λύσης, μεταφέρονται 0,125gr κοπράνων σε ένα αποστειρωμένο σωληνάριο, που περιέχει 0,3gr με 0,1mm αποστειρωμένες σφαίρες ζirkονίου και 0,1gr με 0,5 mm σφαίρες. Αμέσως προστίθεται 1 mL διάλυμα λύσης ανά δείγμα και ακολουθεί ομογενοποίηση στο MiniBead Beater™ (BioSpec Products, US), το οποίο τα αναδεύει και βοηθάει στη λύση των μεμβρανών των κυττάρων. Μετά την ανάδευση, επωάζουμε τα δείγματα για 15 λεπτά στους 95°C και φυγοκεντρούμε σε ψυχόμενη φυγόκεντρο στα 20.000xg για 5 λεπτά. Στη συνέχεια, συλλέγουμε το υπερκείμενο, προσθέτουμε 300μl διαλύματος λύσης και επαναλαμβάνουμε τη διαδικασία, ενοποιώντας στα τέλος τα υπερκείμενα που έχουμε συλλέξει.

Στο στάδιο της κατακρήμνισης των νουκλεϊκών οξέων, προσθέτουμε 260 μL οξικό αμμώνιο 10M σε κάθε δείγμα και μετά από φυγοκέντρωση στις 16.000xg για 10 λεπτά στους 4°C προστίθεται ισοπροπανόλη (1:1) και επωάζονται τα δείγματα στον πάγο για 30 λεπτά. Φυγοκεντρούμε στις 16.000xg για 15 λεπτά στους 4°C, αφαιρούμε το

υπερκείμενο, κάνουμε καθαρισμό με 70% αιθανόλη, στεγνώνουμε καλά τα ιζήματα και τα επαναδιαλύουμε σε 100μL Tris-EDTA.

Τέλος, στο στάδιο της απομάκρυνσης του RNA, των πρωτεϊνών και των περιττών προσμίξεων, προσθέτουμε 2 μl RNάση και επωάζουμε τα δείγματα για 15 λεπτά στους 37°C, στη συνέχεια προσθέτουμε 15μL πρωτεϊνάση K και 200μL το διάλυμα AL από το QIAmp®DNA Mini kit και επωάζουμε για 10 λεπτά στους 70°C. Ακολούθως, προστίθενται 200μL αιθανόλη, μεταφέρουμε το δείγμα σε μια στήλη από το kit και κάνουμε διαδοχικές πλύσεις με 500μL των διαλυμάτων AW1 και AW2. Στο τέλος, προστίθενται 200μl διαλύματος έκλουσης (AE) στη στήλη και ακολουθεί φυγοκέντρηση και συλλογή του DNA σε ειδικά σωληνάρια, για να μην προσκολλάται το DNA στα τοιχώματά τους.

Η καθαρότητα και η τελική συγκέντρωση του DNA ελέγχονται φωτομετρικά στο μηχάνημα IMPLEN P330 με την χρήση του προγράμματος για dsDNA (double-stranded DNA). Τα δείγματα αποθηκεύονται στους -80°C μέχρι την επεξεργασία με σκοπό την μοριακή ταυτοποίηση του μικροβιόκοσμου.

3.3.2.2 Ποσοτικός προσδιορισμός εντερικού μικροβιόκοσμου με τη μέθοδο real-time PCR (quantitative PCR)

Στο πλαίσιο της μελέτης πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός μελών του εντερικού μικροβιόκοσμου στα δείγματα κοπράνων με τη χρήση μοριακής προσέγγισης (quantitative PCR), προκειμένου να διερευνηθούν τυχόν διαφοροποιήσεις ανάλογα τη παρουσία ή όχι ΔΑΦ. Συγκεκριμένα, με την εφαρμογή ποσοτικής PCR (qPCR) και τη χρήση κατάλληλων εκκινητών πραγματοποιήθηκε ο ποσοτικός προσδιορισμός ($\log_{10}$ αντίγραφα 16S rRNA /g κοπράνων) στο ολικό DNA των ολικών βακτηρίων (total bacteria), καθώς και μικροοργανισμών με ιδιαίτερο βιβλιογραφικό ενδιαφέρον στη περίπτωση των ΔΑΦ, όπως του γένους *Prevotella*, του γένους *Bifidobacterium*, της ομάδας *Lactobacillus* group, της ομάδας του *Clostridium perfringens* και του βουτυροπαραγωγού είδους *Faecalibacterium prausnitzii*. Ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιείται με τη χρησιμοποίηση κατάλληλων εκκινητικών μορίων (primers), που στοχεύουν πολύ συγκεκριμένες περιοχές του γονιδίου 16S rRNA εξειδικευμένες ως προς την κατηγορία των μικροοργανισμών που στοχεύουμε σε κάθε αντίδραση (ΠΙΝΑΚΑΣ 3), με ιχνηθέτηση των προϊόντων της PCR με φθορίζοντα μόρια και μέτρηση

της έντασης φθορισμού ο οποίος εκπέμπεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Οι αντιδράσεις qPCR πραγματοποιήθηκαν στο όργανο LightCycler®2.0 (Roche Diagnostics GmbH, Germany) σε γυάλινα τριχοειδή (capillaries) με χρήση του μίγματος αντιδράσεων KAPA SYBR® Fast Master Mix (2x) Universal Kit (Kapa Biosystems Inc., USA), το οποίο στηρίζεται στη τεχνολογία φθορισμού της χρωστικής SYBR Green. Σε κάθε αντίδραση (20μl) χρησιμοποιούνται 10μl του kit, 0.4μl του κάθε εκκινητή, 0.25μl BSA (Bovine serum Albumin, για αποφυγή της προσκόλλησης του μίγματος της αντίδρασης στα γυάλινα τριχοειδή), 5μl από το DNA-στόχο (αραιώσεις πρότυπου στελέχους ή δείγματα κοπράνων) και 3.95μl PCR-grade ύδατος. Η διαδικασία της PCR περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του ενζύμου (πολυμεράση), την ενίσχυση του προϊόντος (45 κύκλοι), την ανάλυση melting curves και τη ψύξη του οργάνου. Οι συνθήκες της αντίδρασης PCR (ενίσχυση του προϊόντος) προέκυψαν κατόπιν βελτιστοποίησης για την κάθε υπό εξέταση μικροβιακή ομάδα (127).

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπό εξέταση μικροοργανισμών της μελέτης

Στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδισμού	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πρότυπο στέλεχος	Παραπομπή
Total Bacteria	Forward Reverse	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCGGTATCTAATCCTGTT	60°C	466	<i>Bacteroides fragilis</i> MM44 (ATCC 25285)	Nadkarni et al., 2002
<i>Prevotella</i> spp.	g-Prevo-F g-Prevo-R	CACRGTAACGATGGATGCC GGTCGGGTTCAGACC	55°C	513	<i>Prevotella copri</i> DSM 18205	Matsuki et al., 2002
<i>Clostridium perfringens</i> group	CPF CPR	ATGCAAGTCGAGCGATG TATGCGGTATTAATCTCCCTTT	55°C	120	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Phong et al., 2010
<i>Lactobacillus</i> group	Forward Reverse	AGCAGTAGGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	58°C	341	<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243	Rintilla et al., 2004
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Forward Reverse	TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG CCACATCCAGC(A/G)TCCAC	58°C	243	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20456	Rintilla et al., 2004
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FPR-2F Fprau645R	GGAGGAAGAAGGTCTTCGG AATTCCGCCTACCTCTGCACT	60°C	248	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM 17677	Feng et al., 2014 Suau et al., 2001 Wang, Cao & Cerniglia, 1996

(128-134)

Η ποσοτικοποίηση των βακτηρίων σε κάθε δείγμα υπολογίζεται βάσει της τιμής του Ct (threshold circle), η οποία ορίζεται ως ο αριθμός των κύκλων της qPCR όπου ο φθορισμός του προϊόντος της PCR φτάνει στο κατώφλι ανίχνευσης καθώς είναι η μόνη φάση (log-linear phase) όπου η απόδοση της αντίδρασης PCR είναι σταθερή. Όσο λιγότεροι κύκλοι χρειάζονται για να φτάσει ένα δείγμα στο δεδομένο επίπεδο φθορισμού

(μικρότερο Ct) τόσο μεγαλύτερη η ποσότητα του DNA-στόχου στο αρχικό δείγμα. Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης των βακτηρίων σε κάθε δείγμα κοπράνων γίνεται μέσω πρότυπων καμπύλων αναφοράς, όπου δίνεται η γραμμική σχέση του δεκαδικού λογάριθμου των αντιγράφων (copies) του γονιδίου του 16S rRNA στο πρότυπο μικροβιακό στέλεχος προς τις αντίστοιχες τιμές Ct. Η συλλογή και επεξεργασία των δεδομένων για την παραγωγή των καμπύλων αναφοράς επιτυγχάνεται με τη χρήση του λογισμικού LCS4 4.1.1.2 (Roche Diagnostics GmbH), με αποδεκτό εύρος απόδοσης το 1.8 με 2.0. Τα τελικά αποτελέσματα εκφράζονται ως «δεκαδικός λογάριθμος των αντιγράφων του 16S rRNA γονιδίου/g δείγματος κοπράνων» ($\log_{10}$ copies / g δείγματος κοπράνων).

3.3.3 Στατιστική επεξεργασία μικροβιολογικών στοιχείων

Ο έλεγχος κανονικότητας των συνεχών μεταβλητών πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο Kolmogorov-Smirnov. Στη περίπτωση κανονικής κατανομής, η σύγκριση της μεταβλητής ανάμεσα στις ομάδες των εθελοντών (ΦΑ vs. ΔΑΦ) πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο t για ανεξάρτητα δείγματα (Student's T test) και οι τιμές εκφράστηκαν ως μ.ο.± S.D. Στη περίπτωση μη κανονικής κατανομής, η σύγκριση της μεταβλητής ανάμεσα στις ομάδες των εθελοντών (ΦΑ vs. ΔΑΦ) πραγματοποιήθηκε με τον μη παραμετρικό έλεγχο Mann-Whitney για ανεξάρτητα δείγματα (Mann-Whitney test) και οι τιμές εκφράζονται ως διάμεσος (Q1-Q3). Οι συσχετίσεις μεταξύ ενεργειακής πρόσληψης, φυτικών ινών και μικροοργανισμών έγιναν με το κριτήριο spearman λόγω μη παραμετρικότητας. Το επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε στο 10% ($p < 0.1$). Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα IBM® SPSS® Statistics version 20.

