

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

**A gasztrointesztinális mikrobiom módosításának hatása a
szociális magatartásra és a zsírsav összetételre**

Doktori (PhD) értekezés

Mintál Kitti

Témavezető: Prof. Dr. Karádi Zoltán

Társtémavezető: Dr. Tóth Attila

Programvezető: Prof. Dr. Karádi Zoltán

Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Reglődi Dóra

Pécsi Tudományegyetem,
Általános Orvostudományi Kar,
Élettani Intézet,

Pécs

2024

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	3
I. Bevezető	5
II. Irodalmi háttér	6
II.1. Autizmus spektrum zavar (ASD)	6
II.1.1. Jellemzői és kezelése	6
II.1.2. Valproát indukálta ASD állatmodell	7
II.2. Gasztrointesztinális (GI) mikrobiom	8
II.2.1. A gasztrointesztinális mikrobiom fiziológias szerepe	9
II.2.2. Az ASD és a mikrobiom kapcsolata	12
II.2.3. A mikrobiom módosításának eszközei	13
II.2.3.1. Antibiotikumok	14
II.2.3.2. Probiotikumok	14
II.3. A zsírsavak	15
II.3.1. Zsírsavak fiziológias szerepe	17
II.3.2. Zsírsavak és a GI baktériumok	19
III. Célkitűzések	22
IV. Anyagok és Módszerek	24
IV.1. Kísérleti állatok	24
IV.2. Kezelések	24
IV.2.1. Antibiotikummal és probiotikummal történő kezelések	24
IV.2.2. Lítium-kloriddal történő kezelés	26
IV.2.3. Valproáttal történő kezelések	26
IV.3. Kísérletes vizsgálatok	27
IV.3.1. Testtömeg, táplálék- és vízfelvétel mérése	27
IV.3.2. Szociális interakciós teszt	27
IV.4. Kromatográfias vizsgálatok	28
IV.4.1. Rövid szénláncú zsírsavak (SCFAs) analízise	28
IV.4.2. Zsírsav metil-észterek (FAMES) analízise	29
IV.5. Szövevény	30
IV.6. Statisztika	31
V. Eredmények	33
V.1. Testtömeg, táp- és vízfelvétel	33
V.2. Szociális interakciós teszt	34

V.3. Rövid szénláncú zsírsavak analízise	41
V.4. Zsírsav metil-észterek analízise	45
V.4.1. A kromatogram jellemzői.....	45
V.4.2. Lineáris kevert random modell eredményei	46
V.4.2.1. Telített zsírsavak (SAT)	48
V.4.2.1.1. Rövid szénláncú telített zsírsavak (shortSAT)	51
V.4.2.2. Elágazó szénláncú és transz-zsírsavak	51
V.4.2.2.1. Elágazó szénláncú telített zsírsavak	52
V.4.2.2.2. Transz-zsírsavak (TFA).....	52
V.4.2.3. Egyszeresen telítetlen cisz-zsírsavak (cMUFAs)	52
V.4.2.4. Többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFAs)	53
V.4.2.5. A rágcsálótáp zsírsav összetétele	56
V.5. Szövettan	59
VI. Diskusszió	61
VI.1. A GI mikrobiom megváltoztatásának hatása a szociális magatartási folyamatokra	61
VI.2. A GI mikrobiom módosításának hatása az SCFAs termelésre	64
VI.3. A GI mikrobiom zsírsavtermelésben betöltött szerepe	65
VII. Összefoglalás.....	70
VIII. Köszönetnyilvánítás.....	72
IX. Irodalomjegyzék	73
X. Publikációs jegyzék	82

Rövidítések jegyzéke

- ABx:** antibiotikum kezelt csoport
- ABx+probiotikum:** antibiotikum és probiotikum kezelt csoport
- ADHD:** figyelemhiányos hiperaktivitás zavar
- ALA:** alfa-linolénsav/18:3n-3
- amu:** atomi tömeg egység
- ANOVA:** varianciaanalízis
- ASD:** autizmus spektrum zavar
- CLA:** konjugált linolsav
- cMUFAs:** egyszeresen telítetlen cisz-zsírsavak
- C-VPA:** kontroll valproát kezelt csoport
- DHA:** dokozahexaénsav
- EPA:** eikozapentaénsav
- FAMEs:** zsírsav metil-észterek
- GABA:** gamma-amino-vajsav
- GC-MS:** gázkromatográfia-tömegspektrometria
- GI:** gasztrointesztinális
- HDAC:** hiszton deacetiláz
- HPA:** hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg
- IQR:** interkvartilis terjedelem (interquartile range)
- KIR:** központi idegrendszer
- kontroll:** kontroll csoport
- LA:** linolsav/18:2n-6
- LC PUFAs:** hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak
- LiCl:** lítium-klorid
- MDD:** súlyos depressziós zavar
- MUFAs:** egyszeresen telítetlen zsírsavak
- NMDA:** N-metil-D-aszparaginsav
- PC:** főkomponensek
- PCA:** főkomponens analízis (Principal Component Analysis)
- probiotikum:** probiotikum kezelt csoport
- PUFAs:** többszörösen telítetlen zsírsavak

P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport

rpm: fordulatszám/perc

S.E.M.: mintából számított standard hiba (standard error of the mean)

SAT: telített zsírsavak

SCFAs: rövid szénláncú zsírsavak

short SAT: rövid szénláncú telített zsírsavak

TFA: transz-zsírsavak

tömeg%: zsírsavak tömegszázalékos aránya

Wnt: wingless-type protein

I. Bevezető

A gasztrointesztinális rendszer mikrobiom összetételének károsodásával napjainkban egyre többször találkozunk, egyrészt központi idegrendszert érintő bizonyos mentális zavarokat (súlyos depressziós zavar, autizmus spektrum zavar, Alzheimer-kór, stb.) kapcsán, másrészt egyre fokozódó, társadalmi, egészségügyi ellátást befolyásoló hatása okán. Ezek a kórformák egyre szélesebb rétegeket és korosztályokat érintenek, s általános jellemzőjüként megállapítható, hogy kezelésükben döntően nem kauzális, hanem csak tüneti eljárások alkalmazhatóak. Kutatásainkat arra a hipotézisre alapozzuk, hogy a bélmikrobiom nem csak a perifériás funkciók, hanem a központi idegrendszeri működések szabályozásában is jelentős szerepet játszik, és ennek következtében a magatartásra is hatást tud gyakorolni. Az intesztinális mikrobiom, vagyis a bélrendszerben fellelhető kommenzalista, szimbióta és patogén mikroorganizmusok közösségének az összetétele és egyensúlya kulcsfontosságú szerepet tölt be a szervezet fiziológiai működésében. Ezt az is alátámasztja, hogy e komplex rendszer egyensúlyának a megbomlása perifériásan és centrálisan is megnyilvánuló organizmikus elváltozásokhoz vezet. Jelen kísérletsorozatunk a bélbaktériumok módosítása következtében megjelenő szociális magatartásbeli zavarokat előidéző, továbbá és a zsírsav spektrumra gyakorolt hatásának a vizsgálatára irányul.

PhD tanulmányaim alatt végzett munkánk egyik fő célja az volt, hogy Wistar-patkányok intesztinális mikrobiomját felnőtt korban széles spektrumú antibiotikumok elegendővel, valamint probiotikum keverék segítségével módosítsuk és ennek nyomán tanulmányozzuk székletből a bélflóra részletes zsírsav spektrumra gyakorolt hatását.

A programunk másik fő fókuszában a bélbaktériumok sokrétű, viselkedést befolyásoló szerepének jobb megértését célzó vizsgálatok voltak, ennek nyomán a mikrobiom módosítása következtében megfigyelhető szociális magatartásmintázatokat elemeztük és összehasonlítottuk ezeket egy olyan autizmus állatmodellben észlelhető tünetekkel, mely modell mindhárom validitási kritériumnak leginkább megfelel. A fent említetteken túl, vizsgálataink során kitértünk a rövid szénláncú zsírsavak és a szociális viselkedés kapcsolatának tisztázására is.

II. Irodalmi háttér

II.1. Autizmus spektrum zavar (ASD)

II.1.1. Jellemzői és kezelése

Az autizmus spektrum zavar komplex idegrendszeri fejlődési rendellenesség, melynek prevalenciája napjainkban szignifikánsan növekszik, ma már a gyermekek több mint 1 %-át érinti. [1]. Az ASD során sérülnek a szociális és kognitív funkciók, emellett különböző sztereotip motoros mozgásmintázatok is megjelennek [2]. E három fő szimptóma mellett más pszichológiai és neurológiai tünetekkel is jellemzett megbetegedésekkel, mint például a figyelemhiányos hiperaktivitás zavar (ADHD), az epilepszia, a szorongás és a súlyos depressziós zavar (MDD) [2-4] ugyancsak gyakran találkozunk. Az ASD esetében a gasztrointesztinális (GI) tünetek megjelenésének prevalenciája is magasabb, ilyen tünetek közé tartozhat a konstipáció vagy a hasmenés, a reflux, az alhasi diszkomfort érzés [5], továbbá az irritábilis bél szindróma, de más GI rendszerhez kapcsolódó kóros állapotok megjelenési aránya is gyakoribb [6, 7].

Neuropatológiáját tekintve számos agyi régióban, többek között a kognitív szabályozásban fontos szerepet játszó prefrontális kéregben, a tanulási és memória folyamatokért felelős hippocampus különböző szegmenseiben, vagy akár a szociális magatartás szabályozásában az egyik meghatározó agyterületen az amygdalában szintén megfigyeltek az egészségesekben tapasztalhatótól jelentős eltéréseket a neuronok számában és méretében egyaránt [8-10]. Emellett, a hippocampus esetében nem csak strukturális (atipikus méret és forma, neuronális elrendeződés), de funkcionális eltérések is detektáltak az ASD esetében [11]. Az ASD során megjelenő megannyi tünet közül mégis a betegek számára a legnagyobb nehézséget okozó, és a beteg egész életét végig kísérő elváltozások a szociális készségekkel összefüggő zavarok: ide sorolhatók a szociális kommunikációt érintő hiányosságok, a társas interakciók kialakításának és fenntartásának nehézségei, a csökkent szociális motiváció, a szociális készségek zavara és az interakciós prioritások korlátozott felismerése [12, 13]. Az ASD diagnózisának felállítása is ezen fő szimptómák meglétéén alapul a DSM-5 diagnosztikai klasszifikációs rendszer alkalmazása során, ennek megfelelően kulcsfontosságú a tartós deficit megléte a szociális kommunikációban és szociális interakciókban, valamint a sztereotip, repetitív

motoros mintázatok megjelenése a viselkedésben, érdeklődésben és aktivitásban egyaránt [14].

A terápiás megközelítések egyik alapvető eleme az ASD-vel diagnosztizált páciensek esetében a szociális készségeket erősítő kezelési módok kidolgozása [15]. A jelenlegi, megoldást ígérő eljárások közé tartoznak a különböző, kognitív viselkedést erősítő terápiás eszközök, a szociális és kommunikációs készségek fejlesztése, a családtagok támogatása és segítsége, illetve a virtuális valóság és a humanoid robotok segítségével történő szociális tréningek [16, 17].

Az ASD-s beteg állapotát, viselkedését intenzív fejlesztéssel javító tapasztalatokkal szemben állóan, néhány újabban közölt tanulmány [2, 18] ígéretes eredményei ellenére jelenlegi tudásunk szerint a betegség nem gyógyítható és célzott gyógyszeres terápiára sincs lehetőség a fő kórtünetek kezelésében.

II.1.2. Valproát indukálta ASD állatmodell

Az állatkísérletes vizsgálatokból származó eredmények módot teremtenek az ASD kórfolyamatainak jobb megértésére, mivel lehetővé teszik a betegség molekuláris és idegrendszeri változásainak feltárását és monitorozását, potenciális rizikófaktorok vizsgálatát, és mindezekben túlmenően döntő jelentőségűek új terápiás kezelések, gyógyszerek kifejlesztésében, tesztelésében. A fentiekre tekintettel megkérdőjelezhetetlen mennyire alapvető fontosságúak, az ASD esetében is, a jól transzlálható állatkísérletes modellek. Ilyenek pedig ismertek a szakirodalomban. Az eredményes módszerek közé tartoznak az ASD kialakulásával összefüggésben álló gének célzott mutációján vagy különféle kémiai ágensek használatán alapuló eljárások [9, 19, 20].

Az állatmodelleket 3 validitási kritérium szerint kell értékelni, és ezeknek megfelelően a valproát indukálta ASD állatmodell az egyik leggyakrabban használt és mindhárom kritériumot tekintve a leginkább alkalmas modell a betegség vizsgálatára [21, 22].

1. Az első validitási kritérium a konstrukciós validitás, mely esetben a modellnek tüneteket kell produkálnia, ha a betegség hátterében álló rizikófaktoroknak tesszük ki az egyedeket. Megállapítható, hogy a valproát indukálta ASD modell hatékonyan utánozza a szindróma etiológiájának ezen aspektusát.

2. A második, a fenomenológiai validitási kritérium alapján a modellnek mutatnia kell a humán betegség során detektált főbb tüneteket, azaz a szociális deficitet és a repetitív mozgási, illetve viselkedési mintázatokat. A valproát modell esetében az eljárás egyszerűsége mellett is feltűnő e jellemzők erőteljes érvényesülése.
3. A harmadik kritérium a prediktív validitás, a legnehezebben azonosítható az ASD állatmodellekben. Itt lényegében arról van szó, hogy az emberben sikeresen alkalmazott terápiás eljárásokkal pozitív esetben a modellben megjelenő tünetek is effektíven gyengíthetők, azaz a kezelt egyed állapota javítható, bizonyosságát adva annak, hogy a modell a jövőbeli kezelések tesztelésére is hatékonyan alkalmazható lesz [21, 22].

A valproát indukálta ASD állatmodell létrehozása során prenatális korban már egyetlen valproát expozíció is elegendő, hogy az utódban élethosszig tartó viselkedési változások következzenek be. A valproát eredetileg egy 8 szénatomos elágazó szénláncú zsírsav, amelyet antiepileptikumként használnak a klinikumban, s amelyről azonban hamarosan kiderült, hogy terhességben való alkalmazása során az utódban autizmus spektrum zavarra jellemző kóros viselkedésmintázatok alakulnak ki. Ezen megfigyelés alapján jött létre az ASD állatmodell, a megfelelő gesztációs időszakban végzett egyszeri, hatásos dózisú valproát injekció nyomán kialakítható a valproát indukálta ASD állatmodell [23, 24]. A valproát hatásmechanizmusát tekintve nem szelektív hiszton deacetiláz (HDAC) inhibitor, azaz a pozitív elektromos töltéseket növelve csökkenti a géntranszkripciót, így a központi idegrendszer embrionális fejlődése során a kritikus időszakban adva hozzájárul az ASD patogenezisének kialakításához. Mindemellert a valproát expozíció emelheti a GABA (gamma-amino-vajsav) szintet a központi idegrendszerben és szabályozhatja a Wnt (Wingless-type protein) jelátviteli útvonalat is [23, 25, 26].

II.2. Gasztrointesztinális (GI) mikrobiom

Napjainkra már teljesen egyértelmű tényként fogadjuk el, hogy a gasztrointesztinális traktus mikroba flórájának, a testünkben jelen lévő diverz kommenzalista, szimbiota és patogén mikroorganizmusok alkotta komplex ökológiai rendszernek az összetétele és egyensúlya meghatározó elemei a szervezet fiziológiás működésének. A GI mikrobiom közel 10 billió baktériumot tartalmaz, melyek eloszlása nem egyenletes, a disztális szakaszon jóval több mikroorganizmus él, mint a proximális részen [27, 28]. Jelenlegi

tudásunk szerint a mikroba kolonizáció szülés során kezd kialakulni, majd az életkorral folyamatosan változik, de felnőtt korra egy viszonylag stabil és állandó mikrobiom összetétel alakul ki [29]. A humán szervezetben megtalálható fő törzsek a *Firmicutes* 38-60%, *Bacteroidetes* 15-27%, *Actinobacteria* 8-15%, *Verrucomicrobia* 1-2%, *Proteobacteria* 1-2% és *Methanobacteria* 1%, melyeknek az összetétele és aránya különböző, részben környezeti tényezők (étkezés, földrajzi területi adottságok, stressz, különféle betegségek, gyógyszeres behatások) függvényében változhat. A mikrobiom jellemzők általános jelentőségét támasztja alá az a tény, hogy más emlősök esetében is főként ezek a törzsek, hasonló arányban alkotják a bélflóra legnagyobb részét [27, 29-31].

II.2.1. A gasztrointesztinális mikrobiom fiziológiás szerepe

A GI mikrobiom és a gazdaszervezet között több szintes kommunikáció zajlik, léteznek lokális hatások, ahol a GI traktusban jelenlévő mikrobák reagálnak a helyi környezetre és annak változásaira, ezen túlmenően az egész GI traktus és a mikrobiom között is tetten érhető információ csere, de emellett fellelhető egy kétirányú, egymásra kölcsönösen ható kapcsolati rendszer is a GI traktus mikrobái és az egész szervezet között. Mára széles körben elfogadott nomenklaturával ezt a bidirekcionális irányultságú, a központi idegrendszer által kontrollált kapcsolati rendszert hívjuk mikrobiom-bél-agy tengelynek [30, 32].

A GI traktus baktériumainak nagy része, fermentációs folyamataik révén, a bélrendszerben lévő anaerob környezetnek és a rostban gazdag szubsztátok (cellulóz, pektin, inulin, magas amidáz tartalmú keményítő, nyálkahártya-glikátok) meglétének köszönhetően tevékeny részt vállal az anyagcserefolyamatokban és az energiacserében [27]. Ezeket a szubsztátokat a GI rendszerben nagy mennyiségben jelenlévő *Firmicutes* és *Bacteroides* törzs legtöbb tagja képes fermentálni, és ennek következtében rövid szénláncú zsírsavak keletkeznek, melyek becslések szerint akár a szervezet szükséges kalória mennyiségének 5-15%-át biztosítják [27, 33]. Amellett, hogy az energiacserében a GI mikrobiom kiemelten fontos, döntő szerepet játszik bizonyos tápanyagok és vitaminok szintézisében is. A bélbaktériumok jelentős mennyisége képes szintetizálni a legtöbb vízben oldódó B vitamint (biotin, kobalamin, folsav, nikotinsav, pantoténsav, piridoxin, riboflavin, tiamin) és a K vitamint is, azonban a szervezet ezeket már csak a vastagbélből tudja felvenni [34, 35].

A mikrobiom az immunfunkciókban is fontos szerepet tölt be, lokálisan képes a GI barrier integritását szabályozni, továbbá részt vesz a bélnyálkahártya immunfolyamataiban. A GI barrier központi feladatot lát el a patogénnel szembeni fizikai, kémiai és immunológiai védekezésben is, és azt szintén kimutatták, hogy a bélflóra aktív szerepet tölt be a bélnyálkahártya permeabilitásának szabályozásában, illetve elősegíti a nyákréteg fenntartását [36]. Ma már azt is tudjuk, hogy a GI mikrobiom a fentiekén túlmenően az antimikrobiális molekulák felszabadításában is érintett [37]. Mikroba asszociált molekuláris mintázatok és különböző intracelluláris jelátviteli kaskádok segítségével képes kiváltani bizonyos immunmoduláló anyagok expresszióját, melyek a nyálkahártya gyulladását eredményezik, és hozzájárulnak a veleszületett és szerzett immunfolyamatok további aktivitásához [38]. A GI mikrobiom jelentősége így tetten érhető az immunrendszer szabályozó működéseiben. Újabb kutatások arra is rámutattak, hogy a GI mikrobiom a megfelelő immunsejt differenciáció kialakításában szintén nélkülözhetetlen [38, 39]. Napjainkban is zajló sajátos kutatások pedig a cirkadián ritmus és az intesztinális baktériumok változása között is egyre nagyobb számban találtak összefüggéseket [40].

Külső környezeti tényezők hatására (étkezés változása, stressz, gyógyszeres behatások, stb.), vagy akár a szervezeten belüli elváltozások (különbéle betegségek) következményeként a mikrobiom kvalitatív és kvantitatív összetételében módosulások következnek be, ezzel pedig a GI mikroba populáció károsodása úgynevezett diszbiózis lép fel [41]. Mivel a GI mikrobiom számos fiziológias működés szabályozásában szerepet játszik, ezért a bélflóra megváltozása ezekre az élettani folyamatokra természetesen hatással van. A problémakört a másik oldalról megközelítve az is megfigyelhető, hogy számos kórfolyamat esetében megjelenik a diszbiózis, többek között különböző metabolikus rendellenességek, gyomor és bélrendszert érintő megbetegedések, diabétesz és elhízás esetében egyaránt [42-45]. Az e téren tett megfigyelések különösen fontos hozadéka annak felismerése, hogy nem csak a periférián megjelenő betegségek esetében, hanem centrálisan, a központi idegrendszert érintő kórfolyamatok során is megjelenik a bélflóra egyensúly- és összetételbeli elváltozása [46].

A gasztrointesztinális traktus mikroba populációja jelentős szerepet játszik a központi idegrendszer (KIR) működésében és a viselkedés modulálásában is [47]. A mikrobiom-bél-agy tengelynek a meglétét a kétezres évek első felében sikerült igazolni, így ma már egyértelműen kijelenthetjük, hogy a központi idegrendszer és a GI mikrobiom között kétirányú kapcsolat van [32]. A pontos mechanizmusa azonban a mikrobiom és a KIR

kommunikációjának még nem teljesen tisztázott, de 5 fő útvonal ismert, melyen keresztül az intesztinális mikrobiom képes befolyásolni a központi idegrendszer működését és ennek hatása révén a viselkedést [48].

1. Az egyik útvonal az immunfolyamatok szabályozása révén lehetséges. Ebben az esetben a gasztrointesztinális barrieren átjutott baktériumok, illetve endotoxinok aktiválni tudják az immunrendszert, és így hatással vannak a gyulladáskeltő citokinekre, melyek mennyiségét megemelik, ezek a citokinek pedig átjutva a vér-agy gáton a KIR idegsejtjeire is hatást gyakorolnak és ennek következtében mikroglia aktivációt tudnak indukálni [47, 49, 50].
2. Egy következő útvonal a különböző neurotranszmitterek és bélhormonok szintézisének szabályozásán keresztül valósul meg [51]. A GI traktus baktériumai képesek fermentáció révén rövid szénláncú zsírsavak (SCFAs) termelésére, és ezek a zsírsavak pedig az enteroendokrin sejtek receptoraihoz tudnak kapcsolódni és ennek révén számos különféle bélhormon szintézisét befolyásolni [52, 53]. Emellett bizonyos baktériumfajok képesek önmagukban is szintetizálni sokféle neurotranszmittereket (szerotonin, noradrenalin, dopamin, hisztamin, acetilkolin, GABA [54].
3. A rövid szénláncú zsírsavaknak továbbá epigenetikus módosító hatásuk is van, így e tulajdonságuknak köszönhetően szintén lényeges szereppel rendelkeznek a mikrobiom-bél-agy tengely kommunikációjában, ugyanis képesek változásokat indukálni a transzkripció folyamatokban [55, 56].
4. Egy újabb lehetséges útvonal a GI traktust és a központi idegrendszert összekötő bolygóideg (nervus vagus), mely közvetlen útvonalat biztosít a mikrobák által létrehozott különböző szignálok terjedésére [57, 58].
5. Az ötödik útvonal a hipotalamusz-hipofízis-mellékvesekéreg (HPA) tengely stresszre adott válaszmechanizmusának modulálásában rejlik [48]. Ez egy szoros, kétirányú kapcsolat, mely során a stressz kvalitatív és kvantitatív változásokat idéz elő a mikrobiom ökoszisztémájában, ennek következtében a mikroorganizmusok által termelt anyagok szintjén is kialakul egy változás, és ezek a módosulások a HPA tengely aktivációjának szabályozása révén fejtik ki hatásukat [59].

A kétirányú kapcsolat és jelenlegi tudásunk révén, ma már egyre inkább azt feltételezik, hogy a GI mikrobiom diszbiózisa és a központi idegrendszert érintő neurológiai betegségek szoros összefüggésben állnak egymással. Az elmúlt években

számos kutatás igazolta, hogy a mikroba összetétel jelentős eltéréseket mutat törzs és akár család szinten is bizonyos neurológiai kórfolyamatok esetében, mint a Parkinson-kór vagy az Alzheimer-kór, emellett egyre több bizonyíték támasztja alá az intesztinális mikrobiom jelentős szerepét különböző központi idegrendszert érintő rendellenességek kialakulásában, tüneteinek súlyosbodásával [60, 61].

II.2.2. Az ASD és a mikrobiom kapcsolata

Napjainkban egyre több bizonyíték támasztja alá, hogy az intesztinális mikrobiomnak a különböző neuropszichiátriai, fejlődésneurológiai és neurodegeneratív betegségek kialakulásában és tüneteinek megjelenésében kiemelkedő szerepe van [62, 63]. Hasonlóan más neuropszichiátriai betegségekhez, az autizmus spektrum zavar esetében is megfigyelhető a gyomor-bélrendszeri tünetek (konstipáció, hasmenés, reflux, alhasi diszkomfort érzés) gyakoribb előfordulása, az irritabilis bél szindróma és más GI kapcsolt betegségek magasabb prevalenciája [64-66]. Emellett az erre irányuló kutatások szoros korrelációt mutattak ki az ASD tüneteinek súlyossága és a GI diszfunkció mértéke között gyermekekben történt vizsgálatok során [67].

Autizmus spektrum zavarban a mikroba profil megváltozása is megfigyelhető, mely állapokra nem csak a megemelkedett mikroba szám jellemző, hanem ezzel együtt a diverzitás csökkenése is, ami kedvező lehetőséget biztosít a káros baktériumok túlszaporodására, ennek nyomán a már megjelenő tünetek súlyosbodására [68]. Egyik jellemző változás a *Clostridium* nemzetség tagjainak megemelkedett abundanciája [64]. Emellett változások detektálhatók a *Bacteroidetes/Firmicutes* törzsek és bizonyos nemzetségek tagjainak (*Lactobacillus*, *Caloramator*, *Alistipes*, *Sarcina*, *Enterobacteriaceae*, *Desulfovibrio*) egymáshoz viszonyított arányában, továbbá egyes törzsek kvantitatív változásai is jellemzően megfigyelhetők [68-70]. Jellemző nemzetség szintű változások között tartjuk számon a *Prevotella*, *Coprococcus* és *Veilonellaceae* nemzetség abundanciájának csökkenését, illetve a *Sutterella* és *Ruminococcus torques* nemzetségek emelkedését [69, 71, 72]. A mikrobák mennyiségi és minőségi változása mellett értelemszerűen az általuk termelt anyagokban is eltérések figyelhetők meg, többek között a rövid szénláncú zsírsavak esetében kutatások igazolták, hogy az ASD betegek faeces mintáiban jellemzően megemelkedik a proprionát mennyisége [73]. Emellett gyakran megfigyelhető a hiperszerotoninémia fennállása, melynek mértéke összefügg a GI tünetek intenzitásával [74].

Az ASD és a GI mikrobiom közötti kölcsönkapcsolat meglétére fontos bizonyítékot jelentenek a csíramentes állatokon végzett kísérletek, melyek során csíramentes egerekbe ASD páciensekből nyert székletminták széklettranszplantációját követően a mikrobiom összetétel változásának köszönhetően az állatok ASD-re jellemző viselkedést kezdtek mutatni, s emellett változásokat detektáltak a triptofán- szerotonin anyagcserében is [75]. A GI mikrobiom ASD patogenezisében való érintettségének további bizonyítékai a különböző mikrobiom módosítások révén megjelenő eltérések az ASD tüneteiben. Különféle probiotikum készítmények, bizonyos diéták, antibiotikumok alkalmazása és széklet transzplantációs kezelések számottevő eredményeket értek el a GI tünetek enyhítésében, azonban a jövőben még számos vizsgálat szükséges ahhoz, hogy ezeket az eredményeket egyértelműen igazolni lehessen [76, 77].

Az antibiotikumokhoz köthető mikrobiom módosulás és az ASD kapcsolatát elemző újabb vizsgálatok során megfigyelték, hogy az ASD kialakulásának kockázatát a kisgyermekkorban antibiotikum kitettség enyhén növelte [78, 79]. Mindazonáltal, a jelenleg rendelkezésre álló adatok többsége, nem támasztja alá azt az elképzelést, mely szerint a közvetlen pre-, vagy posztnatalis korban történő antibiotikum-expozíció valóban az egyik reguláris kockázati tényező lenne az ASD kialakulásában [80]. Mindezeknek köszönhetően több hipotézis is létezik, melyek az ASD és a bélflóra közötti kapcsolat lehetséges mechanizmusát próbálják megvilágítani, továbbá azt a nézetet alátámasztani, mely szerint a kórfolyamat egyik lehetséges kiindulási pontja a GI mikrobiom megváltozásaiban keresendő.

II.2.3. A mikrobiom módosításának eszközei

A GI mikrobiom minőségi és mennyiségi összetétele fiatal korban még sokkal fluktuálóbbr és instabilabb, mint felnőtt korban, amikor már viszonylag stabil és állandó a mikrobiom közösség [29]. Az is igaz azonban, hogy külféle kezelések hatására a bélflóra összetételében jelentős változásokat tudunk elérni felnőtt korban is, s ennek fontos szerepe lehet a külféle kórfolyamatok terápiás megközelítésében. A mikrobiom módosulását külféle módszerekkel befolyásolhatjuk, többek között az étrend megváltoztatásával, probiotikumokkal (olyan élő mikroorganizmusokkal, melyek a szervezet számára jótékony hatással bírnak), prebiotikumokkal (olyan, a szervezet számára nem emészthető élelmiszer összetevők, melyek szelektíven képesek stimulálni bizonyos baktériumoknak a szaporodását és aktivitását), szimbiotikumokkal

(probiotikumok és prebiotikumok együttes jelenléte), posztbiotikumokkal (jótékony hatású mikroorganizmusok anyagcsere termékei vagy alkotórészei), antibiotikumokkal és széklettranszplantációval [30, 81]. Az alábbiakban a kutatásaim során figyelembe vett módosító eszközöket veszem sorra, melyeket kísérletes formában is alkalmaztunk.

II.2.3.1. Antibiotikumok

Napjainkban világszerte egyre nagyobb az antibiotikumok használata, mely nem csak a különböző antibiotikum-rezisztens törzsek kialakulása miatt jelent egyre nagyobb veszélyt, hanem jelentősen befolyásolja a bélflóra egyensúlyát is, mely diszbiózishoz vezet. Az antibiotikum kezelés ugyanakkor egy hasznos eszközt és egy új vizsgálati módszert adott a mikrobiom-bél-agy tengely működésének jobb megértéséhez, emellett jó lehetőséggel szolgál az antibiotikum kitétség (mint környezeti faktor) és különböző kórfolyamatok (mint az ASD-t létrehozók) kapcsolatának részletesebb feltárásához [80]. Több kutatás számolt be arról, hogy az antibiotikumok segítségével történő bélflóra módosítás komplex egyensúlybeli elváltozásokat hoz létre a GI mikrobiom közösségében, mely végső soron befolyásolja a központi idegrendszer működését és a viselkedésben eltéréseket tud indukálni a mikrobiom-bél-agy tengely mentén [79, 80, 82].

Az antibiotikumokkal történő kezelések kifejezetten az intesztinális baktériumok mennyiségi és minőségi összetételét változtatják meg, anélkül, hogy direkt hatást fejtenének ki a zsírsavak összetételére [83], mely jó lehetőséget biztosít a baktériumok által termelt anyagok (zsírsavak, fehérjék) vizsgálatára is. Az antibiotikumok típusától, alkalmazott dózistól, az expozíció időtartamától és az alkalmazás alatti ételszakasztól függően különböző mikrobiális összetételbeli változásokat lehet indukálni és ennek következtében viselkedési mintázatokban bekövetkező lehetséges változások detektálására is lehetőség nyílik. Nemrégiben, egy kutatócsoportnak e területen példaértékű vizsgálatokban, sikerült meghatározott embrionális korban bizonyos antibiotikumok hatására szociális deficitet indukálnia [82].

II.2.3.2. Probiotikumok

A probiotikumok használata szintén jelentős mértékben képes modulálni a bélflóra összetételét, mai tudásunk szerint a zsírsavakra történő direkt hatás nélkül [83]. Különböző probiotikum készítményeket gyakran használnak a GI mikrobiom

helyreállítására és javítására, emellett sok probiotikus hatású baktériumfaj képes hatékonyan kezelni számos GI traktust érintő betegséget, például az antibiotikumok okozta GI panaszokat, akut fertőző hasmenést, vagy akár *Clostridium difficile* fertőzés ellen is hatásosak lehetnek [83, 84].

Széles körben elterjedt probiotikus baktériumfajok közé tartoznak a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetség tagjai, melyek a természetes bélflóra nagy részében is megtalálhatóak [85]. E nemzetség meghatározott tagjai képesek csökkenteni az oxidatív stresszt és gyulladáscsökkentő, immunmoduláló tulajdonságokkal is rendelkeznek, továbbá bizonyos fajaik képesek helyreállítani a GI barriert, és bizonyos neurotranszmitterek és citokinek termelését is tudják modulálni különféle jelátviteli útvonalak segítségével, így az idegrendszerre, mind közvetlenül, mind közvetve hatást gyakorolnak [86-89]. Fontos azonban figyelembe venni, hogy a probiotikus hatások általában egy adott törzsre jellemzőek és e hatások akár fajon belül is változhatnak [85]. Emiatt a probiotikum kezelések hatása sokféle tényezőtől igen nagymértékben függ: készítményben jelenlévő törzsektől, ezek dózísától, kezelés időtartamától, illetve a már meglévő mikroba populáció mennyiségétől és összetételétől, ezért ebből adódóan lehetőségünk van akár szelektíven is modulálni a GI mikrobiom közösségét [90]. A megfelelően kiválasztott és alkalmazott probiotikus hatású fajok esetében már számos jótékony hatást leírtak, melyek nem csak az antibiotikum kezelést követően fellépő nem kívánt következményeket szüntették meg, hanem perifériásan és akár centrálisan érintett mechanizmusokra is hatást gyakoroltak [91]. Ilyenek lehetnek bizonyos központi idegrendszert érintő rendellenességek is, mint például a súlyos depressziós zavar, mely esetében pozitív változásokat tudtak elérni probiotikus szerek alkalmazásával a MDD tüneteinek enyhítésében [47, 91]. Habár a jelenlegi kutatási eredmények még részlegesek és korlátozottak, de a jövőben is fontos terápiás lehetőségként tartják számon a probiotikumok alkalmazását, melyek a mikrobiom-bél-agy tengely mentén képesek lehetnek a különböző neuropszichiátriai, fejlődésneurológiai és neurodegeneratív betegségek tüneteinek enyhítésében [91].

II.3. A zsírsavak

A zsírsavak fontos alkotóelemei minden többsejtű élőlénynek, elsődlegesen a sejtmembránok foszfolipid kettősrétegének, emellett a szervezet egészséges fejlődésében is esszenciális szereppel bírnak. Általánosságban a zsírsavak szénhidogénláncból állnak,

melynek hossza 2 és 30 szénatom között helyezkedik el, ennek a láncnak az egyik végén karboxil csoporttal (könnyen reagál észter kötéseket képezve), a másik végén pedig metil csoporttal [92, 93]. A szénhidrogén láncok alapján két fő csoportba sorolhatjuk a zsírsavakat, így elkülöníthetünk telített zsírsavakat (SAT) és telítetlen zsírsavakat. A telített zsírsavak nem tartalmaznak kettős kötéseket, így csak C-C egyszeres kötések alkotják, míg a telítetlen zsírsavak legalább egy kettős kötést tartalmaznak, ennek megfelelően a telítetlen zsírsavakat is tovább lehet csoportosítani egyszeresen telítetlen (egy darab C=C kettőskötéssel rendelkeznek, mely különböző pozíciókban előfordulhat, *cisz* és *transz* konfigurációban) és többszörösen telítetlen zsírsavakra (PUFAs) [93, 94]. A telített zsírsavak esetében elkülöníthetünk rövid szénláncú- (short SAT), közepes szénláncú- és hosszú szénláncú telített zsírsavakat szénláncuk száma alapján [95].

Az esszenciális zsírsavak közé azok a zsírsavak tartoznak, melyek szükségesek az egészséges szervezet fiziológias működéseinek a fenntartásához, azonban az emlős szervezetekből hiányoznak a szintézisükhöz szükséges enzimek, így csak a táplálkozás révén tudja felvenni őket a szervezet. Ezzel szemben az egyszeresen telítetlen zsírsavak (MUFAs) nem tartoznak az esszenciális zsírsavak közé, mivel *de novo* is elő tudja állítani őket a szervezet [96]. Általánosságban elmondható, hogy a többszörösen telítetlen zsírsavak az esszenciális zsírsavak közé tartoznak, ilyenek például a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak (LC PUFAs) prekursorai is, mint a linolsav/18:2n-6 (LA) és alfa-linolénsav/18:3n-3 (ALA), melyeknek csak táplálék útján van lehetőségük a szervezetbe kerülni [97].

A többszörösen telítetlen zsírsavakban jelenlévő kettős kötések metilencsoportjuk révén elkülönülnek egymástól és 2 fő csoportra oszthatóak az első kettős kötés helyzete alapján, így az egyik fő csoport az n-6 (omega-6 zsírsavak), ahol az első kettős kötés a metil (omega) végétől a hatodik és hetedik szénatom között helyezkedik el, a másik fő csoport az n-3 (omega-3 zsírsavak), ahol az első kettős kötés a metil végtől a harmadik és negyedik szénatom között található [92, 94]. A telítetlen zsírsavak esetében transz-zsírsavakat (TFA) is el tudunk különíteni, ezek olyan zsírsavak, melyek legalább egy darab nem konjugált kettős kötést tartalmaznak transz konfigurációban (egyenesebb alakot biztosít a zsírsavaknak). Bizonyos TFA megtalálhatóak a természetben is, azonban az iparilag előállított transz-zsírsavakat táplálékkal sokkal nagyobb mennyiségben juttathatunk a szervezetbe. A természetesen előforduló TFA konjugált linolsavként vannak jelen, melyeket egyes mikroorganizmusok a többszörösen telítetlen zsírsavak izomerizációjával állítanak elő [98].

II.3.1. Zsírsvak fiziológias szerepe

A telített és a telítetlen zsírsvak egyaránt nélkülözhetetlen tápanyagforrást biztosítanak a szervezetnek, de szerkezetüktől függően egyedi biológiai tulajdonságokkal is rendelkeznek. Központi szerepet töltenek be különböző élettani folyamatokban, beleértve a lipid-anyagcserében és az energia háztartásban betöltött kulcsfontosságú funkciójukat. A zsírsvak az oxidációval történő energiatermelés szubsztrátjai, melyek a zsírsvövetben raktározódnak. Mindemellett jelentős szerepet játszanak a membrán fluiditásában, jelátviteli útvonalak és transzkripciós faktorok modulálásában [94, 99-101]. A központi idegrendszer működésében is fontos szerepet töltenek be a zsírsvak, az n-3 LC PUFAs és ezen belül is különösen a dokozahexaénsav (DHA) igen nagy mennyiségben felelhet a központi idegrendszerben, mivel a neuronok membránjának egyik fontos komponense, és ennek köszönhetően lényeges strukturális és funkcionális feladatokban érintett [102].