4.Αποτελέσματα

4.1 Χαρακτηριστικά του δείγματος

Το δείγμα προς ανάλυση αποτελείται από 46 παιδιά εκ των οποίων τα 27 (58%) είναι διαγνωσμένα με ΔΑΦ ενώ τα υπόλοιπα 19 (42%) είναι ΦΑ. Η ηλικία τους είναι 4-10 ετών με μέσο όρο τα $7,0 \pm 2$ χρόνια. Από αυτά τα 17 (37%) είναι κορίτσια και τα 29 (63%) είναι αγόρια.

Από τα παιδιά με ΔΑΦ, το μέσο όρο ηλικίας είναι $7,3 \pm 2,2$ χρόνια, τα 20 είναι αγόρια και τα 7 κορίτσια, ενώ από τα ΦΑ παιδιά το μέσο όρο ηλικίας είναι $6,4 \pm 2,2$, τα 10 είναι αγόρια και τα 9 κορίτσια. Ο δείκτης μάζας σώματος στα παιδιά με ΔΑΦ βρέθηκε στα $17,5 \pm 3 \text{ Kg/m}^2$, ενώ στα ΦΑ παιδιά βρέθηκε $16 \pm 2 \text{ Kg/m}^2$. Η διαφορά δεν βρέθηκε να είναι στατιστικώς σημαντική ($p=0,132$)

Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται τα περιγραφικά δεδομένα των παιδιών της μελέτης.

Πίνακας 4: Περιγραφικά χαρακτηριστικά των παιδιών (μέσοι όροι $\pm$ τυπικές αποκλίσεις ή ποσοστά)			
	ΔΑΦ	ΦΑ	P value
Ηλικία (χρόνια)	$7,3 \pm 2,2$	$6,4 \pm 2,2$	0,200
Αγόρια (%)	17 (74%)	9 (26%)	
Κορίτσια (%)	7 (47,5%)	8 (52,5%)	
ΔΜΣ (Kg/m^2)	$17,5 \pm 3,3$	16 ± 2	0,132

4.2 Διατροφικές συμπεριφορές και συνήθειες στα παιδιά με ΔΑΦ

Τα στοιχεία που συλλεχτήκανε και επεξεργαστήκανε τόσο στα παιδιά με ΔΑΦ όσο και στα ΦΑ παιδιά ήταν τα εξής: συνολική ενεργειακή πρόσληψη, διαιτητική πρόσληψη υδατανθράκων, πρωτεϊνών, λιπιδίων και διαιτητικών ινών σε γραμμάρια, βιταμίνης C και ασβεστίου σε mg, η διαιτητική πρόσληψη κορεσμένων, μονοακόρεστων και

πολυακόρεστων λιπαρών οξέων σε γραμμάρια. Στην συνέχεια υπολογίστηκε το επί της εκατό ποσοστό ενεργειακής πρόσληψης από τα διάφορα μακροθρεπτικά, και τα γραμμάρια πρωτεϊνών ανά κιλό σωματικού βάρους. Πριν γίνουν οι αναλύσεις ελέγχθηκε η κανονικότητα των μεταβλητών. Οι κανονικές μεταβλητές εκφραστήκαν ως “μέσος όρος $\pm$ τυπική απόκλιση” ενώ οι μη κανονικές μεταβλητές ως “διάμεσος (25^ο τεταρτημόριο-75^ο τεταρτημόριο)”. Τα αποτελέσματα από τις συγκρίσεις παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα

Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τις διατροφικές συγκρίσεις μεταξύ των παιδιών με ΔΑΦ και των ΦΑ παιδιών. Όλα τα μακροθρεπτικά είναι αποτυπωμένα ως ποσότητα (gr) και ως ποσοστό επί της ημερήσιας ενεργειακής πρόσληψης (%E). Το p value 2 είναι η στατιστική σημαντικότητα της σύγκρισής μας όταν ελέγξαμε το φύλο και την ηλικία ως συγχυτικούς παράγοντες.

Πίνακας 5: Διατροφικές συγκρίσεις μεταξύ ΔΑΦ και ΦΑ παιδιών (μέσοι όροι $\pm$ τυπικές αποκλίσεις)				
	ΦΑ	ΔΑΦ	P value	P value 2
Ενέργεια (Kcal)	1802(1498 – 2060)	1791(1612 – 1950)	0,300	
Υδατάνθρακες				
Gr	188 $\pm$ 45	223 $\pm$ 70	0,043	0,402
% E	44,2 $\pm$ 4	49,2 $\pm$ 8	0,014	0,071
Πρωτεΐνες				
Gr	65 $\pm$ 12	68 $\pm$ 15	0,584	
% E	15,7 $\pm$ 2,3	15,4 $\pm$ 3	0,751	
Gr/Kg ΣΒ	2,7(2,3 – 3,8)	2,5(2 – 3)	0,252	
Λίπη				
Gr	77 $\pm$ 14	72 $\pm$ 16	0,271	
% E	41,2 $\pm$ 3,7	36,5 $\pm$ 5,8	0,003	0,010

Κορεσμένα λιπαρά οξέα				
Gr	30±7	29±8	0,688	
% E	16,3±2,8	15±3,4	0,146	
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα				
Gr	30±7	26±7	0,050	0,001
% E	16,3±2,9	13,4±3,6	0,005	0,003
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα				
Gr	9±2,6	9±3,6	0,574	
% E	4,7±1,2	4,6±1,2	0,799	
Ζάχαρη				
Gr	69,5±15	89,8±37	0,605	
% E	19,5±2	17,4±5	0,567	
Ασβέστιο(mg)	983±232	883±299	0,229	
Βιταμίνη C(mg)	63±42	87±64	0,169	
Διαιτητικές ίνες(gr)	9(8 – 15)	13(8,5 – 16)	0,083	0,663

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 5 οι υδατάνθρακες διέφεραν μεταξύ των 2 ομάδων τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε % επί της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης. Συγκεκριμένα, τα παιδιά με ΔΑΦ και τα ΦΑ παιδιά δήλωσαν ότι κατανάλωναν 223±70 gr και 188±45 gr αντίστοιχα ($p=0,043$), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν 49,2±8% και 44,2±4% αντίστοιχα ($p=0,014$).

Τα λίπη διέφεραν μεταξύ των παιδιών με ΔΑΦ συγκριτικά με τα ΦΑ παιδιά στο % επί της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης, με τα παιδιά με ΔΑΦ να δηλώνουν κατανάλωση 36,5±5,8% ενώ τα ΦΑ παιδιά 41,2±3,7% ($p=0,003$).

Όσον αφορά τα μονοακόρεστα λιπαρά οξέα, διέφεραν μεταξύ των 2 ομάδων τόσο σε απόλυτες τιμές όσο και σε % επί της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης. Πιο συγκεκριμένα, τα παιδιά με ΔΑΦ και τα ΦΑ παιδιά δήλωσαν ότι κατανάλωναν 26 ± 7 gr και 30 ± 7 gr αντίστοιχα ($p=0,050$), ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ήταν $13,4 \pm 3,6\%$ και $16,3 \pm 2,9\%$ αντίστοιχα ($p=0,005$).

Όσον αφορά τις διαιτητικές ίνες, βρέθηκε διαφορά μεταξύ των δύο ομάδων, με τα παιδιά με ΔΑΦ να καταναλώνουν 13 gr (8,5 – 16) ενώ τα ΦΑ παιδιά 9 gr (8-15) ($p=0,083$).

Τέλος, διαφορές βρήκαμε, αλλά με μικρότερη στατιστική σημαντικότητα, τόσο στο ασβέστιο όσο και στη βιταμίνη C. Στο ασβέστιο τα παιδιά με ΔΑΦ δήλωσαν ότι κατανάλωναν 883 ± 299 mg ενώ τα ΦΑ παιδιά 983 ± 232 mg ($p=0,229$). Όσον αφορά τη βιταμίνη C, τα παιδιά με ΔΑΦ δήλωσαν ότι κατανάλωναν 87 ± 64 mg ενώ τα ΦΑ παιδιά 63 ± 42 mg ($p=0,169$).

Στη συνέχεια ελέγξαμε για τους κλασικούς συγχυτικούς παράγοντες, δηλαδή την ηλικία και το φύλο. Η στατιστική σημαντικότητα χάθηκε από την συνολική ποσότητα στη δίαιτα σε gr των υδατανθράκων ($p=0,402$) και των φυτικών ινών (0,663).

4.3 Ο μικροβιόκοσμος στα παιδιά με ΔΑΦ

Οι τελικές αναγωγές έγιναν έτσι ώστε να έχουμε τη σύσταση του μικροβιόκοσμου ανά γραμμάριο κοπράνων. Μελετήθηκαν 21 δείγματα εκ των οποίων τα 14 ήταν από παιδιά με ΔΑΦ και τα 7 από ΦΑ παιδιά. Μετρήθηκαν τα ολικά βακτήρια, τα *Bifidobacterium spp*, τα *Clostridium perfringens*, τα *Faecalibacterium prausnitzii*, η ομάδα των *Lactobacillus* και το γένος της *Prevotella*. Τα ολικά βακτήρια, τα *Clostridium spp* και τα *Prevotella spp* δεν είχαν κανονική κατανομή σε αντίθεση με τα *Bifidobacterium spp*, τα *F.prausnitzii* και τους λακτοβάκιλλους που είχαν κανονική κατανομή. Τα αποτελέσματα από τη σύγκριση ΔΑΦ και ΦΑ παιδιών φαίνονται στον πίνακα 6.

Πίνακας 6: Σύγκριση μικροβιόκοσμου ΔΑΦ και ΦΑ παιδιών (μέσοι όροι $\pm$ τυπικές αποκλίσεις)			
Βακτήρια	ΦΑ	ΔΑΦ	P value
Ολικά βακτήρια	11,57 (11,37 – 11,57)	11,51 (11,45 – 11,71)	0,681
<i>Bifidobacterium spp</i>	10,53 $\pm$ 0,42	10,68 $\pm$ 0,38	0,412
<i>C.perfringens</i>	8,58 (7,6 – 8,87)	8,92 (8,02 – 9,12)	0,351
<i>F.prausnitzii</i>	10,30 $\pm$ 0,46	10,29 $\pm$ 0,37	0,942
<i>Lactobacillus group</i>	7,53 $\pm$ 0,75	7,87 $\pm$ 0,98	0,427
<i>Prevotella spp</i>	8,79 (8,40 – 9,50)	8,54 (8,17 – 8,88)	0,314
*ο αριθμός των βακτηρίων εκφράζεται ως ο δεκαδικός λογάριθμος των αντγράφων του 16S rRNA γονιδίου ανά γραμμάριο κοπράνων			

Δεν υπήρχαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ολικών βακτηρίων, και των διαφόρων πληθυσμών βακτηρίων μεταξύ των παιδιών με ΔΑΦ και των ΦΑ παιδιών.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ολικής ενεργειακής πρόσληψης και της πρόσληψης των διαιτητικών ινών με τους μικροοργανισμούς ανά γραμμάριο κοπράνων που βρέθηκαν από τις αναλύσεις. Οι αναλύσεις έγιναν με το κριτήριο spearman, λόγω μη κανονικότητας των μεταβλητών και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 7 και 8.