A telített zsírsvak átlagosan az összes zsírsvak mennyiségének 30-40 %-át teszik ki és fontos szerepet töltenek be a celluláris- és szervezeti szintű anyagcsere folyamatokban. Annak ellenére, hogy a szervezet is képes a telített zsírsvak szintézisére, nem nélkülözhetően fontos forrást jelent a táplálékkal bevitt SAT mennyisége is, habár ma még nehéz kvantifikálni az étrendből származó és szintetizálódó telített zsírsvak valódi jelentőségét. Kutatások bizonyították, hogy a magas SAT bevitel ezen belül is a C14:0, C12:0 és C16:0 zsírsvak mutatnak leginkább pozitív korrelációt a magas koleszterinszinttel és a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásának magasabb kockázatával [95, 103]. A telített zsírsvakhoz hasonlóan az emlős szervezet képes szintetizálni az egyszeresen telítetlen zsírsvakat is, ennek ellenére a táplálkozás során e zsírsvak a zsírbevitel egyharmadát teszik ki a világ nagy részén [96].

A Zsírsvak az immunrendszer működésében is fontos szerepet töltenek be, azonban az egyszeresen telítetlen zsírsvak hatása ellentétesnek mutatkozik a telített zsírsvakkal szemben, míg a SAT inkább gyulladás fokozó hatással bírnak, addig általánosságban elmondható, hogy a legtöbb egyszeresen telítetlen zsírsvak csökkenti a gyulladós folyamatokat. Habár a MUFAs gyulladáscsökkentő hatása kevésbé tanulmányozott, az eddigi vizsgálatok alátámasztják e hatását [104]. Emellett a MUFAs táplálékkal történő nagyobb bevitele a szervezetbe pozitív korrelációt mutatott a kognitív funkciók és memória hosszabb megőrzésével [105]. Vannak azonban olyan telítetlen zsírsvak is, amelyek nagy mennyiségű fogyasztása komoly egészségügyi kockázatot jelent, ide

tartoznak a mesterségesen előállított TFA-k is, amelyeknek a megemelkedett szintje jelentős korrelációt mutatott számos kórfolyamat megjelenésének magasabb prevalenciájával, többek között az allergia, a rák, a diabetes, az elhízás különféle fajtái és különböző kardiovaszkuláris rendszert érintő rendellenességek [106, 107]. A többszörösen telítetlen zsírsavak mellett, hogy számottevő szerepet játszanak a sejtmembránok alkotóelemeiként, megkülönböztetett jelentőséggel bírnak különböző egészségügyi problémák kialakulásának csökkentésében, mint a kardiovaszkuláris rendellenességek, gyulladási folyamatok és bizonyos a központi idegrendszert érintő kórfolyamatok [108].

A modern táplálkozásnak köszönhetően egyre inkább megfigyelhető az omega-6 PUFAs fogyasztásának megemelkedett aránya és ezzel párhuzamosan az omega-3 PUFAs csökkenése. Az n-3 LC PUFAs hiánya a szervezetben számos betegség kialakulásához vezet, mint például különböző neurodegeneratív rendellenességek, rák, MDD és gyulladási kórfolyamatok, míg e zsírsavak visszapótlása különösen a DHA és eikozapentaénsav (EPA) jelentősen javította ezen egészségügyi problémákat [109]. Mindazonáltal nem csak az n-6 és n-3 LC PUFAs abszolút mennyiségében bekövetkező változások fontosak, hanem az egymáshoz viszonyított arányuk is meghatározó. A nyugati típusú táplálkozásnak köszönhetően az n-6/n-3 zsírsavak aránya jelentősen megváltozott és a jelenlegi szakirodalmi ajánlásoktól eltérően az 1:1 arányról akár 20:1 arányra is megemelkedhet ez az érték, mely jelentős egybeesést mutat a túlsúly és a definitív elhízás prevalenciájának emelkedésével [94, 110]. Mindemellett kimutatható, hogy e két hosszú szénláncú zsírsav arányában bekövetkező változások erősen hozzájárhatnak az érlelmeszesedés, cukorbetegség és különböző gyulladási megbetegedések arányának megemelkedéséhez is [110].

Az LC PUFAs befolyásolják a központi idegrendszer fejlődését és működését is, ezért az n-3 és n-6 LC PUFAs egymáshoz viszonyított aránya különösen fontos e folyamatokban. Ennek megfelelően e zsírsavak megoszlásában bekövetkező változások akár neurológiai kórfolyamatokat is előidézhetnek, vagy épp ellenkezőleg neuroprotektív hatással bírhatnak [94, 111, 112]. Állatkísérletes vizsgálatok során igazolták, hogy az n-6/n-3 arányban történő változások a magatartási folyamatokat befolyásolják [113, 114]. Rágcsálókban történő n-3 PUFAs deficit esetében megfigyelhető, hogy a központi idegrendszerben is jelentősen csökken a DHA szint és ezzel párhuzamosan megemelkedik az n-6 PUFAs aránya, továbbá alacsony n-3 PUFAs tartalmazó táppal nevelt állatok esetében megfigyelték, hogy a stresszel szembeni érzékenységük,

szorongásos viselkedésük megemelkedett és agresszívvá váltak, mint kontroll társaik [97, 115].

II.3.2. Zsírsvak és a GI baktériumok

A zsírsvak a szervezetre gyakorolt hatásuk mellett fontos szerepet töltenek be a GI mikrobiom összetételének alakításában is, ennek következtében a zsírsvakban bekövetkező minőségi és mennyiségi változás a bélflóra komplex ökológiai rendszerét jelentősen befolyásolja. Napjainkban egyre több vizsgálat irányul a különböző diéták és a bélmikrobiom összetétel kapcsolatának felderítésére. Különböző zsírsvakokat és zsírsvak csoportokat tartalmazó diéták, többek között SAT, MUFAs, PUFAs alapúak, illetve ezek különböző kombinációi, vagy akár a zsírsvak táplálkozással történő megváltoztatásának alkalmazása jelentős eltéréseket eredményezett a GI flóra összetételében, mind faj, mind pedig család szinten is [116-118].

A zsírsvak struktúrájuknál fogva eltérően hatnak a különböző baktériumokra. Ez megfigyelhető akár törzs szinten is, mint például a *Bacteroidetes* törzsbe tartozó fajok arányát jelentősen befolyásolja, hogy SAT-, n-3 PUFAs-, vagy n-6 PUFAs-gazdag táplálékot kapnak az állatok [117, 119]. Nem csak törzs szinten jelentkeznek azonban eltérések, hanem nemzetség szinten is hasonló hatások figyelhetők meg, például a szervezet számára jótékony hatással bíró *Bifidobacterium*, illetve *Lactobacillus* nemzetség tagjaiban jelentős populáció szintű változások következtek be attól függően, hogy milyen zsírsvakban gazdag diétának voltak kitéve a vizsgált egyedek [117, 120, 121]. Az n-3/n-6 PUFAs arányában történő eltérések nem csak a szervezet fiziológias folyamataiban okoznak változásokat, hanem a mikrobiom közösségen belül is képesek diszbiózist indukálni azáltal, hogy a GI traktus baktériumainak a diverzitását és abundanciáját jelentősen módosítják [117, 118, 122, 123]. Jól tudjuk ugyanakkor, hogy a táplálkozási szokások megváltoztatásával a mikrobiom közösséget kedvező irányban is el lehet mozdítani. Vizsgálatok igazolták, hogy a MUFAs alapú diéta jótékonyan befolyásolta a bélflórát azáltal, hogy növelte a GI rendszer számára fontos kommenzalista baktériumok mennyiségét szemben az SAT alapú diétával [117]. Továbbá a különböző poliszacharid és szénhidrát alapú diéták a jótékony hatású *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségbe tartozó fajok arányának megemelkedését okozták [124]. Mindezek a kísérletek alapján elmondható, hogy az intesztinális traktus baktériumainak

arányát akár negatív akár pozitív irányba el lehet mozdítani a különböző zsírsav alapú diéták segítségével.

A legtöbb zsírsav rendelkezik antibakteriális tulajdonságokkal, különösképpen a MUFAs és a LC PUFAs (C16-C20) kategóriába tartozó zsírsavak, és e sajátosságuk lehetővé teszi, hogy a patogén mikroorganizmusok abundanciáját hatásosan képesek redukálni, azonban azt, hogy a patogének melyik fajára fejtenek ki hatást és milyen mértékben képesek bennük csökkenést kiváltani, nagyban meghatározza a zsírsavak típusa, a mikrobák összetétele és a környezet pH tartalma [119, 121, 125-127].

Ma már tudjuk, hogy a zsírsavak és a mikrobiom kapcsolata nem csak egyirányú, egyre nagyobb számú kutatás bizonyítja, hogy a mikrobiom alkotta ökoszisztéma megváltozása hatással van a zsírsavak mennyiségére és összetételére is. A vizsgálatok fő fókuszában a rövid szénláncú zsírsavak és a mikrobiom kapcsolatának feltárása áll, ugyanis a rövid szénláncú zsírsavak (ecetsav, propionsav, butánsav) a komplex szénhidrátok bakteriális fermentációja során keletkező végtermékek, emiatt az SCFAs jelenléte fontos indikátorként szolgál a bakteriális fermentáció meglétéről, ennek következtében a vastagbélben jelenlévő baktériumflóra összetételéről [128, 129]. Az SCFAs kiemelt szerepe, hogy energiát biztosítsanak a gasztrointesztinális rendszerben jelenlévő sejteknek, ezen belül is a butánsav biztosítja a fő energiaforrást az enterociták és a kolonociták számára [128, 130]. A propionátot szintén tudják lokálisan hasznosítani a sejtek [131] ezáltal elmondható, hogy az SCFAs nagy része hasznosul és felszívódik a GI traktusban, illetve a mikrobiomban, azonban egy kis részük (főként az ecetsav) a perifériás keringésbe jut. A keringésbe kerülő SCFAs képesek a vér-agy gáton áthaladni, így az SCFAs képesek az egész szervezet működésére hatást gyakorolni nem csak lokálisan a GI traktus sejtjeire, hanem a glukóz homeosztázisra, a lipid metabolizmusra, és a lokális immun funkciókra is [132, 133]. Mivel legnagyobb mennyiségben az ecetsav tud a keringésbe jutni, ezáltal a vér-agy gáton átjutva képes csökkenteni az étvágyat központi homeosztatiszikus mechanizmusok révén [134]. Mindamelllett, hogy a propionsav és butánsav koncentrációja alacsony a perifériás keringésben, képesek szisztémás hatásokat is kifejteni azáltal, hogy indirekt hatnak a hormonális- és központi idegrendszerre [133]. Az SCFAs másodlagos messenger molekulaként is funkcionálnak, ezáltal képesek szabályozni számos génextpressziós folyamatot, stimulálni képesek hormonok, illetve a bélrendszerben termelődő peptidek szintézisét, valamint különböző szignál transzdukciós útvonalakat tudnak befolyásolni [132, 133]. A butánsav speciálisan, HDAC inhibitor aktivitásának köszönhetően képes változásokat indukálni a gén

expresszióban. Kísérletesen bizonyították, hogy a neuronális regenerációban és plaszticitásban szerepet játszó bizonyos gének expresszióját növeli [132, 133, 135]. Mindezek következtében az SCFAs számos perifériás és centrális folyamat szabályozásában részt vesznek, és ebből következik, hogy a bélmikrobiom hatása sem korlátozódik a GI traktusra, hanem magasabb, akár központi idegrendszeri folyamatokat is képesek befolyásolni az általuk termelt zsírsavak segítségével.

A mikrobiom módosulásának következményei azonban nem csak a rövid szénláncú zsírsavak összetételében, hanem a hosszabb szénláncú zsírsavak tartalmában is változásokat tud okozni. A fentiekén túl többen alátámasztották, hogy a bélflóra jelentős szereppel bír bizonyos zsírsavak termelésében. Számos baktérium, többek között a *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* nemzetségbe tartozó fajok képesek bioaktív zsírsav izomerek szintézisére, mint például a konjugált linolsav (CLA), melyet összefüggésbe hoztak lokális és szisztémás egészség megőrző tulajdonságokkal, ezt a szabad linolsavból linolsav-izomeráz enzim segítségével képesek szintetizálni a baktériumok [136-138]. A baktériumok a linolsavból képesek még transz-C18:1 zsírsav izomereket is szintetizálni, mint például a vaccénsavat, mely szintén pozitív tulajdonságokkal bír a szervezet számára [139, 140]. Habár a PUFAs-at, mint esszenciális zsírsavakat az emésztőrendszerben jelenlévő baktériumok nem képesek szintetizálni, a mikrobiom mégis hatással van a metabolizmusukra és abszorpciójukra. Egyes baktériumok részben képesek metabolizálni bizonyos PUFAs-at, és ezzel a zsírsav metabolizmusban és eloszlásban eltéréseket tudnak generálni. Ezáltal, léteznek olyan mikrobiális flórát alkotó fajok, melyek képesek lehetnek megemelni akár az omega-3 PUFAs szintjét, mely jelentősen hozzájárul egészségünk megőrzéséhez [122, 141]. A PUFAs mellett a telített hosszú szénláncú zsírsavakban is eltéréseket tud indukálni a mikrobiom összetételének megváltozása. Vizsgálatok igazolták, hogy a *Prevotella*, *Lactobacillus* és *Alistipes* nemzetségek fajai összefüggésben állnak a telített hosszú szénláncú zsírsavak mennyiségével [126]. A páratlan szénatomszámú SAT-okat is baktériumok termelik, ezáltal a mikrobiom összetételének változása szintén képes modulálni e zsírsavak mennyiségét [126, 142].

Mindezek alapján a gasztrointesztinális mikrobiom és a szervezetben jelenlévő zsírsavak közötti kapcsolat meghatározóbb lehet, mint eddig gondoltuk, és nem csak a táplálkozás, de a bélmikrobiom összetétele is fontos szerepet játszhat a zsírsavak összetételének és mennyiségének változásában.

III. Célkitűzések

A disszertáció anyaga 2 fő téziscsoport köré épül.

1. Kutatásunk első célkitűzése az volt, hogy megismerjük a gasztrointesztinális traktus mikrobiom módosításának szociális magatartási folyamatokra gyakorolt hatásait, s ennek révén jobban megértsük a bélbaktériumok viselkedésre kifejtett sokrétű hatását.
2. Kísérletsorozatunk második célja az volt, hogy megvizsgáljuk a gasztrointesztinális traktus mikrobiom módosításának hatásait a részletes zsírsav spektrumra, s ennek következtében jobban megismerjük a bélbaktériumok zsírsavtermelésben betöltött szerepét.

Mindezek alapján a dolgozat további részében az alábbi központi kérdések megválaszolására összpontosítottunk:

- Célunk volt megvizsgálni, hogy a krónikus széles spektrumú antibiotikum kezelés okozhat-e felnőtt állatoknál autizmus spektrum zavarhoz hasonló tüneteket a szociális viselkedésben, illetve, hogy ezen viselkedésbeli elváltozások összehasonlíthatóak-e a valproát indukálta ASD modellben megjelenő eltérésekkel.
- Probiotikum keverékünkkel kapcsolatos fő kérdésünk volt, hogy a kezelés képes-e visszafordítani az antibiotikum által kiváltott magatartásbeli eltéréseket.
- További célunk volt megállapítani, hogy a probiotikum keverékkel történő kezelés képes-e a valproát indukálta ASD fejlődési modellben megjelenő szociális viselkedési eltérések enyhítésére, csökkentésére.
- Azt is szeretnénk feltárni, hogy a krónikus széles spektrumú antibiotikum kezelés hogyan hat a testsúlyra, a táp- és vízfelvételre.
- Ugyancsak tisztázni kívántuk, hogy az antibiotikum kezelés következtében kialakuló mikrobiális változások képesek-e befolyásolni a zsírsavak koncentrációját és tömegszázalékos arányát.

- Megválaszolandó kérdésként merült fel, hogy probiotikum keverék adásával tudunk-e változtatni a zsírsavösszetételen.
- Végül pedig azt is szeretnénk volna megvizsgálni, hogy a probiotikum keverék adásával vissza tudjuk-e állítani az antibiotikum okozta változásokat a zsírsavak összetételében.

IV. Anyagok és Módszerek

IV.1. Kísérleti állatok

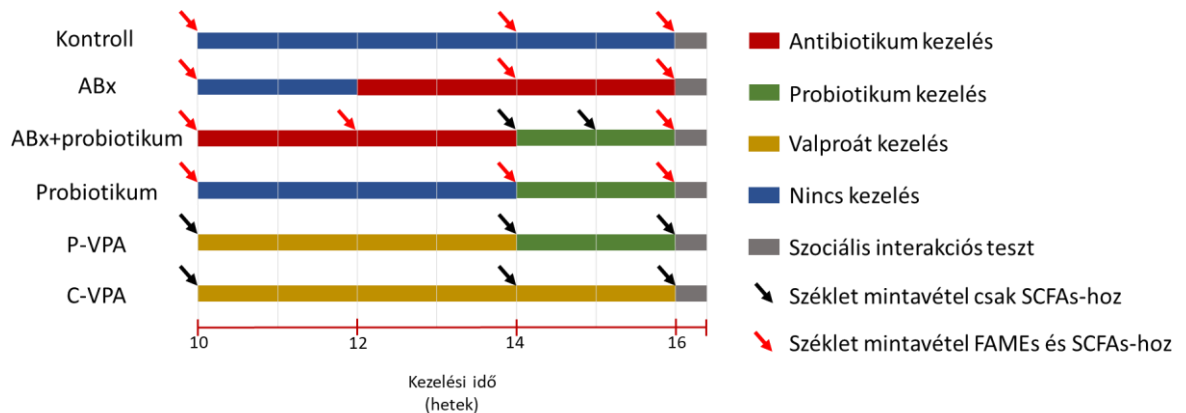
Kísérleteinkben összesen 72 darab felnőtt hím Wistar patkányt használtunk. A kezelések az állatok 10 hetes korától kezdődtek. Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között tartottuk egyesével külön ketrecben, állandó hőmérséklet (21 ± 2 °C), páratartalom (55-60 %) és 12-12 órás sötét-világos periódust biztosítva. Az állatok standard laboratóriumi rágcsálótápot (LT/R standard rágcsálótáp, Innovo Kft, Isaszeg, Hungary) és csapvizet kaptak *ad libitum*. Mindennapi kézhez szoktatásban (handling) részesítettük őket, hogy az emberi jelenléthez és érintéshez hozzászokjanak. A kísérleti állatok tartása és a velük való foglalkozás során az intézeti (kísérleti engedély száma: BA02/2000-07/2023; BA02/2000-06/2023) hazai (1998. évi XXVIII. tv. az állatok védelméről és kíméletéről; 40/2013. (II.14) Kormányrendelet az állatkísérletekről) és nemzetközi előírások, európai uniós irányelvek érvényesültek (A Tanács 86/609/EGK irányelve, 1986, 2006; Az Európai Parlament és a Tanács 2010/63/EU irányelve).

IV.2. Kezelések

IV.2.1. Antibiotikummal és probiotikummal történő kezelések

Az állatokat random módon (egy vagy két patkány/alom/csoport) négy csoportba osztottuk: 1. Kontroll csoport (kontroll); 2. Antibiotikum kezelt csoport (ABx); 3. Antibiotikum és probiotikum kezelt csoport (ABx+probiotikum); 4. Probiotikum kezelt csoport (probiotikum) (1. ábra). Az állatokat széles spektrumú antibiotikum keverékkel kezeltük annak érdekében, hogy az intesztinális baktériumflórát jelentősen lecsökkentsük. Az antibiotikum keveréket az egyedeknek 4 héten keresztül biztosítottuk ivóvizükbe való keveréssel, ezzel is csökkentve az őket érő stresszt. A keverék 5 féle antibiotikumból állt (ampicillin 1 g/l, vancomycin 500 mg/l, ciprofloxacin HCl 20 mg/l, imipenem 250 mg/l és metronidazole 1 g/l), melyet 3 naponta cseréltünk [143]. Azoknak az állatoknak az ivóvizét, akik nem részesültek antibiotikum kezelésben szintén 3 naponta cseréltük. Az antibiotikum kezelést követően probiotikumot kapó- és a csak probiotikum kezelésben részesülő csoportok tagjai 2 héten keresztül minden nap probiotikum keveréket kaptak táplálékukhoz kiegészítve. A készítmény 4 féle jótékony hatású

baktériumfajt tartalmazott (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) meghatározott mennyiségben és összetételben, mely a Pécsi tudományegyetem szellemi termékeként van bejegyezve (422.lbh.5.(2019.09.05)). A baktériumtörzsek a DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Deutschland, Leibnitz) cégtől származnak. A *Lactobacillus spp.* tenyésztése 100-100 ml folyékony Rogosa medium táptalajon (OXOID Ltd. UK) 2 éjszakán át 37 °C-on rázó inkubátor (200 rpm) segítségével történt, míg a *Bifidobacterium spp.* kitenyésztése anaerob agarta táptalajra oltva (Neogen Europe Ltd. UK) zajlott, és az anaerob kondíció GENbag anaer (BioMérieux SA France) használatával lett biztosítva. 2 napos szaporítást követően a baktériumtörzseket 100-100 ml tápoldatba oltva 4 °C-on 5000 fordulat/perc sebességgel 5 percig centrifugáltuk. Az üledéket fiziológiás sóoldatban újraszuszpendáltuk és a törzsek szuszpenzióit összekevertük a meghatározott CFU/ml mennyiség eléréséig. A törzsek elvegyítése előtt időközönként kvalitatív és kvantitatív analízist is végeztünk MALD-TOF módszer segítségével. A 2 héten át tartó probiotikum kezelés során a keverék naponta lett legyártva és azonnal felhasználásra került a probiotikumot kapó egyedek esetében.



1. ábra Kísérleti elrendezés a csoportok és kezelési idők alapján. Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, Probiotikum: probiotikum kezelt csoport, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport, C-VPA: valproát kezelt csoport. A nyilak a széklet mintavételi időpontokat mutatják a csoportok esetében, a fekete nyíl csak a rövid szénláncú zsírsavakhoz (SCFAs) történő mintavételeket jelöli, a piros nyilak a rövid szénláncú zsírsavak (SCFAs) és a zsírsav metil-észterek (FAMES) analíziséhez történő mintavételi időpontokat jelölik egyszerre.

IV.2.2. Lítium-kloriddal történő kezelés

Annak érdekében, hogy egyértelműen kizárhassuk, hogy a magatartásban megjelenő eltérések nem az antibiotikum kezelés következtében megjelenő intesztinális diszkomfort érzésnek a következményei pilot kísérletet végeztünk. A pilot kísérletben egy lítium-kloriddal (LiCl) kezelt csoportot alakítottunk ki, mely során 8 állatot kezeltünk. Ebben a kísérleti felállásban, lítium-klorid segítségével melyről ismeretes, hogy erőteljes gyomor és bélrendszeri panaszokat idéz elő, szeretnénk volna intesztinális diszkomfortot kiváltani az állatoknál. A patkányoknak lítium-klorid (125 mg/kg/ml) [144] injekciót adtunk intraperitoneálisan, majd fél órával az injekció után történtek a magatartási vizsgálatok.

IV.2.3. Valproáttal történő kezelések

Az autizmus spektrum zavar modellezéséhez valproát indukálta ASD állatmodellt használtunk [145]. A modell létrehozásához először hím és nőstény állatokat pároztattunk 1 éjszakán keresztül, majd az ezt követő reggelen, ha hüvelydugó jelenlétét észleltük, akkor a vemhesség első napjának tekintettük ezt a napot. A sikeres megtermékenyítést követően a vemhes nőstényeket egyszeri intraperitoneális injekcióban részesítettük a vemhesség 12,5 napján. A vemhes anyák 500mg/ttkg valproát (Sigma-Aldrich; P4543) injekciót kaptak 250 mg/ml fiziológias sóoldatban oldva, míg azok az anyák, melyek utódai a kontroll csoportot képezték csak fiziológias sóoldatot kaptak. A valproát injekciót kapott nőstények egészségesek voltak, azonban az almonkénti utódjaik száma megközelítőleg 25 %-kal alacsonyabb volt, mint a kontroll anyák utódjainak száma. Minden anyaállatot egyedileg tartottunk, utódjaik zavartalan felnevelése érdekében. A megszületett utódok közül csak a hímekkel dolgoztunk a továbbiakban, és amint elérték a 8 hetes kort leválasztottuk őket véletlenszerűen (1 vagy 2 patkány/ alom/ csoport) 2 csoportba osztva: 1. kontroll valproát kezelt csoport (C-VPA); 2. valproát és probiotikum kezelt csoport (P-VPA) (1. ábra). A probiotikumot is kapó csoport egyedei a fentebb leírt probiotikum keveréket ugyanolyan módussal kapták minden nap 2 héten keresztül.

IV.3. Kísérletes vizsgálatok

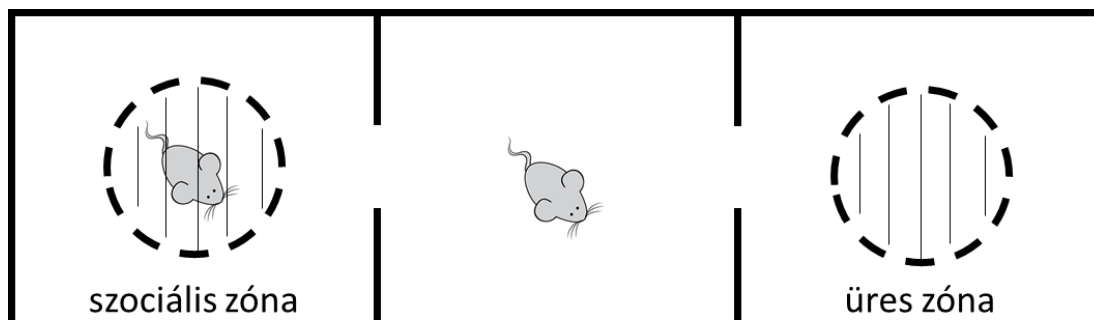
IV.3.1. Testtömeg, táplálék- és vízfelvétel mérése

A kísérletben résztvevő állatok súlya 10 hetes koruktól a kísérletek végeztéig 3 naponta lett megmérve, víz- és táp fogyasztásuk pedig naponta volt monitorozva.

IV.3.2. Szociális interakciós teszt

Háromkamrás szociális interakciós tesztet használtunk az állatok általános szociabilitásának vizsgálatára és a szociális deficit azonosítására [146]. Az apparátus (150 × 40 × 40 cm) 3 részből állt: középső zóna (30 × 40 cm), szociális zóna (60 × 40 cm) és üres zóna (60 × 40 cm). Az utóbbi két zóna mindegyike tartalmazott 1-1 kerek 18 cm átmérőjű ketrecet. A kísérleti elrendezés a 2. ábrán látható. A kísérleteket egy hangszigetelt, gyengén megvilágított szobában végeztük. Minden állat után az egész apparátust 1 %-os Incidin spray-vel kitakarítottuk, megakadályozva, hogy az állatok szaga befolyásolja egymás viselkedését. Az aréna fölött egy videokamerát helyeztünk el, amely rögzítette az állatok mozgását, majd ezt a Noldus EthoVision Basic software (Noldus Information Technology b.v., Wageningen, Hollandia) segítségével tároltuk és elemeztük ki. A kísérlet során az állatokat először a középső zónába helyeztük és hagytuk, hogy szabadon felfedezzék az apparátust 10 percen keresztül (habituáció), majd ezt követően egyből visszahelyeztük őket saját ketrecükbe 3 percre, s ezalatt egy számukra ismeretlen, azonos nemű és korú, még sosem látott egyedre tettünk az egyik ketrecbe. Ezáltal az ismeretlen állatot tartalmazó ketrec zónája vált a szociális zónává és az üres ketrecet tartalmazó zóna az üres zóna lett. A 3 perc leteltével az állatokat visszahelyeztük a középső zónába és hagytuk, hogy 10 percig ismét szabadon felfedezzék az egész apparátust (teszt). A kísérlet során rögzítettük az állatok által megtett távolságot, a különböző zónákban eltöltött időt és a teszt során a két oldalsó zónába történő első belépés időpontját. Emellett feljegyeztük az állatok interakcióját az ismeretlen állatot tartalmazó ketrec és az üres ketrec esetében is. A patkányok magatartási mintázatait, azaz az ágaskodások (rearing) és mosakodások (grooming) számát kézzel regisztráltuk, melyek, mint ismétlődő sztereotip mozgásmintázatoknak feleltethetők meg. Ezenfelül kiszámoltuk a szociabilitási indexet (szociális zónában töltött idő – üres zónában töltött

idő) / (szociális zónában töltött idő + üres zónában töltött idő), mely megmutatja az ismeretlen állattal történő interakció mértékét.



2. ábra A háromkamrás szociális interakciós teszt kísérleti elrendezése.

IV.4. Kromatográfias vizsgálatok

A zsírsavak kromatográfias analiziséhez meghatározott időközönként (SCFAs vizsgálatánál 3-5 időpont, zsírsav metil-észterek (FAMEs) vizsgálatánál 3 időpont) friss székletmintát vettünk az állatoktól steril eppendorf csövekbe, melyeket a felhasználásig $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os hűtőben tároltunk.

IV.4.1. Rövid szénláncú zsírsavak (SCFAs) analízise

A rövid szénláncú zsírsavak vizsgálatára Wall és munkatársai [147] protokollját vettük alapul kismértékű módosításokkal. A mintaelőkészítés során az előzőleg levett székletmintákból 100 mg-ot kimérve 1 ml desztillált vízzel homogenizáltuk vortex segítségével, majd 10 perc szobahőmérsékleten történő állást követően 100 μl (2 mmol/l, heptánsav - Sigma-Aldrich; 43858) belső standardot adtunk hozzá. A mintákat ezt követően 5 percig centrifugáltuk 10.000-es fordulatszámra és a filteren átszűrt felülúszót használtuk a 3 rövid szénláncú zsírsav (ecetsav/C2, propionsav/C3, butánsav/C4) koncentrációjának meghatározására. A mennyiségi meghatározást belső standard módszer segítségével végeztük, melyhez kalibrációs sort (10 mmol/l, 7,5 mmol/l, 5 mmol/l, 2,5 mmol/l and 0,5 mmol/l) készítettünk a standard oldatokból (ecetsav - Sigma-Aldrich; A6283; propionsav - Sigma-Aldrich; 94425; és butánsav - Sigma-Aldrich; 19215). Az analízist Agilent Technology 6890N GC-5975 MS gázkromatográf-tömegspektrométer készülékkel (GC-MS) végeztük, melyhez HP-INNOWAX oszlopot

(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm; Agilent Technology) használtunk. A mérés során hélium vivőgázt használtunk 1,5 ml/perc-es áramlási sebességgel. A hőmérsékleti program során a kályha hőmérséklete kezdetben 1 percig 80 °C volt, majd 20 °C/perc sebességgel felmelegítettük 200 °C-ra és 2 percig ott tartottuk. Az injektálás során split-splitless automata mintabemérést használtunk (250 °C), 20:1-es befecskendezési aránnyal. Az injektált mennyiség 1 μl volt. Az átvezető hőmérséklete 250 °C-os volt, a tömegspektrométer ionforrását 230 °C-on, a Quadrupol analizátort 150 °C-on tartottuk. Oldószer késleltetése 3 perc volt. A tömegspektrométer elektronütközéses ionizációs (EI) üzemmódban 70 eV energiájú elektronnyalábon használtuk, és a pásztázott tömegtartomány 50-300 amu (atomi tömegegység) volt.

IV.4.2. Zsírsvav metil-észterek (FAMES) analízise

A zsírsvav metil-észterek analíziséhez kis módosításokkal Lopez-Lopez [148] protokollját használtuk. A vizsgálathoz begyűjtött székletmintákból (44 db állat mintái) megközelítőleg 100 mg mennyiségeket vettünk ki teflonbéléses kupakkal ellátott 16 x 125 mm-es tesztcsövekbe. Ezt követően minden mintához hozzáadtunk 60 mg metil-tridekanoát (C13-0) 20 ml n-hexánnal készült oldatából 40 μl-t, mint standard oldatot. A mintákhoz 3 ml metanol:hexán 4:1 (V/V) elegyet és 1-2 mg pirogallolt adtunk, majd ezt követően minimum fél órán át fagyasztottuk a mintákat. A fagyasztást követően lassan adagolva 300 μl acetil-kloridot adtunk a csövekhez, majd a standardot tartalmazó, acetil-kloridos mintákat 100 °C-os forralás alatt 1 órán át rázógép segítségével rázattuk. Amint a csöveket lehűtöttük lassan 5 ml 6 %-os K₂CO₃-oldatot adunk hozzá a reakció leállítására és a keverék semlegesítése céljából. A mintákat ezt követően vortex segítségével homogenizáltuk és 10 percig centrifugáltuk 3000 fordulat/perc sebességgel. A felső hexános fázist egy 2 ml-es mintatartócsőbe mikropipetta segítségével átvittük, majd ehhez még az 1 ml-es folyadékszint eléréséig hexánt adagoltunk. A gázkromatográfiás készülékbe történő injektálásig -80 °C-os fagyasztóban tároltuk a mintákat. A zsírsvavak analízisét PerkinElmer Clarus 690 gázkromatográfiás készülékkel és ehhez tartozó lángionizációs detektor (PerkinElmer, USA) segítségével vizsgáltuk, melyhez Rt-2560 kapillárisoszlopot (100 m × 0,25 mm i.d. × 0,20 μm, Restek) használtunk. Vivőgázként héliumot alkalmaztunk 1,3 ml/perc áramlási sebességgel. Az injektálás során split mintabemérést használtunk (225 °C) és a befecskendezési arány 20:1 volt. Az injektált mennyiség 2 μl volt. A detektor hőmérsékletét 300 °C-ra állítottuk. A kályha

hőmérséklete kezdetben 100 °C volt, melyet 4 percig tartottunk majd 3 °C/perc sebességgel felmelegítettük 250 °C-ra és 25 percig ott tartottuk.

A minták lemerését követően a zsírsav metil-észterek analízisét a PerkinElmer TotalChrom szoftverével számított görbe alatti terület alapján elemeztük. A zsírsavak azonosítása a külső standardok retenciós idején alapult (PUFA3 (Supelco, St. Louis, MO, USA; GLC-674, 642, 643, 569b, 481, 473, Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA; C16:1n-9-ME (Larodan AB, Solna, Svédország), The Bacterial Acid Methyl Esters CP Mixture (Matreya LLC., State College, PA, USA)) és a zsírsavak koncentrációját µg/100 mg-ban fejeztük ki. Az abszolút koncentrációt (µg zsírsav/100 mg nedves széklet) és relatív zsírsav koncentrációt, azaz a zsírsavak tömegszázalékos arányát (tömeg%: minden meghatározott zsírsav tömege az összes meghatározott zsírsav össztömegéhez viszonyítva) is meghatároztuk a külső standardokból származó korrekciós tényezők felhasználásának segítségével.

IV.5. Szövettan

A hippocampus rétegvastagságának megállapítása céljából szövettani vizsgálatokat végeztünk. A kísérletek befejeztével az állatokat i.p. adott uretánnal (20 %, 1,4 g /tkg) túllattattuk, majd először izotóniás sóoldattal, azután pedig 4 %-os formaldehid-oldattal transzkardiálisan perfundáltuk. Csoportonként 6 db állatnak az agyát eltávolítottuk, majd 4 %-os formalinban fixáltuk. Ezt követően fagyasztott, 40 µm-es sorozatmetszeteket készítettünk a hippocampus területéről, amiket krezil-violával festettünk meg (Nyssl-festés). A festés során 70- és 50 %-os etanolba merítettük a metszeteket, majd kétszer desztillált vízbe 5-5 percre. Ezt követően 0,5 %-os krezil-viola oldatban 7 percig festettük. A festés után desztillált vízzel öblítettük és 70 %-os 10 csepp 100 %-os ecetsavval kevert etanolban dehidratáltuk a metszeteket, és ezt követően 70-, 90-, és duplán 96 %-os etanolba, majd 1 percig 1-propanolba mártjuk a lemezeket. A fixálás során a metszeteket 1:1 arányú 1-propanol és xilol keverékébe helyeztük 5 percre és ezután a fedőlemezek felhelyezése előtt hagytuk 1 éjszakán át xilolban ázni. A metszeteket ImageJ (NIH) software segítségével elemeztük ki, melynek során a hippocampus különböző régióinak (subiculum, CA1, CA2, CA3, Gyrus dentatus) átmérőjét vizsgáltuk egy általunk kiválasztott szakasz (bregma -3,6-tól bregma 3,8-ig) esetében.

IV.6. Statisztika

A háromkamrás szociális interakciós teszt, a rövid szénláncú zsírsavak és a szövettani vizsgálat eredményeinek elemzése során az adatokat SPSS statisztikai szoftvercsomag (IBM SPSS Statistics 22) segítségével dolgoztuk fel és a szignifikancia szintet minden esetben $p < 0,05$ -nél határoztuk meg. A normalitás- és homogenitás vizsgálata során a szociális interakciós teszt analízise esetében a szociális és üres zónába történő első belépés ideje és a szociabilitási index eredményei nem követték a normál eloszlást ezért ezekben az esetekben a nem parametrikus Kruskal–Wallis tesztet alkalmaztuk a vizsgálati csoportok (C-VPA, P-VPA, kontroll, ABx, ABx+probiotikum és probiotikum) különbségeinek feltárására. A grafikonokon és táblázatokban ezen adatok medián (interkvartilis terjedelem [IQR]) értékei szerepelnek. A szociális interakciós teszt többi mért paraméterének adatai és az állatok súlyának, táp- és vízfogyasztásának értékei normál eloszlást mutattak, ezért a parametrikus tesztek közül az egyutas ANOVA-t alkalmaztuk, és a post-hoc analízishez Tukey tesztet végeztük. A grafikonokon és táblázatokban ezen adatok átlag \pm standard hiba (S.E.M.) értékei szerepelnek. A rövid szénláncú zsírsavak adatai nem követték a normál eloszlást, ezért a csoporton belüli összehasonlításokat Friedman-próbával végeztük és a csoportok közötti szignifikanciák feltárására Kruskal–Wallis tesztet alkalmaztunk. Az eredményeket a grafikonokon és táblázatokban medián (IQR) értékekkel tüntettük fel. A szövettani vizsgálatok eredményei nem mutattak normál eloszlást, ezért Kruskal–Wallis tesztet alkalmaztunk a különbségek feltárására.

A FAMEs analízise során először főkomponens analízist (PCA) végeztük. A PCA az adatokat egy alacsonyabb dimenziójú térré változtatja át azáltal, hogy az adatokat egy új, ortogonális koordináta-rendszerre alakítja, amelyeket főkomponenseknek (PC) neveznek. Ezeket a főkomponenseket a program variancia mértéke szerint rendezi úgy, hogy egymás közelében legyenek a hasonlóak. Ha az eltérések hasonlóak, akkor a pontszámoknak közel kell lenniük egymáshoz a PC1 és a PC2 közötti diagramon. A PCA modell illesztése eigenvalue (sajátérték) dekompozíciós módszerrel történt. A kezeléseknek a zsírsavak összetételére és koncentrációjára gyakorolt hatásának időbeni kimutatására egy lineáris kevert random modellt alkalmaztunk, ahol az egyes patkányokat azonosítóval láttuk el és ezeket az azonosítókat használtuk, mint random faktor és a neasted (fészek) hatás pedig az alom volt. A koncentrációváltozások modellezésénél logaritmikus transzformációt alkalmaztunk a megfelelő modellillesztés érdekében.

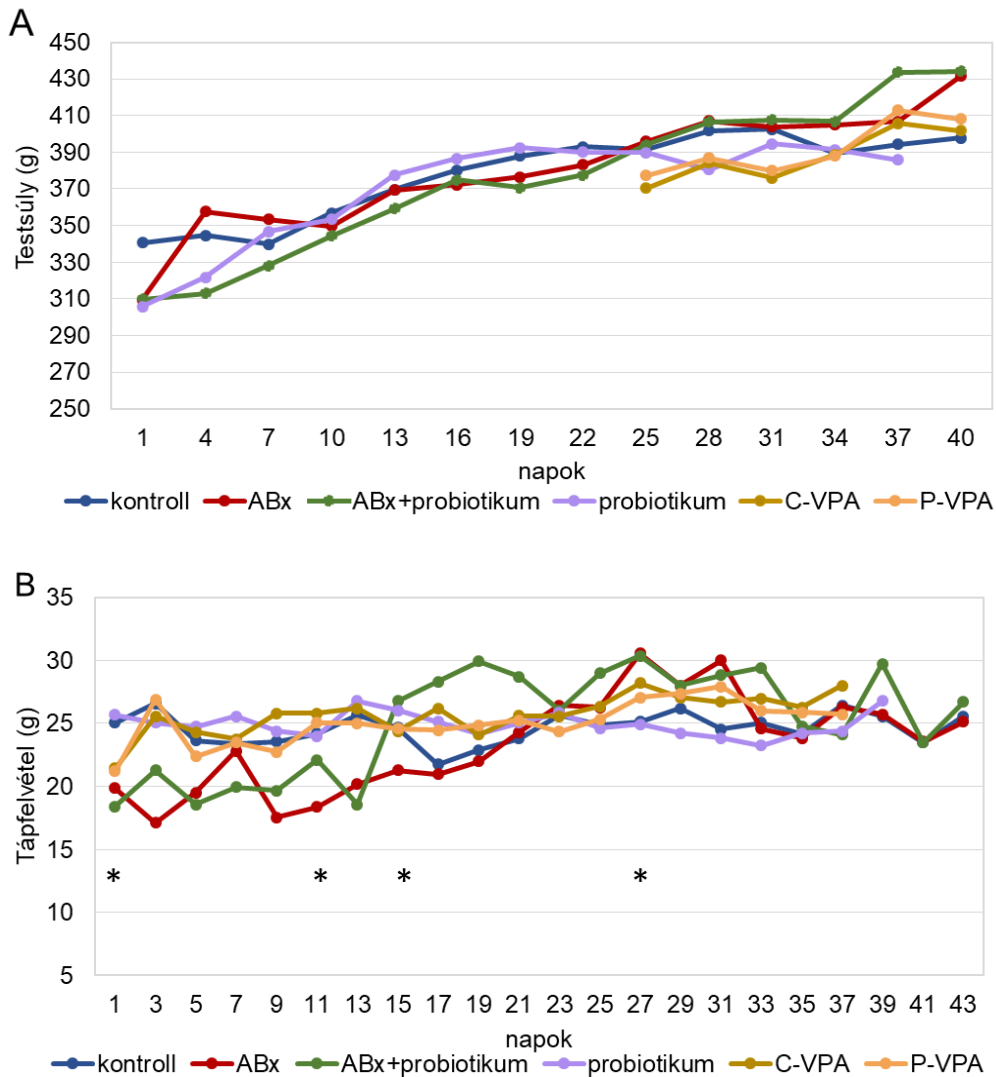
Valamennyi modellben a mintavételek időpontját, a kezeléseket és ezek kölcsönhatását használtuk, mint vizsgált paraméterek, és a modelleket az alapértékekhez igazítottuk. A zsírsav metil-észterek elemzését R statisztikai szoftverrel (4.2.1-es verzió; csomagok: lme4, lmerTest; R Core Team, Bécs, Ausztria) végeztük [149, 150]. A szignifikancia szintet minden esetben $p < 0,05$ -nél határoztuk meg.

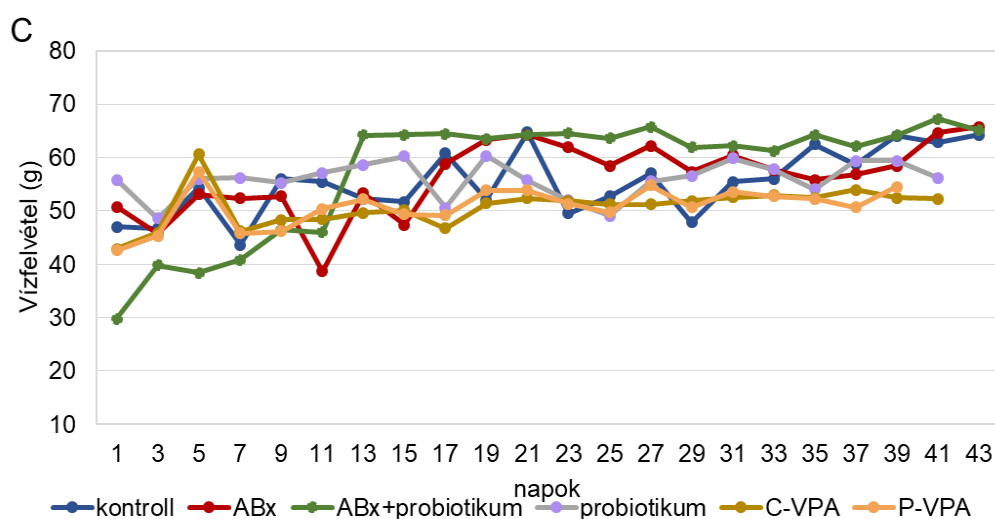
Az alomhatások kiküszöbölése érdekében a magatartási tesztek és a zsírsavak analízise esetében is minden alomból csoportonként egy állatot vettünk be a vizsgálatokba, azonban volt olyan eset is mely során egynél több állat került be a csoportba ugyanabból az alomból, ebben az esetben az egy alomból származó állatok adatait átlagoltuk [151].

V. Eredmények

V.1. Testtömeg, táp- és vízfelvétel

A kezelések alatt történt testtömegmérések során kapott eredmények nem mutattak szignifikáns eltéréseket a vizsgált csoportok között (3. ábra). A folyadék- és táplálékfogyasztás vizsgálata során a széles spektrumú antibiotikum kezelés hatására az állatok által elfogyasztott táp és víz mennyiségében csökkenő tendencia mutatkozott a többi csoporthoz képest, emellett a tápfogyasztás esetében 4 különböző mérési időpont alkalmával volt fellelhető szignifikáns különbség, azonban ezeket leszámítva nem mutatkozott jelentős eltérés a csoportok között (3. ábra).





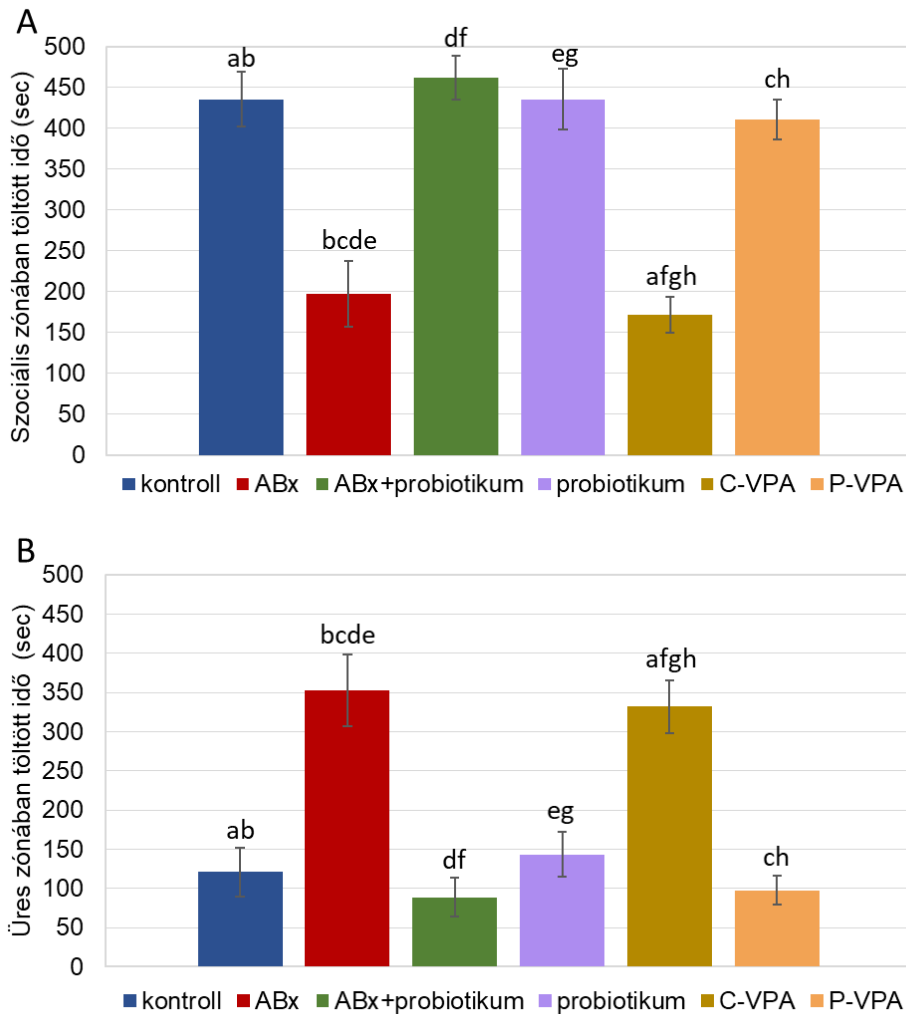
3. ábra Az ábrák a testsúlyt (A), táp- (B) és vízfogyasztást (C) jelölik a különböző csoportok egyedeinek esetében a kezelések alatt. Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport, C-VPA: valproát kezelt csoport, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport. Az adatokat átlag \pm szórásban fejeztük ki ($n=10$ /csoport). Szignifikáns változást a csillag jelöli (egyutas ANOVA $*p<0,05$).

V.2. Szociális interakciós teszt

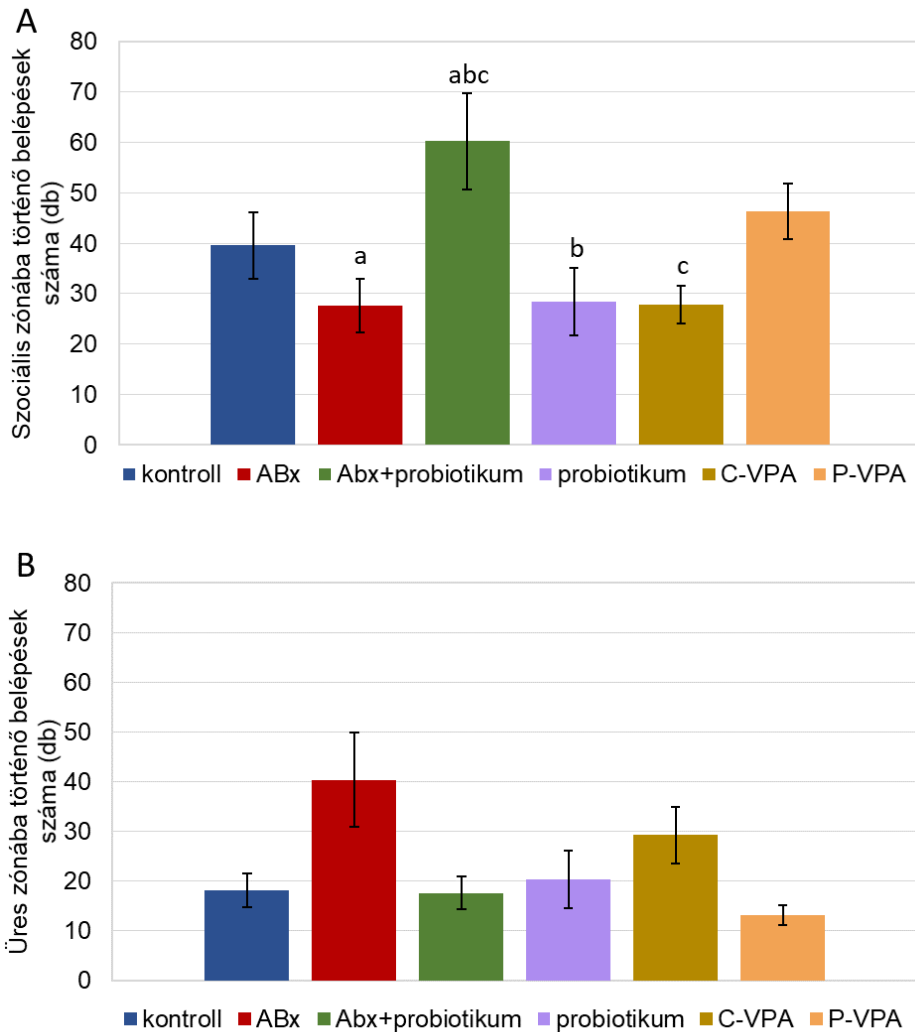
A háromkamrás szociális interakciós teszt adatainak elemzése során számos paraméter tekintetében szignifikáns eltéréseket találtunk a vizsgált csoportok között (1. táblázat). Az üres zónába történő első belépés időpontjának elemzése során nem találtunk szignifikáns különbségeket a csoportok között, míg a szociális zónába való első belépés időpontjánál tendenciát láttunk, mely során a probiotikum kezelt csoport egyedei később kezdték felfedezni ezt a zónát (1. táblázat). Az explorációs idő tekintetében eltérések mutatkoztak a csoportok között, a csak valproát, illetve az antibiotikum kezelésben részesülő állatok szignifikáns eltéréseket mutattak a többi egyedhez képest (4. ábra). Mindkét kezelt állatscsoport szignifikánsan kevesebb időt töltött az ismeretlen állatot tartalmazó szociális zónában (C-VPA: $p = 0,013$; ABx: $p = 0,006$) és sokkal több időt az üres ketrecet tartalmazó üres zónában (C-VPA: $p = 0,046$; ABx: $p = 0,005$). Ezeket a különbségeket csak a teszt során detektáltuk, a habituáció vizsgálatokor minden csoport

megközelítőleg egyforma időt töltött a két oldalsó zónában. A szociabilitási index, mely fontos információval szolgál az ismeretlen állathoz való preferencia fokának megállapításában megközelítőleg 70 %-kal alacsonyabb volt a C-VPA és ABx csoport egyedei esetében, mint a többi csoportnál kapott érték ($p = 0,022$) (1. táblázat). A szociális és üres zónákba történő belépési frekvencia meghatározása során a kezelt csoport tagjai nem mutattak szignifikáns eltérést a kontroll csoporttól, azonban az ABx+probiotikum csoport egyedei szignifikánsan többször léptek be a szociális zónába, mint a C-VPA, ABx ($p = 0,035$) és csak probiotikumot kapott csoport tagjai ($p = 0,041$) (5. ábra). Az ismeretlen állattal és üres ketreccel való interakciók mérése során az antibiotikum kezelt ($p = 0,002$) és C-VPA állatok ($p = 0,050$) sokkal kevesebbszer érintkeztek az ismeretlen állatot tartalmazó ketreccel, mint a kontroll csoport tagjai, emellett az antibiotikum kezelt csoport szignifikánsan eltért az ABx+probiotikum ($p = 0,025$), probiotikum ($p = 0,003$) és P-VPA ($p = 0,010$) csoporttól is. Ezzel ellentétben az üres ketreccel történő interakció vizsgálata során nem mutatkozott jelentős eltérés a csoportok tagjai között (6. ábra). Az állatok által megtett távolság vizsgálata során nem volt különbség a csoportok között (1. táblázat). A sztereotip magatartási mintázatok értékelése esetében (ágaskodás és mosakodás) szintén nem mutatkozott számottevő eltérés a vizsgált csoportok között (1. táblázat).

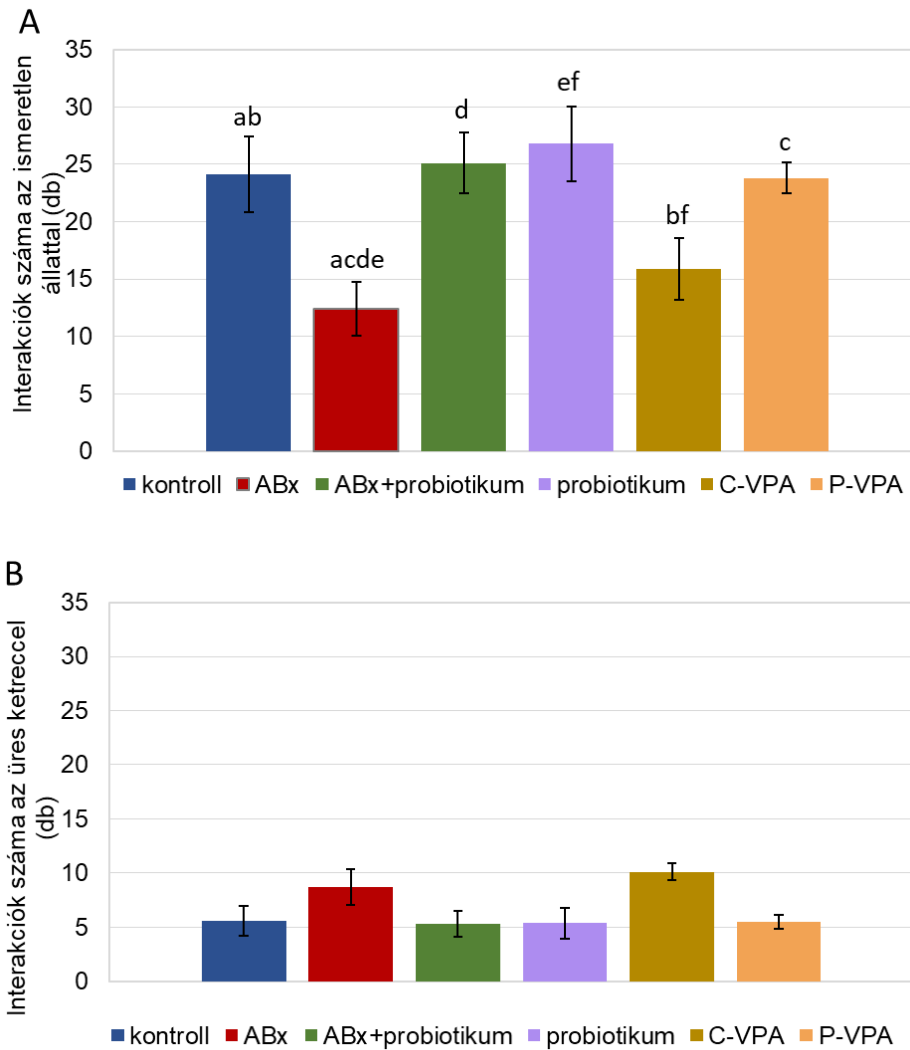
A lítium-kloriddal történő kezelést követően nem találtunk szignifikáns eltéréseket az ismeretlen állatot tartalmazó zónában eltöltött explorációs idő, sem a szociabilitási index tekintetében a hat vizsgált csoport tagjaihoz képest, azonban szignifikánsan kevesebb volt a belépések frekvenciájának száma a szociális zónába és több az üres zónába összehasonlítva a vizsgált csoportokkal (1. táblázat).



4. ábra Az ábrák a háromkamrás szociális interakciós teszt alatt a szociális zónában (**A**) és az üres zónában (**B**) eltöltött időt ábrázolják a különböző csoportok között a kezelések hatására. Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport, C-VPA: valproát kezelt csoport, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport. Az adatokat átlag \pm szórásban fejeztük ki ($n=10$ /csoport). A csoportok közötti szignifikáns változást az oszlopok feletti azonos kis betűk jelölik (a-h) (egyutas ANOVA, $p<0,05$).



5. ábra Az ábrák a háromkamrás szociális interakciós teszt alatt a szociális (A) és az üres (B) zónákba történő belépési frekvenciát mutatják a különböző csoportok között a kezelések hatására. Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport, C-VPA: valproát kezelt csoport, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport. Az adatokat átlag \pm szórásban fejeztük ki ($n=10$ /csoport). A csoportok közötti szignifikáns változást az oszlopok feletti azonos kis betűk jelölik (a-c) (egyutas ANOVA, $p < 0,05$).



6. ábra Az ábrák a háromkamrás szociális interakciós teszt során mért interakciók számát mutatják az ismeretlen állat ketrecével (**A**) és az üres ketrecel (**B**) a különböző csoportok között a kezelések hatására. Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport, C-VPA: valproát kezelt csoport, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport. Az adatokat átlag \pm szórásban fejeztük ki ($n=10$ /csoport). A csoportok közötti szignifikáns változást az oszlopok feletti azonos kis betűk jelölik (a-f) (egyutas ANOVA, $p<0,05$).

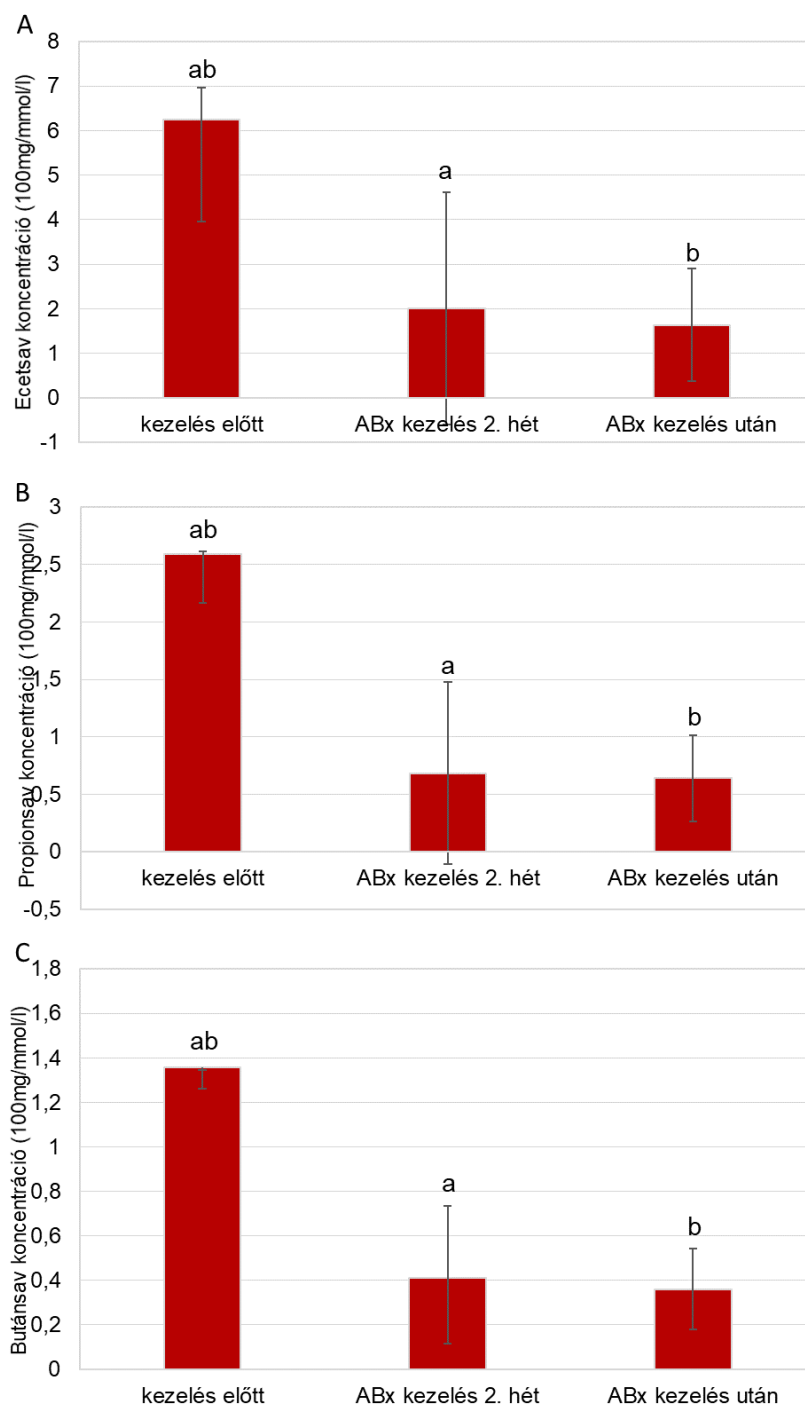
Üres zónába történő belépési frekvencia	Szociális zónába történő belépési frekvencia	Szociabilitási index	Üres zónában töltött explorációs idő (sec)	Szociális zónában töltött explorációs idő (sec)	Üres ketrec zónájába történő első belépés (sec)	Ismeretlen állapot zónájába történő első belépés (sec)	3 kamrás szociális interakciós teszt
18,19 ± 3,41 a	40,44 ± 6,91 a	0,69 (0,26-0,75) ab	131,41 ± 37,77 ab	429,75 ± 39,44 ab	36,00 (4,88-86,88)	17,00 (4,75-27,75)	kontroll
39,94 ± 11,36 b	24,50 ± 5,74 bg	-0,48 (-0,63-0,10) acde	367,93 ± 52,18 cade	185,64 ± 48,14 acde	4,75 (3,00-13,50)	23,00 (10,38-154,13)	ABx
17,13 ± 4,10 c	55,88 ± 9,37 cghj	0,74 (0,54-0,88) cf	93,55 ± 30,69 cf	463,26 ± 33,58 cf	19,50 (2,00-70,88)	19,00 (8,50-77,25)	ABx+probiotikum
20,44 ± 6,99 d	24,81 ± 6,98 dh	0,45 (0,31-0,63) dg	133,01 ± 31,65 dg	440,78 ± 42,01 dg	150,25 (68,13-294,00)	16,00 (4,88-45,25)	probiotikum
27,21 ± 6,22 e	30,79 ± 8,55 ej	-0,19 (-0,47-0,24) bfgh	282,41 ± 72,36 bfgh	195,83 ± 49,37 bfgh	51,00 (18,50-60,00)	40,50 (2,00-103,00)	C-VPA
12,21 ± 3,18 f	43,71 ± 9,73 f	0,79 (0,51-0,81) eh	84,31 ± 21,70 eh	422,47 ± 47,96 eh	46,00 (4,50-217,00)	7,00 (5,00-14,75)	P-VPA
2,25 ± 0,75 abcdef	3,13 ± 1,04 abcdef	0,13 (-0,47-0,84)	264,37 ± 86,84	306,94 ± 82,93	59 (3,75-200,50)	23 (8,50-170,25)	LiCl

Ágaskodás (db)	Mosakodás (db)	Megtett távolság (cm)	Üres ketrec érintéseinek száma	Ismeretlen állatot tartalmazó ketrec érintéseinek száma
19,31 ± 3,07	8,88 ± 1,72	2839,09 ± 273,11	5,38 ± 1,55	26,56 ± 2,25 abc
13,38 ± 2,60	5,94 ± 1,44	2104,82 ± 268,13	8,56 ± 1,76	12,06 ± 2,52 adef
17,06 ± 3,02	6,13 ± 1,13	2536,27 ± 156,76	5,44 ± 1,44	23,88 ± 2,62 d
15,38 ± 3,02	4,25 ± 0,94	2856,05 ± 637,81	5,38 ± 1,78	25,25 ± 3,32 egh
15,14 ± 3,98	8,50 ± 1,46	2077,91 ± 214,07	9,64 ± 1,59	16,43 ± 4,02 bg
18,57 ± 3,59	8,07 ± 2,62	2137,07 ± 165,78	5,21 ± 0,93	24,00 ± 1,95 f
8,38 ± 3,13	3,25 ± 1,01	1845,97 ± 86,64	6,50 ± 1,95	16,13 ± 4,00 ch

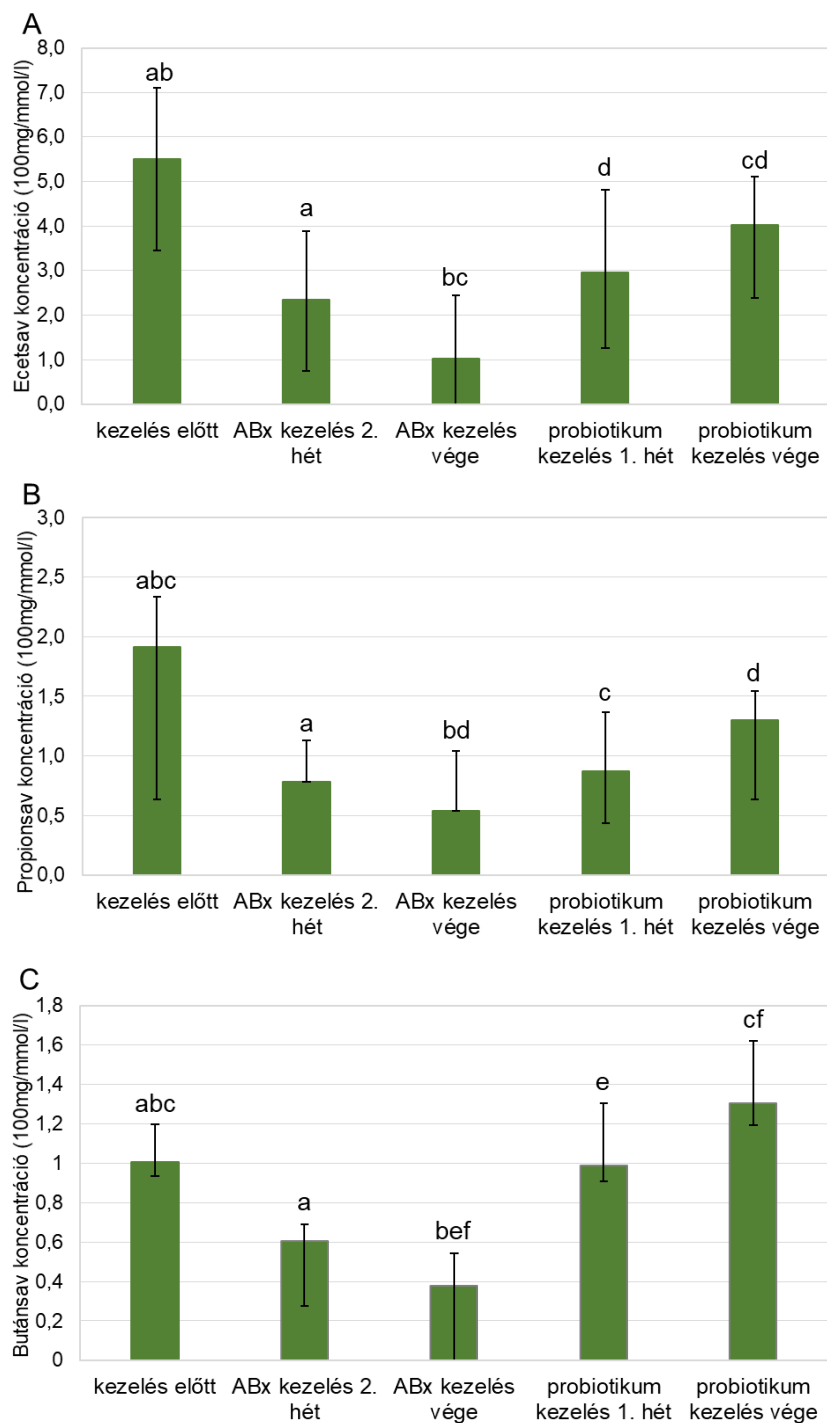
1. táblázat A háromkamrás szociális interakciós teszt során mért eredmények a csoportok között. *Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport, C-VPA: valproát kezelt csoport, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport, LiCl: pilot kísérletben lítium-kloriddal kezelt csoport.* Az ismeretlen- és üres zónába történő belépések száma, szociabilitási index és a mosakodás értékei medián (IQR)-ben vannak feltüntetve, a szociális- és üres zónában töltött explorációs idő, szociális- és üres zónába történő belépések frekvenciája, ismeretlen állatot tartalmazó- és üres ketrec érintéseinek száma, megtett távolság és az ágaskodások eredményeit átlag ± szórással fejeztük ki. Az egyes csoportok közötti szignifikáns változást az azonos kis betűk jelölik (a-h) (egyutas ANOVA, Kruskal–Wallis teszt, $p < 0,05$).

V.3. Rövid szénláncú zsírsavak analízise

A rövid szénláncú zsírsavak analízise során mind a 6 vizsgált csoport kezelése előtti és kezelése utáni székletmintáit hasonlítottuk össze, valamint minden csoport esetében meghatároztuk az SCFAs mennyiségének időbeli változásait is a csoportokon belül. A csoportok közötti összehasonlítások esetében a kezelése előtt nem mutatkozott szignifikáns eltérés. Azonban a kezelése után a széles spektrumú antibiotikum keverék alkalmazása jelentősen csökkentette a három vizsgált zsírsav (butánsav, propionsav, ecetsav) koncentrációját összehasonlítva a többi csoport egyedeivel; C-VPA ($p = 0,001$), P-VPA ($p = 0,042$), ABx+probiotikum ($p = 0,013$), probiotikum ($p = 0,002$), kontroll ($p = 0,025$) csoport (2. táblázat). A csoportokon belüli összehasonlítások esetében szintén jelentős eltéréseket detektáltunk. Az ABx csoport vizsgálata során szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető az ecetsav ($p = 0,001$), butánsav ($p = 0,001$) és propionsav ($p = 0,001$) esetében a kezelés előtti és kezelés utáni mintáknál. Mindemellett ez a jelentős csökkenés már a 2 héten át biztosított antibiotikum kezelést követően is megjelent, mindhárom zsírsav koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint az antibiotikum kezelés előtt (7. ábra). Az ABx+probiotikum csoport esetében is hasonlóan megfigyelhető volt a jelentős koncentráció csökkenés az antibiotikum kezelést követően ($p = 0,001$), azonban az általunk használt probiotikum keverék képes volt e zsírsavak szintjét visszaállítani 2 héten belül a kiindulási, kezelés előtti koncentráció szintjére (8. ábra). Mindemellett, számottevő különbség nem mutatkozott a kezelése előtti és utáni koncentráció értékeikben az ecetsav és a propionsav tekintetében, de a butánsav esetében megfigyelhető volt egy magasabb koncentrációs érték az ABx+probiotikum csoporton belül a kezelése előtti és utáni állapot vizsgálata során, ennek ellenére a csoportok közötti összehasonlítás esetében csupán tendencia szintjén volt észlelhető a magasabb butánsav koncentráció az ABx+probiotikum csoport esetében. Az önmagában csak probiotikumot kapó csoport analízise során nem detektáltunk szignifikáns eltéréseket a probiotikum kezelés előtti és azt követő mintavételi időpontban egyik rövid szénláncú zsírsav esetében sem (2. táblázat). A valproát kezelésben részesülő csoportok vonatkozásában nem detektáltunk semmiféle szignifikáns eltérést sem a csoportok közötti sem a csoportokon belüli SCFAs analízise során.



7. ábra Az antibiotikum kezelés hatása az ecetsav (A), propionsav (B) és butánsav (C) koncentrációjára (100mg/mmol/l) a kezelésekek előtt, antibiotikum kezelés közben (2. hét), antibiotikum kezelés után. ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelés. A koncentrációk értékei medián (IQR)-ben vannak feltüntetve (n=10/csoport). A csoportok közötti szignifikáns változást az oszlopok feletti azonos kis betűk jelölik (a-b) (Friedman teszt, $p < 0,05$).



8. ábra Az antibiotikum és probiotikum kezelés hatása (ABx+probiotikum csoport egyedeinek adatai) az ecetsav (A), propionsav (B) és butánsav (C) koncentrációjára (100mg/mmol/l) a kezeléseket előtt, antibiotikum kezelés közben (2. hét), antibiotikum kezelés után, 1 hetes probiotikum kezelés közben és probiotikum kezelés után. ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelés. A koncentrációk értékei medián (IQR)-ben vannak feltüntetve (n=10/csoport). A csoportok közötti szignifikáns változást az oszlopok feletti azonos kis betűk jelölik (a-f) (Friedman teszt, $p < 0,05$).

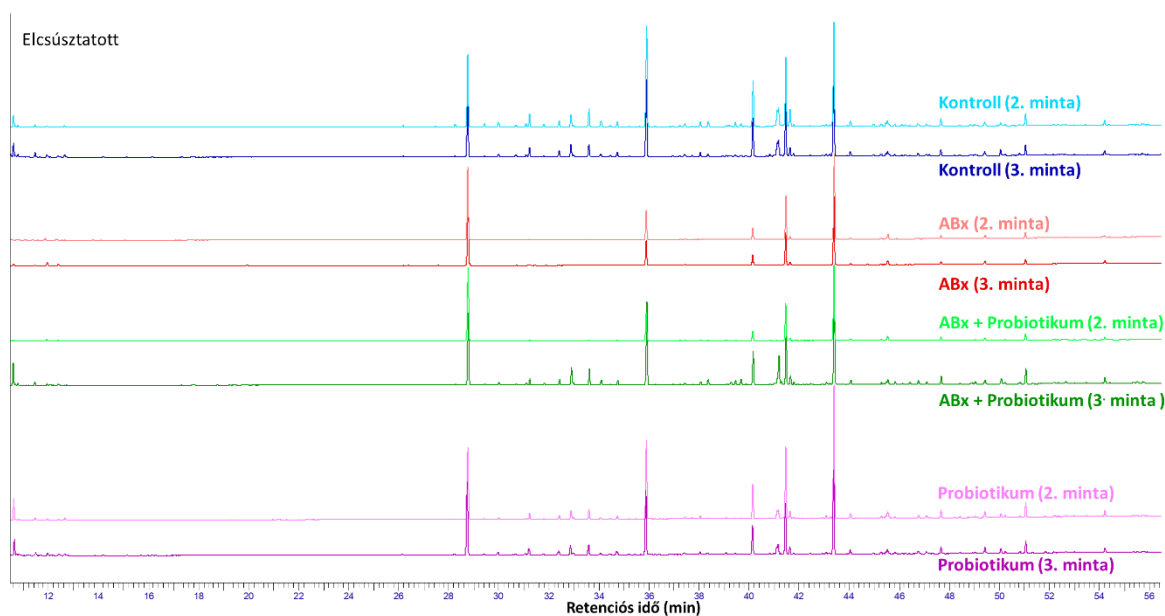
SCFA koncentrációk (100mg/mmol/l)	kontroll	ABx	ABx+ probiotikum	probiotikum	C-VPA	P-VPA
Kezelések előtt						
ecetsav	7,13 (4,73-8,25)	6,25 (4,03-8,54)	5,50 (3,44-7,09)	4,75 (4,04-5,64)	7,16 (6,36-7,78)	8,79 (7,13-9,02)
propionsav	1,80 (1,63-3,14)	2,59 (1,88-3,02)	1,91 (1,38-2,33)	1,70 (1,47-2,44)	2,49 (2,09-2,92)	3,24 (2,78-3,79)
butánsav	1,10 (0,99-1,59)	1,36 (1,18-1,45)	1,00 (0,93-1,20)	0,93 (0,86-1,15)	1,48 (1,14-2,10)	1,92 (1,39-2,16)
totál SCFAs	10,67 (7,58-13,04)	9,76 (7,56-13,63)	9,50 (5,80-10,37)	7,61 (6,69-9,16)	10,86 (10,05-12,47)	14,22 (11,24-14,83)
Kezelések után						
ecetsav	4,67 (2,85-5,28) a	1,64 (0-2,90) abcde	3,03 (2,37-5,11) b	4,14 (2,19-7,14) c	7,77 (6,97-8,25) d	5,56 (4,49-8,60) e
propionsav	2,09 (1,57-2,40) a	0,64 (0,00-1,02) abcde	1,30 (0,74-1,54) b	2,45 (1,48-2,57) c	2,98 (2,60-3,50) d	2,82 (2,35-3,40) e
butánsav	1,22 (1,00-1,35) a	0,36 (0,00-0,54) abcde	1,30 (1,19-1,62) b	0,96 (0,75-1,23) c	2,23 (1,77-2,33) d	1,15 (0,76-2,22) e
totál SCFAs	7,79 (5,73-8,62) a	2,65 (0,00-4,44) abcde	6,46 (4,18-8,50) b	7,40 (5,82-10,58) c	13,30 (11,44-13,56) d	9,14 (7,79-14,22) e

2. táblázat A rövid szénláncú zsírsavak (ecetsav, propionsav, butánsav) koncentrációinak (100mg/mmol/l) eredményei a kezelések előtti és kezelések utáni mintavételi időpontban. Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport, C-VPA: valproát kezelt csoport, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport. A koncentrációk értékei medián (IQR)-ben vannak feltüntetve. Az egyes csoportok közötti szignifikáns változást az azonos kis betűk jelölik (a-e) (Kruskal–Wallis teszt, Friedman teszt, $p < 0,05$).