Πίνακας 7: Συσχέτιση μεταξύ της Ενεργειακής πρόσληψης και των βακτηρίων						
	Ολικά βακτήρια	Bifidobacterium	C.perfringens	F.prausnitzii	Lactobacillus	Prevotella
Συντελεστής συσχέτισης	0,230	-0,008	0,166	0,144	0,761	0,058
P value	0,317	0,973	0,471	0,533	0,001	0,801

Βρέθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των ημερήσιων θερμίδων που παίρνει το παιδί, και τον πληθυσμό των βακτηρίων που ανήκουν στην ομάδα *Lactobacillus* ($r=0,761$ και $p=0,001$). Στα ολικά βακτήρια, καθώς και στις υπόλοιπες ομάδες βακτηρίων που μελετήθηκαν, δεν παρατηρήθηκε στατιστική σημαντικότητα.

Πίνακας 8: Συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης φυτικών ινών και των βακτηρίων

	Ολικά βακτήρια	<i>Bifidobacterium</i>	<i>C.perfringens</i>	<i>F.prausnitzii</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Prevotella</i>
Συντελεστής συσχέτισης	0,018	-0,352	0,062	0,014	0,449	-0,027
P value	0,938	0,118	0,789	0,953	0,041	0,907

Επίσης, βρέθηκε μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας της ημερήσιας πρόσληψης φυτικών ινών και τον πληθυσμό των *Lactobacillus* ($r=0,449$ και $p=0,041$). Και σε αυτή την περίπτωση, δεν βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα μεταξύ φυτικών ινών – ολικών βακτηρίων και των άλλων ομάδων βακτηρίων που μελετήθηκαν.

5. Συζήτηση

Ο φαινότυπος του αυτισμού έχει από πίσω του μια πληθώρα αιτιών, γενετικών και περιβαλλοντικών, η κάθε μια απ τις οποίες συνεισφέρει με το δικό της πολύπλοκο τρόπο στο αποτέλεσμα. Τα αίτια είτε είναι περιβαλλοντικά και επιγενετικά είτε είναι γενετικά, δηλαδή σχετίζονται με κληρονομούμενα γονίδια που πήρε το παιδί απ' τους γονείς του. Όσον αφορά τη διατροφική συμπεριφορά των παιδιών με ΔΑΦ, βλέπουμε ότι υπάρχουν διαφοροποιήσεις ως προς τα αποτελέσματα άλλων μελετών, με άλλες να υποστηρίζουν διαφοροποιήσεις στην ενεργειακή πρόσληψη ή στην πρόσληψη κάποιων θρεπτικών συστατικών και άλλες να μην βρίσκουν σημαντικές διαφορές. Όσον αφορά τη σύσταση του εντερικού μικροβιόκοσμου, η βιβλιογραφία έχει εντοπίσει διαφορές στα παιδιά με ΔΑΦ σε επίπεδο γένους, είδους ή ακόμα και ομάδας βακτηρίων, αλλά και πάλι, όχι προς μία μόνο κατεύθυνση, προφανώς λόγω πολυπαραγοντισμού του συγκεκριμένου φαινοτύπου.

Η παρούσα εργασία διερευνά αν υπάρχουν διαφορές στην διαιτητική πρόσληψη και στον μικροβιόκοσμο των παιδιών με ΔΑΦ. Το δείγμα της μελέτης είναι 46 παιδιά εκ των οποίων τα 27 (58%) είναι διαγνωσμένα με ΔΑΦ ενώ τα υπόλοιπα 19 (42%) είναι ΦΑ. Από τα παιδιά με ΔΑΦ, ο μέσος όρος ηλικίας είναι κοντά στα 7 χρόνια, τα 20 είναι αγόρια και τα 7 κορίτσια, ενώ από τα ΦΑ παιδιά ο μέσος όρος ηλικίας είναι κοντά στα 6,5 χρόνια, τα 10 είναι αγόρια και τα 9 κορίτσια. Ο μέσος δείκτης μάζας σώματος στα παιδιά με ΔΑΦ βρέθηκε στα 17,5 Kg/m², ενώ στα ΦΑ παιδιά βρέθηκε 16 Kg/m². Δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά ανάμεσα στις δύο ομάδες όσον αφορά την ηλικία και το ΔΜΣ.

Τα παιδιά με ΔΑΦ βρέθηκε ότι κατανάλωναν μεγαλύτερο ποσοστό υδατανθράκων, μικρότερο ποσοστό λιπών, σε σχέση με τη συνολική ενεργειακή πρόσληψη, μικρότερη ποσότητα μονοακόρεστων λιπαρών οξέων, μικρότερο ποσοστό μονοακόρεστων λιπαρών οξέων ως προς τη συνολική ενεργειακή πρόσληψη, ελαφρά μικρότερη ποσότητα ασβεστίου και τέλος λίγο υψηλότερη ποσότητα βιταμίνης C.

Όσον αφορά το μικροβιόκοσμο των παιδιών με ΔΑΦ, το δείγμα αποτελείται από 21 δείγματα κοπράνων, 14 εκ των οποίων ήταν από παιδιά με ΔΑΦ και 7 από ΦΑ παιδιά. Μετρήθηκαν τα ολικά βακτήρια, τα βακτήρια του γένους *Bifidobacterium*, τα βακτήρια *Clostridium perfringens*, τα *Faecalibacterium prausnitzii*, η ομάδα των *Lactobacillus* και τα βακτήρια του γένους *Prevotella*, και εκφράστηκαν ως ο δεκαδικός λογάριθμος του

αριθμού των αντιγράφων του γονιδίου ανά γραμμάριο νωπών κοπράνων του παιδιού. Σε κανένα απ τους παραπάνω δείκτες δεν βρέθηκε να υπάρχει σημαντική διαφορά ανάμεσα στα παιδιά με ΔΑΦ και στα ΦΑ παιδιά.

Στη συνέχεια διερευνήθηκε αν υπάρχει συσχέτιση μεταξύ της ολικής ενεργειακής πρόσληψης και της πρόσληψης των διαιτητικών ινών με τους μικροοργανισμούς. Βρέθηκε ισχυρή θετική συσχέτιση μεταξύ των ημερήσιων θερμίδων που παίρνει το παιδί, και τον πληθυσμό των βακτηρίων που ανήκουν στην ομάδα του *Lactobacillus*, και βρέθηκε μέτρια θετική συσχέτιση μεταξύ της ποσότητας της ημερήσιας πρόσληψης φυτικών ινών και τον πληθυσμό πάλι των λακτοβακίλλων.

Συγκρίνοντας τα διατροφικά μας ευρήματα με μια μετά-ανάλυση όπου περιελάμβανε αποτελέσματα από 17 μελέτες, που δημοσιεύτηκαν σε περιοδικά επικεντρωμένα στις ΔΑΦ κυρίως δημοσιευμένες μετά το 2000 (135), παρατηρούμε τα εξής: Η συνολική ενεργειακή πρόσληψη δεν διέφερε στη μετά-ανάλυση, όπως και στη δική μας μελέτη, μεταξύ των παιδιών με ΔΑΦ και των ΦΑ παιδιών. Το ίδιο ισχύει και για τις διαιτητικές ίνες, στη μετά-ανάλυση δεν βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα, στη δική μας έρευνα ενώ στην αρχή βρέθηκε, όταν ελέγξαμε για τους συγχυτικούς παράγοντες ηλικία και φύλο, εξαφανίστηκε. Δεν βρέθηκε στατιστική σημαντικότητα για τη βιταμίνη C, ενώ εμείς λόγω του μεγέθους του δείγματος, δεχτήκαμε ότι υπάρχει μια ελαφρά διαφορά, με τα παιδιά με ΔΑΦ να έχουν ελαφρά μεγαλύτερη πρόσληψη. Ακόμα, στη μετά-ανάλυση βρέθηκε ότι τα παιδιά με ΔΑΦ είχαν στατιστικά σημαντική διαφορά στην κατανάλωση ολικών πρωτεϊνών ενώ στη δική μας μελέτη βρήκαμε μεγαλύτερη πρόσληψη υδατανθράκων, μικρότερη λιπών και παρόμοια πρόσληψη πρωτεϊνών. Τέλος, στη μετανάλυση βρέθηκε χαμηλότερη πρόσληψη ασβεστίου, στο οποίο συμφωνεί κι η δική μας μελέτη. Στο σημείο αυτό οφείλουμε να τονίσουμε ότι υπάρχει ποικιλία ευρημάτων στη βιβλιογραφία, πολλές φορές αντικρουόμενων μεταξύ τους. Για παράδειγμα σε μια άλλη έρευνα (32) παρατηρήθηκε χαμηλότερη μέση πρόσληψη ενέργειας, μέση πρόσληψη πρωτεΐνης, υδατανθράκων και λιπών, δηλαδή όλων των μακροθρεπτικών συστατικών της διατροφής του παιδιού. Σε μια άλλη έρευνα (36) βρέθηκε μικρότερη πρόσληψη βιταμίνης C ενώ στη δική μας περίπτωση βρήκαμε ελαφρά μεγαλύτερη πρόσληψη.

Ένα ακόμα συμπέρασμα, το οποίο δεν αφορά τα παιδιά με ΔΑΦ συγκεκριμένα, αλλά όλα τα παιδιά στην Ελλάδα, είναι ότι δεν βρέθηκε διαφορά στην κατανάλωση ζάχαρης και στο ποσοστό επί της συνολικής ενεργειακής πρόσληψης της ζάχαρης, οπότε το συμπέρασμα μπορεί να αναχθεί στο γενικό πληθυσμό. Η ημερήσια κατανάλωση

ζάχαρης βρέθηκε περίπου στα 85 γραμμάρια και το ποσοστό κοντά στο 18%. Αυτό μεταφράζεται σε πάνω από 16 κουταλάκια του γλυκού ζάχαρη τη μέρα, άλλο ένα αρνητικό στοιχείο για την διατροφική κατάσταση των παιδιών στην Ελλάδα.

Αναφορικά με τις διαφορές στο μικροβιόκοσμο στα παιδιά με ΔΑΦ βλέπουμε από τη βιβλιογραφία μειωμένα επίπεδα στα βακτήρια του γένους *Prevotella* (109, 137), υψηλότερα επίπεδα πληθυσμών στα *Clostridium* spp. (116), υψηλότερα επίπεδα της ομάδας των λακτοβακίλλων (136,138), χαμηλότερα επίπεδα των βακτηρίων του γένους *Bifidobacterium* (138). Κι άλλες πολλές έρευνες έχουν βρει διαφορές ανάμεσα στο μικροβιόκοσμο των παιδιών με ΔΑΦ και των ΦΑ παιδιών, με τα αποτελέσματα που αναπαράγονται περισσότερο να είναι ο μεγαλύτερος αριθμός Λακτοβακίλλων και Κλοστρίδιων κι ο μικρότερος αριθμός στα γένη *Bifidobacterium* και *Prevotella*. Παρόλα αυτά στη δική μας μελέτη δεν βρήκαμε διαφορές στις ποσότητες των βακτηρίων που μελετήσαμε μεταξύ των δυο ομάδων.

Όσον αφορά τους περιορισμούς της μελέτης μας, οφείλουμε να επισημάνουμε τους κυριότερους. Αρχικά, πρέπει να αναφέρουμε ότι το δείγμα της μελέτης ήταν σχετικά μικρό. Αυτό λόγω του ότι υπάρχει μια επιφυλακτικότητα απ την πλευρά των γονέων που έχουν παιδιά με αυτισμό, ως προς τη συμμετοχή σε μια ακόμη έρευνα. Επίσης ένας από τους περιορισμούς της έρευνας είναι ότι το δείγμα αποτελείται καθαρά από παιδιά που ζούνε στις περιοχές της Αττικής. Ένας περιορισμός στη μεθοδολογία ήταν η σχετική έκταση των ερωτηματολογίων, που στην προσπάθεια να καλύψουν τις απαραίτητες πληροφορίες που χρειάζονταν, έγιναν μια επιπλέον επιβάρυνση για το γονιό, που ήδη, στις περισσότερες των περιπτώσεων, είχε πολύ επιβαρυνμένη καθημερινότητα και λόγω του παιδιού. Όσον αφορά τη συλλογή κοπράνων, πρακτικός περιορισμός ήταν το παράθυρο των δυο ωρών μέσα στο οποίο το δείγμα έπρεπε να βρίσκεται στο εργαστήριο για να το επεξεργαστούμε. Είναι κατανοητό ότι από τη στιγμή που το παιδί πήγαινε να κάνει την κένωση, μέχρι να ενημερωθεί ο ερευνητής και να μεταφέρει το δείγμα στο εργαστήριο τα όρια ήταν πολύ στενά, ειδικά όταν η περιοχή διαμονής ήταν απομακρυσμένη. Ένας επιπλέον περιορισμός ήταν στη δυσκολία που επέφερε, ακόμα και σε ιδεαλιστικό επίπεδο, η σκέψη του ίδιου του δείγματος (κόπρανα), με μερικές φορές ο γονέας να μην θέλει να μπει στην όλη διαδικασία της συλλογής του δείγματος. Πολλές φορές το ίδιο το παιδί δεν ήθελε με κανένα τρόπο να αφοδεύσει μέσα στο ειδικό δοχείο συλλογής που δίναμε στους γονείς. Επιπροσθέτως, το μικρό δείγμα που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση του μικροβιόκοσμου των παιδιών με ΔΑΦ, είναι

πιθανό να μην επέτρεψε την ανάδειξη κάποιας ποσοτικής διαφοροποίησης στο μικροβιόκοσμο των παιδιών με ΔΑΦ, συγκριτικά με τα ΦΑ παιδιά.

Στα πλεονεκτήματα της έρευνας πρέπει να επισημάνουμε για ακόμα μια φορά, την ανάγκη που υπάρχει, απ την πλευρά των γονιών, να έχουν περισσότερη γνώση πάνω στις ιδιαιτερότητες του παιδιού τους, και σε αυτή την κατεύθυνση βρίσκεται και η παρούσα εργασία. Ένα από τα κύρια πλεονεκτήματα της έρευνας αυτής, είναι ότι μαζί με την καταγραφή της διατροφικής πρόσληψης του παιδιού, έγινε και συλλογή μιας ολικής κένωσης στις ίδιες μέρες που έγινε κι η καταγραφή, κι έτσι τα αποτελέσματα της διατροφικής πρόσληψης μπορούν να μπουν σε ένα κοινό πυλώνα σκέψης μαζί με τα αποτελέσματα από το μικροβιόκοσμο των παιδιών. Όσον αφορά τη διατροφή στη δική μας περίπτωση, είδαμε ότι τα παιδιά με ΔΑΦ είχαν μεγαλύτερη κατανάλωση σε υδατάνθρακες και λιγότερη σε μονοακόρεστα λιπαρά οξέα. Αυτό δείχνει πιθανότατα ότι το παιδί καταναλώνει λιγότερα σπιτικά γεύματα, και περισσότερα τυποποιημένα. Είναι πιθανό ο γονιός να προσπαθεί να ευχαριστήσει το παιδί του με αυτό τον τρόπο παρόλο που είναι βλαβερός. Έρευνες όπως αυτή που δείχνουν την διατροφική κατάσταση του παιδιού, έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να κρούσουν τον κώδωνα του κινδύνου στους γονείς, και να τους κάνει να αναζητήσουν άλλους τρόπους να κάνουν χαρούμενα τα παιδιά τους. Ένα ακόμα πλεονέκτημα ήταν ότι στην έρευνα αυτή έγινε καταγραφή της συνήθους διατροφικής πρόσληψης του παιδιού, και έτσι τα δεδομένα που εξήχθησαν αντικατοπτρίζουν μια συνολική εικόνα διατροφής.

Ατενίζοντας τη μελλοντική κλινική πράξη, θα πρέπει να γίνεται πλήρης διατροφική καταγραφή στα παιδιά με ΔΑΦ, όταν επισκέπτονται το νοσοκομείο για τις καθιερωμένες εξετάσεις τους. Η βοήθεια που παίρνει ο γονιός, ακόμα κι από την γνώση του σε πιο πλαίσιο κινείται η διατροφή του παιδιού του σε επίπεδο μακρο- και μικρο- θρεπτικών συστατικών είναι πολύ σημαντική. Ακόμα θα πρέπει να υπάρχει κάποια βοήθεια από διαιτολόγο και παιδίατρο, για το πώς μπορεί να αλλάξουν κάποια στοιχεία της διατροφής του παιδιού με ΔΑΦ, ιδιαίτερα σε παιδιά που παρουσιάζουν έντονα διαταραγμένη διατροφική συμπεριφορά. Τέλος, είναι απαραίτητο να υπάρχει σοβαρή ενημέρωση στους γονείς από διαιτολόγους για να μην εξαπατώνται από τη βιομηχανία συμπληρωμάτων διατροφής, και να αναζητούν τις διατροφικές τους λύσεις στο φυσικό τους χώρο, στα γεύματα που ακολουθούν την ισορροπημένη διατροφή.

Όσον αφορά τη μελλοντική έρευνα, οι διατροφικές ιδιαιτερότητες ενός παιδιού με ΔΑΦ πρέπει να συγκεκριμενοποιηθούν, κι έτσι να προσφερθούν ως γνώση στους γονείς για

να αποκομίσουν κάποια οφέλη για το παιδί τους. Όσον αφορά τη μελέτη πάνω στο μικροβιόκοσμο των παιδιών με ΔΑΦ, είναι σημαντικό να διερευνηθεί και να εξακριβωθεί, πιο μέρος του ολικού φαινοτύπου των συμπεριφορών του αυτισμού, επηρεάζει ο μικροβιόκοσμος και οι αλλαγές του. Θα μπορούσαμε τροποποιώντας το μικροβιόκοσμο του παιδιού, ακόμα και στο επίπεδο μιας ομάδας βακτηρίων, να έχουμε κάποια επίδραση σε προβληματικούς φαινοτύπους που είναι συνδεδεμένοι με τις ΔΑΦ. Ακόμα, σκεφτόμενοι ότι ο επιπολασμός των ΔΑΦ αυξάνεται παγκοσμίως, κι ότι αυτό άρα είναι πολύ πιθανό να οφείλεται σε αλλαγές στον τρόπο ζωής, όπως η διατροφή, είναι αναγκαίο πέρα από τις διατροφικές έρευνες στα ίδια τα παιδιά, να γίνουν διατροφικές έρευνες και στις μητέρες κατά την περίοδο της εγκυμοσύνης. Να ελεγχθεί, έτσι, αν υπάρχει κάποια σχέση μεταξύ της χαμηλής πρόσληψης σε βιταμίνες ή/και άλλα θρεπτικά στοιχεία της μητέρας με την εμφάνιση ενός παιδιού με ΔΑΦ.