V.4. Zsírsvav metil-észterek analízise

V.4.1. A kromatogram jellemzői

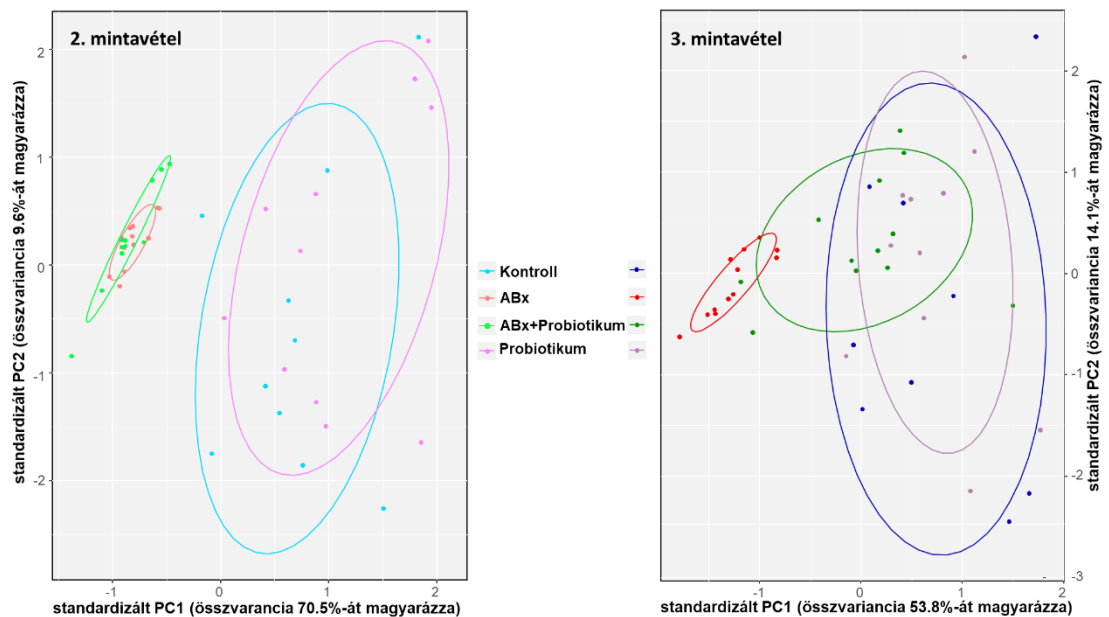
A zsírsvav metil-észterek (C4:0-C26:0) analízise során különböző csoportokból (kontroll, ABx, ABx+probiotikum, probiotikum) származó székletminták lettek megvizsgálva a kezelések előtt (1. minta), a kezelések alatt (2. minta) és a kezelések befejeztével (3. minta). A zsírsvavak analízise során jelentős különbségeket detektáltunk a második és a harmadik mintavételi időpont között (9. ábra).



9. ábra Reprezentatív GC kromatogramok a 4 vizsgát csoport második és harmadik mintavételi időpontjában 1-1 patkány faeces mintájából. Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport. A kromatogramok C4:0 és C26:0 közötti zsírsvavakat mutatják, melyek a C13:0 belső standard csúcsának magasságához lettek grafikusán normalizálva.

Annak érdekében, hogy ténylegesen igazolni lehessen a kromatogramokon megjelenő, mintavételek közötti eltéréseket PCA analízist alkalmaztunk, mely alátámasztotta, hogy a zsírsvavak csúcs alatti területei eltérőek, és ezek az eltérések a kezelésekből adódnak. A két fő komponens (PC1 és PC2) magyarázta a második

mintavételi időpontban a kromatogramok eltéréseinek 80,1 %-át. Az analízis egyértelműen két nagyobb részre osztotta a mintákat. Az egyik rész tartalmazta az ABx és az ABx+probiotikum csoport egyedeinek mintáit, a másik részhez pedig a kontroll és probiotikum csoport mintái tartoztak. A harmadik mintavételi időpont esetében a PC1 és PC2 csupán a csúcs alatti területek varianciáinak 67,9 %-át magyarázta, mégis látható volt, hogy az ABx+probiotikum csoport közelít a kontroll és a csak probiotikumot kapó csoport egyedeinek mintáihoz, míg az ABx csoport elkülönült a másik három csoporttól (10. ábra).



10. ábra A főkomponens analízis két fő komponensének (PC1 és PC2) eredményei a 4 csoport tekintetében. Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport. A grafikonok a második és harmadik mintavételi időpontot ábrázolják, melyek a kromatogramok görbe alatti területeinek alapján lettek kiszámolva.

V.4.2. Lineáris kevert random modell eredményei

A zsírsavak koncentrációi és tömegszázalékos arányai közötti különbségek feltárására lineáris kevert random modellt alkalmaztunk. Az analízis során jelentős eltéréseket detektáltunk a vizsgált zsírsavcsoportok között az általunk összehasonlított paraméterekben (mintavételi időpontok, kezelések és ezek interakciói) a koncentráció

szintjeiben és a tömegszázalékos arány esetében is, melyek p értékeit a 3. táblázat tartalmazza. Emellett a vizsgált zsírsavak összkoncentrációjában is jelentős eltéréseket figyeltünk meg a vizsgált paraméterek között. Továbbá a zsírsavkategóriákon belül az egyes zsírsavak között is számos esetben szignifikáns különbségeket detektáltunk, ezek p értékei a 4. és 5. táblázatban lettek feltüntetve. Mindez jelzi a bélmikrobiom jelentős hatását a zsírsavak termelésében.

Zsírsav csoportok	Lineáris kevert random modell eredményei					
	koncentrációk p értékei			tömeg% p értékei		
	mintavételi időpontok	kezelések	időpontok és kezelések	mintavételi időpontok	kezelések	időpontok és kezelések
Teljes zsírsav	$1,56 \times 10^{-6}$	$1,10 \times 10^{-6}$	$6,91 \times 10^{-7}$			
SAT	$2,90 \times 10^{-8}$	$1,21 \times 10^{-13}$	$3,27 \times 10^{-10}$	$2,81 \times 10^{-3}$	$2,20 \times 10^{-11}$	$4,46 \times 10^{-7}$
<i>ShortSAT</i>	$5,12 \times 10^{-13}$	$6,31 \times 10^{-10}$	$2,54 \times 10^{-10}$	$6,34 \times 10^{-7}$	$7,41 \times 10^{-8}$	$2,11 \times 10^{-3}$
Elágazó transz	$1,03 \times 10^{-12}$	$1,27 \times 10^{-15}$	$< 2,20 \times 10^{-16}$	$1,54 \times 10^{-6}$	$2,82 \times 10^{-8}$	$2,81 \times 10^{-11}$
<i>Elágazó SAT</i>	$3,58 \times 10^{-11}$	$< 2,20 \times 10^{-16}$	$< 2,20 \times 10^{-16}$	$1,24 \times 10^{-5}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$1,07 \times 10^{-13}$
<i>TFA</i>	$5,82 \times 10^{-7}$	$< 2,20 \times 10^{-16}$	$3,55 \times 10^{-14}$	$2,53 \times 10^{-3}$	$7,60 \times 10^{-13}$	$8,06 \times 10^{-8}$
cMUFA	$8,44 \times 10^{-5}$	$8,73 \times 10^{-7}$	$5,80 \times 10^{-4}$	0,163	$1,14 \times 10^{-6}$	$6,73 \times 10^{-3}$
PUFA	$2,04 \times 10^{-2}$	$3,43 \times 10^{-2}$	0,218	$1,03 \times 10^{-4}$	$< 2,20 \times 10^{-16}$	$2,10 \times 10^{-8}$
<i>n-3 PUFA</i>	$4,85 \times 10^{-2}$	$1,53 \times 10^{-2}$	0,214	$1,58 \times 10^{-4}$	$1,78 \times 10^{-14}$	$9,28 \times 10^{-6}$
<i>n-6 PUFA</i>	$1,94 \times 10^{-2}$	$3,64 \times 10^{-2}$	0,221	$1,38 \times 10^{-4}$	$3,26 \times 10^{-16}$	$2,23 \times 10^{-8}$
LCPUFA	$2,57 \times 10^{-3}$	$5,50 \times 10^{-4}$	0,127	$4,38 \times 10^{-4}$	$4,49 \times 10^{-6}$	$1,13 \times 10^{-6}$
<i>n-3 LCPUFA</i>	0,576	0,308	0,797	0,916	0,56	0,915
<i>n-6 LCPUFA</i>	$2,62 \times 10^{-3}$	$5,43 \times 10^{-4}$	0,128	$4,27 \times 10^{-4}$	$4,64 \times 10^{-6}$	$1,09 \times 10^{-6}$

3. táblázat A lineáris kevert random modell p értékei a mintavételi időpontok, kezelések, mintavételi időpontok és kezelések függvényében a koncentrációk és tömegszázalékos arányok esetében, a félkövér betűk a szignifikanciákat jelölik ($p < 0,05$). Telített zsírsavak (SAT): *shortSAT* + C9:0 + C10:0 + C11:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C23:0 + C24:0 + C25:0 + C26:0; rövid telített zsírsavak (*shortSAT*): C4:0 + C5:0 + C6:0 + C7:0 + C8:0; elágazó transz-zsírsavak (elágazó transz): elágazó SAT + TFA + (*tC16:1n-7* + C17i) + (*tC17:1n-7* + C18i); transz-zsírsavak (TFA): *tC18:1* izomerek; elágazó szénláncú telített zsírsavak (elágazó SAT): C13ai + C14i + C15i + C15ai + C16i; egyszerűen telítetlen cisz-zsírsavak (cMUFAs): C13:1n-1 + C14:1n-5 + C16:1n-9 + C16:1n-7 + C18:1n-9 + C18:1n-7 + C20:1n-9 + C22:1n-9; többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFAs): *n-3* PUFAs + *n-6* PUFAs; *n-3* többszörösen telítetlen zsírsavak (*n-3* PUFAs): C18:3n-3 + *n-3* LC PUFAs; *n-6* többszörösen telítetlen zsírsavak (*n-6* PUFAs): C18:2n-6 + *n-6* LC PUFAs; hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak (LC PUFAs): *n-3* LC PUFAs + *n-6* LC PUFAs; *n-3* hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak (*n-3* LC PUFAs): C20:5n-3; *n-6* hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak (*n-6* LC PUFAs): C20:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6 + C22:4n-6 + C22:5n-6

V.4.2.1. Telített zsírsavak (SAT)

A telített zsírsavak, mint zsírsavkategória elemzése során számottevő különbség mutatkozott a koncentrációk és a tömegszázalékos arányok esetében a mintavételi időpontok, kezelések és e kettő interakciója között, mely jelzi, hogy az antibiotikum illetve az ezt követő probiotikum kezelés döntően befolyásolja a koncentráció szintjét és a tömegszázalékok arányt (3. táblázat). Következésképp a legtöbb, e kategóriába tartozó zsírsav megjelenésében fontos szerepet játszott a GI mikrobiom. A koncentráció vizsgálata során hasonló szignifikáns különbségek jelentkeztek a vizsgált paraméterek tekintetében a C12:0-C26:0 telített zsírsavak mindegyikénél egy kivétellel (C25:0), ahol csak tendencia szinten volt ez megfigyelhető. Ez egyértelműen arra utal, hogy a kezelések képesek voltak módosítani a zsírsavak koncentrációját, vagyis az antibiotikum kezelés jelentősen lecsökkentette ezen zsírsavak szintjét, majd az antibiotikum kúrát követő probiotikum kezelés sikeresen vissza tudta állítani a telített zsírsavak koncentrációs szintjét (9. ábra). Részletezve e kategóriába tartozó zsírsavak vizsgálati eredményeit (4. táblázat) az detektálható, hogy a C10:0 esetében a mintavételi időpontok és a kezelések

szignifikáns eltéréseket mutattak, azonban a kettő közötti interakcióban nem volt jelentős különbség. Ennek eredményeképpen az antibiotikum kezelés képes volt drasztikusan lecsökkenteni a zsírsav szintjét, azonban az ezt követő probiotikum kezelés nem tudta visszaállítani ezt. Továbbá, a C11:0 esetében is csak a kezelések mutattak szignifikáns eltérést, mely során az antibiotikum kezelés jelentősen csökkentette a zsírsav mennyiségét, azonban a probiotikum nem volt képes módosítani azt. A C9:0 esetében viszont nem figyeltünk meg egyik vizsgált paraméter tekintetében sem szignifikáns eltéréseket sem a koncentráció sem pedig a tömegszázalék vizsgálata során. A tömegszázalékos arány analízise esetében megállapítottuk, hogy a C14:0, C15:0, C17:0 és C18:0 szignifikáns eltéréseket mutatott a vizsgált paraméterek tekintetében, tehát a kezelések képesek voltak módosítani ezen zsírsavak tömegszázalékos arányát, vagyis az antibiotikum kezelés jelentősen csökkentette, míg az ezt követő probiotikum adása helyreállította ezt az arányt. A C26:0 esetében csupán a kezelések és a mintavételi időpontok mutattak szignifikáns eltérést, vagyis az antibiotikum kúra nagymértékben csökkentette a tömegszázalékos arányát a zsírsavnak, azonban a probiotikum kezelés számottevő hatását nem detektáltuk. A C16:0 és a C20:0 és C25:0 közötti zsírsavak esetében nem figyeltünk meg szignifikáns különbségeket a vizsgált paraméterek tekintetében (9. ábra és 4. táblázat).

Zsírsavak	Lineáris kevert modell eredményei					
	koncentrációk p értékei			tömeg% p értékei		
	mintavételi időpontok	kezelések	időpontok és kezelések	mintavételi időpontok	kezelések	időpontok és kezelések
C4:0	$4,17 \times 10^{-13}$	$3,70 \times 10^{-9}$	$2,15 \times 10^{-10}$	$4,11 \times 10^{-7}$	$3,18 \times 10^{-7}$	$1,15 \times 10^{-3}$
C5:0	$1,41 \times 10^{-6}$	$1,83 \times 10^{-13}$	$4,96 \times 10^{-5}$	$1,35 \times 10^{-2}$	$1,54 \times 10^{-2}$	0,111
C6:0	$9,52 \times 10^{-3}$	$2,32 \times 10^{-9}$	0,201	0,064	$1,53 \times 10^{-4}$	0,389
C7:0	0,474	$1,51 \times 10^{-3}$	$4,12 \times 10^{-2}$	0,953	0,272	0,13
C8:0	$1,43 \times 10^{-2}$	$2,76 \times 10^{-4}$	0,733	0,056	$1,90 \times 10^{-3}$	0,858
C9:0	0,498	0,145	0,275	0,327	0,097	0,271
C10:0	$2,15 \times 10^{-2}$	$5,04 \times 10^{-12}$	0,053	$3,68 \times 10^{-2}$	$2,54 \times 10^{-10}$	0,058
C11:0	0,433	$3,35 \times 10^{-10}$	0,619	0,286	$1,44 \times 10^{-10}$	0,316

C12:0	$1,45 \times 10^{-6}$	$1,09 \times 10^{-7}$	$8,91 \times 10^{-4}$	0,695	$1,42 \times 10^{-2}$	0,998
C14:0	$6,92 \times 10^{-11}$	$3,52 \times 10^{-11}$	$8,24 \times 10^{-12}$	$9,44 \times 10^{-6}$	$3,39 \times 10^{-8}$	$3,55 \times 10^{-6}$
C15:0	$1,73 \times 10^{-11}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$1,93 \times 10^{-15}$	$9,45 \times 10^{-10}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$
C16:0	$2,59 \times 10^{-3}$	$3,31 \times 10^{-7}$	$6,62 \times 10^{-5}$	0,505	0,898	0,154
C17:0	$1,01 \times 10^{-4}$	$6,77 \times 10^{-14}$	$2,77 \times 10^{-7}$	0,097	$3,16 \times 10^{-6}$	$4,02 \times 10^{-3}$
C18:0	$2,08 \times 10^{-4}$	$2,52 \times 10^{-12}$	$2,59 \times 10^{-7}$	0,478	$9,08 \times 10^{-5}$	$4,27 \times 10^{-4}$
C20:0	$2,71 \times 10^{-4}$	$1,10 \times 10^{-8}$	$1,85 \times 10^{-6}$	0,450	0,052	$3,68 \times 10^{-4}$
C22:0	$3,68 \times 10^{-3}$	$1,56 \times 10^{-8}$	$3,32 \times 10^{-4}$	0,155	0,275	0,881
C23:0	$2,19 \times 10^{-3}$	$2,34 \times 10^{-4}$	$1,03 \times 10^{-3}$	0,365	0,363	0,38
C24:0	$1,21 \times 10^{-3}$	$2,62 \times 10^{-8}$	$7,40 \times 10^{-5}$	0,335	0,104	0,429
C25:0	0,493	$4,16 \times 10^{-2}$	0,054	0,5	0,578	0,593
C26:0	$5,76 \times 10^{-3}$	$2,58 \times 10^{-7}$	$4,89 \times 10^{-4}$	$1,19 \times 10^{-2}$	$8,84 \times 10^{-3}$	0,354
tC16:1n-7 +C17i	$3,13 \times 10^{-4}$	$2,26 \times 10^{-9}$	$4,51 \times 10^{-7}$	0,135	$7,06 \times 10^{-6}$	$3,11 \times 10^{-2}$
tC17:1n-7 +C18i	$3,41 \times 10^{-4}$	$8,79 \times 10^{-8}$	$5,32 \times 10^{-7}$	0,785	0,069	$2,07 \times 10^{-2}$
tC18:1-mix	$5,82 \times 10^{-7}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$3,55 \times 10^{-14}$	$2,53 \times 10^{-3}$	$7,60 \times 10^{-13}$	$8,06 \times 10^{-8}$
C13ai	$2,92 \times 10^{-6}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$2,77 \times 10^{-7}$	$1,31 \times 10^{-6}$	$2,39 \times 10^{-13}$	$7,03 \times 10^{-8}$
C14i	$3,16 \times 10^{-16}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$4,71 \times 10^{-15}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$
C15i	$4,82 \times 10^{-15}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$6,10 \times 10^{-12}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$
C15ai	$8,94 \times 10^{-11}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$3,31 \times 10^{-7}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$1,07 \times 10^{-14}$
C16i	$5,34 \times 10^{-6}$	$2,93 \times 10^{-15}$	$4,22 \times 10^{-10}$	$4,49 \times 10^{-2}$	$4,23 \times 10^{-8}$	$9,59 \times 10^{-5}$

4. táblázat A vizsgált telített zsírsavak (C4:0 - C26:0, tC16:1n-7+C17i, tC17:1n-7+C18i, tC18:1-mix, C13ai, C14i, C15i, C15ai, C16i) lineáris kevert random modell p értékeinek eredményei a mintavételi időpontok, kezelések, mintavételi időpontok és kezelések függvényében a koncentrációk és a tömegszázalékos arányok esetében. A félkövér betűk a szignifikanciákat jelölik ($p < 0,05$).

V.4.2.1.1. Rövid szénláncú telített zsírsavak (shortSAT)

A rövid szénláncú telített zsírsavak a telített zsírsavak egy alkategóriájába tartoznak. Jelenlegi vizsgálataink során 5 db zsírsavat (C4:0, C5:0, C6:0, C7:0, C8:0) analizáltunk, melyek ehhez az alkategóriához tartoznak. Hasonlóan a SAT kategóriához a shortSAT is jelentős eltéréseket mutatott a különböző kezelések hatására (3. táblázat). A koncentrációk elemzése során a C4:0, C5:0 és C7:0 szintjében szignifikáns eltérés jelentkezett a vizsgált paraméterek mindegyikében, mely azt tükrözi, hogy a kezelések képesek voltak módosítani e zsírsavak koncentrációját, mégpedig úgy, hogy az antibiotikum kezelés jelentősen lecsökkentette a szintjüket, majd az ezt követő probiotikum kezelés képes volt visszaállítani azt (9. ábra és 4. táblázat). A C6:0 és C8:0 esetében azonban csak a kezelések és a mintavételi időpontok különböztek, de a kettőjük interakciója nem mutatott szignifikáns eltéréseket, mely azt jelezte, hogy az antibiotikum kezelés jelentős koncentráció esést idézett elő, azonban az ezt követő probiotikum adás nem volt már képes megnövelni és visszaállítani ezt az alacsony szintet. A koncentráció eltéréseihez hasonlóan a tömegszázalékos arányban is nagymértékű különbségeket detektáltunk (9. ábra és 3. táblázat). A C4:0 vizsgálata során a 3 vizsgált paraméter mindegyikében találtunk eltéréseket, mely azt mutatta, hogy az antibiotikum hatásosan csökkentette a tömegszázalékos arányt, míg az ezt követő probiotikum kezelés sikeresen képes volt visszaállítani azt. A C5:0 analízise során csak a kezelések és mintavételi időpontok mutattak eltéréseket, de a kettőjük interakciója nem, tehát csak az antibiotikum kezelés volt képes változásokat előidézni és a probiotikum kezelésnek nem mutatkozott semmiféle hatása. A C6:0 és C8:0 esetében csupán a kezelések mutattak szignifikáns különbségeket, vagyis az antibiotikum kezelés képes volt leredukálni e zsírsavak tömegszázalékos arányát, de az ezt követő probiotikum kezelés már nem tudta megváltoztatni ezt. A C7:0 vizsgálata során egyik paraméter sem mutatott eltéréseket a tömegszázalékos arányban (9. ábra és 4. táblázat).

V.4.2.2. Elágazó szénláncú és transz-zsírsavak

Ez a fő kategória 3 koeluciót (tC17:1n-7+C18i, tC16:1n-7+C17i, tC18-1mix) és 5 elágazó szénláncú telített zsírsavat tartalmaz. Mind a fő kategória mind pedig a 3 koelució esetében jelentős különbségeket figyeltünk meg a kezelések, mintavételi időpontok és a kettő interakciója között, tehát az antibiotikum kezelés mellett az azt követő probiotikum

adás is képes volt módosítani a koncentrációs szinteket és a tömegszázalékos arányokat is (3. táblázat).

V.4.2.2.1. Elágazó szénláncú telített zsírsavak

Az egész kategória, illetve az ezt alkotó, általunk vizsgált zsírsavak mindegyikénél szignifikáns eltéréseket detektáltunk a kezelések, a mintavételi időpontok és ezek interakciója között mind a koncentráció, mind pedig a tömegszázalékos arány analízise során. Ebből kifolyólag megállapítható, hogy az itt észlelt változásokért a kezelések tehetők felelőssé és ennek következtében pedig a bélben jelenlévő baktériumok, hiszen az antibiotikum kezelés képes volt nagymértékben lecsökkenteni a zsírsavak mennyiségét és tömegszázalékos arányukat, míg az ezt követő probiotikum bevitel sikeresen visszaállította ezeket az értékeket az eredeti állapotra (9. ábra és 4. táblázat).

V.4.2.2.2. Transz-zsírsavak (TFA)

Ennek az kategóriának, azaz a tC18:1 zsírsavnak a vizsgálata során hasonló eredményeket kaptunk, mint amit a fő kategóriájának analízise során láttunk. Ennek a transz-zsírsavnak mind a mennyisége, mind pedig a tömegszázalékos aránya jelentősen lecsökkent az antibiotikum kúra hatására, míg az antibiotikumot követő probiotikum kezelés képes volt ezeket az alacsony értékeket helyreállítani és az eredeti, kezelés előtti szintre visszahozni (9. ábra és 4. táblázat).

V.4.2.3. Egyszeresen telítetlen cisz-zsírsavak (cMUFAs)

Az egyszeresen telítetlen cisz-zsírsavak kategóriájának elemzése során jelentős különbségeket detektáltunk a koncentráció és a tömegszázalékos arány tekintetében is mindhárom vizsgált paraméter esetében, azaz az antibiotikum és az ezt követő probiotikum kezelés is képes volt ezeknek az értékeit módosítani (3. táblázat). Ebben a kategóriában összesen 8 egyszeresen telítetlen cisz-zsírsavat tanulmányoztunk: C13:1n-1, C14:1n-5, C16:1n-9, C16:1n-7, C18:1n-9, C18:1n-7, C20:1n-9, C22:1n-9. A C22:1n-9 zsírsav kivételével, mely csak tendenciát mutatott, a többi vizsgált cMUFAs szignifikáns eltérést mutatott a kezelések, a mintavételi időpontok és e kettő interakciója esetében a koncentrációs szint mérésénél. Ennek következtében elmondhatjuk, hogy az

antibiotikum kúra nagymértékű koncentráció esést idézett elő, azonban az ezt követő probiotikum kezelés sikeresen visszaállította a kontrollhoz hasonló szintre (9. ábra és 5. táblázat). A tömegszázalékos arány vizsgálata során mindössze 3 zsírsav (C13:1n-1, C14:1n-5, C18:1n-9) mutatott szignifikáns különbséget a vizsgált paraméterek mindegyikében, azonban e kategóriához tartozó többi analizált zsírsavaknál nem figyeltünk meg számottevő eltéréseket. A C13:1n-1 és a C14:1n-5 esetében az antibiotikum kezelés hatására lecsökkent, míg a C18:1n-9 esetében megemelkedett a tömegszázalékos arány. Mindhárom esetben az antibiotikum kezelést követő probiotikum bevitel helyreállította a megváltozott tömegszázalékos arányokat (9. ábra és 5. táblázat).

V.4.2.4. Többszörösen telítetlen zsírsavak (PUFAs)

Markáns eltéréseket tártunk fel a többszörösen telítetlen zsírsavak kategóriájának vizsgálata során a koncentráció és a tömegszázalékos arány esetében, mely jelezte, hogy a kezeléseknek erőteljes hatása van e zsírsav csoport módosításában (3. táblázat). Ez a fő kategória két alcsoportra bontható, melyek esetében szintén nagyon hasonló eltéréseket figyeltünk meg: az egyik az n-3 PUFAs csoportja (ALA:C18:3n-3 és C20:5n-3), a másik pedig az n-6 PUFAs csoportja (C18:2n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6, C22:5n-6). A tömegszázalékos arány analízise során mindkét alkategória szignifikáns különbségeket mutatott minden általunk összehasonlított paraméter tekintetében, vagyis az antibiotikum kezelés hatására csökkenés jelentkezett, míg ezt követően a probiotikum kezelés hatására visszatért a kiindulási állapothoz. A koncentráció vizsgálata esetében, azonban csak a kezelések és a mintavételi időpontok mutattak szignifikáns különbségeket, de a kettőjük interakciójában nem jelentkezett differencia. Ennek következtében, megállapítható, hogy csak az antibiotikum kezelés volt képes szignifikánsan csökkenteni a koncentráció mértékét, de az ezt követő probiotikum kúra nem okozott számottevő változást. Egy másik megközelítésben a PUFAs fő kategórián belül el tudunk különíteni egy alkategóriát a hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavakat, illetve ezen az alkategórián belül még további két alcsoportot tudunk megkülönböztetni az n-6 LC PUFAs-t (C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6, C22:5n-6) és az n-3 LC PUFAs-t (C20:5n-3). Ha ebben a megközelítésben vizsgáltuk meg az adatokat, akkor az LC PUFAs alkategória és az ezen belüli n-6 LC PUFAs alcsoport eredményei hasonló eltéréseket mutattak, míg az n-3 LC PUFAs alcsoport esetében nem jelentkezett szignifikáns eltérés sem a koncentrációk, sem pedig a

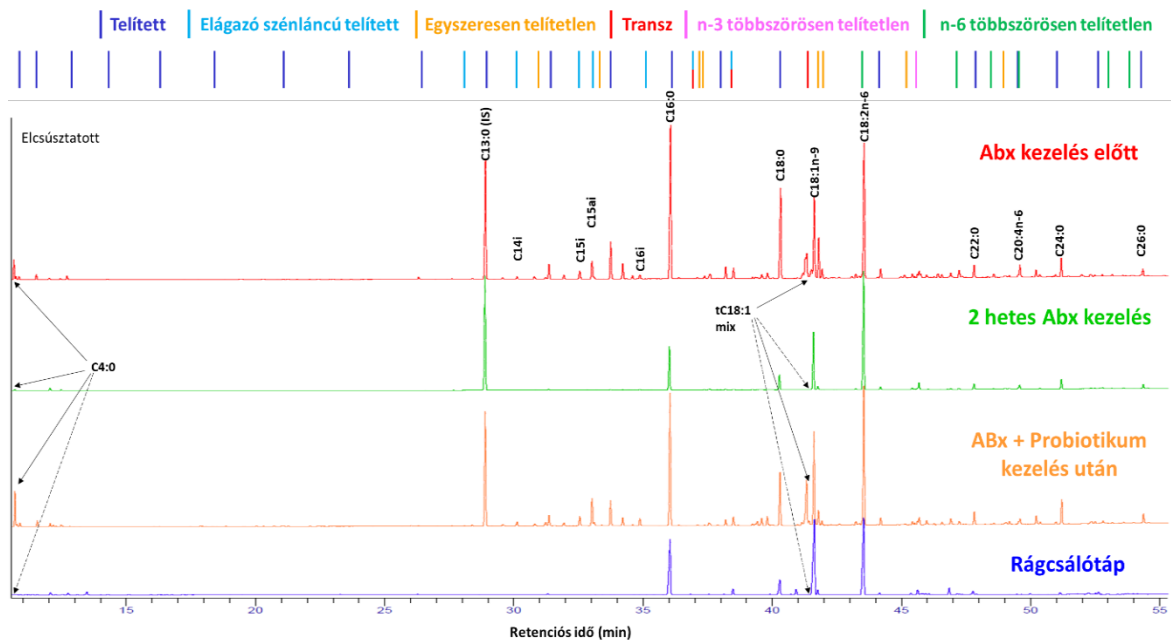
tömegszázalékos arány tekintetében (3. táblázat). Ezen eredmények tükrében, miszerint a C20:5n-3 zsírsavnál nem jelentkezett szignifikáns változás, kijelenthető, hogy a C18:3n-3 a meghatározó zsírsav, mely a változásokért felelt az n-3 PUFAs alkategóriában, mely a koncentráció tekintetében ugyanazokat a szignifikáns eltéréseket mutatta, mint fő kategóriája. Továbbá a tömegszázalékos arány analízise során a kezelések és a mintavételi időpontok interakciójában is jelentkezett szignifikáns eltérés. Az n-6 PUFAs alkategória vizsgálata során csupán két zsírsav (C20:2n-6, C20:3n-6) mutatott szignifikáns eltérést a három vizsgált paraméter tekintetében a koncentrációs szint mérése során. Mindkét zsírsav mennyiségében jelentősen csökkenést detektáltunk antibiotikum kezelést követően, azonban az ezt követő probiotikum kúra képes volt visszaállítani az eredeti állapotot. A tömegszázalékos arány analízise alapján a C18:2n-6 és C20:4n-6 zsírsavak kivételével, az n-6 PUFAs alkategória tagjai nem mutattak szignifikáns eltéréseket, azonban e két zsírsavnál szignifikánsan megemelkedett a tömegszázalékos arány az antibiotikum kezelést követően, továbbá az ezt követő probiotikum adás pedig képes volt ellensúlyozni ezt a hatást és visszaállította a tömegszázalékos arányokat a kiindulási értékekre (9. ábra és 5. táblázat).

Zsírsavak	Lineáris kevert modell eredményei					
	koncentrációk p értékei			tömeg% p értékei		
	mintavételi időpontok	kezelések	időpontok és kezelések	mintavételi időpontok	kezelések	időpontok és kezelések
C13:1n-1	$6,97 \times 10^{-14}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$9,67 \times 10^{-11}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$	$< 2,2 \times 10^{-16}$
C14:1n-5	$1,67 \times 10^{-5}$	0,620	$2,29 \times 10^{-5}$	$1,16 \times 10^{-4}$	0,853	$1,03 \times 10^{-4}$
C16:1n-9	0,129	$4,91 \times 10^{-7}$	$3,96 \times 10^{-2}$	0,690	$3,57 \times 10^{-2}$	0,650
C16:1n-7	$3,25 \times 10^{-4}$	$7,49 \times 10^{-6}$	$1,40 \times 10^{-2}$	0,247	0,096	0,843
C18:1n-9	$1,96 \times 10^{-3}$	$2,50 \times 10^{-6}$	$5,33 \times 10^{-3}$	$3,88 \times 10^{-3}$	$3,11 \times 10^{-6}$	$1,42 \times 10^{-3}$
C18:1n-7	$3,43 \times 10^{-5}$	$2,11 \times 10^{-8}$	$3,78 \times 10^{-4}$	0,102	$1,82 \times 10^{-3}$	0,544
C20:1n-9	$1,07 \times 10^{-4}$	$1,63 \times 10^{-8}$	$1,53 \times 10^{-5}$	0,861	0,176	0,101
C22:1n-9	$4,81 \times 10^{-3}$	$1,36 \times 10^{-5}$	0,096	0,246	0,647	0,866
C18:2n-6	$2,41 \times 10^{-2}$	0,052	0,242	$5,23 \times 10^{-4}$	$1,09 \times 10^{-14}$	$3,00 \times 10^{-7}$
C18:3n-3	$5,00 \times 10^{-2}$	$1,53 \times 10^{-2}$	0,217	$1,62 \times 10^{-4}$	$2,14 \times 10^{-14}$	$1,05 \times 10^{-5}$
C20:2n-6	$2,25 \times 10^{-6}$	$8,52 \times 10^{-7}$	$3,17 \times 10^{-6}$	0,987	0,282	0,797
C20:3n-6	$3,35 \times 10^{-3}$	$1,71 \times 10^{-4}$	$8,77 \times 10^{-3}$	0,630	0,290	0,823
C20:4n-6	0,734	0,092	0,316	$3,46 \times 10^{-7}$	$9,08 \times 10^{-7}$	$1,90 \times 10^{-10}$
C20:5n-3	0,534	0,284	0,795	0,916	0,56	0,915
C22:4n-6	0,164	$3,93 \times 10^{-2}$	0,641	0,657	0,067	0,955
C22:5n-6	$1,24 \times 10^{-2}$	$2,17 \times 10^{-3}$	0,263	0,734	0,714	$3,10 \times 10^{-2}$

5. táblázat A vizsgált egyszeresen telítetlen cisz-zsírsavak és többszörösen telítetlen zsírsavak lineáris kevert random modell p értékeinek eredményei a mintavételi időpontok, kezelések, mintavételi időpontok és kezelések függvényében a koncentrációk és tömegszázalékok esetében, a félkövér betűk a szignifikanciákat jelölik ($p < 0,05$).

V.4.2.5. A rágsálótáp zsírsav összetétele

Az állatoknak biztosított standard rágsálótáp zsírsav összetétele nem volt teljes mértékben feltüntetve, ezért a rágsálótápban található zsírsavak összetételét is kielemeztük (6. táblázat) és összevetettük a kezelések által megjelenő zsírsav összetétel változásaival (11. ábra). Az eredmények azt mutatták, hogy a cMUFAs kategória mennyisége a legmagasabb a PUFAs és SAT kategória mellett. A cMUFAs kategória vizsgálata során a C18:1n-9 volt a legnagyobb mennyiségben jelen. A PUFAs mérés során megállapítottuk, hogy az n-6 PUFAs alkategória arányaiban nagyobb mennyiségben van jelen, mint a n-3 PUFAs alcsoport, továbbá ezeken belül is a C18:2n-6 és a C18:3n-3 zsírsavak voltak a legdominánsabb képviselői a PUFAs kategóriának. A SAT kategória tekintetében a legmagasabb mennyiségben előforduló zsírsavak a C16:0 és a C18:0 voltak. A rövid szénláncú telített zsírsavakat, illetve a TFA kategórián belül a tC18:1 zsírsavat minimális mennyiségben tudtuk detektálni, ezzel ellentétben nem tudunk kimutatni elágazó szénláncú telített zsírsavakat a rágsálótápban. Így ezen eredmények tükrében elmondható, hogy nem a tápból bevitt zsírsavak okozták a kezelések következtében látott zsírsavak változásait.



11. ábra Az ábra a C4:0 és C26:0 zsírsavak változásait mutatja be egy antibiotikum majd probiotikum kezelést kapó állat kromatogramjai alapján. Az ábra tetején a különböző zsírsav csoportok (telített, elágazó szénláncú telített, egyszeresen telített, transz, n-3 többszörösen telítetlen, n-6 többszörösen telítetlen zsírsavak) különböző színnel láthatóak, és alattuk az egyes vizsgált zsírsavak a zsírsavcsoportoknak megfelelő színnel jelölve. Az első kromatogram az antibiotikum (ABx) kezelés előtti, a második kromatogram a 2 héten át tartó antibiotikum kezelés, a harmadik kromatogram az antibiotikum majd probiotikum kezelés utáni zsírsav összetételt mutatja, a negyedik kromatogram a rágcsálótápban található zsírsavakat jelöli. A szaggatott nyilak a komponensek hiányát jelzik. A székletminták kromatogramjait grafikusán normalizáltuk a belső standard C13:0 csúcsmagasságához.