Βιβλιογραφία

1. Frith, J. «Αυτισμός, εξηγώντας το αίνιγμα». Ελληνικά Γράμματα. 1999
2. Cermak SA, Curtin C, Bandini LG. Food selectivity and sensory sensitivity in children with autism spectrum disorders. *Journal of the American Dietetic Association*. 2010; 110(2):238-246. doi:10.1016/j.jada.2009.10.032.
3. <http://autismhellas.gr/fasma/index.htm><http://autismhellas.gr/fasma/index.htm>
4. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/autism-spectrum-disorders/en/>
5. <http://www.autismgreece.gr>
6. Wu S, et al. Advanced parental age and autism risk in children: a systematic review and meta-analysis. *Acta Psychiatr Scand*. 2017; 135(1):29–41.
7. Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Prenatal risk factors for autism: comprehensive meta-analysis. *Br J Psychiatry*. 2009; 195(1):7–14.
8. Gardener H, Spiegelman D, Buka SL. Perinatal and neonatal risk factors for autism: a comprehensive meta-analysis. *Pediatrics*. 2011; 128(2):344–55.
9. Kancherla V, Dennis LK. A meta-analysis of prenatal, perinatal, and neonatal risks for autism. *Am J Epidemiol*. 2006; 163(11):S20.
10. Kolevzon A, Gross R, Reichenberg A. Prenatal and perinatal risk factors for autism: a review and integration of findings. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2007; 161(4):326–33.
11. Curran EA, et al. Research review: birth by caesarean section and development of autism spectrum disorder and attention-deficit/hyperactivity disorder: a systematic review and meta-analysis. *J Child Psychol Psychiatry*. 2015; 56(5):500–8.
12. Conde-Agudelo A, Rosas-Bermudez A, Norton MH. Birth spacing and risk of autism and other neurodevelopmental disabilities: a systematic review. *Pediatrics*. 2016; 137(5)
13. Jiang HY, et al. Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: a systematic review and meta-analysis. *Brain Behav Immun*. 2016; 58:165–72.
14. Wu S, et al. Family history of autoimmune diseases is associated with an increased risk of autism in children: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2015; 55:322–32.
15. Gentile S. Risks of neurobehavioral teratogenicity associated with prenatal exposure to valproate monotherapy: a systematic review with regulatory repercussions. *Cns Spectrums*. 2014; 19(4):305–15.
16. Rosen BN, et al. Maternal smoking and autism spectrum disorder: a metaanalysis. *J Autism Dev Disord*. 2015; 45(6):1689–98.
17. De la Torre-Ubieta L, Won H, Stein JL, et al. Advancing the understanding of autism disease mechanisms through genetics. *Nature Medicine*. 2016; 22: 345–361.
18. Devlin B, Scherer SW. Genetic architecture in autism spectrum disorder. *Curr Opin Genet Dev*. 2012; 22: 229–37.
19. Pinto D, Pagnamenta AT, Klei L, et al. Functional impact of global rare copy number variation in autism spectrum disorders. *Nature*. 2010; 466: 368–72.
20. Pinto D, Delaby E, Merico D, et al. Convergence of genes and cellular pathways dysregulated in autism spectrum disorders. *Am J Hum Genet*. 2014; 94: 677–94.
21. Anney R, Klei L, Pinto D, et al. Individual common variants exert weak effects on the risk for autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet*. 2012; 21: 4781–92.
22. Anney R, Klei L, Pinto D, et al. A genome-wide scan for common alleles affecting risk for autism. *Hum Mol Genet*. 2010; 19: 4072–82.
23. Wang K, Zhang H, Ma D, et al. Common genetic variants on 5p14.1 associate with autism spectrum disorders. *Nature*. 2009; 459: 528–33.
24. Autism Spectrum Disorders Working Group of the Psychiatric Genomics C. Meta-analysis of GWAS of over 16,000 individuals with autism spectrum disorder highlights a novel locus at 10q24.32 and a significant overlap with schizophrenia. *Mol Autism*. 2017; 8: 21.
25. Grove J, Ripke S, Als TD, et al. Common risk variants identified in autism spectrum disorder. *BioRxiv*. 2017; 224774.
26. Lowther C, Speevak M, Armour CM, et al. Molecular characterization of NRXN1 deletions from 19,263 clinical microarray cases identifies exons important for neurodevelopmental disease expression. *Genet Med*. 2017; 19:53–61.
27. Zhang, Z., S. Li, et al. "Polymorphisms in Vitamin D Receptor Genes in Association with Childhood Autism Spectrum Disorder." *Dis Markers*. 2018; 11(7862892).
28. Ozonoff S, Young GS, Carter A, et al. Recurrence risk for autism spectrum disorders: a Baby Siblings Research Consortium study. *Pediatrics*. 2011; 128: e488–95.
29. Rubenstein, E., L. D. Wiggins, et al. "Associations between parental broader autism phenotype and child autism spectrum disorder phenotype in the Study to Explore Early Development." *Autism*. 2018; 1.
30. Bolton P, Macdonald H, Pickles A, et al. A case-control family history study of autism. *Journal of Child Psychology and Psychiatry, and Allied Disciplines*. 1994; 35: 877–900.
31. Sucksmith E, Roth I and Hoekstra RA. Autistic traits below the clinical threshold: re-examining the broader autism phenotype in the 21st century. *Neuropsychology Review*. 2011; 21: 360–389.
32. Sidrak S, Yoong T, Woolfenden S. Iron deficiency in children with global developmental delay and autism spectrum disorder. *J Paediatr Child Health*. 2014 May; 50(5):356-61
33. Liu, X., J. Liu, et al. "Correlation between Nutrition and Symptoms: Nutritional Survey of Children with Autism Spectrum Disorder in Chongqing, China." *Nutrients*. 2016; 8(5).
34. Liu X, Liu J, Xiong X, et al. Correlation between Nutrition and Symptoms: Nutritional Survey of Children with Autism Spectrum Disorder in Chongqing, China. *Nutrients*. 2016; 8(5):294. doi:10.3390/nu8050294.\

35. Lockner, D. W., T. K. Crowe, et al. "Dietary intake and parents' perception of mealtime behaviors in preschool-age children with autism spectrum disorder and in typically developing children." *J Am Diet Assoc.* 2008; 108(8): 1360-1363.
36. Hyman, S. L., P. A. Stewart, et al. "Nutrient intake from food in children with autism." *Pediatrics.* 2012; 130(2): 2012-0900L.
37. Evans, E. W., A. Must, et al. "Dietary Patterns and Body Mass Index in Children with Autism and Typically Developing Children." *Res Autism Spectr Disord.* 2012; 6(1): 399-405.
38. Curtin, C., M. Jovic, et al. "Obesity in children with autism spectrum disorder." *Harv Rev Psychiatry.* 2014; 22(2): 93-103.
39. Yu Y, Zhu H, Miller DT, et al. Age- and gender-dependent obesity in individuals with 16p11.2 deletion. *Journal of genetics and genomics = Yi chuan xue bao.* 2011; 38(9):403–9.10.1016/j.jgg. 2011.08.003
40. Shinawi M, Sahoo T, Maranda B, et al. 11p14.1 microdeletions associated with ADHD, autism, developmental delay, and obesity. *American journal of medical genetics Part A.* 2011; 155A(6): 1272–80.10.1002/ajmg.a.33878
41. Kitsiou-Tzeli S, Tzetzis M, Sofocleous C, et al. De novo interstitial duplication of the 15q11.2-q14 PWS/AS region of maternal origin: Clinical description, array CGH analysis, and review of the literature. *American journal of medical genetics Part A.* 2010; 152A(8):1925–32.10.1002/ajmg.a. 33447
42. Siegel M. Psychopharmacology of autism spectrum disorder: evidence and practice. *Child and adolescent psychiatric clinics of North America.* 2012; 21(4):957–73.10.1016/j.chc.2012.07.006
43. Must A, Parisi SM. Sedentary behavior and sleep: paradoxical effects in association with childhood obesity. *International journal of obesity (2005).* 2009; 33(Suppl 1):S82–6.10.1038/ijo. 2009.23
44. Gail Williams P, Sears LL, Allard A. Sleep problems in children with autism. *Journal of sleep research.* 2004; 13(3):265–8.10.1111/j.1365-2869.2004.00405.x
45. Spiegel K, Tasali E, Penev P, Van Cauter E. Brief communication: Sleep curtailment in healthy young men is associated with decreased leptin levels, elevated ghrelin levels, and increased hunger and appetite. *Annals of Internal Medicine.* 2004; 141:846–850.
46. Råstam M, Täljemark J, Tajnia A, et al. Eating Problems and Overlap with ADHD and Autism Spectrum Disorders in a Nationwide Twin Study of 9- and 12-Year-Old Children. *The Scientific World Journal.* 2013;2013:315429. doi:10.1155/2013/315429.
47. Sharp WG, Berry RC, McCracken C, Nuhu NN, Marvel E, Saulnier CA, Klin A, Jones W, Jaquess DL. Feeding problems and nutrient intake in children with autism spectrum disorders: a meta-analysis and comprehensive review of the literature. *J Autism Dev Disord.* 2013 Sep; 43(9):2159-73.
48. Bandini LG, Anderson SE, Curtin C, Cermak S, Evans EW, Scampini R, Maslin M, Must A. Food selectivity in children with autism spectrum disorders and typically developing children. *J Pediatr.* 2010 Aug; 157(2):259-64
49. Zimmer MH, Hart LC, Manning-Courtney P, Murray DS, Bing NM, Summer S. Food variety as a predictor of nutritional status among children with autism. *J Autism Dev Disord.* 2012 Apr; 42(4):549-56
50. Schreck KA, Williams K. Food preferences and factors influencing food selectivity for children with autism spectrum disorders. *Res Dev Disabil.* 2006 Jul-Aug; 27(4):353-63.
51. Evans EW, Must A, Anderson SE, Curtin C, Scampini R, Maslin M, Bandini L. Dietary Patterns and Body Mass Index in Children with Autism and Typically Developing Children. *Res Autism Spectr Disord.* 2012; 6(1):399-405
52. Williams PG, Dalrymple N, Neal J. Eating habits of children with autism. *Pediatr Nurs.* 2000 May-Jun; 26(3):259-64.
53. Rogers LG, Magill-Evans J, Rempel GR. Mothers' Challenges in Feeding their Children with Autism Spectrum Disorder- Managing More Than Just Picky Eating. *J Dev Phys Disabil.* 2012; 24(1):19–33.
54. Whiteley P, Rodgers J, Shattock P. Feeding patterns in autism. *Autism.* 2000; 4:207–211.
55. Cornish E. A balanced approach towards healthy eating in autism. *J Hum Nutr Diet.* 1998;11(6):501–509.
56. Hubbard, K. L., S. E. Anderson, et al. "A comparison of food refusal related to characteristics of food in children with autism spectrum disorder and typically developing children." *J Acad Nutr Diet.* 2014; 114(12): 1981-1987.
57. Kawicka, A. and B. Regulska-Ilow. "How nutritional status, diet and dietary supplements can affect autism. A review." *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2013; 64(1): 1-12
58. Evangelidou A., Vlachonikolis I., Mihailidou H. et al.: Application of a ketogenic diet in children with autistic behaviour: pilot study. *J. Child. Neurol.* 2003, 18, 113- 118
59. Piwowarczyk, A., Horvath, A., Łukasik, J. et al. *Eur J Nutr.* 2018; 57: 433. <https://doi.org/10.1007/s00394-017-1483-2>
60. Gottschall E.: Digestion-gut-autism connection: the specific carbohydrate diet. *Med. Veritas.* 2004; 1, 261-271
61. Robertson W.G.: Role of dietary intake and intestinal absorption of oxalate in calcium stone formation. *Nephron. Physiol.* 2004; 98, 64-71.
62. James S.J., Cutler P., Melnyk S., Jernigan S., Janak L., Gaylor D.W., Neubrandner J.A. Metabolic biomarkers of increased oxidative stress and impaired methylation capacity in children with autism. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004; 80:1611–1617. doi: 10.1093/ajcn/80.6.1611.
63. James, S.J.; Melnyk, S.; Jernigan, S.; Cleves, M.A.; Halsted, C.H.; Wong, D.H.; Cutler, P.; Bock, K.; Boris, M.; Bradstreet, J.J.; et al. Metabolic endophenotype and related genotypes are associated with oxidative stress in children with autism. *Am. J. Med. Genet. Neuropsychiatr. Genet.* 2006; 141, 947–956.
64. Adams JB, Audhya T, Geis E, et al. Comprehensive Nutritional and Dietary Intervention for Autism Spectrum Disorder—A Randomized, Controlled 12-Month Trial. *Nutrients.* 2018;10(3):369. doi:10.3390/nu10030369.
65. Adams, J.B.; Audhya, T.; McDonough-Means, S.; Rubin, R.A.; Quig, D.; Geis, E.; Gehn, E.; Loresto, M.; Mitchell, J.; Atwood, S.; et al. Effect of a Vitamin/Mineral Supplement on Children and adults with Autism. *BMC Pediatr.* 2011; 11, 111.
66. Mazahery, H.; Stonehouse, W.; Delshad, M.; Kruger, M.C.; Conlon, C.A.; Beck, K.L.; von Hurst, P.R. Relationship between Long Chain n-3 Polyunsaturated Fatty Acids and Autism Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control and Randomised Controlled Trials. *Nutrients.* 2017; 9, 155.
67. Adams, J.B.; Audhya, T.; McDonough-Means, S.; Rubin, R.A.; Quig, D.; Geis, E.; Gehn, E.; Loresto, M.; Mitchell, J.; Atwood, S.; et al. Nutritional and Metabolic Status of Children with Autism vs. Neurotypical Children, and the Association with Autism Severity. *Nutr. Metab.* 2011; 8, 34.