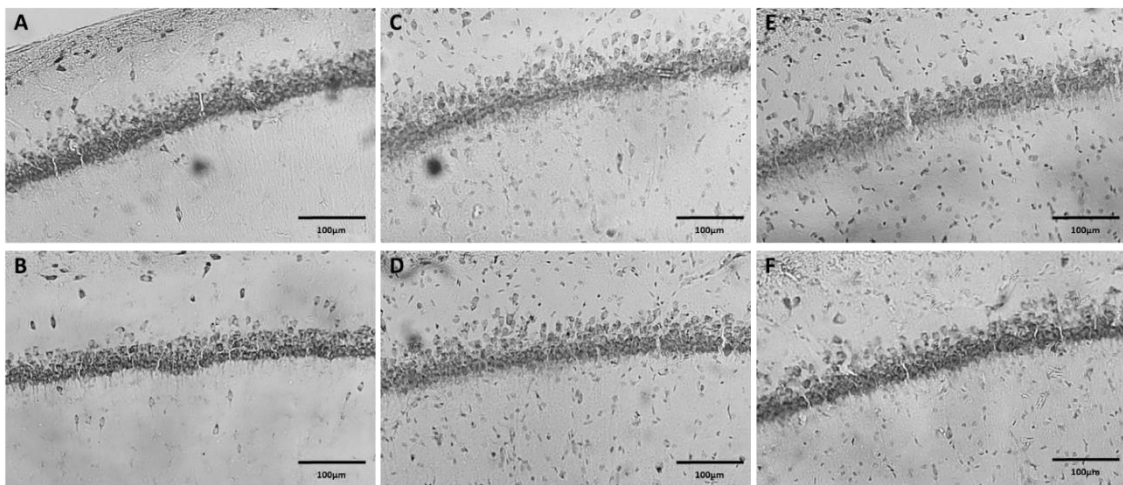
w/w %	Átlag	Szórás
SAT	27,32	0,18
shortSAT	1,37	0,19
Elágazó transz	0,1	0,01
Elágazó SAT	-	-
TFA	0,09	0,01
cMUFA	36,09	0,14
PUFA	31,16	0,23
n-3 PUFA	1,52	0,03
n-6 PUFA	29,64	0,21
LC PUFA	0,45	0,01

w/w %	Átlag	Szórás
n-3 LC PUFA	0,12	0,01
n-6 LC PUFA	0,33	0
C14:0	0,31	0,01
C16:0	22,76	0,07
C18:0	5,34	0,03
t18:1mix	0,09	0,01
C18:1n-9	34,05	0,14
C18:1n-7	1,29	0,01
C18:2n-6	29,31	0,21
C18:3n-3	1,4	0,03

6. táblázat A rágcsálótápanyagban megtalálható zsírsavak százalékos arányának (w/w%) átlaga és szórása 3 paralel mérés alapján. SAT: telített zsírsavak, shortSAT: rövid szénláncú telített zsírsavak, Elágazó transz: elágazó transz-zsírsavak, Elágazó SAT: elágazó szénláncú telített zsírsavak, TFA: transz-zsírsavak, cMUFAs: egyszeresen telítetlen cisz-zsírsavak, PUFAs: többszörösen telítetlen zsírsavak, n-3 PUFAs: n-3 többszörösen telítetlen zsírsavak, n-6 PUFAs: n-6 többszörösen telítetlen zsírsavak, LC PUFAs: hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak, n-3 LC PUFAs; n-3 hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak, n-6 LC PUFAs: n-6 hosszú szénláncú többszörösen telítetlen zsírsavak.

V.5. Szövettan

A kísérletek végeztével csoportonként 6 db véletlenszerűen kiválasztott állat esetében elemeztük ki a hippocampus különböző régiójának (subiculum, CA1, CA2, CA3, Gyrus dentatus) átmérőjét az általunk kiválasztott szakaszban (bregma -3,6-tól bregma 3,8-ig). A szövettani analízis során szembeűnő változásokat figyeltünk meg a hippocampus területein (7. táblázat és 12. ábra). Azonban nem csak a csoportok között, de a csoportokon belül az egyedek között is jelentős eltéréseket észleltünk, ezért a szövettani adatok jelen formájukban nem interpretálhatók.



12. ábra A hippocampus CA1-es régiójának krezil-viola festése a vizsgált csoportokban. *A: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, B: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, C: probiotikum kezelt csoport, D: valproát és probiotikum kezelt csoport, E: valproát kezelt csoport, F: kontroll csoport kezelés nélkül.* A jobb alsó sarokban található vonal (scale bar) mérete 100 µm.

Hippocampus területeinek átmérője (µm)	kontroll	ABx	ABx+ probiotikum	probiotikum	C-VPA	P-VPA
subiculum	41.82 (34.73-49.81) abcd	45.36 (37.97-57.03) a	43.98 (35.98-51.65) aefg	45.96 (39.25-53.33) be	45.59 (38.72-53.64) dg	45.93 (39.49-55.74) cf
Ca1	38.69 (33.52-43.89) a	39.68 (34.71-43.61) bcde	34.92 (30.52-39.87) abcde	40.14 (34.65-46.07) abcde	42.99 (38.23-49.58) ae	43.73 (38.14-49.41) ad
Ca2	67.27 (58.62-78.85) ab	63.92 (57.17-71.07) acde	63.74 (53.79-70.49) bfg	68.45 (57.19-77.85) cdf	71.70 (62.16-80.51) ehi	72.15 (63.11-81.34) dgi
Ca3	67.50 (52.94-81.36) a	67.79 (56.32-84.70) bcd	63,02 (52.23-79.77) bde	62,02 (48.92-81.36) acde	77.31 (64.07-93.02) df	68.54 (52.70-88.11) ef
gyrus dentatus	62.22 (53.51-73.70) a	65.89 (56.43-78.14) b	60.92 (52.78-72.49) c	63.76 (52.24-79.19) d	66.16 (57.52-77.87) e	68.39 (59.34-79.46) abcde

7. táblázat A hippocampus különböző régióinak (subiculum, CA1, CA2, CA3, Gyrus dentatus) átmérője (µm) medián (IQR)-ben feltüntetve (n=6/csoport). Kontroll: kontroll csoport kezelés nélkül, ABx: széles spektrumú antibiotikum kezelt csoport, ABx+probiotikum: széles spektrumú antibiotikum kezelt majd probiotikum kezelt csoport, probiotikum: probiotikum kezelt csoport, C-VPA: valproát kezelt csoport, P-VPA: valproát és probiotikum kezelt csoport. Az egyes csoportok közötti szignifikáns változást az azonos kis betűk jelölik (a-i) (Kruskal–Wallis teszt, Friedman teszt, $p < 0,05$).

VI. Diszkusszió

VI.1. A GI mikrobiom megváltoztatásának hatása a szociális magatartási folyamatokra

A szociális viselkedés és a GI mikrobiom kapcsolatát elsősorban csíramentes állatokkal történő vizsgálatok és a pre- illetve posztnatális periódusban különféle antibiotikum kezelések segítségével tanulmányozták és a szociabilitás károsodása nagymértékben megfigyelhető ezeknél a vizsgálatoknál [82]. A csíramentes állatokkal történő kísérletek során, a normál mikrobiommal történő kolonizálást követően a szociális deficit normalizálódott. Ezen eredmények alapján pedig feltételezhetjük, hogy a GI mikrobiom szerepet játszik a szociális viselkedés fejlődésének integratív folyamataiban [152, 153]. Ennek ellenére a felnőtt korban történő bélflóra módosítás és a szociális viselkedés kapcsolata kevésbé tanulmányozott.

A kísérleteink egyik alapvető eredménye, hogy a felnőtt korban alkalmazott széles spektrumú antibiotikum kezelést követően szociális deficit jelentkezett. A szociális interakciós teszt során a szociális zónában eltöltött időben, interakciók számában és a szociabilitási index eredményeiben, melyek az ismeretlen állathoz való preferenciát leginkább megmutatják, megfigyelhető, hogy az antibiotikum kezelés hatására hasonlóan, mint a kontroll valproát kezelt csoportnál szociális deficit jelentkezett. Ezen eredmények pedig azt jelzik, hogy a krónikus széles spektrumú antibiotikum kezelés felnőtt korban is képes negatívan befolyásolni a társas viselkedési mintázatokat. Továbbá a szociális magatartásban megnyilvánuló eltérések nagyfokú hasonlóságot mutatnak a VPA patkány modellben megfigyelhető szociális abnormalitásokkal. Mindezek alapján úgy tűnik, hogy az eredményeink támogatják azt az elképzelést, mely szerint az antibiotikumok által módosított mikrobiom kockázati tényezőként megjelenhet az ASD kialakulásában [78, 80, 154]. A megjelenő szociális viselkedésbeli eltérések mellett azonban a teszt során nem volt különbség az állatok által megtett távolságban és az ismeretlen állat zónájába történő első belépésben, illetve a belépések számában. Mindemellett a LiCl-os pilot kísérletben, mely során az állatokban intesztinális diszkonfort érzést váltottunk ki nem jelentkezett csökkent szociális viselkedés, mint ami a hosszú távú antibiotikum kezelés során detektálható volt. Ennek következtében elmondható, hogy a szociális viselkedésben tapasztalható abnormalitások nem az

antibiotikum kezelés hatására megjelenő viscerális diszkonfort érzésből erednek, hanem az antibiotikumok okozta GI mikrobiom jelentős redukciójával állnak szoros összefüggésben. Ezen eredmények tükrében megállapítható, hogy fontos szerepet tölt be a szociális viselkedésben a GI traktusban jelenlévő bakteriális közösség egyensúlya, melynek nagymértékű csökkenése, vagy megváltozása lényeges hatást vált ki a mikrobiom-bél-agy tengely mentén, és ennek következtében szociális magatartásbeli deficithez vezet, függetlenül attól, hogy fennáll-e az intesztinális diszkomfort érzése vagy sem.

Amellett, hogy az ABx- és a VPA kezelt állatoknál hasonló szociális deficit jelentkezett, teljesen eltérő útvonalakon váltották ki a magatartásmódosító hatásukat. Az első esetben az antibiotikum kezelés erőteljesen csökkentette a GI baktériumok mennyiségét és ennek hatására a mikrobiom-bél-agy tengely mentén megjelenő módosulások vezettek végezetül a viselkedés változásához [143, 155]. A VPA állatmodell, mint fejlődési modell esetében a prenatális VPA kezelés feltételezhetően módosításokat okozott a HDAC aktivitásában, emellett GABA és Wnt szignáltranszdukciós változásokat is eredményezhetett, továbbá a neuronok fejlődésében károsodásokat válthatott ki [26, 156, 157]. Ezen mechanizmusok számos agyterületen funkcionális és morfológiai eltéréseket képes generálni, többek között a kérgi és a hippokampális régiókban [157, 158]. A hisztológiai eredményeink alapján, mely során a hippokampális régió rétegvastagságát analizáltuk nagyfokú variabilitást detektáltunk a VPA kezelt csoport egyedei esetében, azonban nem csak ez a csoport vonatkozásában, hanem a többi csoport vizsgálata során is, így egyértelmű morfológiai eltéréseket nem tudunk egyik kezeléshez sem hozzákapcsolni.

Annak ellenére, hogy a két kezelés eltérő útvonalakon fejti ki hatását, mégis hasonló szociális magatartási deficitet regisztráltunk a két kezelt csoport esetében, ezért, hogy pontosabb képet kapjunk a GI mikrobiom és az ASD kialakulásának, illetve fő tüneteinek kapcsolatáról egy másik irányból is szeretnénk vizsgálni ezt a kérdést, ezért bevezettünk egy probiotikum keverékkel történő kezelést is, mellyel szintén a bélflóra módosítása során tudtuk vizsgálni az egyedek magatartását. Ma már több vizsgálat is igazolja, hogy a probiotikumok alkalmazása jótékony hatással bír az antibiotikumok által generált fiziológiai és pszichológiai rendellenességekre [159, 160]. Emellett vannak olyan tanulmányok is, melyek kifejezetten a probiotikumok bizonyos központi idegrendszeri érintő betegségekre irányuló alkalmazását célozzák [161, 162]. Tekintettel arra, hogy az ASD esetében megfigyelhető egy eltérő mikrobiális profil, ennek

következtében számos kutatás irányult arra, hogy a GI mikrobiomot probiotikumok segítségével pozitív irányba módosítsa, és néhány esetben ezek a módosítások jótékony hatást eredményeztek mind a GI rendszer szintjén, mind pedig az ASD-ben megjelenő viselkedési deficit enyhítésében egyaránt [162-165]. A VPA autizmus állatmodell amellett, hogy az ASD tüneteivel nagyfokú hasonlóságot mutat, a GI mikrobiomra is hatással van és egy megváltozott mikroba közösséget alakít ki [45, 166, 167]. Mindezek ellenére napjainkban még kevés vizsgálat irányul kifejezetten a VPA autizmus állatmodellben történő különböző probiotikumok hatásának tesztelésére, azonban az egyik ilyen tanulmány pozitív eredményekről számolt be, *Lactobacillus* törzsek mindennapi adagolásával magatartási zavarok csökkenését idézték elő [168].

Jelen vizsgálatainkkal sikerült igazolnunk, hogy speciális probiotikus hatású baktériumfajok keveréke, mint egy potenciálisan újfajta megközelítés az ASD szociális viselkedést érintő tüneteinek enyhítésében hatásosnak bizonyult mind a VPA-, mind pedig az antibiotikum kezelt állatcsoport esetében. Az általunk alkalmazott probiotikum keverék képes volt javítani mindkét kezelt csoport esetében az ismeretlen állathoz való preferencia mértékét, mindez pedig azt jelzi, hogy a keverékünk sikeresen csökkentette az antibiotikum- illetve a VPA kezelés okozta antiszociális viselkedést. Mindemellett eredményeink során nem találtunk lényeges eltérést a kontroll csoport és a P-VPA illetve az ABx+probiotikummal kezelt csoportok között, így a probiotikum keverék nem csak enyhítette az antiszociális magatartást, hanem a fiziológiásnak tekinthető szociális viselkedési mintázatot is sikeresen visszaállította. Habár mindkét modell teljesen eltérő útvonalakon fejti ki hatását, a kialakult szociális viselkedési deficit hasonlósága számottevő, emellett a probiotikum keverék képes volt helyreállítani mindkét modell esetében a kontroll egyedekre jellemző szociális magatartást. Ezen eredmények alapján azt feltételezzük, hogy mindkét modellben a probiotikus kezelés védő hatásai azonos módon érvényesültek és fejtették ki a magatartásra gyakorolt hatásukat. Azonban csak önmagában a 2 héten át tartó probiotikum kezelés nem tudott kiváltani semmiféle jelentős változást az állatok magatartásában, vizsgálataink során csupán a szociális zónába történő belépések számánál detektáltunk szignifikáns eltéréseket a kontroll csoporthoz képest, mely azonban feltehetően abból adódott, hogy a csak probiotikum kezelésben részesülő egyedek több időt töltöttek az ismeretlen állatot tartalmazó zónában egy-egy belépést követően. Mindazonáltal a jövőben további vizsgálatokra lenne szükség, annak érdekében, hogy szélesebb körben feltárjuk a mikrobiom módosításának a különböző magatartásformákra gyakorolt hatását, emellett a későbbiekben szintén fontos lenne

megvizsgálni, hogy a probiotikum kezelés csak átmeneti, vagy tartós hatást okozott az állatok szociális viselkedésében.

VI.2. A GI mikrobiom módosításának hatása az SCFAs termelésre

Az antibiotikum és VPA kezelés eredményeként megjelenő szociális deficit probiotikum keverékkel történő sikeres helyreállításának következtében azt valószínűsítjük, hogy azonos útvonalon történik a probiotikum keverék magatartásra gyakorolt védő hatásának kialakulása. Kísérleteink során azt feltételeztük, hogy ez a hatás a rövid szénláncú zsírsavak megváltozásának köszönhető, hisz ma már jelentős szakirodalma van az SCFAs fiziológias működésekben betöltött szerepének, emellett igazolt, hogy jótékony hatással bírnak a GI traktus normál funkcióira, szabályozzák az immunmechanizmusokat, és már neuroaktív tulajdonságaikat is leírták [169-173]. A három fő SCFAs (butánsav, propionsav, ecetsav) tekintetében a humán vizsgálatok során egymástól eltérő eredményeket írtak le, ennek következtében egy ASD-re jellemző SCFAs profilt nem lehet definiálni [45, 174, 175]. Mindazonáltal állatkísérletek esetében is megfigyelhető az SCFAs változása, többek között a VPA autizmus állatmodellben SCFAs koncentrációjában is eltéréseket detektáltak [166]. Emellett a propionsav, mint az egyik fő SCFAs rágszálómodellekben történő alkalmazása esetén az ASD-ben megjelenő viselkedéshez nagyon hasonló magatartási zavarok idézhetők elő [176].

Mindezek ellenére, habár feltételeztük, hogy az SCFAs összetételében bekövetkező változások okozzák a probiotikum magatartásra gyakorolt jótékony hatását, mégis a vizsgálati eredményeink tükrében, úgy tűnik, hogy nem a zsírsavak szintjén kell keresnünk a probiotikum hatásáért felelős közös utat. A fő SCFAs vizsgálata során a VPA-val kezelt és a kontroll állatok között nem sikerült szignifikáns eltéréseket detektálnunk, továbbá a probiotikum kezelést követően sem jelentkezt jelentős különbség az SCFAs mennyiségében és összetételében. Mindazonáltal a széles spektrumú antibiotikum kezelés jelentősen lecsökkentette az ecetsav, butánsav és propionsav koncentrációját, mely arra utal, hogy az antibiotikum kezelés nagy mértékben képes volt redukálni a GI baktériumflóra mennyiségét. Annak ellenére, hogy az antibiotikum kezelést követő probiotikum kúra jelentősen megemelte az SCFAs koncentrációját a többi csoport eredményeivel összehasonlítva nem detektáltunk lényeges különbségeket, mindazonáltal feltételezhető, hogy a probiotikum keverék erősebb hatást vált ki az antibiotikumok használata következtében kialakuló diszbiózist

követően, mint a kompakt, kezeletlen mikrobiom közösség esetén, amely jelen esetben a csak probiotikumok kapó csoport volt. A jelen konzekvenciák egyértelműen azt mutatják, hogy a 3 fő SCFAs koncentrációjának változása nem lehet az egyetlen ok-okozati komponens, amely meghatározza, hogy a probiotikum keverék hogyan fejti ki pozitív hatását a szociális magatartásra. Ezért úgy gondoljuk, hogy az általunk kevert probiotikum készítmény az SCFAs módosítása nélkül fejtette ki hatását és feltételezzük, hogy a szerotonerg rendszeren keresztül tudta visszaállítani mind az antibiotikumok, mind a VPA okozta magatartásban megnyilvánuló elváltozásokat.

Mindkét modell esetében leírtak már eltéréseket a szerotonerg rendszer tekintetében. Az antibiotikum kezelés a diszbiózison keresztül módosítja, míg a VPA kezelés a fejlődés korai szakaszában vált ki eltéréseket a szerotonerg rendszerben [143, 177]. A GI mikrobiom képes közvetve vagy közvetlenül befolyásolni a triptofán elérhetőségét és a szerotonin szintézist, illetve a kinurenin útvonal szabályozását is, mely fontos szerepet tölt be a neuroprotektív kinurénsav (N-metil-D-aszparaginsav (NMDA) receptor antagonist) és a neurotoxikus kinolinsav (NMDA receptor agonista) termelődésének szabályozásában [178]. Így végső soron a kinurenin útvonal modulálása az NMDA receptorok expresszációjának változását tudja eredményezni [178-180]. A VPA kezelés fokozni tudja az NMDA-receptorok működését a központi idegrendszerben az egyedfejlődés során, azonban farmakológiai szuppresszióval vagy NMDA receptor antagonisták alkalmazásával jelentős változás érhető el a szociális deficitben, hiszen az NMDA receptorok alapvető szerepet bírnak a komplex kognitív és szociális viselkedési folyamatok szabályozásában [166, 181-185]. Mindezek következtében elképzelhető, hogy a kinurenin útvonal a kulcs faktor, melyen keresztül képes volt az általunk alkalmazott probiotikum keverék helyre állítani az antiszociális viselkedést. Mindazonáltal a jövőben további vizsgálatokra van szükség a metabolikus mintázatoknak és az NMDA receptor expressziós szintjének mérésére az összes állatcsoportunk esetében.

VI.3. A GI mikrobiom zsírsavtermelésben betöltött szerepe

Napjainkban egyre több bizonyíték támasztja alá a GI mikrobiom fiziológiás működésekben betöltött jelentős hatását, többek között meghatározó szerepe van a zsírraktározás és az energia háztartás szabályozásában, segíti az ásványi anyagok felszívódását és befolyásolja a zsírsavtermelést [122, 126, 138]. Annak érdekében, hogy

alaposabban feltárjuk a GI mikrobiom zsírsavtermelésben betöltött szerepét és megvizsgáljuk az intesztinális baktériumok hatását a zsírsav spektrumra felnőtt korban egy széles spektrumú antibiotikumokkal kezelt állatmodellt választottunk, ugyanis a masszív, hosszú távú antibiotikum kezelés képes jelentősen lecsökkenteni/kimeríteni a bélben jelenlévő baktériumközösségeket.

Mivel a GI mikrobiom összetételét jelentősen befolyásolhatja a kezdeti kolonizáció, az étrend és számos egyéb környezeti tényező [186, 187], ezért a vizsgálatainkban olyan patkányokat igyekeztünk alkalmazni, akik egy időben és egy helyen születtek, azonos genetikai háttérrel rendelkeztek, továbbá ugyanazt a táplálékot fogyasztották és azonos környezetben nevelkedtek. Ezáltal próbáltuk a lehető legminimálisabbra csökkenteni a változók hatását, emellett az állatok random csoportokba történő besorolása esetében az alomhatásokat is statisztikailag korreláltuk egymáshoz, így, mindezeket a tényezőket figyelembe véve feltételeztük, hogy a kezelések előtt a mikrobiom összetétele nagyfokú hasonlóságot mutat az egyedek között. Ezt az elképzelést a kezelések előtt mért zsírsav koncentrációk és tömegszázalékos arányok is igazolták, ugyanis a vizsgált zsírsavak között nem jelentkezett szignifikáns különbség a kezelések előtti időpontban.

Ma már egyértelműen tudjuk, hogy a fő rövid szénláncú zsírsavakat a bél mikrobiota termeli [117, 118, 122, 188], emellett a hosszabb páratlan szénatomszámú zsírsavakat, mint például a C15:0 vagy C17:0 zsírsavakat is igazoltan baktériumok állítják elő [122]. Továbbá bizonyos baktériumfajok képesek metabolizálni az n-6 C18:2 és az n-3 C18:3 zsírsavakat, és konjugált linonsavvá, illetve más transz-zsírsavakká (transz-vakcénsav (C18:1n-7t) átalakítani őket [122, 139]. Jelenlegi eredményeink is megerősítik ezeket az állításokat és emellett további fontos telített és telítetlen zsírsavakat is feltártak, melyeket feltételezhetően szintén a GI mikrobiom termel.

A részletes zsírsav spektrum analízise során a rövid szénláncú zsírsavakat is megvizsgáltuk és a GC-MS méréseinkhez hasonlóan azt az eredményt kaptuk, hogy a C4:0/butánsav és C5:0/ecetsav termelődésében a GI baktériumoknak döntő szerepe van. A hosszabb szénláncú telített zsírsavak vizsgálata során megállapítottuk, hogy e csoportba tartozó zsírsavak többségét a GI traktus baktériumai állítják elő, és nem csak a jelenlegi ismereteink alapján feltételezett páratlan szénatomot tartalmazó zsírsavakat, hanem a páros szénatomszámú zsírsavak nagy részét is. Mindössze 2 zsírsav (C9:0, C25:0) koncentrációjában nem jelentkezett csökkenés az antibiotikum kezelést követően, azonban e két zsírsav minimális mennyiségben volt kimutatható a vizsgált egyedekben, de ettől függetlenül azt feltételezzük, hogy nem, vagy csak csekély mértékben

befolyásolják az intesztinális baktériumok a termelődésüket annak ellenére, hogy páratlan szénatomszámú telített zsírsavakhoz tartoznak. Az elágazó SAT csoporthoz tartozó zsírsavak koncentrációja is jelentős csökkenést mutatott az antibiotikum kezelést követően, ami megerősíti a közelmúltban a szakirodalom által leírt eredményeket, miszerint az elágazó szénláncú telített zsírsavak a fehérjék bakteriális lebomlásából származnak [189], a GI traktus baktériumainak hiánya pedig az elágazó SAT hiányát idézi elő, melynek számos anyagcserét érintő következménye lehet [190]. A cMUFAs többsége a koncentráció meghatározása során szintén nagyfokú süllyedést mutatott az antibiotikum kezelés után, továbbá legjobb tudomásunk szerint nincs szakirodalmi háttér arról, hogy az intesztinális rendszerben megjelenő cMUFAs csak a táplálkozás során történő bevitelnek tulajdonítható, ezért feltételezzük, hogy a GI mikrobiom döntő szerepet tölt be e zsírsavak termelésében. Az analízisben részt vevő n-3 PUFAs és n-6 PUFAs csoportba tartozó legtöbb zsírsav esetében azonban nem detektáltunk koncentrációesést az antibiotikum kezelést követően, ez pedig szintén egybeesik a szakirodalomban leírtakkal, mely szerint ezekben a csoportokba tartozó zsírsavaknak a mennyisége szoros összefüggést mutat a táplálékkal történő bevitellel [97, 112]. Az állatok által fogyasztott rágcshalótápanyagban nagy mennyiségben fordultak elő a többszörösen telítetlen zsírsavak és ezek közül is leginkább a C18:2n-6 volt a legjelentősebb mennyiségben jelen. Érdekes módon a C22:4n-6 és C22:5n-6 zsírsavak koncentrációjában némi csökkenést mértünk, de valószínűsíthető, hogy a detektált koncentrációesés annak a következménye, hogy e két komponens nagyon alacsony koncentrációban volt fellelhető a kezelés előtt is. Újabb tanulmányok azt valószínűsítik a plazmában, májsejtekben és a bendőfolyadékban mért eredményeik alapján, hogy a C20:2n-6 és a C20:3n-6 mennyiségével összefüggést mutat a mikrobiom [191-193]. Vizsgálataink során e két zsírsav mennyisége jelentősen lecsökkent az antibiotikum kezelést követően, ezért azt az elképzelést, mely szerint a GI baktériumok fontos regulátorai a C20:2n-6 és C20:3n-6 zsírsavak termelődésének eredményeink részben szintén bizonyítják.

Az egyes zsírsavak koncentrációjának vizsgálata mellett a tömegszázalékos arányaikat is tanulmányoztuk. Eredményeink azt mutatták, hogy ahol az antibiotikum kezelést követően a zsírsavak koncentrációban csökkenés jelentkezett ott a zsírsavak többségének tömegszázalékos arányában is hasonlóan csökkenés volt detektálható. Ebből következik, hogy törvényszerűen szükséges bizonyos zsírsavak tömegszázalékos arányának emelkedése, ilyen például a C20:4n-6 és a C18:1n-9, melyeknek a

tömegszázalékos aránya emelkedett annak ellenére, hogy az abszolút koncentrációjuk csökkent.

A vizsgálataink során a kéthetes széles spektrumú antibiotikum kezelés jelentősen leredukálta a GI baktérium közösséget és ennek következtében a zsírsav spektrumban is nagymértékű csökkenést detektáltunk, ezen eredmények alapján szoros összefüggést feltételezünk e zsírsavak és a bél mikrobái között. Emellett bizonyos probiotikus hatású baktériumfajokból álló keverék adásának hatását is szeretnénk volna megvizsgálni a zsírsav spektrumra vetítve és eredményeink alapján azt gondoljuk, hogy az antibiotikum kezelést követően a rövid, 2 héten át tartó probiotikum kúra képes volt újra elindítani a baktérium populációk terjedését és ennek következtében pedig számos zsírsav koncentrációját is helyreállította. Mivel a probiotikum keverék nem tudta az összes általunk vizsgált zsírsav, antibiotikum kezelést követően módosult koncentrációs szintjét helyreállítani a kezelés előtti állapothoz, ezért feltételezzük, hogy ezekben az esetekben más baktériumfajok, vagy további mikrobiális kölcsönhatásoknak a megléte elengedhetetlen a zsírsavak termelődésében, ilyen például a C6:0, C10:0, C11:0, C16:1n-9 és C16:1n-7. Ezen eredményeink tükrében azt valószínűsítjük, hogy a *Bifidobacterium spp.* és a *Lactobacillus spp.*, melyeket a probiotikum keverékünk előállításához alkalmaztunk, nem voltak felelősek e zsírsavak termeléséért. Azonban az antibiotikum kezelést követő probiotikum keverék alkalmazása azon zsírsavak többségében, melyek koncentrációjában változás következett be visszatért a kiindulási, antibiotikum kezelés előtti szinthez. Ez az eredmény megerősítette, hogy a *Bifidobacterium spp.* és *Lactobacillus spp.* fajainak meghatározott összetételű keveréke képes volt indukálni e zsírsavak termelődését, de az is elképzelhető, hogy ezek a baktériumtörzsek kölcsönhatásba léptek más baktériumfajokkal [194], és ily módon, együttesen váltották ki a megfelelő zsírsavak termelődésének fokozását. Azonban azt jelenleg nem tudjuk, hogy még melyik baktériumtörzsek képesek előállítani ezeket a zsírsavakat, de az eredményeink alapján feltételeztük, hogy a probiotikum keverékben található törzseknek döntő szerepe van ezeknek a zsírsavaknak (elágazó szénláncú telített zsírsavak és a legtöbb telített zsírsav, emellett számos cMUFAs) a termelődésében, ezért ha ezeket a törzseket az antibiotikum kezelést követően alkalmazzuk, akkor a székletből nyert részletes zsírsavspektrumnak a jelentős mennyiséget helyre tudjuk állítani.

Mivel nemcsak az abszolút koncentrációk, hanem a zsírsavak egymáshoz viszonyított tömegszázalékos aránya is fontos információval szolgál, ezért a probiotikum kezelést követően is hangsúlyt fektettünk a tömegszázalékos arányok meghatározására. Míg az

antibiotikum kezelés következtében jelentős eltéréseket detektáltunk a tömegszázalékos arányok vizsgálata során, addig a probiotikum kúra után ezeknek az arányoknak a visszarendeződését tapasztaltuk. Tekintettel arra, hogy a tömegszázalék a zsírsavak egymáshoz viszonyított arányát mutatja meg, így a probiotikum keverék adagolását követően eredményeink azt demonstrálják, hogy a legtöbb zsírsav koncentrációjának helyreállása elégségesnek bizonyult a zsírsavak tömegszázalékos arányának normalizálódásához is.

A vizsgálatban résztvevő állatok ugyanazt a meghatározott zsírsavösszetételű rágcsálótápot kapták a kísérlet során, ezért a tápban található zsírsavaknak a kezelések során bekövetkező változásait is nyomon tudtuk követni az egyes mintavételi időpontokban. A C18:2n-6 kivételével a tápban előforduló összes zsírsavnak csökkent a koncentrációja az antibiotikum kezelést követő időpontban és az ezt követő probiotikum kezelés ismét visszaállította e zsírsavak mennyiségét. Az a tény, hogy a folyamatos, táplálékkal bejutatott zsírsavak döntő többségének változik a mennyisége a bélflórát módosító kezelések következtében egy fontos bizonyítékként szolgál arra, hogy a vizsgálataink során elemzett zsírsavak, melyeknek a mennyisége az antibiotikum hatására megváltozott és a probiotikum kezelést követően visszatért a GI rendszerben jelenlévő baktériumoknak köszönhető és nem annak, hogy külsőleg, a táplálkozás során kerülnek az emésztőrendszerbe.

Mindazonáltal, hogy vizsgálataink során jelentős bizonyítékok támasztják alá a mikrobiom meghatározott zsírsavak termelésében betöltött szerepét fontos figyelembe venni a kutatásunk korlátait is, melyeket későbbi kísérletsorozatok során fontos lenne megvizsgálni. Mivel eredményeink csak közvetett módon igazolják a bélflóra és a zsírsavak kapcsolatát ezért a székletmintákban ténylegesen jelenlévő baktérium közösségek vizsgálata kulcsfontosságú a jövőben, hiszen a vizsgálataink során kapott eredményeinkből nem tudjuk megmondani, hogy pontosan melyik baktériumfajok felelősek a változásokért.

VII. Összefoglalás

Az értekezés egyik fő céljának vizsgálata során kapott eredményeink megerősítik, hogy a felnőtt korban történő széles spektrumú antibiotikum kezelés a VPA autizmus állatmodellben megjelenő antiszociális viselkedéshez hasonló magatartást vált ki. Legjobb tudomásunk szerint a disszertációban leírt eredmények az elsők a szakirodalomban, melyek alátámasztják, hogy specifikus, probiotikus hatású baktériumfajok keverékéből álló készítmény képes helyreállítani a normál szociális viselkedéstől eltérő társas magatartási mintázatokat mind a kettő vizsgált állatmodell esetében. Feltételezzük, hogy a probiotikum keverékünk egy közös, nem a rövid szénláncú zsírsavak módosításán keresztüli útvonalon fejtette ki jótékony hatását mindkét modell esetében, függetlenül attól, hogy az antibiotikum kezelés a bélflóra jelentős lecsökkentésének következtében a mikrobiom-bél-agy tengely mentén megjelenő módosulások eredményeképpen váltotta ki az antiszociális viselkedést, míg a VPA állatmodell, mely egy fejlődési modell teljesen másik útvonalon okozta ugyanezt a magatartást. Mindezek alapján kutatásaink eredményei megerősíteni látszanak azt a hipotézist, miszerint a GI mikrobiom homeosztatisz egyensúlya jelentősen befolyásolja a központi idegrendszer működését és ezen belül a szociális magatartást is.

Az értekezés másik fő kérdéscsoportjának vizsgálati eredményei az egyik elsők közé tartoznak, melyek feltárják a GI mikrobiom felnőtt korban történő módosításának a részletes zsírsav spektrumra gyakorolt hatását. Eredményeink kimutatták, hogy a rövid szénláncú zsírsavakon kívül számos más telített és telítetlen zsírsav termelésében is kulcs szerepük lehet az intesztinális rendszer baktériumainak. A már bizonyítottan baktériumok által termelt transz és elágazó szénláncú telített zsírsavak megerősítése mellett eredményeink közvetett módon igazolták, hogy a feltételezésekkel ellentétben nem csak a páratlan-, hanem a páros telített szénláncú zsírsavak többségének termelésében is döntő szerepet töltenek be a GI baktériumok. Eredményeink rámutatnak, hogy a széles spektrumú antibiotikum kezelés jelentősen csökkenti a székletben mérhető zsírsavak mennyiségét, azonban az ezt követő specifikus probiotikus baktériumfajokból álló kezelés képes helyreállítani a zsírsav spektrum releváns hányadát. Emellett eredményeink felhívják a figyelmet a GI mikrobiom jelentősebb szerepére a zsírsavak termelésében és egy újfajta megközelítést nyújthatnak a zsírsavak arányának és mennyiségének megváltozásából eredő rendellenességek kezelésére.

Összességében az eredmények fontos bizonyítékot szolgáltatnak arról, hogy a GI mikrobiom modulálásának jelentős befolyásoló hatása van a zsírsavak mennyiségi és minőségi összetételére és a szociális magatartásmintázatokra, mint azt korábban gondolták. Továbbá különféle specifikus probiotikus hatású baktériumfajok kombinációi képesek hatékonyan helyreállítani a diszbiózis következtében kialakuló zsírsav összetételbeli elváltozásokat és emellett a szociális viselkedésben megjelenő zavarok enyhítésében is hatékonyan bizonyulhatnak.

Reményeink szerint vizsgálataink hozzájárulhatnak a GI mikrobiom komplex, szerteágazó szabályozási rendszerének részletesebb megismeréséhez, s a jövőben új, a zsírsavak összetételének megváltozásából eredő rendellenességek és az autizmus spektrum zavarban jelenlévő szociális viselkedési zavarok gyógyítását célzó új terápiás eljárások kidolgozásához.

VIII. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni mindenekelőtt témavezetőimnek, Prof. Dr. Karádi Zoltánnak, és Dr. Tóth Attilának belém vetett megtisztelő bizalmukért, szakmai iránymutatásukért, mindenkori támogatásukért és azért, hogy biztosították a munkámhoz a megfelelő háttérrel.

Köszönet illeti Prof. Dr. Lénárd Lászlót, a publikációk megírása során nyújtott segítségéért, hasznos szakmai tanácsaiért.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Zelena Dórának a PTE ÁOK Élettani Intézet igazgatójának, hogy lehetővé tette a fokozat megszerzését.

Köszönöm továbbá Hormay Edinának, László Kristófnak, Kovács Anitának, Vizvári Zoltánnak, Cserjési Renátának, Péczely Lászlónak és Ollmann Tamásnak a kísérletek során nyújtott különféle, sokat jelentő segítségükért.

Kiemelt köszönettel tartozom Bufa Anitának, Marosvölgyi Tamásnak, Szabó Évának, Makszin Lillának a gázkromatográfiás vizsgálatok elvégzéséhez nyújtott rengeteg segítségükért, továbbá köszönöm Farkas Nellinek és Sipos Zoltánnak az adatok elemzéséhez nyújtott segítséget.

Hálás vagyok Kocsis Béla Tanár úrnak, Varga Adorjának és Kovács Krisztinának, akik nélkülözhetetlen segítséget nyújtottak a probiotikum keverék elkészítésében.

Külön köszönetet szeretnék mondani Fuchs Ildikónak, Gonda Ágnesnek, Győrfi Ninának, Géczi Fanninak, Wahr Mátyásnak, Gáspárné Bak Erikának, Kvak Erikának, Klonga Ákosnak és Wilhelm Ferencnek a kísérletek előkészítésében és kivitelezésében nyújtott nélkülözhetetlen és áldozatos munkájukért, technikai segítségükért.

Végül, de nem utolsósorban köszönetet szeretnék mondani családomnak, akik mindvégig bíztattak, mellettem álltak és megértően támogattak.

Munkám az alábbi pénzügyi támogatások segítségével valósult meg:

Proof of Principle PTE/101413-1/2019,

EFOP-3.6.1- 16-2016-00004, EFOP-VEKOP, TKP2

IX. Irodalomjegyzék

1. Sharma, S.R., X. Gonda, and F.I. Tarazi, *Autism Spectrum Disorder: Classification, diagnosis and therapy*. Pharmacol Ther, 2018. 190: p. 91-104.
2. Lord, C., et al., *Autism spectrum disorder*. Nat Rev Dis Primers, 2020. 6(1): p. 5.
3. Bougeard, C., et al., *Prevalence of Autism Spectrum Disorder and Co-morbidities in Children and Adolescents: A Systematic Literature Review*. Front Psychiatry, 2021. 12: p. 744709.
4. Hollocks, M.J., et al., *Anxiety and depression in adults with autism spectrum disorder: a systematic review and meta-analysis*. Psychol Med, 2019. 49(4): p. 559-572.
5. Holingue, C., et al., *Gastrointestinal symptoms in autism spectrum disorder: A review of the literature on ascertainment and prevalence*. Autism Res, 2018. 11(1): p. 24-36.
6. Kohane, I.S., et al., *The co-morbidity burden of children and young adults with autism spectrum disorders*. PLoS One, 2012. 7(4): p. e33224.
7. Yeh, T.C., et al., *Risks of Major Mental Disorders and Irritable Bowel Syndrome among the Offspring of Parents with Irritable Bowel Syndrome: A Nationwide Study*. Int J Environ Res Public Health, 2021. 18(9).
8. Courchesne, E., et al., *Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism*. JAMA, 2011. 306(18): p. 2001-10.
9. Varghese, M., et al., *Autism spectrum disorder: neuropathology and animal models*. Acta Neuropathol, 2017. 134(4): p. 537-566.
10. Wegiel, J., et al., *The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes*. Acta Neuropathol, 2010. 119(6): p. 755-70.
11. Banker, S.M., et al., *Hippocampal contributions to social and cognitive deficits in autism spectrum disorder*. Trends Neurosci, 2021. 44(10): p. 793-807.
12. Baron-Cohen, S. and S. Wheelwright, *The Friendship Questionnaire: an investigation of adults with Asperger syndrome or high-functioning autism, and normal sex differences*. J Autism Dev Disord, 2003. 33(5): p. 509-17.
13. Bottema-Beutel, K., *Glimpses into the blind spot: Social interaction and autism*. J Commun Disord, 2017. 68: p. 24-34.
14. Mukherjee, S.B., *Autism Spectrum Disorders - Diagnosis and Management*. Indian J Pediatr, 2017. 84(4): p. 307-314.
15. Mackay, T., F. Knott, and A.W. Dunlop, *Developing social interaction and understanding in individuals with autism spectrum disorder: a groupwork intervention*. J Intellect Dev Disabil, 2007. 32(4): p. 279-90.
16. Chung, E.Y.-h., *Robot-Mediated Social Skill Intervention Programme for Children with Autism Spectrum Disorder: An ABA Time-Series Study*. International Journal of Social Robotics, 2021. 13: p. 1095–1107.
17. Scassellati, B., et al., *Improving social skills in children with ASD using a long-term, in-home social robot*. Sci Robot, 2018. 3(21).
18. Parker, K.J., et al., *A randomized placebo-controlled pilot trial shows that intranasal vasopressin improves social deficits in children with autism*. Sci Transl Med, 2019. 11(491).
19. Ergaz, Z., L. Weinstein-Fudim, and A. Ornoy, *Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD)*. Reprod Toxicol, 2016. 64: p. 116-40.
20. Banerjee, S., M. Riordan, and M.A. Bhat, *Genetic aspects of autism spectrum disorders: insights from animal models*. Front Cell Neurosci, 2014. 8: p. 58.
21. Mabunga, D.F., et al., *Exploring the Validity of Valproic Acid Animal Model of Autism*. Exp Neurol, 2015. 24(4): p. 285-300.