68. Waring, R.H.; Ngong, J.M.; Klovsra, L.; Green, S. Sharp, H. Biochemical Parameters in Autistic Children. *Dev. Brain Dysfunct.* 1997; 10, 40–43.
69. Geier, D.A.; Kern, J.K.; Garver, C.R.; Adams, J.B.; Audhya, T.; Geier, M.R. A prospective study of transsulfuration biomarkers in autistic disorders. *Neurochem. Res.* 2009; 34, 386–393. Erratum in *Neurochem. Res.* 2009, 34, 394.
70. Waring, R.H.; Klovsra, L.V. Sulfur Metabolism in Autism. *J. Nutr. Environ. Med.* 2000; 10, 25–32.
71. Geier, D.A.; Kern, J.K.; Davis, G.; King, P.G.; Adams, J.B.; Young, J.L.; Geier, M.R. A prospective double-blind, randomized clinical trial of levocarnitine to treat autism spectrum disorders. *Med. Sci. Monit.* 2011; 17, P115–P123.
72. 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. Evaluation, diagnosis, and treatment of gastrointestinal disorders in individuals with ASDs: A consensus report. *Pediatrics.* 2010; 125 (Suppl. 1), S1–S18.
73. Adams, J.B.; Johansen, L.J.; Powell, L.D.; Quig, D.; Rubin, R.A. Gastrointestinal Flora and Gastrointestinal Status in Children with Autism—Comparisons to Neurotypical Children and Correlation with Autism Severity. *BMC Gastroenterol.* 2011; 11, 22.
74. Kang, D.W.; Adams, J.B.; Gregory, A.C.; Borody, T.; Chittick, L.; Fasano, A.; Khoruts, A.; Geis, E.; Maldonado, J.; McDonough-Means, S.; et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: An open-label study. *Microbiome.* 2017; 5, 10.
75. De Magistris, L.; Picardi, A.; Siniscalco, D.; Riccio, M.P.; Sapone, A.; Cariello, R.; Abbadessa, S.; Medici, N.; Lammers, K.M.; Schiraldi, C.; et al. Antibodies against Food Antigens in Patients with Autistic Spectrum Disorders. *BioMed Res. Int.* 2013; 1–11.
76. Iovene, M.R.; Bombace, F.; Maresca, R.; Sapone, A.; Iardino, P.; Picardi, A.; Marotta, R.; Schiraldi, C.; Siniscalco, D.; Serra, N.; et al. Intestinal Dysbiosis and Yeast Isolation in Stool of Subjects with Autism Spectrum Disorders. *Mycopathologia.* 2016; 182, 349–363.
77. Yang, Y.; J. Tian, et al. "Targeting gut microbiome: A novel and potential therapy for autism." *Life Sci.* 2018; 194: 111–119.
78. A.S. Neish, Microbes in gastrointestinal health and disease, *Gastroenterology.* 2018; 136 (2009) 65–80, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2008.10.080>.
79. Y. Belkaid, S. Naik, Compartmentalized and systemic control of tissue immunity by commensals, *Nat. Immunol.* 14. 2013; 646–653, <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2604>.
80. G.P. Donaldson, S.M. Lee, S.K. Mazmanian, Gut biogeography of the bacterial microbiota, *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 14 20–32, <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3552>.
81. J.L. Round, S.K. Mazmanian, The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease, *Nat. Rev. Immunol.* 2009; 9 313–324, <http://dx.doi.org/10.1038/nri2515>.
82. C.A. Lopez, D.D. Kingsbury, E.M. Velazquez, A.J. Bäumlér, Collateral damage: microbiota-derived metabolites and immune function in the antibiotic era, *Cell Host Microbe.* 2014; 16 156–163, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2014.07.009>.
83. P. Hemarajata, J. Versalovic, Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation, *Ther. Adv. Gastroenterol.* 2013; 6 39–51, <http://dx.doi.org/10.1177/1756283X12459294>.
84. S.M. Collins, P. Bercik, The relationship between intestinal microbiota and the central nervous system in normal gastrointestinal function and disease, *Gastroenterology.* 2009; 136 2003–2014, <http://dx.doi.org/10.1053/j.gastro.2009.01.075>.
85. Y. Wang, L.H. Kasper, The role of microbiome in central nervous system disorders, *Brain Behav. Immun.* 2014; 38 1–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.015>.
86. M.T. Bailey, S.E. Dowd, J.D. Galley, A.R. Hufnagle, R.G. Allen, M. Lyte, Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation, *Brain Behav. Immun.* 2011; 25 397–407, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2010.10.023>.
87. M. Carabotti, A. Scirocco, M.A. Maselli, C. Severi, The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems, *Ann. Gastroenterol.* 2015; 28 203–209, <http://dx.doi.org/10.1038/ajgsup.2012.3>.
88. S. Macfarlane, J.F. Dillon, Microbial biofilms in the human gastrointestinal tract, *J. Appl. Microbiol.* 2007; 102 1187–1196, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03287.x>.
89. A.V. Golubeva, S. Crampton, L. Desbonnet, D. Edge, O. O'Sullivan, K.W. Lomasney, et al., Prenatal stress-induced alterations in major physiological systems correlate with gut microbiota composition in adulthood, *Psychoneuroendocrinology.* 2015; 60 58–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.psyneuen.2015.06.002>.
90. A.J. Park, J. Collins, P.A. Blennerhassett, J.E. Ghia, E.F. Verdu, P. Bercik, et al., Altered colonic function and microbiota profile in a mouse model of chronic depression, *Neurogastroenterol. Motil.* 2013; 25 <http://dx.doi.org/10.1111/nmo.12153>.
91. Horvath, K., & Perman, J. A. Autistic disorder and gastrointestinal disease. *Current Opinion in Pediatrics.* 2002; 14, 583–587.
92. Black, C., Kaye, J. A., & Jick, H. Relation of childhood gastrointestinal disorders to autism: Nested casecontrol study using data from the UK. *General Practice Research Database. British Medical Journal.* 2002; 325, 419–421.
93. Goldberg, E. A. "The link between gastroenterology and autism." *Gastroenterol Nurs.* 2004; 27(1): 16–19.
94. Wakefield, A. J., Murch, S.H., Anthony, A., Linnell, J., Cassou, D. M., Malik, M., et al. Ileal-lymphoidnodular hyperplasia, non-specific colitis, and pervasive developmental disorder in children. *Lancet.* 1998; 351, 637–641.
95. Wakefield, A. J., Anthony, A., Murch, S. H., Thomson, M., Montgomery, S. M., Davies, S., et al. Enterocolitis in children with developmental disorders. *American Journal of Gastroenterology.* 2000; 95 2285–2295.
96. Horvath, K., Papadimitriou, J. C., Rabsztyan, A., Drachenberg, C., & Tildon, J. T. Gastrointestinal abnormalities in children with autistic disorder. *Journal of Pediatrics.* 1999; 135, 559–563.
97. D'Eufemia, P., Celli, M., Finocchiaro, R., Pacifico, L., Viozzi, L., Zaccagnini, M., et al. Abnormal intestinal permeability in children with autism. *Acta Paediatrica.* 1996; 85, 1076–1079.
98. Horvath, K., & Perman, J. A. Autistic disorder and gastrointestinal disease. *Current Opinion in Pediatrics.* 2002; 14, 583–587.
99. Torrente, F., Ashwood, P., Day, R., Machado, N., Furlano, R., Anthony, A., et al. Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Molecular Psychiatry.* 2002; 7, 375–382.
100. Weizman, A., Weizman, R., Szekely, G. A. Abnormal immune response to brain tissue antigen in the syndrome of autism. *American Journal of Psychiatry.* 1982; 139, 1462–1465.

101. Singh, V. K., Lin, S. X., & Yang, V. C. Serological association of measles virus and human herpesvirus-6 with brain autoantibodies in autism. *Clinical Immunologic Immunopathology*. 1998; 89, 105-107.
102. Kerneis, S., Bogdanova, A., Kraehenbuhl, J. P., & Pringault, E. Conversion of Peyer's patch lymphocytes of human enterocytes into M cells that transport bacteria. *Science*. 1997; 277, 949-952.
103. Reichelt, K. L., Ekrein, J., & Scott, H. Gluten, milk proteins and autism: Dietary intervention effects on behavior and peptide secretion. *Journal of Applied Nutrition*. 1990; 42, 1-11.
104. O. Zerbo, A.M. Iosif, C. Walker, S. Ozonoff, R.L. Hansen, I. Hertz-Picciotto, Is maternal influenza or fever during pregnancy associated with autism or developmental delays? Results from the CHARGE (childhood autism risks from genetics and environment) study, *J. Autism Dev. Disord.* 2013; 43 25–33, <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-012-1540-x>.
105. N.V. Malkova, C.Z. Yu, E.Y. Hsiao, M.J. Moore, P.H. Patterson, Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism, *Brain Behav. Immun.* 2012; 26 607–616, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2012.01.011>.
106. B.K. Lee, C. Magnusson, R.M. Gardner, Å. Blomström, C.J. Newschaffer, I. Burstyn, et al., Maternal hospitalization with infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders, *Brain Behav. Immun.* 2015; 44 100–105, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbi.2014.09.001>.
107. E.L. Sullivan, E.K. Nosen, K.A. Chamblou, K.L. Grove, The impact of maternal high-fat diet consumption on neural development and behavior of offspring, *Int. J. Obes. Suppl.* 2012; 2 S7–S13, <http://dx.doi.org/10.1038/ijosup.2012.15>.
108. P.H. Patterson, Maternal infection and immune involvement in autism, *Trends Mol. Med.* 2011; 17 389–394, <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.001>.
109. D.W. Kang, J.G. Park, Z.E. Ilhan, G. Wallstrom, J. LaBaer, J.B. Adams, et al., Reduced incidence of prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children, *PLoS One*. 2013; 8 <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0068322>.
110. S.M. Finegold, D. Molitoris, Y. Song, C. Liu, M. Vaisanen, E. Bolte, et al., Gastrointestinal microflora studies in late-onset autism, *Clin. Infect. Dis.* 2002; 35 S6–S16, <http://dx.doi.org/10.1086/341914>.
111. Tomova, V. Husarova, S. Lakatosova, J. Bakos, B. Vlкова, K. Babinska, et al., Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia, *Physiol. Behav.* 2015; 138 179–187, <http://dx.doi.org/10.1016/j.physbeh.2014.10.033>.
112. S.M. Finegold, S.E. Dowd, V. Gontcharova, C. Liu, K.E. Henley, R.D. Wolcott, et al., Pyrosequencing study of fecal microflora of autistic and control children, *Anaerobe*. 2010; 16 444–453, <http://dx.doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.06.008>.
113. B.L. Williams, M. Hornig, T. Parekh, W. Ian Lipkin, Application of novel PCR-based methods for detection, quantitation, and phylogenetic characterization of *Sutterella* species in intestinal biopsy samples from children with autism and gastrointestinal disturbances, *MBio*. 2012; 3 1–11, <http://dx.doi.org/10.1128/mBio.00261-11>.
114. S.M. Finegold, Therapy and epidemiology of autism-clostridial spores as key elements, *Med. Hypotheses*. 2008; 70 508–511, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2007.07.019>.
115. H.T. Ding, Y. Taur, J.T. Walkup, Gut microbiota and autism: key concepts and findings, *J. Autism Dev. Disord.* 2016; 0 (1–10, <http://dx.doi.org/10.1007/s10803-016-2960-9>.
116. Y. Song, C. Liu, S.M. Finegold, Real-time PCR quantitation of clostridia in feces of autistic children, *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70 6459–6465, <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.70.11.6459-6465.2004>.
117. H.M.R.T. Parracho, M.O. Bingham, G.R. Gibson, A.L. McCartney, Differences between the gut microflora of children with autistic spectrum disorders and that of healthy children, *J. Med. Microbiol.* 2005; 54 987–991, <http://dx.doi.org/10.1099/jmm.0.46101-0>.
118. E.R. Bolte, Autism and clostridium tetani, *Med. Hypotheses*. 1998; 51 133–144, [http://dx.doi.org/10.1016/S0306-9877\(98\)90107-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0306-9877(98)90107-4).
119. P.A. Efron, J.E. Mazuski, Clostridium difficile colitis, *Surg. Clin. North Am.* 2009; 89 483–500, <http://dx.doi.org/10.1016/j.suc.2008.09.014>.
120. J. McLaughlin, K.A. Grant, Clostridium botulinum and Clostridium perfringens. 2007; pp. 41–78, http://dx.doi.org/10.1007/978-1-59745-501-5_3.
121. R.H. Sandler, S.M. Finegold, E.R. Bolte, C.P. Buchanan, A.P. Maxwell, M.- L. Vaisanen, et al., Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism, *J. Child Neurol.* 2000; 15 429–435, <http://dx.doi.org/10.1177/088307380001500701>.
122. K. Lu, R. Mahbub, J.G. Fox, Xenobiotics: interaction with the intestinal microflora, *ILAR J.* 2015; 56 218–227, <http://dx.doi.org/10.1093/ilar/ilv018>.
123. Sandhu, B., C. Steer, et al. "The early stool patterns of young children with autistic spectrum disorder." *Arch Dis Child* 2009; 94(7): 497-500.
124. Turunen K, Tsouvelakidou E, Nomikos T et al. Impact of beta-glucan on the faecal microbiota of polypectomized patients: a pilot study. *Anaerobe*. 2011; 17, 403-406.
125. Yu Z and Morrison M. Improved extraction of PCR-quality community DNA from digesta and fecal samples. *Biotechniques*. 2004; 36, 808-812.
126. Salonen A, Nikkilä J, Jalanka-Tuovinen J, Immonen O, Rajilić-Stojanović M, Kekkonen RA, Palva A, de Vos WM Comparative analysis of fecal DNA extraction methods with phylogenetic microarray: effective recovery of bacterial and archaeal DNA using mechanical cell lysis. *J Microbiol Methods*. 2010; 81, 127-134.
127. Mitsou EK, Kakali A, Antonopoulou S, Mountzouris KC, Yannakoulia M, Panagiotakos DB, Kyriacou A. Adherence to the Mediterranean diet is associated with the gut microbiota pattern and gastrointestinal characteristics in an adult population. *Br J Nutr*. 2017; 117, 1645-1655.
128. Feng J, Tang H, Li M et al. The abundance of fecal Faecalibacterium prausnitzii in relation to obesity and gender in Chinese adults. *Arch Microbiol*. 2014; 196, 73-77.
129. Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J et al. Development of 16S rRNA-gene-targeted group-specific primers for the detection and identification of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol*. 2002; 68, 5445-5451.
130. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA et al. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*. 2002; 148, 257-266.

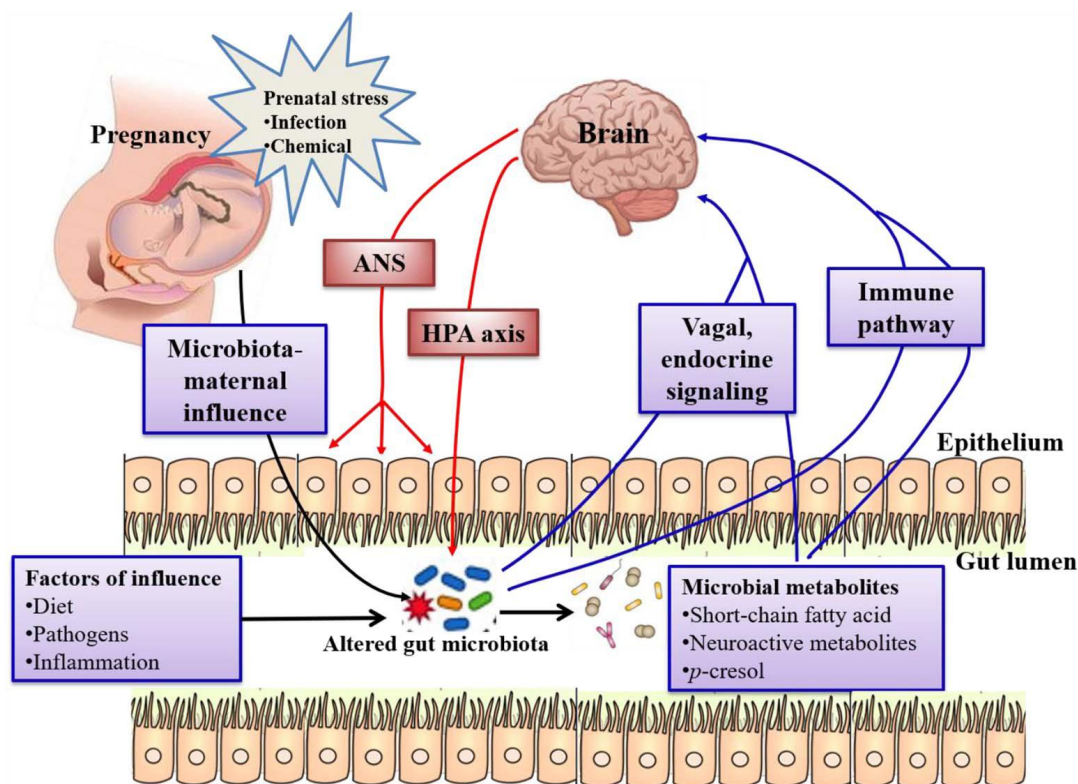
131. Phong SF, Shanmugavelu S, Thayalini K et al. Detection of *Lactobacillus*, *Bacteroides* and *Clostridium perfringens* in the gastrointestinal contents of chicken fed different diets by real-time PCR. *J Trop Agric and Fd Sc.* 2010; 38, 81-87.
132. Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E et al. Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2004 97, 1166-1177.
133. Suau A, Rochet V, Sghir A et al. *Fusobacterium prausnitzii* and related species represent a dominant group within the human fecal flora. *Syst Appl Microbiol.* 2001; 24, 139-145.
134. Wang RF, Cao WW & Cerniglia CE. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62,1242-1247.
135. Sharp, W. G., R. C. Berry, et al. "Feeding problems and nutrient intake in children with autism spectrum disorders: a meta-analysis and comprehensive review of the literature." *J Autism Dev Disord.* 2013; 43(9): 2159-2173.
136. Tomova A, Husarova V, Lakatosova S, Bakos J, Vlkova B, Babinska K, and Ostatnikova D. Gastrointestinal microbiota in children with autism in Slovakia. *Physiol Behav.* 2015; 138:179–187.
137. Kang DW, Park JG, Ilhan ZE, Wallstrom G, Labaer J, Adams JB, and Krajmalnik-Brown R. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS ONE.* 2013; 8:e68322.
138. Sandler RH, Finegold SM, Bolte ER, Buchanan CP, Maxwell AP, Väisänen ML, Nelson MN, and Wexler HM. Short-term benefit from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. *J Child Neurol.* 2000; 15:429–435.