22. Silverman, J.L., et al., *Reconsidering animal models used to study autism spectrum disorder: Current state and optimizing future*. Genes Brain Behav, 2022. 21(5): p. e12803.
23. Bambini-Junior, V., et al., *Prenatal Exposure to Valproate in Animals and Autism*. Comprehensive Guide to Autism, 2014: p. 1779–1793.
24. Chaliha, D., et al., *A Systematic Review of the Valproic-Acid-Induced Rodent Model of Autism*. Dev Neurosci, 2020. 42(1): p. 12-48.
25. Chomiak, T., N. Turner, and B. Hu, *What We Have Learned about Autism Spectrum Disorder from Valproic Acid*. Patholog Res Int, 2013. 2013: p. 712758.
26. Nicolini, C. and M. Fahnstock, *The valproic acid-induced rodent model of autism*. Exp Neurol, 2018. 299(Pt A): p. 217-227.
27. Kennedy, M.S. and E.B. Chang, *The microbiome: Composition and locations*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2020. 176: p. 1-42.
28. Martinez-Guryn, K., V. Leone, and E.B. Chang, *Regional Diversity of the Gastrointestinal Microbiome*. Cell Host Microbe, 2019. 26(3): p. 314-324.
29. Ottman, N., et al., *The function of our microbiota: who is out there and what do they do?* Front Cell Infect Microbiol, 2012. 2: p. 104.
30. Barko, P.C., et al., *The Gastrointestinal Microbiome: A Review*. J Vet Intern Med, 2018. 32(1): p. 9-25.
31. Diamant, M., E.E. Blaak, and W.M. de Vos, *Do nutrient-gut-microbiota interactions play a role in human obesity, insulin resistance and type 2 diabetes?* Obes Rev, 2011. 12(4): p. 272-81.
32. Sudo, N., et al., *Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice*. J Physiol, 2004. 558(Pt 1): p. 263-75.
33. Bergman, E.N., *Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species*. Physiol Rev, 1990. 70(2): p. 567-90.
34. LeBlanc, J.G., et al., *Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective*. Curr Opin Biotechnol, 2013. 24(2): p. 160-8.
35. Magnusdottir, S., et al., *Systematic genome assessment of B-vitamin biosynthesis suggests co-operation among gut microbes*. Front Genet, 2015. 6: p. 148.
36. Inczefi, O., et al., *The Influence of Nutrition on Intestinal Permeability and the Microbiome in Health and Disease*. Front Nutr, 2022. 9: p. 718710.
37. Shi, N., et al., *Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system*. Mil Med Res, 2017. 4: p. 14.
38. Sanders, D.J., et al., *The role of the microbiome in gastrointestinal inflammation*. Biosci Rep, 2021. 41(6).
39. Hrcir, T., et al., *Gut microbiota and lipopolysaccharide content of the diet influence development of regulatory T cells: studies in germ-free mice*. BMC Immunol, 2008. 9: p. 65.
40. Voigt, R.M., et al., *Circadian Rhythm and the Gut Microbiome*. Int Rev Neurobiol, 2016. 131: p. 193-205.
41. Carding, S., et al., *Dysbiosis of the gut microbiota in disease*. Microb Ecol Health Dis, 2015. 26: p. 26191.
42. Castaner, O., et al., *The Gut Microbiome Profile in Obesity: A Systematic Review*. Int J Endocrinol, 2018. 2018: p. 4095789.
43. Sato, J., et al., *Gut dysbiosis and detection of "live gut bacteria" in blood of Japanese patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2014. 37(8): p. 2343-50.
44. Torres-Fuentes, C., et al., *The microbiota-gut-brain axis in obesity*. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2017. 2(10): p. 747-756.
45. Wang, L., et al., *Gut Microbial Dysbiosis in the Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review and Meta-Analysis of Case-Control Studies*. J Acad Nutr Diet, 2020. 120(4): p. 565-586.

46. Yarandi, S.S., et al., *Modulatory Effects of Gut Microbiota on the Central Nervous System: How Gut Could Play a Role in Neuropsychiatric Health and Diseases*. J Neurogastroenterol Motil, 2016. 22(2): p. 201-12.
47. Foster, J.A., et al., *Gut Microbiota and Brain Function: An Evolving Field in Neuroscience*. Int J Neuropsychopharmacol, 2016. 19(5).
48. Kao, A.C., S. Harty, and P.W. Burnet, *The Influence of Prebiotics on Neurobiology and Behavior*. Int Rev Neurobiol, 2016. 131: p. 21-48.
49. Reyes, R.E.N., et al., *Microbiome meets microglia in neuroinflammation and neurological disorders*. Neuroimmunology and Neuroinflammation, 2020. 7(3): p. 215-33.
50. Schirmer, M., et al., *Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity*. Cell, 2016. 167(4): p. 1125-1136 e8.
51. Holzer, P. and A. Farzi, *Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis*. Adv Exp Med Biol, 2014. 817: p. 195-219.
52. Larraufie, P., et al., *SCFAs strongly stimulate PYY production in human enteroendocrine cells*. Sci Rep, 2018. 8(1): p. 74.
53. Lu, V.B., F.M. Gribble, and F. Reimann, *Free Fatty Acid Receptors in Enteroendocrine Cells*. Endocrinology, 2018. 159(7): p. 2826-2835.
54. Chen, Y., J. Xu, and Y. Chen, *Regulation of Neurotransmitters by the Gut Microbiota and Effects on Cognition in Neurological Disorders*. Nutrients, 2021. 13(6).
55. Grabiec, A.M. and J. Potempa, *Epigenetic regulation in bacterial infections: targeting histone deacetylases*. Crit Rev Microbiol, 2018. 44(3): p. 336-350.
56. Stilling, R.M., T.G. Dinan, and J.F. Cryan, *Microbial genes, brain & behaviour - epigenetic regulation of the gut-brain axis*. Genes Brain Behav, 2014. 13(1): p. 69-86.
57. Fulling, C., T.G. Dinan, and J.F. Cryan, *Gut Microbe to Brain Signaling: What Happens in Vagus*. Neuron, 2019. 101(6): p. 998-1002.
58. Gershon, M.D. and K.G. Margolis, *The gut, its microbiome, and the brain: connections and communications*. J Clin Invest, 2021. 131(18).
59. Mackos, A.R., et al., *Role of the Intestinal Microbiota in Host Responses to Stressor Exposure*. Int Rev Neurobiol, 2016. 131: p. 1-19.
60. Haikal, C., Q.Q. Chen, and J.Y. Li, *Microbiome changes: an indicator of Parkinson's disease?* Transl Neurodegener, 2019. 8: p. 38.
61. Vogt, N.M., et al., *Gut microbiome alterations in Alzheimer's disease*. Sci Rep, 2017. 7(1): p. 13537.
62. Cryan, J.F., et al., *The gut microbiome in neurological disorders*. Lancet Neurol, 2020. 19(2): p. 179-194.
63. Sorboni, S.G., et al., *A Comprehensive Review on the Role of the Gut Microbiome in Human Neurological Disorders*. Clin Microbiol Rev, 2022. 35(1): p. e0033820.
64. Ding, H.T., Y. Taur, and J.T. Walkup, *Gut Microbiota and Autism: Key Concepts and Findings*. J Autism Dev Disord, 2017. 47(2): p. 480-489.
65. Lefter, R., et al., *A Descriptive Review on the Prevalence of Gastrointestinal Disturbances and Their Multiple Associations in Autism Spectrum Disorder*. Medicina (Kaunas), 2019. 56(1).
66. Nikolov, R.N., et al., *Gastrointestinal symptoms in a sample of children with pervasive developmental disorders*. J Autism Dev Disord, 2009. 39(3): p. 405-13.
67. Adams, J.B., et al., *Gastrointestinal flora and gastrointestinal status in children with autism--comparisons to typical children and correlation with autism severity*. BMC Gastroenterol, 2011. 11: p. 22.
68. Fattorusso, A., et al., *Autism Spectrum Disorders and the Gut Microbiota*. Nutrients, 2019. 11(3).
69. Ahmed, S.A., et al., *Study of the gut Microbiome Profile in Children with Autism Spectrum Disorder: a Single Tertiary Hospital Experience*. J Mol Neurosci, 2020. 70(6): p. 887-896.

70. Finegold, S.M., *Desulfovibrio species are potentially important in regressive autism*. Med Hypotheses, 2011. 77(2): p. 270-4.
71. Kang, D.W., et al., *Reduced incidence of Prevotella and other fermenters in intestinal microflora of autistic children*. PLoS One, 2013. 8(7): p. e68322.
72. Wang, L., et al., *Increased abundance of Sutterella spp. and Ruminococcus torques in feces of children with autism spectrum disorder*. Mol Autism, 2013. 4(1): p. 42.
73. Macfabe, D.F., *Short-chain fatty acid fermentation products of the gut microbiome: implications in autism spectrum disorders*. Microb Ecol Health Dis, 2012. 23.
74. Marler, S., et al., *Brief Report: Whole Blood Serotonin Levels and Gastrointestinal Symptoms in Autism Spectrum Disorder*. J Autism Dev Disord, 2016. 46(3): p. 1124-30.
75. Xiao, L., et al., *Fecal Microbiome Transplantation from Children with Autism Spectrum Disorder Modulates Tryptophan and Serotonergic Synapse Metabolism and Induces Altered Behaviors in Germ-Free Mice*. mSystems, 2021. 6(2).
76. Abdellatif, B., et al., *The Promising Role of Probiotics in Managing the Altered Gut in Autism Spectrum Disorders*. Int J Mol Sci, 2020. 21(11).
77. Zebrowska, P., I. Laczanska, and L. Laczanski, *Future Directions in Reducing Gastrointestinal Disorders in Children With ASD Using Fecal Microbiota Transplantation*. Front Cell Infect Microbiol, 2021. 11: p. 630052.
78. Bittker, S.S. and K.R. Bell, *Acetaminophen, antibiotics, ear infection, breastfeeding, vitamin D drops, and autism: an epidemiological study*. Neuropsychiatr Dis Treat, 2018. 14: p. 1399-1414.
79. Wimberley, T., et al., *Otitis media, antibiotics, and risk of autism spectrum disorder*. Autism Res, 2018. 11(10): p. 1432-1440.
80. Lukasik, J., et al., *Early Life Exposure to Antibiotics and Autism Spectrum Disorders: A Systematic Review*. J Autism Dev Disord, 2019. 49(9): p. 3866-3876.
81. Vinderola, G., M.E. Sanders, and S. Salminen, *The Concept of Postbiotics*. Foods, 2022. 11(8).
82. Needham, B.D., W. Tang, and W.L. Wu, *Searching for the gut microbial contributing factors to social behavior in rodent models of autism spectrum disorder*. Dev Neurobiol, 2018. 78(5): p. 474-499.
83. Langdon, A., N. Crook, and G. Dantas, *The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation*. Genome Med, 2016. 8(1): p. 39.
84. Pham, M., D.A. Lemberg, and A.S. Day, *Probiotics: sorting the evidence from the myths*. Med J Aust, 2008. 188(5): p. 304-8.
85. Williams, N.T., *Probiotics*. Am J Health Syst Pharm, 2010. 67(6): p. 449-58.
86. He, B.L., et al., *Bifidobacterium spp. as functional foods: A review of current status, challenges, and strategies*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023. 63(26): p. 8048-8065.
87. Kazmierczak-Siedlecka, K., et al., *Gut Microbiota Modulation in the Context of Immune-Related Aspects of Lactobacillus spp. and Bifidobacterium spp. in Gastrointestinal Cancers*. Nutrients, 2021. 13(8).
88. Kong, Y., et al., *The Potential of Lactobacillus spp. for Modulating Oxidative Stress in the Gastrointestinal Tract*. Antioxidants (Basel), 2020. 9(7).
89. Quaresma, M., et al., *Probiotic mixture containing Lactobacillus spp. and Bifidobacterium spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice*. Nutr Cancer, 2020. 72(8): p. 1355-1365.
90. Pandey, K.R., S.R. Naik, and B.V. Vakil, *Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review*. J Food Sci Technol, 2015. 52(12): p. 7577-87.
91. Umbrello, G. and S. Esposito, *Microbiota and neurologic diseases: potential effects of probiotics*. J Transl Med, 2016. 14(1): p. 298.
92. Childs, C.E., et al., *Gender differences in the n-3 fatty acid content of tissues*. Proc Nutr Soc, 2008. 67(1): p. 19-27.

93. Rustan, A.C. and C.A. Drevon, *Fatty acids: Structures and properties*. Encyclopedia of Life Sciences, 2005.
94. Zarate, R., et al., *Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health*. Clin Transl Med, 2017. 6(1): p. 25.
95. Rioux, V. and P. Legrand, *Saturated fatty acids: simple molecular structures with complex cellular functions*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2007. 10(6): p. 752-8.
96. Yaqoob, P., *Monounsaturated fatty acids and immune function*. Eur J Clin Nutr, 2002. 56 Suppl 3: p. S9-S13.
97. Kulkarni, A., et al., *Tissue-Specific Content of Polyunsaturated Fatty Acids in (n-3) Deficiency State of Rats*. Foods, 2022. 11(2).
98. Bhardwaj, S., S.J. Passi, and A. Misra, *Overview of trans fatty acids: biochemistry and health effects*. Diabetes Metab Syndr, 2011. 5(3): p. 161-4.
99. de Bus, I., et al., *The role of n-3 PUFA-derived fatty acid derivatives and their oxygenated metabolites in the modulation of inflammation*. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2019. 144: p. 106351.
100. Flock, M.R. and P.M. Kris-Etherton, *Diverse physiological effects of long-chain saturated fatty acids: implications for cardiovascular disease*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2013. 16(2): p. 133-40.
101. Nakamura, M.T., B.E. Yudell, and J.J. Loor, *Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids*. Prog Lipid Res, 2014. 53: p. 124-44.
102. Cunnane, S.C., et al., *Fish, docosahexaenoic acid and Alzheimer's disease*. Prog Lipid Res, 2009. 48(5): p. 239-56.
103. Legrand, P. and V. Rioux, *Specific roles of saturated fatty acids: Beyond epidemiological data*. European Journal of Lipid Science and Technology, 2015. 117(10): p. 1489-1499.
104. Ravaut, G., et al., *Monounsaturated Fatty Acids in Obesity-Related Inflammation*. Int J Mol Sci, 2020. 22(1).
105. Naqvi, A.Z., et al., *Monounsaturated, trans, and saturated Fatty acids and cognitive decline in women*. J Am Geriatr Soc, 2011. 59(5): p. 837-43.
106. Pipoyan, D., et al., *The Effect of Trans Fatty Acids on Human Health: Regulation and Consumption Patterns*. Foods, 2021. 10(10).
107. Stender, S. and J. Dyerberg, *Influence of trans fatty acids on health*. Ann Nutr Metab, 2004. 48(2): p. 61-6.
108. Kapoor, B., et al., *Dietary Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Uses and Potential Health Benefits*. Curr Nutr Rep, 2021. 10(3): p. 232-242.
109. Kerdiles, O., S. Layé, and F. Calon, *Omega-3 polyunsaturated fatty acids and brain health: Preclinical evidence for the prevention of neurodegenerative diseases*. Trends in Food Science & Technology, 2017. 69, Part B: p. 203-213.
110. Simopoulos, A.P., *An Increase in the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio Increases the Risk for Obesity*. Nutrients, 2016. 8(3): p. 128.
111. Laye, S., et al., *Anti-Inflammatory Effects of Omega-3 Fatty Acids in the Brain: Physiological Mechanisms and Relevance to Pharmacology*. Pharmacol Rev, 2018. 70(1): p. 12-38.
112. Schuchardt, J.P., et al., *Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children*. Eur J Pediatr, 2010. 169(2): p. 149-64.
113. Saini, R.K. and Y.S. Keum, *Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance - A review*. Life Sci, 2018. 203: p. 255-267.
114. van Elst, K., et al., *Chronic dietary changes in n-6/n-3 polyunsaturated fatty acid ratios cause developmental delay and reduce social interest in mice*. Eur Neuropsychopharmacol, 2019. 29(1): p. 16-31.
115. Fedorova, I. and N. Salem, Jr., *Omega-3 fatty acids and rodent behavior*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2006. 75(4-5): p. 271-89.

116. Ounnas, F., et al., *Whole Rye Consumption Improves Blood and Liver n-3 Fatty Acid Profile and Gut Microbiota Composition in Rats*. PLoS One, 2016. 11(2): p. e0148118.
117. Patterson, E., et al., *Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice*. Br J Nutr, 2014. 111(11): p. 1905-17.
118. Robertson, R.C., et al., *Maternal omega-3 fatty acids regulate offspring obesity through persistent modulation of gut microbiota*. Microbiome, 2018. 6(1): p. 95.
119. Yu, H.N., et al., *Effects of fish oil with a high content of n-3 polyunsaturated fatty acids on mouse gut microbiota*. Arch Med Res, 2014. 45(3): p. 195-202.
120. Caesar, R., et al., *Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling*. Cell Metab, 2015. 22(4): p. 658-68.
121. Wan, J., et al., *The impact of dietary sn-2 palmitic triacylglycerols in combination with docosahexaenoic acid or arachidonic acid on lipid metabolism and host faecal microbiota composition in Sprague Dawley rats*. Food Funct, 2017. 8(5): p. 1793-1802.
122. Fu, Y., et al., *Associations among Dietary Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids, the Gut Microbiota, and Intestinal Immunity*. Mediators Inflamm, 2021. 2021: p. 8879227.
123. Robertson, R.C., et al., *Deficiency of essential dietary n-3 PUFA disrupts the caecal microbiome and metabolome in mice*. Br J Nutr, 2017. 118(11): p. 959-970.
124. Shang, W., et al., *Characterization of fecal fat composition and gut derived fecal microbiota in high-fat diet fed rats following intervention with chito-oligosaccharide and resistant starch complexes*. Food Funct, 2017. 8(12): p. 4374-4383.
125. Baltić, B., et al., *Importance of medium chain fatty acids in animal nutrition*. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 2017. 85: p. 012048.
126. Zhao, L., et al., *Saturated long-chain fatty acid-producing bacteria contribute to enhanced colonic motility in rats*. Microbiome, 2018. 6(1): p. 107.
127. Zheng, C.J., et al., *Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids*. FEBS Lett, 2005. 579(23): p. 5157-62.
128. Holscher, H.D., *Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota*. Gut Microbes, 2017. 8(2): p. 172-184.
129. Peng, M. and D. Biswas, *Short chain and polyunsaturated fatty acids in host gut health and foodborne bacterial pathogen inhibition*. Crit Rev Food Sci Nutr, 2017. 57(18): p. 3987-4002.
130. Salvi, P.S. and R.A. Cowles, *Butyrate and the Intestinal Epithelium: Modulation of Proliferation and Inflammation in Homeostasis and Disease*. Cells, 2021. 10(7).
131. De Vadder, F., et al., *Microbiota-generated metabolites promote metabolic benefits via gut-brain neural circuits*. Cell, 2014. 156(1-2): p. 84-96.
132. Alexander, C., et al., *Perspective: Physiologic Importance of Short-Chain Fatty Acids from Nondigestible Carbohydrate Fermentation*. Adv Nutr, 2019. 10(4): p. 576-589.
133. Koh, A., et al., *From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites*. Cell, 2016. 165(6): p. 1332-1345.
134. Frost, G., et al., *The short-chain fatty acid acetate reduces appetite via a central homeostatic mechanism*. Nat Commun, 2014. 5: p. 3611.
135. Bourassa, M.W., et al., *Butyrate, neuroepigenetics and the gut microbiome: Can a high fiber diet improve brain health?* Neurosci Lett, 2016. 625: p. 56-63.
136. Gorissen, L., et al., *Production of conjugated linoleic acid and conjugated linolenic acid isomers by Bifidobacterium species*. Appl Microbiol Biotechnol, 2010. 87(6): p. 2257-66.
137. O'Shea, E.F., et al., *Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid*. Int J Food Microbiol, 2012. 152(3): p. 189-205.
138. Wall, R., et al., *Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues*. Am J Clin Nutr, 2009. 89(5): p. 1393-401.

139. Druart, C., et al., *Role of the lower and upper intestine in the production and absorption of gut microbiota-derived PUFA metabolites*. PLoS One, 2014. 9(1): p. e87560.
140. Field, C.J., et al., *Human health benefits of vaccenic acid*. Appl Physiol Nutr Metab, 2009. 34(5): p. 979-91.
141. Wall, R., et al., *Impact of administered bifidobacterium on murine host fatty acid composition*. Lipids, 2010. 45(5): p. 429-36.
142. Buitenhuis, B., et al., *Impact of the rumen microbiome on milk fatty acid composition of Holstein cattle*. Genet Sel Evol, 2019. 51(1): p. 23.
143. Hoban, A.E., et al., *Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat*. Neuroscience, 2016. 339: p. 463-477.
144. Buffalari, D.M., et al., *Nicotine Enhances Footshock- and Lithium Chloride-Conditioned Place Avoidance in Male Rats*. Nicotine Tob Res, 2016. 18(9): p. 1920-3.
145. Markram, K., et al., *Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism*. Neuropsychopharmacology, 2008. 33(4): p. 901-12.
146. Henbid, M.T., et al., *Sociability impairments in Genetic Absence Epilepsy Rats from Strasbourg: Reversal by the T-type calcium channel antagonist Z944*. Exp Neurol, 2017. 296: p. 16-22.
147. Wall, R., et al., *Contrasting effects of Bifidobacterium breve NCIMB 702258 and Bifidobacterium breve DPC 6330 on the composition of murine brain fatty acids and gut microbiota*. Am J Clin Nutr, 2012. 95(5): p. 1278-87.
148. Lopez-Lopez, A., A.I. Castellote-Bargallo, and M.C. Lopez-Sabater, *Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in infant feces*. Anal Biochem, 2000. 282(2): p. 250-5.
149. Bates, D., et al., *Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4*. Journal of Statistical Software, 2015. 67(1): p. 1-48.
150. Kuznetsova, A., P.B. Brockhoff, and R.H.B. Christensen, *lmerTest Package: Tests in Linear Mixed Effects Models*. Journal of Statistical Software, 2017. 82(13): p. 1-26.
151. Jimenez, J.A. and M.J. Zylka, *Controlling litter effects to enhance rigor and reproducibility with rodent models of neurodevelopmental disorders*. J Neurodev Disord, 2021. 13(1): p. 2.
152. Desbonnet, L., et al., *Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour*. Brain Behav Immun, 2015. 48: p. 165-73.
153. Leclercq, S., et al., *Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior*. Nat Commun, 2017. 8: p. 15062.
154. Ternák, G., *Antibiotic-modified Microbiome Might Be Responsible for Non-contagious World-wide Epidemics*. American Journal of Bioscience and Bioengineering, 2019. 7(2): p. 34-39.
155. Bercik, P. and S.M. Collins, *The effects of inflammation, infection and antibiotics on the microbiota-gut-brain axis*. Adv Exp Med Biol, 2014. 817: p. 279-89.
156. Hall, A.C., et al., *Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons*. Mol Cell Neurosci, 2002. 20(2): p. 257-70.
157. Kataoka, S., et al., *Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid*. Int J Neuropsychopharmacol, 2013. 16(1): p. 91-103.
158. Edalatmanesh, M.A., et al., *Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism*. Brain Res, 2013. 1526: p. 15-25.
159. Suez, J., et al., *Post-Antibiotic Gut Mucosal Microbiome Reconstitution Is Impaired by Probiotics and Improved by Autologous FMT*. Cell, 2018. 174(6): p. 1406-1423 e16.
160. Wang, T., et al., *Lactobacillus fermentum NS9 restores the antibiotic induced physiological and psychological abnormalities in rats*. Benef Microbes, 2015. 6(5): p. 707-17.

161. Le Morvan de Sequeira, C., et al., *Effect of Probiotics on Psychiatric Symptoms and Central Nervous System Functions in Human Health and Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis*. *Nutrients*, 2022. 14(3).
162. Navarro, F., Y. Liu, and J.M. Rhoads, *Can probiotics benefit children with autism spectrum disorders?* *World J Gastroenterol*, 2016. 22(46): p. 10093-10102.
163. Niu, M., et al., *Characterization of Intestinal Microbiota and Probiotics Treatment in Children With Autism Spectrum Disorders in China*. *Front Neurol*, 2019. 10: p. 1084.
164. Santocchi, E., et al., *Gut to brain interaction in Autism Spectrum Disorders: a randomized controlled trial on the role of probiotics on clinical, biochemical and neurophysiological parameters*. *BMC Psychiatry*, 2016. 16: p. 183.
165. Shaaban, S.Y., et al., *The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study*. *Nutr Neurosci*, 2018. 21(9): p. 676-681.
166. de Theije, C.G., et al., *Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders*. *Brain Behav Immun*, 2014. 37: p. 197-206.
167. Poolchanuan, P., et al., *An anticonvulsive drug, valproic acid (valproate), has effects on the biosynthesis of fatty acids and polyketides in microorganisms*. *Sci Rep*, 2020. 10(1): p. 9300.
168. Sunand, K., G. Krishna Mohan, and V. Bakshi, *Supplementation of Lactobacillus Probiotic Strains Supports Gut-Brain-Axis and Defends Autistic Deficits Occurred by Valproic Acid-Induced Prenatal Model of Autism*. *Pharmacognosy Journal*, 2020. 12(6): p. 1658-1669.
169. Dalile, B., et al., *The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication*. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019. 16(8): p. 461-478.
170. Roy, C.C., et al., *Short-chain fatty acids: ready for prime time?* *Nutr Clin Pract*, 2006. 21(4): p. 351-66.
171. Silva, Y.P., A. Bernardi, and R.L. Frozza, *The Role of Short-Chain Fatty Acids From Gut Microbiota in Gut-Brain Communication*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020. 11: p. 25.
172. Smith, P.M., et al., *The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis*. *Science*, 2013. 341(6145): p. 569-73.
173. Wong, J.M., et al., *Colonic health: fermentation and short chain fatty acids*. *J Clin Gastroenterol*, 2006. 40(3): p. 235-43.
174. Liu, S., et al., *Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder*. *Sci Rep*, 2019. 9(1): p. 287.
175. Wang, L., et al., *Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder*. *Dig Dis Sci*, 2012. 57(8): p. 2096-102.
176. MacFabe, D.F., *Enteric short-chain fatty acids: microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders*. *Microb Ecol Health Dis*, 2015. 26: p. 28177.
177. Dufour-Rainfray, D., et al., *Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: a model for autism*. *Neurosci Lett*, 2010. 470(1): p. 55-9.
178. O'Mahony, S.M., et al., *Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis*. *Behav Brain Res*, 2015. 277: p. 32-48.
179. Kennedy, P.J., et al., *Kynurenine pathway metabolism and the microbiota-gut-brain axis*. *Neuropharmacology*, 2017. 112(Pt B): p. 399-412.
180. Maqsood, R. and T.W. Stone, *The Gut-Brain Axis, BDNF, NMDA and CNS Disorders*. *Neurochem Res*, 2016. 41(11): p. 2819-2835.
181. de Theije, C.G., et al., *Intestinal inflammation in a murine model of autism spectrum disorders*. *Brain Behav Immun*, 2014. 37: p. 240-7.
182. Finlay, J.M., et al., *Effects of prefrontal cortex and hippocampal NMDA NR1-subunit deletion on complex cognitive and social behaviors*. *Brain Res*, 2015. 1600: p. 70-83.
183. Kang, D.W., et al., *Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study*. *Microbiome*, 2017. 5(1): p. 10.

184. Kuo, H.Y. and F.C. Liu, *Molecular Pathology and Pharmacological Treatment of Autism Spectrum Disorder-Like Phenotypes Using Rodent Models*. Front Cell Neurosci, 2018. 12: p. 422.
185. Yuen, E.Y., et al., *Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism*. J Neurosci, 2005. 25(23): p. 5488-501.
186. Gomaa, E.Z., *Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review*. Antonie Van Leeuwenhoek, 2020. 113(12): p. 2019-2040.
187. Lee, K.H., et al., *The gut microbiota, environmental factors, and links to the development of food allergy*. Clin Mol Allergy, 2020. 18: p. 5.
188. Kuziel, G.A. and S. Rakoff-Nahoum, *The gut microbiome*. Curr Biol, 2022. 32(6): p. R257-R264.
189. Trefflich, I., et al., *Short- and Branched-Chain Fatty Acids as Fecal Markers for Microbiota Activity in Vegans and Omnivores*. Nutrients, 2021. 13(6).
190. Choi, B.S., et al., *Feeding diversified protein sources exacerbates hepatic insulin resistance via increased gut microbial branched-chain fatty acids and mTORC1 signaling in obese mice*. Nat Commun, 2021. 12(1): p. 3377.
191. Albouery, M., et al., *Soluble Fiber Inulin Consumption Limits Alterations of the Gut Microbiota and Hepatic Fatty Acid Metabolism Caused by High-Fat Diet*. Nutrients, 2021. 13(3).
192. Di Rienzi, S.C., et al., *The microbiome affects liver sphingolipids and plasma fatty acids in a murine model of the Western diet based on soybean oil*. J Nutr Biochem, 2021. 97: p. 108808.
193. Xu, C., et al., *Multi-Omics Analysis Reveals a Dependent Relationship Between Rumen Bacteria and Diet of Grass- and Grain-Fed Yaks*. Front Microbiol, 2021. 12: p. 642959.
194. Zhang, D., et al., *Fecal Microbiota and Its Correlation With Fatty Acids and Free Amino Acids Metabolism in Piglets After a Lactobacillus Strain Oral Administration*. Front Microbiol, 2019. 10: p. 785.

X. Publikációs jegyzék

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Kovács A, László K, Bufa A, Marosvölgyi T, Kocsis B, Varga A, Vizvári Z, Cserjési R, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Novel probiotic treatment of autism spectrum disorder associated social behavioral symptoms in two rodent models. *Scientific reports* (2022) 12:5399 **IF:4.6; D1**

Marosvölgyi T*, **Mintál K***, Farkas N, Sipos Z, Makszin L, Szabó É, Tóth A, Kocsis B, Kovács K, Hormay E, Lénárd L, Karádi Z, Bufa A. Antibiotics and probiotics-induced effects on the total fatty acid composition of feces in a rat model. *Scientific reports* (2024) 14(1):6542 **IF: várhatóan: 3.8; Q1**

Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 8.4

Az értekezés alapjául szolgáló konferencia előadások, poszterek

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Kocsis B, László K, Bufa A, Marosvölgyi T, Cserjesi R, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. Autism spectrum disorder associated behavioral symptoms and their relationship with the gastrointestinal microbiome. 7th Hungarian Neuroscience Doctoral Conference for Undergraduate Students, Graduate Students and Junior Post-Docs (HUNDOC) (2024) p. 71

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Kocsis B, László K, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. Modifications of the gastrointestinal microbiome have crucial role in the control of social behavioural processes. MedPECS, Pécs (2023) 74 p. p. 46

Marosvölgyi T, **Mintál K**, Farkas N, Makszin L, Szabó E, Tóth A, Kocsis B, Karádi Z, Bufa A. Antibiotic-induced effects on the fatty acid composition of faeces in a rat model. 15th International ISSFAL Congress (2023) p. 269

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Kovács A, Varga A, Kocsis B, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z. Modifications of the gastrointestinal microbiome are intimately

involved in the control of behavioural processes. IBRO Workshop Budapest, (2022) 277 p. Paper: P7.01

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Bufa A, Marosvölgyi T, Kovács A, Kocsis B, Varga A, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. Gasztrointesztinális mikrobiom szerepe a magatartási folyamatokban. Tavaszi Szél Konferencia (2022) Budapest, 799 p. p. 699

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Bufa A, Marosvölgyi T, Kovács A, Kocsis B, Varga A, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. A gasztrointesztinális mikrobiom módosításának hatása a magatartási folyamatokra. EFOP-361-16-2016-00004 számú „Átfogó fejlesztések a Pécsi Tudományegyetemen az intelligens szakosodás megvalósítása érdekében” (2022)

Mintál K, Tóth A, Hormay E, Bufa A, Marosvölgyi T, Kovács A, Kocsis B, Varga A, Lénárd L, Karádi Z. Modifications of the gastrointestinal microbiome has huge impact on peripheral and central nervous processes. 8th Central European Congress on Obesity Virtual conference (2021) pp. 61.

Mintál K, Marosvölgyi T, Tóth A, Karádi Z, Bufa A. A gasztrointesztinális mikrobiom módosításának hatása a rövid szénláncú zsírsavak mennyiségére. METT25 a Magyar Elválasztástudományi Társaság jubileumi konferenciája Pécs, (2021) pp. 78. Paper: P-14

Mintál K, Tóth A, Kovács A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z. Modification of the gastrointestinal microbiota has huge impact on behavioral responses. IBRO Workshop (2020) Paper: 48

Mintál K, Tóth A, Kovács A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z. The gastrointestinal microbiome has crucial role in the control of behavioral processes. FENS Virtual Forum 2020

Mintál K, Kovács A, Tóth A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Lénárd L, Karádi Z. A gasztrointesztinális traktus mikroba flóra változásának magatartási folyamatokra gyakorolt hatása. Tavaszi Szél Konferencia, Debrecen, (2019) 742 p. pp. 557-557.

Mintál K, Kovács A, Tóth A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z. The effect of modifications of the gastrointestinal microbiota on behavioral processes. *MedPECS Pécs*, (2019) 87 p. p. 52, 1 p.

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó egyéb közlemények

Gyorfí N, Gal AR, Fincsur A, Kalmar-Nagy K, **Mintál K**, Hormay E, Miseta A, Tornoczky T, Nemeth AK, Bogner P, Kiss T, Helyes Zs, Sari Z, Klincsik M, Tadic V, Lenard L, Vereczkei A, Karadi Z, Vizvari Z, Toth A. Novel Noninvasive Paraclinical Study Method for Investigation of Liver Diseases. *Biomedicines* (2023) 11(9):2449 **IF:4.7; Q1**

Vörös D, Kiss O, Ollmann T, **Mintál K**, Péczely L, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, László BR, Berta B, Tóth A, Lénárd L, László K. Intraamygdaloid Oxytocin Increases Time Spent on Social Interaction in Valproate-Induced Autism Animal Model. *Biomedicines* (2023) 11(7):1802 **IF:4.7; Q1**

László K, Vörös D, Kiss O, László B, Ollmann T, Péczely L, **Mintál K**, Tóth A, Kovács A, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, Berta B, Karádi Z, Lénárd L. The Role of Intraamygdaloid Oxytocin and D2 Dopamine Receptors in Reinforcement in the Valproate-Induced Autism Rat Model. *Biomedicines* (2022) 10(9):2309 **IF: 4.7; Q1**

László K, Kiss O, Vörös D, **Mintál K**, Ollmann T, Péczely L, Kovács A, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, Laszló B, Hormay E, Berta B, Toth A, Karadi Z, Lenard L. Intraamygdaloid Oxytocin Reduces Anxiety in the Valproate-Induced Autism Rat Model. *Biomedicines* (2022) 10(2):405. **IF: 4.7; Q1**

László BR, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, Nagy B, László K, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Disturbance of taste reactivity and other behavioral alterations after bilateral interleukin-1 β microinjection into the cingulate cortex of the rat. *Behavioural Brain Research* (2020) 383:112537 **IF: 3.332; Q2**

Hormay E, László BR. Szabó I, Ollmann T, Nagy B, Péczely L, **Mintál K**, Karádi Z. The effect of loss of the glucose-monitoring neurons in the anterior cingulate cortex:

physiologic challenges induce complex feeding-metabolic alterations after local streptozotocin microinjection in rats. *Neuroscience Research* (2019) 149:50-60 **IF: 2.645; Q1**

Az értekezéshez szorosan nem kapcsolódó egyéb konferencia előadások, poszterek

Vörös D, Kiss O, Ollmann T, **Mintál K**, Péczely L, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, László B, Berta B, Tóth A, Lénárd L, László K. Effect of intraamygdaloid oxytocin on social interaction in valproate-induced autism model. International Neuroscience Conference, Pécs, (2024) 302 p. p. 237 Paper: P8.09

László K, Vörös D, Kiss O, László B, Ollmann T, Péczely L, **Mintál K**, Tóth A, Kovács A, Zagoracz O, Kertes E, Kállai V, Berta B, Karádi Z, Lénárd L. The intraamygdaloid oxytocin ameliorates some autistic-like symptoms in valproate-induced autism rodent model. International Neuroscience Conference, Pécs, (2024) 302 p. p. 20 Paper: S2.04

Hormay E, **Mintál K**, László BR, Szabó I, Tóth A, László K, Gyórfi N, Lénárd L, Karádi Z. Long term saccharose consumption associated activity of limbic forebrain glucose-monitoring neurons: A pilot study in the rat. International Neuroscience Conference, Pécs (2024) p. 129 Paper: P3.03

Hormay E, **Mintál K**, László RB, Szabó I, Tóth A, László K, Gyórfi N, Lénárd L, Karádi Z. Different aspects of the taste reactivity test to interpret gustatory responses elicited organismic changes. 7th Hungarian Neuroscience Doctoral Conference for Undergraduate Students, Graduate Students and Junior Post-Docs (HUNDOC) (2024) p. 48 Paper: 35

Hormay E, **Mintál K**, László B, Szabó I, Tóth A, László K, Gyórfi N, Karádi Z. The complex relationship of glucose and neural activity in the light of limbic forebrain glucose-monitoring neurons. MedPECS, Pécs (2023) 74 p. p. 51

Vizvári Z, Gyórfi N, **Mintál K**, Karádi Z, Tóth A, Sári Z, Odry P, Eigner Gy, Kovács L, Léner V, Hámori L, Füredi A. Non-invazív, bioimpedancia alapú mérőeszköz fejlesztése primer daganat kimutatására. Orvosbiológiai kérdések - multidiszciplináris,

bioimpedancia alapú válaszok: A PTE Anyagcserezabályozás és Bioimpedancia Kutatócsoport publikáció gyűjteménye, konferenciakötet, Pécs, (2022) pp. 49-58.