Παράρτημα – Πίνακες και εικόνες

Πίνακας 1: Αναφερόμενη άρνηση του τροφίμου βασισμένη στα χαρακτηριστικά του μεταξύ παιδιών με ΔΑΦ και ΦΑ παιδιών				
Χαρακτηριστικά του τροφίμου	Παιδιά με ΔΑΦ	Παιδιά χωρίς ΔΑΦ	P-value	
Σύσταση/υφή	41 (77%)	21 (36%)	<0,0001	
Αναμεμιγμένα φαγητά	24 (45%)	15 (26%)	0,03	
Θερμοκρασία	16 (30%)	15 (26%)	0,47	
Τα φαγητά να ακουμπάνε άλλα φαγητά	11 (21%)	10 (17%)	0,64	
Χρώμα	8 (15%)	7 (12%)	0,64	
Μάρκα	8 (15%)	1 (2%)	0,01	
Σχήμα	6 (11%)	1 (2%)	0,05	
3 ή παραπάνω απ τα από πάνω	19 (36%)	9 (16%)	0,01	
Κανένα απ τα παραπάνω	5 (9%)	23 (40%)	0,0003	

Πίνακας 2: Μελέτες ιστοπαθολογίας του ΓΣ σε παιδιά με ΔΑΦ				
Ερευνητές	Έτος	Δείγμα και δοκιμασία	Αποτελέσματα	
Wakefield et al.	1998	N = 12 με ΔΑΦ	10/12 με λεμφοειδής οζιδιακή υπερπλασία (LNH), απώλεια αγγειακού μοτίβου και κολίτιδας στην ενδοσκόπηση.	
Wakefield et al.	2000	N = 60 (συμπεριλαμβανομένων των 12 από το 1998)	93% με LNH vs 14% φυσιολογικά της ομάδας ελέγχου. 8% με ειλεΐτιδα και 88% με κολίτιδα στην ενδοσκόπηση.	
Horvath et al.	1999	N = 36 με ΔΑΦ	25/36 (69%) με οισοφαγίτιδα επαναρροής, 15/36 (42%) με χρόνια	

				γαστρίτιδα, 21/36 (58%) με χαμηλή ενεργότητα δισακχαριτών, και 27/36 (75%) με αυξημένη έκκριση του παγκρεατικού-χολικού υγρού μετά από σεκρετίνη IV.
D' Eufemia et al.	1996	Λακτουλόζη/μανιτόλη (L/M) (δοκιμασία για εντερική διαπερατότητα) n = 25		9/21 (43%) με αυξημένη λακτουλόζη που αντανakλά την αυξημένη εντερική διαπερατότητα
Horvath et al.	2000	επαναλαμβανόμενα L/M test n = 25		76% είχαν λόγο L/M πάνω απ' το κατώφλι, το οποίο δείχνει αυξημένη εντερική διαπερατότητα.
Torrente et al.	2002	N = 25		Εναπόθεση IgG σε βαζολατρική επιφάνεια εντερικών επιθηλιακών κυττάρων σε 23/25 ασθενείς. Οι αποθέσεις IgG συν-εντοπίστηκαν με το συμπλήρωμα C1q.
Weizman et al.	1982	N = 17		Κυτταρομεσολαβούμενη ανοσολογική απόκριση περιφερικών λεμφοκυττάρων στη βασική πρωτεΐνη μυελίνης εγκεφάλου σε 13/17 παιδιά με αυτισμό. Αντισώματα στις βασικές πρωτεΐνες μυελίνης που υπάρχουν σε ορούς αυτιστικών ασθενών.
Singh et al.	1998			Οι κυτταρικές διαδρομές M είναι εξειδικευμένες για τη μεταφορά αντιγόνων και μικροοργανισμών διακυτταρικάς από τον εντερικό αυλό σε υποεπιθηλιακό χώρο όπου τα βακτήρια και τα αντιγόνα αλληλεπιδρούν με το ανοσοποιητικό σύστημα. Τα B κύτταρα παράγουν τότε ανοσοσφαιρίνες. Τα επίπεδα IgA και IgG για διατροφική καζεΐνη και γλουτένη είναι αυξημένα σε αυτιστικά παιδιά.
Kerneis et al.	1997			
Reichelt et al.	1990			



Εικόνα 1: οι πιθανοί μηχανισμοί με τους οποίους το εντερικό μικροβίωμα εμπλέκεται στις ΔΑΦ. Οι μολύνσεις της μητέρας, όπως η μητρική βακτηριακή δυσβίωση, πιστεύεται ότι είναι η πρώτη αιτία που προκαλεί αλλαγές στη σύσταση και στη λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου στο νεογνό. Το αλλαγμένο εντερικό μικροβίωμα και οι επακόλουθα αλλαγμένοι μεταβολίτες του είναι ικανά να προκαλέσουν προβλήματα στο έντερο, όπως και να επηρεάσουν τη λειτουργία του εγκεφάλου μέσω μηνυματοφόρων μονοπατιών του ενδοκρινικού και ανοσοποιητικού συστήματος. Τα αλλαγμένα αυτά μονοπάτια που σχετίζονται με τις αλλαγές στο μικροβίωμα μπορεί να παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στην παθογένεση των ΔΑΦ. Αντιστρόφως, ο εγκέφαλος κυρίως επηρεάζει τις γαστρεντερικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της κινητικότητας, του εντερικού φραγμού και της ακεραιότητας του εντερικού επιθηλίου, μέσω των μονοπατιών του ANS. Επιπλέον, ο εγκέφαλος είναι πιθανό να ασκεί μια από τις κύριες επιρροές στη σύσταση και στη λειτουργία του εντερικού μικροβιόκοσμου ρυθμίζοντας τον άξονα HPA, ASD: Διαταραχές αυτιστικού φάσματος, ANS: αυτόνομο νευρικό σύστημα, GI: γαστρεντερικό σύστημα, HPA: άξονας υποθαλάμου υπόφυσης επινεφριδίων. (77)

ΠΙΝΑΚΑΣ 3: Εκκινητές και χαρακτηριστικά της ποσοτικής PCR (qPCR) των υπό εξέταση μικροοργανισμών της μελέτης

Στόχος	Εκκινητής	Αλληλουχία εκκινητή (5'-3')	Θερμοκρασία υβριδισμού	Μέγεθος προϊόντος (bp)	Πρότυπο στέλεχος	Παραπομπή
Total Bacteria	Forward Reverse	TCCTACGGGAGGCAGCAGT GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	60°C	466	<i>Bacteroides fragilis</i> MM44 (ATCC 25285)	Nadkarni et al., 2002
<i>Prevotella</i> spp.	g-Prevo-F g-Prevo-R	CACRGTAACGATGGATGCC GGTCGGGTTGCAGACC	55°C	513	<i>Prevotella copri</i> DSM 18205	Matsuki et al., 2002
<i>Clostridium perfringens</i> group	CPF CPR	ATGCAAGTCGAGCGATG TATGCGGTATTAAATCTCCCTTT	55°C	120	<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Phong et al., 2010
<i>Lactobacillus</i> group	Forward Reverse	AGCAGTAGGAATCTTCCA CACCGCTACACATGGAG	58°C	341	<i>Lactobacillus gasseri</i> DSM 20243	Rintilla et al., 2004
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Forward Reverse	TCGCGTC(C/T)GGTGTGAAAG CCACATCCAGC(A/G)TCCAC	58°C	243	<i>Bifidobacterium bifidum</i> DSM 20456	Rintilla et al., 2004
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	FPR-2F Fprau645R	GGAGGAAGAAGCTCTTCGG AATTCGCCTACCTCTGCAC	60°C	248	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> DSM 17677	Feng et al., 2014 Suau et al., 2001 Wang, Cao & Cerniglia, 1996

Πίνακας 4: Περιγραφικά χαρακτηριστικά των παιδιών (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις ή ποσοστά)

	ΔΑΦ	ΦΑ	P value
Ηλικία (χρόνια)	7,3±2,2	6,4±2,2	0,200
Αγόρια (%)	17 (74%)	9 (26%)	
Κορίτσια (%)	7 (47,5%)	8 (52,5%)	
ΔΜΣ (Kg/m ²)	17,5±3,3	16±2	0,132

Πίνακας 5: Διατροφικές συγκρίσεις μεταξύ ΔΑΦ και ΦΑ παιδιών (μέσοι όροι ± τυπικές αποκλίσεις)				
	ΦΑ	ΔΑΦ	P value	P value 2
Ενέργεια (Kcal)	1802(1498 – 2060)	1791(1612 – 1950)	0,300	
Υδατάνθρακες				
Gr	188±45	223±70	0,043	0,402
% E	44,2±4	49,2±8	0,014	0,071
Πρωτεΐνες				
Gr	65±12	68±15	0,584	
% E	15,7±2,3	15,4±3	0,751	
Gr/Kg ΣΒ	2,7(2,3 – 3,8)	2,5(2 – 3)	0,252	
Λίπη				
Gr	77±14	72±16	0,271	
% E	41,2±3,7	36,5±5,8	0,003	0,010
Κορεσμένα λιπαρά οξέα				
Gr	30±7	29±8	0,688	
% E	16,3±2,8	15±3,4	0,146	
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα				
Gr	30±7	26±7	0,050	0,001
% E	16,3±2,9	13,4±3,6	0,005	0,003
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα				
Gr	9±2,6	9±3,6	0,574	
% E	4,7±1,2	4,6±1,2	0,799	
Ζάχαρη				
Gr	69,5±15	89,8±37	0,605	
% E	19,5±2	17,4±5	0,567	
Ασβέστιο(mg)	983±232	883±299	0,229	
Βιταμίνη C(mg)	63±42	87±64	0,169	
Διαιτητικές ίνες(gr)	9(8 – 15)	13(8,5 – 16)	0,083	0,663

Πίνακας 6: Σύγκριση μικροβιόκοσμου ΔΑΦ και ΦΑ παιδιών (μέσοι όροι $\pm$ τυπικές αποκλίσεις)

Βακτήρια	ΦΑ	ΔΑΦ	P value
Ολικά βακτήρια	11,57 (11,37 – 11,57)	11,51 (11,45 – 11,71)	0,681
Bifidobacterium	10,53 $\pm$ 0,42	10,68 $\pm$ 0,38	0,412
C.perfringens	8,58 (7,6 – 8,87)	8,92 (8,02 – 9,12)	0,351
F.prausnitzii	10,30 $\pm$ 0,46	10,29 $\pm$ 0,37	0,942
Lactobacillis group	7,53 $\pm$ 0,75	7,87 $\pm$ 0,98	0,427
Prevotella	8,79 (8,40 – 9,50)	8,54 (8,17 – 8,88)	0,314
*ο αριθμός των βακτηρίων εκφράζεται ως ο δεκαδικός λογάριθμος ανά γραμμάριο κοπράνων			

Πίνακας 7: Συσχέτιση μεταξύ της Ενεργειακής πρόσληψης και των βακτηρίων

	Ολικά βακτήρια	Bifidobacterium	C.perfringens	F.prausnitzii	Lactobacillus	Prevotella
Συντελεστής συσχέτισης	0,230	-0,008	0,166	0,144	0,761	0,058
P value	0,317	0,973	0,471	0,533	0,001	0,801

Πίνακας 8: Συσχέτιση μεταξύ της πρόσληψης φυτικών ινών και των βακτηρίων

	Ολικά βακτήρια	Bifidobacterium	C.perfringens	F.prausnitzii	Lactobacillus	Prevotella
Συντελεστής συσχέτισης	0,018	-0,352	0,062	0,014	0,449	-0,027
P value	0,938	0,118	0,789	0,953	0,041	0,907