Mintál K, Vizvári Z, Hormay E, Kovács A, Bufa A, Marosvölgyi T, Lénárd L, Karádi Z, Tóth A. A gasztrointesztinális mikrobiom jelentős lecsökkentése testösszetétel módosítása nélkül indukál viselkedési változásokat. Orvosbiológiai kérdések - multidiszciplináris, bioimpedancia alapú válaszok: A PTE Anyagcserezabályozás és Bioimpedancia Kutatócsoport publikáció gyűjteménye, konferenciakötet Pécs, (2022) pp. 95-101.

Laszlo K, Kiss O, Voros D, **Mintal K**, Ollmann O, Peczely L, Kovacs A, Zagoracz O, Kertes E, Kallai V, Laszlo B, Berta B, Toth A, Karadi Z, Lenard L. Behavioural effects of intraamygdaloid oxytocin in valproate induced autism rat model
IBRO Workshop Budapest, (2022) 277 p. Paper: P7.03

László B, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, László K, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Effects of interleukin-1b microinjection in the anterior cingulate cortex of the rat. IBRO Workshop Budapest, (2022) 799 p. p. 717

Hormay E, **Mintál K**, László B, Szabó I, Tóth A, Karádi Z. Előagyi glukóz-monitorozó neuronok sokrétű működési sajátosságai. XXV. Tavaszi Szél Konferencia 2022. Budapest, (2022) 799 p. p. 717

Hormay E, **Mintál K**, László B, Tóth A, Karádi Z. Előagyi glukóz-monitorozó neuronok hosszútávú cukorfogyasztás után. EFOP-361-16-2016-00004 számú „Átfogó fejlesztések a Pécsi Tudományegyetemen az intelligens szakosodás megvalósítása érdekében” (2022)

László, BR, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, László K, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Cinguláris kérgi interleukin-1 β mikroinjekció metabolikus és magatartási hatásai patkányban. EFOP-361-16-2016-00004 számú „Átfogó fejlesztések a Pécsi Tudományegyetemen az intelligens szakosodás megvalósítása érdekében” (2022)

Mintal K, Vizvári Z, Hormay E, Kovacs A, Bufa A, Marosvolgyi T, Lenard L, Karadi Z, Toth A. Gastrointestinal microbiome depletion modifies behavioral processes without

changing body composition. 15th International Symposium on Applied Computational Intelligence and Informatics (SACI), Budapest (2021) pp. 000119-000122. 4p

Hormay E, László B, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. The role of limbic forebrain glucose monitoring neurons in the body weight regulation. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences (2021) Pécs, 128 p. pp. 105-105.

Hormay E, **Mintál K**, László B, Szabó I, Tóth A, Karádi Z Characteristic complex nature of the forebrain glucose-monitoring neurons. 8th Central European Congress on Obesity Virtual conference (2021) pp. 59-60.

László BR, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, László K, Péczely L, Ollmann T, Lénárd L, Karádi Z. Behavioral alterations after bilateral microinjection of interleukin-1 β into the cingulate cortex of the rat. IBRO Workshop (2020) Paper: 47

Mintál K, Tóth A, Kovács A, Hormay E, Varga A, Kocsis B, Vizvári Z, Lénárd L, Karádi Z. Gastrointestinal microbiome changes directly connect to the control of behavioral processes which could be verified by means of a new bioimpedance measurement. Engineering in Medicine & Biology Society International Student Conference: EMBS ICS (2020)

Hormay E, Csetényi B, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. The role of limbic forebrain glucose monitoring neurons in the body weight regulation. Medical Conference for PhD Students and Experts of Clinical Sciences Pécs (2020) 83 p. pp. 58-58. 1 p.

Mintál K. A gasztrointesztinális traktus mikroba flórájának Parkinson-kórban és kognitív működésekben betöltött szerepe. Grastyán konferencia, Pécs, 2019

Hormay E, László B, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. Glucose-monitoring neurons in the cingulate cortex of the rat. – Microelectrophysiological study. 16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, (2019) p. 19

László B, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, Karádi, Z. Taste reactivity alterations after interleukin-1 β microinjection into the cingulate cortex of the rat. 16th Meeting of the Hungarian Neuroscience Society, (2019) p. 55

Tóth A, Vízvári Z, Gál AR, Kovács A, **Mintál K**, Klincsik M, Sári Z, Odry P, Vereczkei A, Kalmár Nagy K, Bajnok L, Gergics M, Németh A, Bogner P, Fincsur A, Miseta A, Lénárd L, Karádi Z. A nem alkohol eredetű zsírmáj bioimpedancia alapú diagnosztikai módszer kifejlesztését célzó összehasonlító klinikai vizsgálata. Magyar Anatómus Társaság Budapest, (2019) p. 105

Csetényi B, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. Az interleukin-1 β íz-percepciót módosító hatása patkány cinguláris kérgében. Budapest, Magyarország: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ) (2018) 519 p. p. 403 , 1 p.

Csetényi B, Hormay E, Szabó I, **Mintál K**, Karádi Z. Íz-reaktivitás változások patkány cinguláris kérgébe adott interleukin-1 β hatására. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, (2018) Paper: P1.44

Gál AR, Tóth A, Vízvári Z, Kovács A, **Mintál K**, Klincsik M, Sári Z, Odry P, Vereczkei A, Kiss T, Fincsur A, Miseta A, Lénárd L, Karádi Z. A nem alkohol eredetű zsírmáj új típusú diagnosztikai módszer kifejlesztését célzó összehasonlító vizsgálata patkányban. *Obesitologia Hungarica* (2018) 17:1 pp. 18-19

Tóth A, Vízvári Z, Gál RA, Kovács A, **Mintál K**, Klincsik M, Sári Z, Odry P, Vereczkei A, Lénárd L, Karádi Z. A máj zsírosodásának mérése új típusú non-invazív bioimpedancia mérőeszközzel. Magyar Élettani Társaság Vándorgyűlése, Szeged, (2018) Paper: P2.30

Tóth A, Vízvári Z, Gál RA, Kovács A, **Mintál K**, Klincsik M, Sári Z, Odry P, Vereczkei A, Németh AA, Fincsur A, Miseta A, Lénárd L, Karádi Z. A nem alkohol eredetű zsírmáj új típusú diagnosztikai módszer kifejlesztését célzó összehasonlító klinikai vizsgálata (vegyes beteganyagon). *Obesitologia Hungarica* (2018) 17:1 p. 19

Tóth A, Amiri Z, Vízvári Z, Karádi K, **Mintál K**, Lénárd L, Karádi Z, Cserjési R. Prebiotikum mediálta figyelmi válasz változás, egészséges humán populációban. A Magyar Élettani Társaság és a Magyar Mikrocirkulációs és Vaszkuláris Biológiai Társaság közös Vándorgyűlése, Debrecen, 2017

Tóth A, Amiri Z, Vízvári Z, **Mintál K**, Lénárd L, Karádi Z, Cserjési R. Prebiotic-mediated changes in the attention in healthy human population. IBNS; Hiroshima, 2017

Az értekezés alapját képező közlemények összesített impakt faktora: 8.4

A publikációk összesített impakt faktora: 33.177

Független citáció: 30

Hirsch index: 3



OPEN

Novel probiotic treatment of autism spectrum disorder associated social behavioral symptoms in two rodent models

Kitti Mintál^{1,2✉}, Attila Tóth^{1,2}, Edina Hormay^{1,2}, Anita Kovács¹, Kristóf László¹, Anita Bufa³, Tamás Marosvölgyi³, Béla Kocsis⁴, Adorján Varga⁴, Zoltán Vizvári^{2,5}, Renáta Cserjési⁶, László Péczely¹, Tamás Ollmann¹, László Lénárd^{1,2} & Zoltán Karádi^{1,2}

The prevalence of autism spectrum disorder (ASD) has rapidly increased in the past decades, and several studies report about the escalating use of antibiotics and the consequent disruption of the gastrointestinal microbiome leading to the development of neurobehavioral symptoms resembling to those of ASD. The primary purpose of this study was to investigate whether depletion of the gastrointestinal microbiome via antibiotics treatment could induce ASD-like behavioral symptoms in adulthood. To reliably evaluate that, validated valproic acid (VPA) ASD animal model was introduced. At last, we intended to demonstrate the assessed potential benefits of a probiotic mixture (PM) developed by our research team. Male Wistar rats were used to create antibiotics treated; antibiotics and PM treated; PM treated, VPA treated; VPA and PM treated; and control groups. In all investigations we focused on social behavioral disturbances. Antibiotics-induced microbiome alterations during adulthood triggered severe deficits in social behavior similar to those observed in the VPA model. Furthermore, it is highlighted that our PM proved to attenuate both the antibiotics- and the VPA-generated antisocial behavioral symptoms. The present findings underline potential capacity of our PM to improve social behavioral alterations thus, indicate its promising therapeutic power to attenuate the social-affective disturbances of ASD.

Autism spectrum disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental disorder characterized by impaired social interactions and communication along with the presence of disturbances of repetitive stereotyped behaviors^{1,2}. Eventually, difficulties with social interactions have been supposed to be the major deficits and these most severe symptoms of the disorder persist across the lifespan^{3–6}. Therefore, one of the key elements of the therapeutic approaches is the development and evaluation of interventions to strengthen the social skills of the patients⁶. The current solutions are limited to social skills training techniques and programs or using human-like robot technologies^{7,8}. However, despite all these strategies, there are no recognized pharmacological treatments to cure the core features of ASD. Nevertheless, there are studies where sulforaphane, oxytocin or arginine-vasopressin treatments were able to improve the general condition of patients^{9–11}. Along with these developments valid animal models are required to test the new therapeutic strategies aiming to improve the core features of ASD. These models also proved to be useful to examine the morphological effects of specific causal factors on characteristic neuropathology of the condition¹². There are two main types of animal models for modelling the pathological features of ASD: genetically- and environmentally induced animal models^{13,14}. The use of genetic manipulations could be helpful to elucidate mechanisms related to the genetic etiology and the pathogenesis of ASD. Animal models for ASD induced by environmental factors (include prenatal infection, valproic acid, propionic acid, poly (I:C) or lipopolysaccharides exposure) can result in a behavioral phenotype reminiscent of ASD, with specific impairments in social interaction, communication and repetitive behaviors^{13–17}. The valproic acid (VPA) animal

¹Institute of Physiology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. ²Cellular Bioimpedance Research Group, Szentágothai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary. ³Institute of Bioanalysis, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. ⁴Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary. ⁵Department of Environmental Engineering, Faculty of Engineering and Information Technology, University of Pécs, Pécs, Hungary. ⁶Institute of Psychology, ELTE Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary. ✉email: kitti.mintal@aok.pte.hu

model is one of the most frequently studied rodent models of ASD in which a single prenatal exposure to VPA in rodents results in lifelong behavioral disturbances and differentially alters morphological parameters of hippocampal regions^{18–21}. This ASD animal model appears to possess all elements of a relevant and capable model, namely, face, construct, and predictive validity, and, therefore, it can represent an important strategic tool for developing novel therapeutic approaches^{18,22,23}.

Epidemiological studies have reported a gradual increase of the prevalence of ASD in the last decades²⁴. This continuous rise is suggested to appear due to the increasing contamination by environmental factors such as toxins, heavy metals, chemicals, maternal infection, various pathogens, and, recently the escalating use of antibiotics has also been proposed as a causal factor^{25–29}. Investigations over the last few years suggested that broad-spectrum antibiotics exposure slightly increases the risk of autism in early childhood^{30,31}, however, the currently available research data pool does not substantiate the notion that either the pre- or post-natal antibiotics exposure is really one of the risk factors for ASD²⁷. Nevertheless, broad-spectrum antibiotics treatments in animal studies can provide another useful way to examine the relationship between the effects of environmental factors, such as antibiotics exposure, and the multiple symptomatology of ASD²⁷. Furthermore, it has also been demonstrated that the antibiotics induced manipulation of complex composition of the intestinal microbiota can ultimately affect brain functions leading to behavioral alterations, through the microbiome–gut–brain axis^{27,31–33}. Certain antibiotics, their definite dosages, during assigned perinatal stages appear to affect social behavior³³. In adulthood, the effect of antibiotics treatment on social behavior is less studied, but still there are some investigations that provided evidence for that the usage of antibiotics can elicit behavioral changes^{33,34}. The employment of probiotics and prebiotics also modulates the composition of the gastrointestinal (GI) microbiome, and recently, probiotics are not only utilized to just reduce unwanted aftereffects following the antibiotics treatments³⁵, but some beneficial microbe types are also applied to improve several peripherally and/or centrally controlled functions. It is worth noting that such medications are successfully used to improve symptoms of several neurobiologically determined disorder-like conditions, psychiatric disorders, depression, etc.^{36,37}. For instance *Lactobacillus*- and *Bifidobacterium* species, which are part of the native microbiota, have beneficial health properties as they could reduce oxidative stress and possess anti-inflammatory characteristics, further they are able to repair gastrointestinal barrier functions, manage to modify several neurotransmitters- and cytokines levels and they could modulate various signaling pathways^{38–42}. Furthermore, short chain fatty acids (SCFAs), the main microbiome metabolites, produced by bacterial fermentation, can directly or indirectly affect microbiome–gut–brain axis and their dose might be critical in determining the effects on behavioral and psychophysiological processes⁴³. For all that, the use of antibiotics and distinct probiotics with well-defined characteristics can modulate the gut microbiota, thus, provide us a tool to examine the relationship between ASD associated symptoms and the functioning of microbiome–gut–brain axis.

The present study aimed to investigate whether chronic antibiotics treatment in adult rats could cause social behavioral abnormalities similar to those described in the ASD. Accordingly, we adapted the VPA animal model of ASD to evaluate and compare this disorder associated characteristic social behavioral phenomena in adulthood. Another further goal of this study was to treat the rats having antibiotics-induced behavioral abnormalities by a probiotic mixture (PM) designed by our research team. Our assumption was that the PM could reduce the pathological behavioral patterns through the beneficial changes induced in the GI microbiome which could be a possible new therapeutic approach to cure social behavioral symptoms.

Methods

Animals. In the present study, in total, 60 male Wistar laboratory rats (antibiotics treated groups 40, valproic acid treated groups 20) were used (10 weeks old at start of treatments). All animal experiments were conducted according to federal and local ethical guidelines, and the protocols were approved by the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary (BA02/2000–15/2020 and BA02/2000–16/2020, Pécs University, Medical School; Hungarian Government Decree, 40/2013. (II. 14.); NIH Guidelines, 1997; European Community Council Directive 86/609/EEC 1986, 2006; European Directive 2010/63/EU of the European Parliament). The present study is reported in accordance with ARRIVE guidelines. The animals were kept individually in a light and temperature-controlled room (12:12 h light–dark cycle; 21 ± 2 °C; humidity 55–60%). To exclude sex as an additional independent variable, only male rats were used in this study. All experimental groups received ad libitum the same laboratory food pellets (LT/R standard rodent food pellet, Innovo Kft, Isaszeg, Hungary) and tap water.

Treatments of the antibiotics groups. Animals have been divided randomly (one or two rats/ litter/ group) into four groups: 1. Control group (control); 2. Antibiotics treated group (ABx); 3. Antibiotics and probiotic treated group (ABx + probiotic); 4. Probiotic treated group (probiotic) (Fig. 1). To effectively deplete the gut microbiota the rats of the antibiotics treated groups received broad-spectrum antibiotics mixture for 4 weeks in adult animals (10 weeks old at the start of treatment). The antibiotics cocktail was dissolved in their drinking water to avoid any chronic stress-induced adverse effects. The antibiotics mixture was chosen based on published protocols³⁴, consisted of ampicillin (1 g/l), vancomycin (500 mg/l), ciprofloxacin HCl (20 mg/l), imipenem (250 mg/l) and metronidazole (1 g/l). This antibiotics cocktail was replaced by freshly made cocktail every 3 days. Probiotic treated and control animals received tap water in the absence of any antibiotics which was also changed every 3 days. (Pilot experiment was conducted (n = 8) to exclude possible behavior changes due to antibiotics-induced intestinal discomfort or pain, detailed in the Supplementary Information; Supplementary Table S1) After this antibiotics exposure in the ABx + probiotic group, and the probiotic group were given our PM of specified cfu/d (colony forming units/day), oral gavage every day for 2 weeks. Throughout the whole experiment water and food consumption were measured every day and the animals' weights were measured

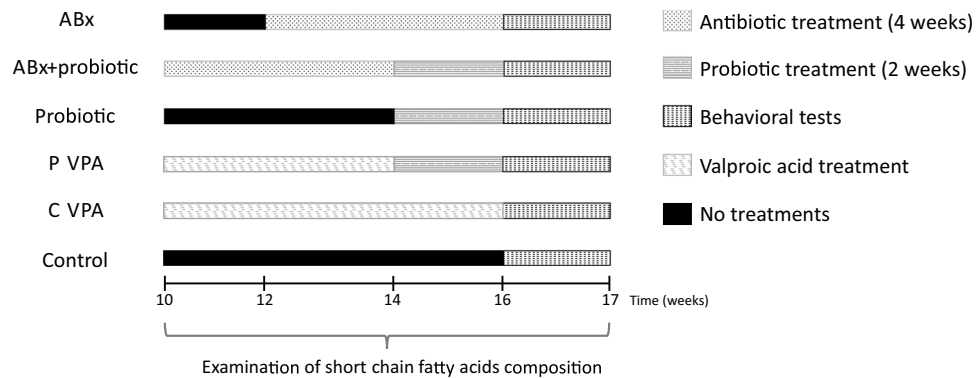


Figure 1. Experimental arrangement of the treatments. Experimental treatments for the groups including demonstration of time and duration of antibiotics and probiotic treatments and those of behavioral testing. ABx: broad-spectrum antibiotics treated group, ABx + probiotic: broad-spectrum antibiotics- and probiotic treated group, Probiotic: probiotic treated group, P-VPA: valproic acid and probiotic treated group, C-VPA: valproic acid treated group, Control: control group without any treatment.

every 3 days. Fresh faecal pellets were collected every week for monitoring the alterations of the SCFAs. Behavioral tests started after the treatments.

Treatment with the probiotic mixture. Our specific PM contained four beneficial bacterial species (*Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.) and this PM is a know-how under the license of the University of Pécs. The origin of the strains was Leibnitz, institut DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH Deutschland. After we received the strains in freeze-dried form we started to cultivate them following the protocol sent by the DSMZ firm. After successful cultivation we checked the strains with different biochemical methods among them MALDI-TOF. After identification we stocked the strains in glycerol preservative fluid at -80°C . Before cultivation for experiments we reactivated the strains from -80°C on optimal media at presence or absence oxygen depending on whether the bacterium was aerobic or anaerobic. *Lactobacillus* spp. strains were cultivated in 100–100 mL liquid Rogosa medium (OXOID Ltd. UK) for 2 nights at 37°C in a shaker incubator at 200 rpm. The *Bifidobacterium* spp. were cultivated on fastidious anaerobic agar CE plates and broth (Neogen Europe Ltd. UK). First, the strains were cultivated on plates. Anaerobic conditions were produced in anaerobic jar with GENbag anaer (BioMérieux SA France). After 2 days cultivation the colonies from plate were inoculated into 100–100 mL anaerobic broth. After 2 days cultivation both the aerobic (for *Lactobacillus*) and anaerobic (for *Bifidobacterium*) fluids were centrifuged at 4°C with 5000 rpm for 5 min. The sediments were resuspended in physiological saline solution (0.9% sodium chloride). We mixed the suspensions of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains and filled with physiological saline solution till 10 mL final volume. This 10 mL mixture was used in experiment for 10 mice. This mixture was produced from day to day and used immediately. From time to time we checked the sediment before we mixed them for the number and identity of bacteria. In this checking process we used double dilution method and MALD-TOF.

Treatments of the valproic acid groups. The valproic acid animal model has been generated as previously described⁴⁴. Male and female Wistar rats were mated one overnight, and the morning when a vaginal plug was found was designated as the first day of gestation. Pregnant female rats received a single intraperitoneal injection of 500 mg/bwkg valproate (Sigma-Aldrich; P4543) dissolved in physiological saline at a concentration of 250 mg/mL on the 12.5th day of gestation, and control females were injected with physiological saline at the same time. Valproate-treated females were healthy individuals and the number of animals per litter was approximately 25% lower in VPA compared to control dams. Females were housed individually and were allowed to raise their own litters. Male offsprings, when reached 8 weeks, for the groups separated and randomly selected from each litter and they were kept individually throughout the experiment. These animals have been divided randomly (one or two rats/ litter/group) into two groups: probiotic treated valproate group (P-VPA); 2. control valproate group (C-VPA) (Fig. 1). The P-VPA group were given the above described PM every day for 2 weeks. Water and food consumption were measured every day and the animals' weights were measured every 3 days during the experimental period. Fresh faecal pellets were collected every week. Behavioral tests were conducted in the same sequence in every group of animals. All 60 animals ($n=10/\text{group}$) completed each behavioral test and their accompanying tissue samples were used for further analyses.

Three chambered social interaction test. A three chambered social interaction task was used to assess social behavior. The protocol was adapted from a previously published article⁴⁵. The apparatus ($150 \times 40 \times 40$ cm) was divided into three chambers: the nonsocial zone (60×40 cm), the social zone (60×40 cm) and the centre (30×40 cm). The non-social and the social zone contained small circular wire cages with a diameter of 18 cm. The testing arena was cleaned with 1% Incidin after each testing trials. Before the sociability task experimental rats immediately were given a habituation session. They were placed into the centre of the apparatus, where they

were allowed to explore it for 10 min. Right away this habituation session test animals were locked in the centre zone for 3 min, while a stranger rat of the same strain and sex was placed into one of the two rat cages in the side chambers. Therefore, one of the side chambers which contained a stranger rat would be the social zone and the other chamber, where the cage remained empty would be the non-social zone. Test animals had no previous interaction with stranger animals for this task and the placement of the stranger rat was randomized and counterbalanced. Following this 3 min centre zone locking, animals were provided 10 min to freely explore the whole apparatus. The entire experimental period was recorded and analyzed by recorded camera shots processed by Noldus EthoVison System (Noldus Information Technology, The Netherlands). We measured the total distance moved, time spent in the side chambers, and during the sociability task latencies to first entry to the side chambers were also determined. Furthermore, direct interactions with either the stranger rat- or empty cages were counted. All types of exploratory behavior were noted, and the sociability index (time spent in the social zone – time spent in the non-social zone)/(time spent in the social zone + time spent in the non-social zone) was also used to indicate a preference to interact with or avoid the stranger rat.

Short chain fatty acids analysis. We used the protocol of Wall et al.⁴⁶ with modification on the internal standard to measure SCFAs. 100 mg of faecal samples were weighted out and vortex-mixed with 1 ml of distilled water. After standing for 10 min at room temperature, 100 µl (2 mmol/l) Heptanoic acid (Sigma-Aldrich; 43858) as an internal standard was added to them and the samples were centrifuged at 10,000 rpm for 5 min. Then supernatant fluids were collected and filtered before being transferred to the vials. Standard solutions containing 10 mmol/l, 7.5 mmol/l, 5 mmol/l, 2.5 mmol/l and 0.5 mmol/l of acetic acid (Sigma-Aldrich; A6283), propionic acid (Sigma-Aldrich; 94425) and butyric acid (Sigma-Aldrich; 19215), respectively, were used for calibration. The concentration of SCFAs analyses were carried out on an Agilent 6890 N gas chromatograph with a 5975 mass spectrometer detector (Agilent, Santa Clara, CA, USA) fitted with a HP-INNOWAX column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm; Agilent). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.5 ml/min. The initial oven temperature was 80 °C held for 1 min and ramped up to 200 °C at 20 °C/min and held for 2 min. The injection port was adjusted at 250 °C and split injection mode was used, the injection ratio was 20:1. The injection volume was 1 µl. The interface temperature was maintained at 250 °C, the source temperature and the quadrupole mass analyzer temperature were set at 230 °C and 150 °C. The solvent delay was 3 min. The mass spectrometer was operated at 70 eV in the electron impact (EI) mode and the scanned mass range was 50–300 amu.

Histology. At the end of behavioral experiments animals were euthanized and transcardially perfused with physiological saline followed by 4% formalin solution. The brains of 6 animals/groups were fixed in 4% formalin, afterwards they were cut into 40 µm sections containing the hippocampus. The sections were stained using Cresyl Violet staining. Briefly, they were immersed in 70 and 50% ethanol and double distilled water for 5 min. The slides were then stained for 7 min in 0.5% cresyl violet solution, and then briefly rinsed in distilled water. They were then dehydrated in 70% ethanol with 10 drops of 100% acetic acid, 70, 90, double 90% ethanol, double 1-propanol for 1 min each. The slices were placed in 1:1 mixed 1-propanol and xylene for 5 min and then in xylene for overnight and then coverslipped. The open-source image-processing software package ImageJ (NIH) was used for image analysis. The diameter of the hippocampal regions (subiculum, CA1, CA2, CA3, dentate gyrus) of the selected section (bregma –3.6 to 3.8 mm) were measured.

Statistics. In the three chamber social interaction test the stranger- and empty cage latency, interactions with the stranger rat and the social index did not pass through normality- and homogeneity test, in these cases non-parametric Kruskal–Wallis test was used to analyze group differences between C-VPA, P-VPA, control, ABx, ABx + probiotic and probiotic treated groups, and if a difference was found to be significant, pair-wise comparison was done using the Mann–Whitney *U*-test. Data were presented as median (interquartile range [IQR]). For the other comparisons in the three chamber social interaction test, body weight, food- and water consumptions among the groups parametric one-way ANOVA was used and Post-hoc group mean comparisons were conducted using Tukey's post hoc test. All of these data were presented as mean ± standard error of the mean (SEM). The analysis of the SCFAs within the groups was completed by Friedman test, and to assess differences in before- and after treatment outcomes between groups were used Kruskal–Wallis test, the results were demonstrated as median (IQR). The data of histological measurements did not have normal distribution, therefore, Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney *U*-test were conducted. To remove the influence of litter effects we applied one animal per litter to the groups, although there were some situations where more than one animal per litter was used, in those circumstances their values were averaged⁴⁷. Significance was denoted with selection of a *p* value of < 0.05. Statistical analyses were conducted using the statistical software package (IBM SPSS Statistics 22).

Results

Body weight comparisons, food and water consumptions. Prenatal valproic acid treatment, antibiotics and/or probiotic administration had no significant effect on body weight change compared to the control group (Supplementary Fig. S1). Some of the animals receiving antibiotics had significantly decreased food- and water consumptions during the first period of antibiotics treatment, however, after this first one week period, food and water intakes of the animals were normalized and the treatments did not affect the consumptions (Supplementary Fig. S1).

Effects of antibiotics- or valproic acid treatment on social behavior. Latency to the first exploration of both the stranger rat and empty cage were analyzed. Although the treatment effects on latency to explore

3 Chamber social interaction test	ABx n = 8	ABx + probiotic n = 8	Probiotic n = 8	P-VPA n = 7	C-VPA n = 7	Control n = 8
Stranger cage latency (s)	23.00 (10.38–154.13)	19.00 (8.50–77.25)	16.00 (4.88–45.25)	7.00 (5.00–14.75)	40.50 (2.00–103.00)	17.00 (4.75–27.75)
Empty cage latency (s)	4.75 (3.00–13.50)	19.50 (2.00–70.88)	150.25 (68.13–294.00)	46.00 (4.50–217.00)	51.00 (18.50–60.00)	36.00 (4.88–86.88)
Sociability index	-0.48 (-0.63–0.10) ^{abcd}	0.74 (0.54–0.88) ^{ac}	0.45 (0.31–0.63) ^{bf}	0.79 (0.51–0.81) ^{es}	-0.19 (-0.47–0.24) ^{efgh}	0.69 (0.26–0.75) ^{dh}
Social zone exploration frequency	24.50 ± 5.74	55.88 ± 9.37	24.81 ± 6.98	43.71 ± 9.73	30.79 ± 8.55	40.44 ± 6.91
Non-social zone exploration frequency	39.94 ± 11.36	17.13 ± 4.10	20.44 ± 6.99	12.21 ± 3.18	27.21 ± 6.22	18.19 ± 3.41
Total distance moved (cm)	2104.82 ± 268.13	2536.27 ± 156.76	2856.05 ± 637.81	2134.07 ± 165.78	2077.91 ± 214.07	2839.09 ± 273.11
No. of rearing behavior	13.38 ± 2.60	17.06 ± 3.02	15.38 ± 3.02	18.57 ± 3.59	15.14 ± 3.98	19.31 ± 3.07
No. of grooming behavior	5.94 ± 1.44	6.13 ± 1.13	4.25 ± 0.94	8.07 ± 2.62	8.50 ± 1.46	8.88 ± 1.72

Table 1. Three chamber social interaction test. ABx: broad-spectrum antibiotics treated group, ABx + probiotic: broad-spectrum antibiotics- and probiotic treated group, Probiotic: probiotic treated group, P-VPA: valproic acid and probiotic treated group, C-VPA: valproic acid treated group, Control: control group. Values of the stranger cage latency, the empty cage latency and sociability index are median (IQR) and the social- and non-social zone exploration frequency, total distance moved values, number of rearing behavior and number of grooming behavior are means and SEMs. One-way ANOVA, Kruskal–Wallis test and Mann–Whitney U-test. Between the groups significances ($p < 0.05$) are represented by distinct (a–h) lowercase letters.

the social zone were non-significant, probiotic treated rats show a tendency to explore later the zone of the empty cage (Table 1).

The total time spent exploring the stranger rat or empty cage was also analyzed (Fig. 2). C-VPA animals spent significantly less time in the social zone ($p = 0.013$) and more time in the non-social zone ($p = 0.046$). Similar to this group, antibiotics treated animals exploring either the stranger ($p = 0.006$) or empty cage ($p = 0.005$) were significantly different from members of the other groups. While compared to the habituation session each group spent balanced time in the social- and in the non-social zone (data not shown).

The sociability index was also estimated to indicate a preference to the stranger rat. This index for the ABx and the C-VPA rats was significantly lower than for the animals of the other groups ($p = 0.022$): it reduced by approximately 70%, compared to the other groups (Table 1).

Analysis of the exploration frequency in the social- or non-social zone of the groups did not show significant differences (Table 1). Interactions with stranger animal and empty cage were overall calculated (Fig. 3). We did not find any difference among the groups in the empty cage interaction, however, compared to individuals of the control groups, significantly less interactions were observed with the stranger rat in the ABx ($p = 0.002$) and C-VPA animals ($p = 0.050$), moreover, ABx rats differed from the ABx + probiotic ($p = 0.025$), probiotic ($p = 0.003$) and P-VPA ($p = 0.010$) rats, too.

The total distance travelled did not show significant differences among the groups (Table 1). Furthermore, we also evaluated calculated stereotype behaviors, the results showing no significant differences in the examined rearing and grooming behaviors (Table 1).

Concentration of the short chain fatty acids in relation to the treatments. Concentrations of the SCFAs were analyzed in all groups before, during and after the treatments. Median (IQR) values of the concentrations of the SCFAs are given in Table 2. Significant differences were observed in all the three measured fatty acid concentration after the antibiotics treatment. Antibiotics significantly reduced SCFAs concentrations compared with the C-VPA ($p = 0.001$), P-VPA ($p = 0.042$), ABx + probiotic ($p = 0.013$), probiotic ($p = 0.002$) and control ($p = 0.025$) groups (Table 2). Additionally, acetic acid ($p = 0.001$), butyric acid ($p = 0.001$) and propionic acid ($p = 0.001$) concentrations were also diminished within the ABx group (Fig. 4). Associated to the probiotic treatment, SCFAs concentrations did not change significantly in case of the majority of groups (Table 2). However, for the ABx + probiotic treated animals, significant decrease ($p = 0.001$) was identified after the usage of antibiotics. It is worth noting that the probiotic treatment was able to restore this decrease to the original state (Fig. 5), but there were no differences before and after both of the treatments in the SCFAs concentrations. Although, there were no significant changes in the butyric acid concentrations, there was a tendency for higher butyrate composition in the ABx + probiotic rats compared to animals of the other groups. Examination of the prenatal VPA exposed rats did not present significant differences among and within these animal groups.

Histology. At the end of behavioral experiments, after preparation of the brains, the diameter of the major hippocampal regions (subiculum, CA1, CA2, CA3, dentate gyrus) was compared among 6–6 animals/groups. Based on the results, diameter of the various hippocampal regions demonstrated extreme differences (Supplementary Table S2; Supplementary Fig. S2), nevertheless, the thickness of each region also revealed remarkable alterations within the groups. Therefore, our histological data, at their present form, proved not to be correctly interpretable.

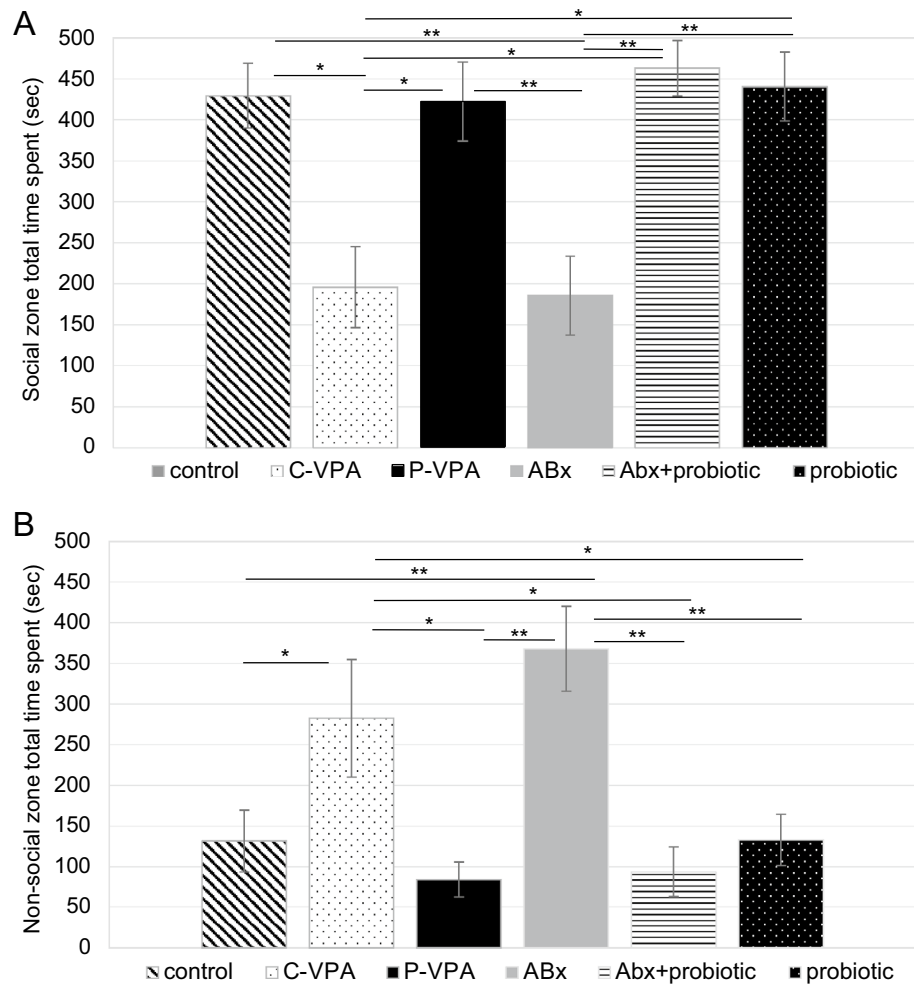


Figure 2. Time spent with the social- (A) and non-social (B) zone exploration (s) in the three chamber social interaction test. Control: control group; C-VPA: valproic acid treated group; P-VPA: valproic acid and probiotic treated group; ABx: broad-spectrum antibiotics treated group, ABx + probiotic: broad-spectrum antibiotics- and probiotic treated group, probiotic: probiotic treated group. One-way ANOVA (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Data graphed as mean \pm SEM.

Discussion

The purpose of this study was to assess the impact of broad-spectrum antibiotics treatment on social behavior in adulthood. To our best knowledge, this report is the first one to demonstrate that chronic depletion of the gut microbiota in adulthood induces profoundly similar social behavioral abnormalities to those observed in animals of the VPA rat model of ASD. Furthermore, as it was supposed, after the antibiotics treatment, our PM was able to re-establish the normal social behavior. In addition to that our PM treatment was capable to markedly reduce the social abnormalities in the VPA animal model, it also appears that even distinct changes of the microbiome could result in remarkable changes in a completely developed brain. According to our present findings, these changes take place in a non-SCFA dependent way.

The instantaneous effect that the GI microbiome exerts on the social behavior has been studied primarily with germ free animals (total lack of microbes) and with certain antibiotic treatments on rodents in their early pre- or post-natal period of life³³. These studies primarily revealed impairments of sociability. Furthermore, colonizing germ free mice with normal faecal microbiota was able to restore the sociability defects. Based on these results, it is reasonable to propose that the gut microbiota is involved in integratory processes of social development^{48,49}. Despite all these facts the effect of broad-spectrum antibiotics treatment on social behavior is less studied in adulthood. One of the fundamental findings of the current study highlights that the antibiotics induced bacterial depletion in adulthood can elicit the same type deficits of the social interaction as those observed in the VPA autism rat model. The sociability index results, indicating a preference to the stranger rat, presented that rats of the C-VPA- and ABx groups display social interaction deficits. These findings suggest that chronic broad-spectrum antibiotics treatment in adulthood negatively affects the social behavior, moreover, it seems as if these deficits were the same type as those we could identify in the VPA rat model of ASD. This finding appears to support the notion that the antibiotics-modified microbiome can act as a causal agent and a risk

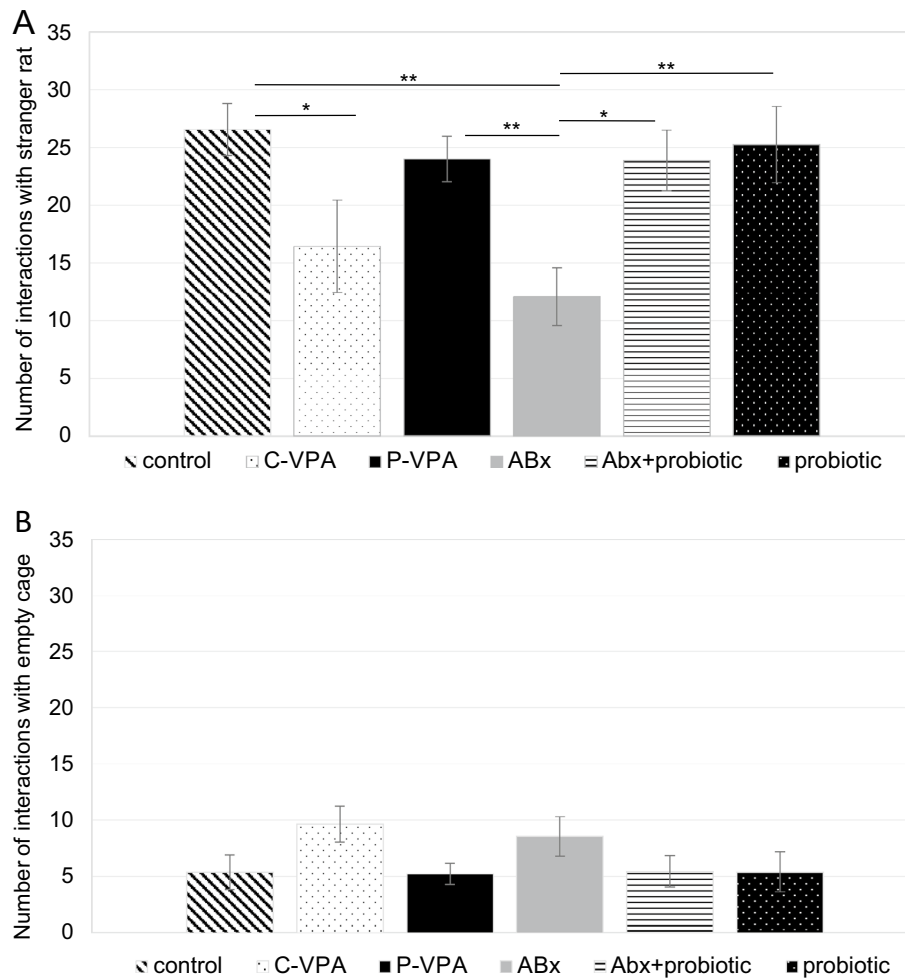


Figure 3. Number of interactions with the stranger rat (**A**) and empty cage (**B**) in the three chamber social interaction test; Control: control group; C-VPA: valproic acid treated group; P-VPA: valproic acid and probiotic treated group; ABx: broad-spectrum antibiotics treated group, ABx + probiotic: broad-spectrum antibiotics- and probiotic treated group, probiotic: probiotic treated group. One-way ANOVA, Kruskal–Wallis test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$). Data graphed as mean \pm SEM.

factor in the development of ASD^{27,30,50}. Despite these social abnormalities, group differences were not found in the total distance travelled and in the latencies to explore the stranger cage. Otherwise, a pilot experiment with LiCl induced visceral illness was not able to result in reduced sociability what we detected in the microbiome depleted ABx rats. These results suggest that impaired sociability is likely cannot be due to the general consequence of visceral discomfort or pain in these animals. The above data underline the importance of disruption of the healthy balance of microbial community and its specific impact on the microbiome–gut–brain axis that leads to the deficits of social behavior regardless of whether visceral discomfort exists or not.

It is established that antibiotics- or VPA treatments interfere with the physiology of the animals disparate ways. In the former case, antibiotics administration strongly depletes gut microbiota, and thus, triggers alterations of the microbiome–gut–brain axis that ultimately lead to behavioral (as well as molecular) deviations^{34,51}. In the latter case, prenatal VPA exposure was shown to modify histone deacetylase activity, to alter gamma-aminobutyric acid (GABA) or Wnt (wingless-type) signaling, and/or to disturb axonal remodeling in the developing neurons^{20,23,52}. These mechanisms can provoke dysfunctions in several brain areas, generating morphological changes, especially in cortical and hippocampal regions^{20,53}. Nevertheless, our histological analysis revealed very high variability within and among the animals, hence, we could not verify that such differences (e.g. in the thickness of hippocampal regions) indeed exist between the VPA treated and other groups. Even though the treatments appeared to act divergent ways, we still noticed similar social behavioral alterations between these groups. Therefore, to more precisely explore the role of the GI microbiome in the development of ASD symptoms, we approached this issue from another direction and introduced a probiotic therapy to interfere these treatments. Previous studies have shown that application of certain probiotics have beneficial effects on antibiotics-induced physiological and psychological abnormalities^{54,55}. Moreover, as different gut microbial community was found in ASD patients in contrast to the healthy individuals, researchers attempted to modify the gut microbiome via probiotics and some results indicate beneficial effects on both behavioral and GI manifestations of ASD^{56–59}. In addition, VPA rat model not just imitate ASD symptoms, it also has a transgenerational impact on the gut

SCFA concentrations (100 mg/mmol/l)	ABx n=8	ABx + probiotic n=8	Probiotic n=8	P-VPA n=7	C-VPA n=7	Control n=7
Before treatments						
Acetic acid	6.25 (4.03–8.54)	5.50 (3.44–7.09)	4.75 (4.04–5.64)	8.79 (7.38–9.02)	7.16 (6.36–7.78)	7.13 (4.73–8.25)
Propionic acid	2.59 (1.88–3.02)	1.91 (1.38–2.33)	1.70 (1.47–2.44)	3.24 (2.78–3.79)	2.49 (2.09–2.92)	1.80 (1.63–3.14)
Butyric acid	1.36 (1.18–1.45)	1.00 (0.93–1.20)	0.93 (0.86–1.15)	1.92 (1.39–2.16)	1.48 (1.14–2.10)	1.10 (0.99–1.59)
Total	9.76 (7.56–13.63)	9.50 (5.80–10.37)	7.61 (6.69–9.16)	14.22 (11.24–14.83)	10.86 (10.05–12.47)	10.67 (7.58–13.04)
After treatments						
Acetic acid	1.64 (0.00–2.90) ^{abcde}	4.03 (2.37–5.11) ^a	4.14 (2.97–7.14) ^b	5.56 (4.49–8.60) ^c	7.77 (6.97–8.25) ^d	4.67 (2.85–5.28) ^e
Propionic acid	0.64 (0.00–1.02) ^{abcde}	1.30 (0.74–1.54) ^a	2.45 (1.48–2.57) ^b	2.82 (2.35–3.40) ^c	2.98 (2.60–3.50) ^d	2.09 (1.57–2.40) ^e
Butyric acid	0.36 (0.00–0.54) ^{abcde}	1.30 (1.19–1.62) ^a	0.96 (0.75–1.23) ^b	1.15 (0.76–2.22) ^c	2.23 (1.77–2.33) ^d	1.22 (1.00–1.35) ^e
Total	2.65 (0.00–4.44) ^{abcde}	6.46 (4.18–8.50) ^a	7.40 (5.82–10.58) ^b	9.14 (7.79–14.22) ^c	13.30 (11.44–13.56) ^d	7.79 (5.73–8.62) ^e

Table 2. Analysis of the short chain fatty acids (acetic acid, propionic acid and butyric acid) concentrations (100 mg/mmol/l) in the faecal samples before and after the treatments. ABx: broad-spectrum antibiotics treated group, ABx + probiotic: broad-spectrum antibiotics- and probiotic treated group, Probiotic: probiotic treated group, P-VPA: valproic acid and probiotic treated group, C-VPA: valproic acid treated group, Control: control group. Values of the concentrations are median (IQR). Kruskal–Wallis test, Mann–Whitney *U*-test and Friedman test. Between the groups significances ($p < 0.05$) are represented by distinct (a–e) lowercase letters.

microbiota^{60–62}. Nevertheless, limited research is available where probiotics are investigated in the VPA animal model as they could be effective therapy, only one study has recently revealed that VPA induced behavioral alterations could be reduced by daily supplementation with *Lactobacillus* strains⁶³. In our present study, it is demonstrated for the first time that specified PM can be a potential novel approach to improve social behavioral alterations both in the VPA- or antibiotics induced animal model. Our PM was able to improve the preference to the stranger rat in both of the C-VPA and ABx treated groups, thus antisocial behavior was reduced. Moreover, the present results demonstrated that the same behavior can be seen in the C-VPA and ABx treated groups as it appeared in the control group. However, the PM itself was not able to significantly change all aspects of the behavior, only in the frequency of the social zone exploration was detected notable difference between the probiotic and the control rats, but this was presumably generated by the fact that probiotic treated animals spent more time in the social zone once they entered there.

Despite the fact that both models developed by different mechanisms, quite similar social behavioral abnormalities were noticed, additionally, our PM was able to reconstruct these behavioral phenomena just as they appear in the control rats. Regarding these consequences, it is suggested that in both models the protective effects of the probiotic treatment get exerted in the same way. A series of studies have described that SCFAs improve the gut health, regulate immune mechanisms and they may possess neuroactive properties^{43,64–67}. However, findings from ASD human studies on the associations among the three main SCFAs have proved to be divergent^{68–70}. At the same time, in rodent models, the administration of propionic acid could produce behavioral changes closely resembling those found in ASD⁷¹, and in the VPA autism model changes of the SCFAs concentrations were also observed⁶⁰. In spite of all these, the analysis of the main SCFAs did not show significant differences between the VPA treated and the control animals, and, after the probiotic therapy, there were also no remarkable effects seen in the SCFAs productions. Nevertheless, it is clear that the antibiotics treatment itself significantly decreases the levels of all the examined SCFAs, referring to the highly decreased total amount of the microbiome in these animals. In spite of the fact that the PM considerably elevated the concentration of the SCFAs after the antibiotics treatment, we did not reveal extreme alterations among the groups after the end of the treatments. However, it is reasonable to suppose that the probiotic impact would be necessarily stronger after the antibiotics administration than in case of challenging the compact, untreated microbiome community. The present results undeniably indicate that the change of concentration of the main SCFAs cannot be the sole causal factor that determines how the PM exerts its positive impact on the social behavior.

Increasing amount of data support the consideration that the manifested inflammation and metabolic patterns are quite comparable in both investigated animal models^{72,73}. While, in the antibiotics-treated rat model, the inflammatory processes and the serotonergic system appear to be linked to the gut dysbiosis^{34,74,75}, in the VPA animal model the elevated pro-inflammatory state, chronic glial activation and disturbance of the serotonergic system are caused by impact of the VPA to the developing brain^{75–78}. Therefore, these observations encourage us to maintain the presumption that our PM made an effect on the serotonergic system without the mediation of the alterations of the SCFAs, thus, providing us the opportunity to hypothesize this to be the common way how the probiotic formulation can re-establish the behavioral alterations. It could occur in a way that modification and reduction of the inflammatory processes (diminishing the gut permeability) altogether with the altered microbiome could interact and alter the serotonergic system^{79–83}. Since GI microbiota can directly or indirectly influence the tryptophan availability and the serotonin synthesis, thus, it ultimately

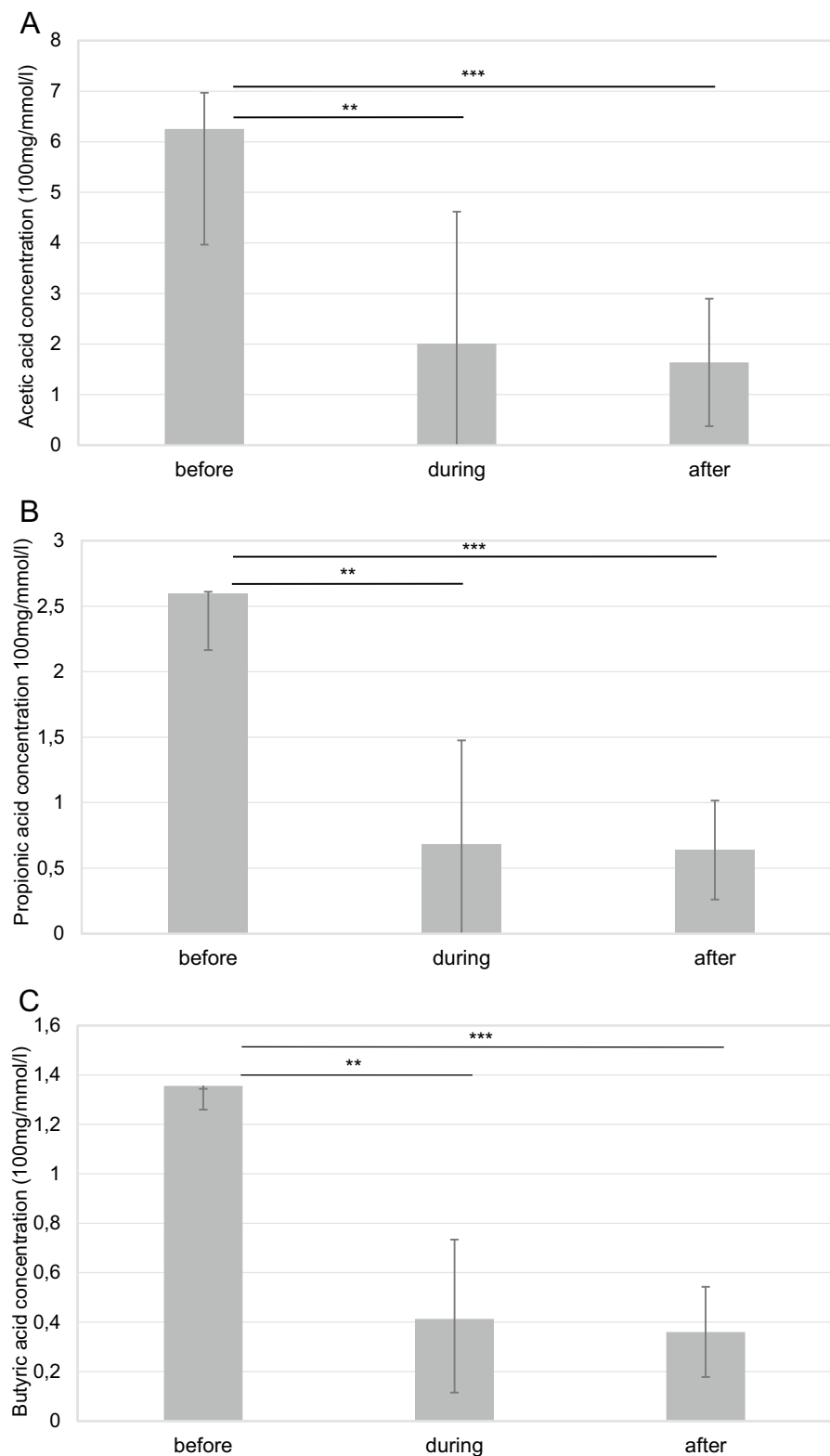


Figure 4. The effect of antibiotics treatments on the acetic acid (A), propionic acid (B) and butyric acid (C) concentrations (100 mg/mmol/l) in the faecal samples before-, during- and after the antibiotics treatment. Abx: broad-spectrum antibiotics treated group; Friedman test (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Data graphed as median \pm IQR.

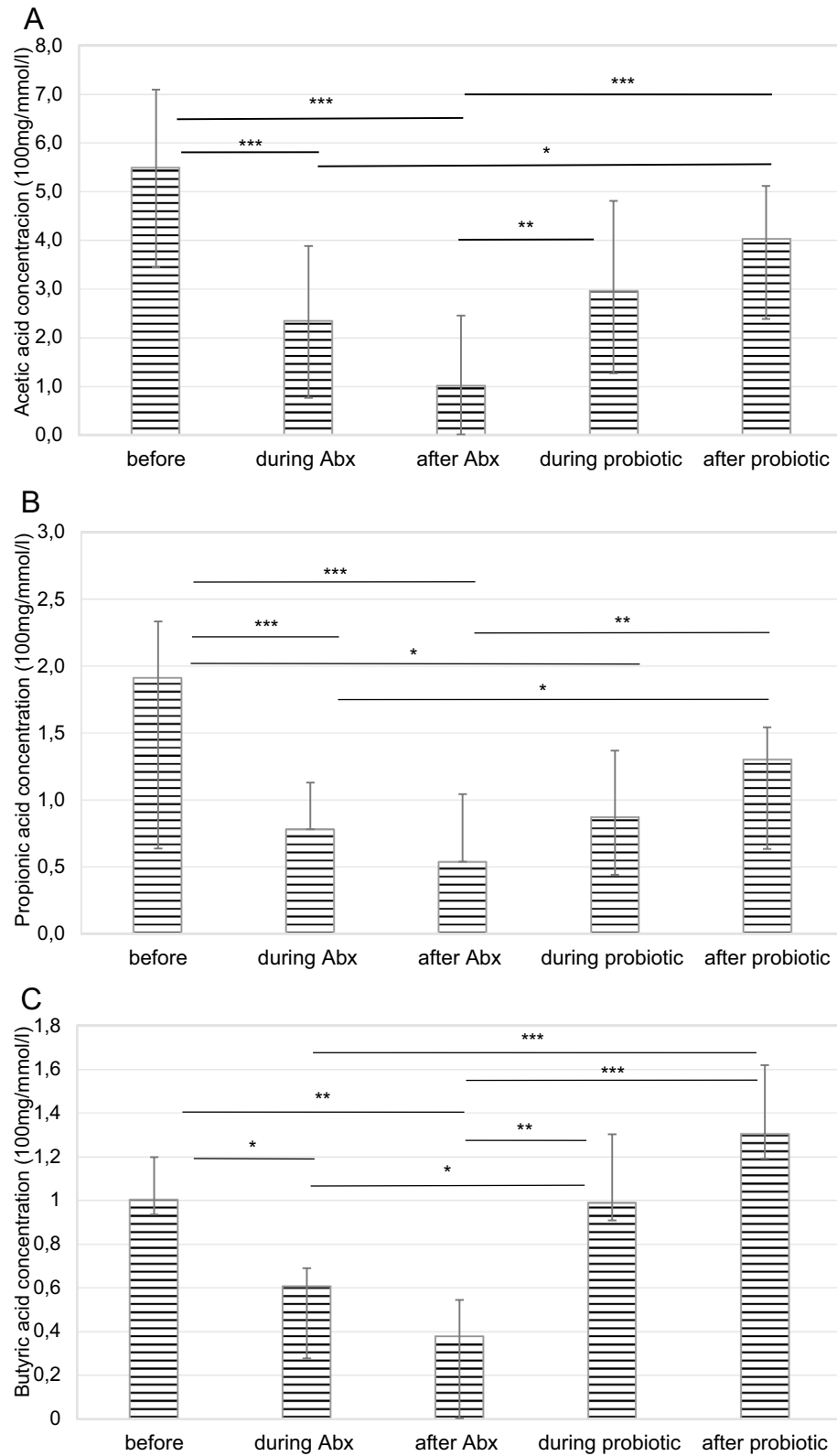


Figure 5. The effect of antibiotics and probiotic treatments on the acetic acid (A), propionic acid (B) and butyric acid (C) concentrations (100 mg/mmol/l) in the faecal samples before the treatments, during- and after the antibiotics treatment, as well as during- and after the probiotic treatment. Abx+ probiotic: broad-spectrum antibiotics treated and after probiotic treated group; Friedman test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Data graphed as median \pm IQR.

influences the regulation of the kynurenine pathway. This pathway controls the production of the neuroprotective kynurenic acid (*N*-methyl-*D*-aspartate (NMDA) receptor antagonist) and that of the neurotoxic quinolinic acid (NMDA receptor agonist)⁸². So, the modulations of this system could lead to altered expression levels of NMDA^{82,84,85}. It has been demonstrated that antibiotics could also alter NMDA receptor subunit expressions⁸⁶. Recent studies have also identified that post-natal VPA treatment enhanced NMDA receptor functioning in the brain which may indicate a compensatory homeostasis with the presence of an excitatory/inhibitory imbalance during development. In subsequent experiments, when using pharmacological suppression therapy or NMDA receptor antagonists, they were able to normalize social deficits^{60,76,87,88}. These results highlight the impact of these transcriptional modifications which could be the last elements in the way how our probiotic could restore the antisocial behavior, since NMDA receptors play an essential role in complex cognitive and social behavioral processes^{89,90}. Furthermore, *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. as GABA-producing species may be able to good candidates to theoretically change glutamate/GABA ratio thus it could be a promising strategy to treat ASD associated social behavioral symptoms^{91,92}. Nevertheless, further studies are needed to measure constituent elements of inflammatory processes, metabolic patterns and NMDA receptor expression levels in both animal models along with measuring these values after the probiotic treatment. Furthermore, additional investigations are necessary to examine changes of other minor SCFAs, as well as to apply other behavioral tests to explore wider ranges of behavioral alterations. Indeed, future studies should also clarify whether the 2 weeks of our PM exposure ensures only shorter, temporary or lasting effects on the social behavior. Furthermore, future studies are expected to reinforce the therapeutic efficacy of our PM on the ASD.

Taken together, our data confirm that broad-spectrum antibiotics treatment during adulthood can induce antisocial behavior similar to that observed in the VPA autism animal model. The current study suggests that the homeostatic balance of the GI microbiome has a profound effect on the social behavior. To our best knowledge this study is among the first ones to demonstrate that specific probiotic mixture can restore the same type of antisocial behavioral phenomena in these two disparate animal models, developed by distinct mechanisms. Based on the present data, this probiotic formulation targets a common pathway with a non-SCFA dependent manner. Overall, this study provides preliminary evidence for that GI microbiome, more specifically some bacterial combinations, appears to have therapeutic value to cure or at least attenuate the condition of social behavior, and thus, to get prepared to act as a proper therapeutic agent to eliminate symptoms of antisocial behavior in the ASD.

Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].

Received: 6 January 2022; Accepted: 22 March 2022

Published online: 30 March 2022

References

- Sharma, S. R., Gonda, X. & Tarazi, F. I. Autism spectrum disorder: Classification, diagnosis and therapy. *Pharmacol. Ther.* **190**, 91–104. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.05.007> (2018).
- Lord, C., Elsabbagh, M., Baird, G. & Veenstra-Vanderweele, J. Autism spectrum disorder. *Lancet* **392**, 508–520. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31129-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31129-2) (2018).
- Baron-Cohen, S. & Wheelwright, S. The Friendship Questionnaire: An investigation of adults with Asperger syndrome or high-functioning autism, and normal sex differences. *J. Autism Dev. Disord.* **33**, 509–517. <https://doi.org/10.1023/a:1025879411971> (2003).
- Bottema-Beutel, K. Glimpses into the blind spot: Social interaction and autism. *J. Commun. Disord.* **68**, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.jcomdis.2017.06.008> (2017).
- Knott, F., Dunlop, A. W. & Mackay, T. Living with ASD: How do children and their parents assess their difficulties with social interaction and understanding?. *Autism* **10**, 609–617. <https://doi.org/10.1177/1362361306068510> (2006).
- Mackay, T., Knott, F. & Dunlop, A. W. Developing social interaction and understanding in individuals with autism spectrum disorder: A groupwork intervention. *J. Intellect. Dev. Disabil.* **32**, 279–290. <https://doi.org/10.1080/13668250701689280> (2007).
- Scassellati, B. *et al.* Improving social skills in children with ASD using a long-term, in-home social robot. *Sci. Robot.* <https://doi.org/10.1126/scirobotics.aat7544> (2018).
- Chung, E. Y.-H. Robot-mediated social skill intervention programme for children with autism spectrum disorder: An ABA time-series study. *Int. J. Soc. Robot.* **13**, 1095–1107. <https://doi.org/10.1007/s12369-020-00699-w> (2021).
- Canitano, R. New experimental treatments for core social domain in autism spectrum disorders. *Front. Pediatr.* **2**, 61. <https://doi.org/10.3389/fped.2014.00061> (2014).
- Parker, K. J. *et al.* A randomized placebo-controlled pilot trial shows that intranasal vasopressin improves social deficits in children with autism. *Sci. Transl. Med.* <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau7356> (2019).
- Singh, K. *et al.* Sulforaphane treatment of autism spectrum disorder (ASD). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 15550–15555. <https://doi.org/10.1073/pnas.1416940111> (2014).
- Basilico, B., Morandell, J. & Novarino, G. Molecular mechanisms for targeted ASD treatments. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **65**, 126–137. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.06.004> (2020).
- Erdogan, H. *et al.* Animal models of autism spectrum disorder. *J. Neurol. Stroke* **6**, 00209. <https://doi.org/10.15406/jnsk.2017.06.00209> (2017).
- Ergaz, Z., Weinstein-Fudim, L. & Ornoy, A. Genetic and non-genetic animal models for autism spectrum disorders (ASD). *Reprod. Toxicol.* **64**, 116–140. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.04.024> (2016).
- Abuhash, S. *et al.* The efficacy of fecal transplantation and bifidobacterium supplementation in ameliorating propionic acid-induced behavioral and biochemical autistic features in juvenile male rats. *J. Mol. Neurosci.* **72**, 372–381. <https://doi.org/10.1007/s12031-021-01959-8> (2022).
- Schneider, T. *et al.* Gender-specific behavioral and immunological alterations in an animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *Psychoneuroendocrinology* **33**, 728–740. <https://doi.org/10.1016/j.psychneuen.2008.02.011> (2008).
- Varghese, M. *et al.* Autism spectrum disorder: Neuropathology and animal models. *Acta Neuropathol.* **134**, 537–566. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1736-4> (2017).

18. Chomiak, T., Turner, N. & Hu, B. What we have learned about autism spectrum disorder from valproic acid. *Patholog. Res. Int.* **2013**, 712758. <https://doi.org/10.1155/2013/712758> (2013).
19. Schneider, T. & Przewlocki, R. Behavioral alterations in rats prenatally exposed to valproic acid: Animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* **30**, 80–89. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300518> (2005).
20. Kataoka, S. *et al.* Autism-like behaviours with transient histone hyperacetylation in mice treated prenatally with valproic acid. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* **16**, 91–103. <https://doi.org/10.1017/S1461145711001714> (2013).
21. Codagnone, M. G., Podesta, M. F., Uccelli, N. A. & Reines, A. Differential local connectivity and neuroinflammation profiles in the medial prefrontal cortex and hippocampus in the valproic acid rat model of autism. *Dev. Neurosci.* **37**, 215–231. <https://doi.org/10.1159/000375489> (2015).
22. Chaliha, D. *et al.* A systematic review of the valproic-acid-induced rodent model of autism. *Dev. Neurosci.* **42**, 12–48. <https://doi.org/10.1159/000509109> (2020).
23. Nicolini, C. & Fahnstock, M. The valproic acid-induced rodent model of autism. *Exp. Neurol.* **299**, 217–227. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.04.017> (2018).
24. Antshel, K. M., Zhang-James, Y., Wagner, K. E., Ledesma, A. & Faraone, S. V. An update on the comorbidity of ADHD and ASD: A focus on clinical management. *Expert Rev. Neurother.* **16**, 279–293. <https://doi.org/10.1586/14737175.2016.1146591> (2016).
25. Goines, P. E. & Ashwood, P. Cytokine dysregulation in autism spectrum disorders (ASD): Possible role of the environment. *Neurotoxicol. Teratol.* **36**, 67–81. <https://doi.org/10.1016/j.ntt.2012.07.006> (2013).
26. Jiang, H. Y. *et al.* Maternal infection during pregnancy and risk of autism spectrum disorders: A systematic review and meta-analysis. *Brain Behav. Immunol.* **58**, 165–172. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.06.005> (2016).
27. Lukasik, J. *et al.* Early life exposure to antibiotics and autism spectrum disorders: A systematic review. *J. Autism Dev. Disord.* **49**, 3866–3876. <https://doi.org/10.1007/s10803-019-04093-y> (2019).
28. State, M. W. & Levitt, P. The conundrums of understanding genetic risks for autism spectrum disorders. *Nat. Neurosci.* **14**, 1499–1506. <https://doi.org/10.1038/nn.2924> (2011).
29. Tick, B., Bolton, P., Happe, F., Rutter, M. & Rijdsdijk, F. Heritability of autism spectrum disorders: A meta-analysis of twin studies. *J. Child Psychol. Psychiatry* **57**, 585–595. <https://doi.org/10.1111/jcpp.12499> (2016).
30. Bittker, S. S. & Bell, K. R. Acetaminophen, antibiotics, ear infection, breastfeeding, vitamin D drops, and autism: An epidemiological study. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* **14**, 1399–1414. <https://doi.org/10.2147/NDT.S158811> (2018).
31. Wimberley, T. *et al.* Otitis media, antibiotics, and risk of autism spectrum disorder. *Autism Res.* **11**, 1432–1440. <https://doi.org/10.1002/aur.2015> (2018).
32. Jia, W., Li, H., Zhao, L. & Nicholson, J. K. Gut microbiota: A potential new territory for drug targeting. *Nat. Rev. Drug Discov.* **7**, 123–129. <https://doi.org/10.1038/nrd2505> (2008).
33. Needham, B. D., Tang, W. & Wu, W. L. Searching for the gut microbial contributing factors to social behavior in rodent models of autism spectrum disorder. *Dev. Neurobiol.* **78**, 474–499. <https://doi.org/10.1002/dneu.22581> (2018).
34. Hoban, A. E. *et al.* Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience* **339**, 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.003> (2016).
35. Ouwehand, A. C. *et al.* Probiotics reduce symptoms of antibiotic use in a hospital setting: A randomized dose response study. *Vaccine* **32**, 458–463. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2013.11.053> (2014).
36. Foster, J. A., Lyte, M., Meyer, E. & Cryan, J. F. Gut microbiota and brain function: An evolving field in neuroscience. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* <https://doi.org/10.1093/ijnp/pyv114> (2016).
37. Umbrello, G. & Esposito, S. Microbiota and neurologic diseases: Potential effects of probiotics. *J. Transl. Med.* **14**, 298. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-1058-7> (2016).
38. Kong, Y., Olejar, K. J., On, S. L. W. & Chelikani, V. The potential of *Lactobacillus* spp. for modulating oxidative stress in the gastrointestinal tract. *Antioxidants (Basel)*. <https://doi.org/10.3390/antiox9070610> (2020).
39. Quaresma, M. *et al.* Probiotic mixture containing *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. attenuates 5-fluorouracil-induced intestinal mucositis in mice. *Nutr. Cancer* **72**, 1355–1365. <https://doi.org/10.1080/01635581.2019.1675719> (2020).
40. Westfall, S. *et al.* Microbiome, probiotics and neurodegenerative diseases: Deciphering the gut brain axis. *Cell Mol. Life Sci.* **74**, 3769–3787. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2550-9> (2017).
41. Zagorska, A., Marcinkowska, M., Jamrozik, M., Wisniowska, B. & Pasko, P. From probiotics to psychobiotics—The gut–brain axis in psychiatric disorders. *Benef. Microbes* **11**, 717–732. <https://doi.org/10.3920/BM2020.0063> (2020).
42. Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C. & Gil, A. Probiotic mechanisms of action. *Ann. Nutr. Metab.* **61**, 160–174. <https://doi.org/10.1159/000342079> (2012).
43. Dalile, B., Van Oudenhove, L., Vervliet, B. & Verbeke, K. The role of short-chain fatty acids in microbiota–gut–brain communication. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 461–478. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0157-3> (2019).
44. Markram, K., Rinaldi, T., La Mendola, D., Sandi, C. & Markram, H. Abnormal fear conditioning and amygdala processing in an animal model of autism. *Neuropsychopharmacology* **33**, 901–912. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301453> (2008).
45. Henbid, M. T. *et al.* Sociability impairments in genetic absence epilepsy rats from strasbourg: Reversal by the T-type calcium channel antagonist Z944. *Exp. Neurol.* **296**, 16–22. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2017.06.022> (2017).
46. Wall, R. *et al.* Contrasting effects of *Bifidobacterium breve* NCIMB 702258 and *Bifidobacterium breve* DPC 6330 on the composition of murine brain fatty acids and gut microbiota. *Am. J. Clin. Nutr.* **95**, 1278–1287. <https://doi.org/10.3945/ajcn.111.026435> (2012).
47. Jiménez, J. A. & Zylka, M. J. Controlling litter effects to enhance rigor and reproducibility with rodent models of neurodevelopmental disorders. *J. Neurodev. Disord.* **13**, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s11689-020-09353-y> (2021).
48. Desbonnet, L. *et al.* Gut microbiota depletion from early adolescence in mice: Implications for brain and behaviour. *Brain Behav. Immunol.* **48**, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2015.04.004> (2015).
49. Leclercq, S. *et al.* Low-dose penicillin in early life induces long-term changes in murine gut microbiota, brain cytokines and behavior. *Nat. Commun.* **8**, 15062. <https://doi.org/10.1038/ncomms15062> (2017).
50. Ternák, G. Antibiotic-modified microbiome might be responsible for non-contagious world-wide epidemics. *Am. J. Biosci. Bioeng.* **7**, 34–39. <https://doi.org/10.11648/j.bio.20190702.12> (2019).
51. Bercik, P. & Collins, S. M. The effects of inflammation, infection and antibiotics on the microbiota–gut–brain axis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **817**, 279–289. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_13 (2014).
52. Hall, A. C. *et al.* Valproate regulates GSK-3-mediated axonal remodeling and synapsin I clustering in developing neurons. *Mol. Cell Neurosci.* **20**, 257–270. <https://doi.org/10.1006/mcne.2002.1117> (2002).
53. Edalatmanesh, M. A., Nikfarjam, H., Vafae, F. & Moghadas, M. Increased hippocampal cell density and enhanced spatial memory in the valproic acid rat model of autism. *Brain Res.* **1526**, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.06.024> (2013).
54. Suez, J. *et al.* Post-antibiotic gut mucosal microbiome reconstitution is impaired by probiotics and improved by autologous FMT. *Cell* **174**, 1406–1423. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.047> (2018).
55. Wang, T. *et al.* *Lactobacillus fermentum* NS9 restores the antibiotic induced physiological and psychological abnormalities in rats. *Benef. Microbes* **6**, 707–717. <https://doi.org/10.3920/BM2014.0177> (2015).
56. Navarro, F., Liu, Y. & Rhoads, J. M. Can probiotics benefit children with autism spectrum disorders?. *World J. Gastroenterol.* **22**, 10093–10102. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i46.10093> (2016).
57. Niu, M. *et al.* Characterization of intestinal microbiota and probiotics treatment in children with autism spectrum disorders in China. *Front. Neurol.* **10**, 1084. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.01084> (2019).

58. Santocchi, E. *et al.* Gut to brain interaction in autism spectrum disorders: a randomized controlled trial on the role of probiotics on clinical, biochemical and neurophysiological parameters. *BMC Psychiatry* **16**, 183. <https://doi.org/10.1186/s12888-016-0887-5> (2016).
59. Shaaban, S. Y. *et al.* The role of probiotics in children with autism spectrum disorder: A prospective, open-label study. *Nutr. Neurosci.* **21**, 676–681. <https://doi.org/10.1080/102845X.2017.1347746> (2018).
60. de Theije, C. G. *et al.* Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav. Immunol.* **37**, 197–206. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.005> (2014).
61. Poolchanuan, P. *et al.* An anticonvulsive drug, valproic acid (valproate), has effects on the biosynthesis of fatty acids and polyketides in microorganisms. *Sci. Rep.* **10**, 9300. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66251-y> (2020).
62. Wang, J. P. *et al.* Effects of dietary fat profile on gut microbiota in valproate animal model of autism. *Front. Med. (Lausanne)* **7**, 151. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.00151> (2020).
63. Sunand K, M. G. K., Bakshi V. Supplementation of lactobacillus probiotic strains supports gut–brain–axis and defends autistic deficits occurred by valproic acid-induced prenatal model of autism. *Pharmacogn. J.* **12**, 1658–1669. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.226> (2020).
64. Silva, Y. P., Bernardi, A. & Frozza, R. L. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut–brain communication. *Front. Endocrinol. (Lausanne)* **11**, 25. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025> (2020).
65. Smith, P. M. *et al.* The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis. *Science* **341**, 569–573. <https://doi.org/10.1126/science.1241165> (2013).
66. Wong, J. M., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A. & Jenkins, D. J. Colonic health: Fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* **40**, 235–243. <https://doi.org/10.1097/00004836-200603000-00015> (2006).
67. Roy, C. C., Kien, C. L., Bouthillier, L. & Levy, E. Short-chain fatty acids: ready for prime time?. *Nutr Clin Pract* **21**, 351–366. <https://doi.org/10.1177/0115426506021004351> (2006).
68. Liu, S. *et al.* Altered gut microbiota and short chain fatty acids in Chinese children with autism spectrum disorder. *Sci. Rep.* **9**, 287. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36430-z> (2019).
69. Wang, J. *et al.* Fecal short-chain fatty acids levels were not associated with autism spectrum disorders in Chinese children: A case–control study. *Front. Neurosci.* **13**, 1216. <https://doi.org/10.3389/fnins.2019.01216> (2019).
70. Wang, L. *et al.* Elevated fecal short chain fatty acid and ammonia concentrations in children with autism spectrum disorder. *Dig. Dis. Sci.* **57**, 2096–2102. <https://doi.org/10.1007/s10620-012-2167-7> (2012).
71. MacFabe, D. F. Enteric short-chain fatty acids: Microbial messengers of metabolism, mitochondria, and mind: implications in autism spectrum disorders. *Microb. Ecol. Health Dis.* **26**, 28177. <https://doi.org/10.3402/mehd.v26.28177> (2015).
72. Becattini, S., Taur, Y. & Pamer, E. G. Antibiotic-induced changes in the intestinal microbiota and disease. *Trends Mol. Med.* **22**, 458–478. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2016.04.003> (2016).
73. Deckmann, I., Schwingel, G. B., Fontes-Dutra, M., Bambini-Junior, V. & Gottfried, C. Neuroimmune alterations in autism: A translational analysis focusing on the animal model of autism induced by prenatal exposure to valproic acid. *NeuroImmunoModulation* **25**, 285–299. <https://doi.org/10.1159/000492113> (2018).
74. Grasa, L. *et al.* Antibiotic-induced depletion of murine microbiota induces mild inflammation and changes in toll-like receptor patterns and intestinal motility. *Microb. Ecol.* **70**, 835–848. <https://doi.org/10.1007/s00248-015-0613-8> (2015).
75. Sun, L. *et al.* Antibiotic-induced disruption of gut microbiota alters local metabolomes and immune responses. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **9**, 99. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00099> (2019).
76. de Theije, C. G. *et al.* Intestinal inflammation in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav. Immunol.* **37**, 240–247. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2013.12.004> (2014).
77. Dufour-Rainfray, D. *et al.* Behavior and serotonergic disorders in rats exposed prenatally to valproate: A model for autism. *Neurosci. Lett.* **470**, 55–59. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.12.054> (2010).
78. Lucchina, L. & Depino, A. M. Altered peripheral and central inflammatory responses in a mouse model of autism. *Autism Res.* **7**, 273–289. <https://doi.org/10.1002/aur.1338> (2014).
79. Corridoni, D. *et al.* Probiotic bacteria regulate intestinal epithelial permeability in experimental ileitis by a TNF-dependent mechanism. *PLoS ONE* **7**, e42067. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042067> (2012).
80. Leber, B. *et al.* The influence of probiotic supplementation on gut permeability in patients with metabolic syndrome: An open label, randomized pilot study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **66**, 1110–1115. <https://doi.org/10.1038/ejcn.2012.103> (2012).
81. Lyte, J. M. *et al.* Gut-brain axis serotonergic responses to acute stress exposure are microbiome-dependent. *Neurogastroenterol. Motil.* **32**, e13881. <https://doi.org/10.1111/nmo.13881> (2020).
82. O'Mahony, S. M., Clarke, G., Borre, Y. E., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain–gut–microbiome axis. *Behav. Brain Res.* **277**, 32–48. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.07.027> (2015).
83. Ruiz, L., Delgado, S., Ruas-Madiedo, P., Sanchez, B. & Margolles, A. Bifidobacteria and their molecular communication with the immune system. *Front. Microbiol.* **8**, 2345. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02345> (2017).
84. Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G. & Clarke, G. Kynurenine pathway metabolism and the microbiota–gut–brain axis. *Neuropharmacology* **112**, 399–412. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2016.07.002> (2017).
85. Maqsood, R. & Stone, T. W. The gut–brain axis, BDNF, NMDA and CNS disorders. *Neurochem. Res.* **41**, 2819–2835. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-2039-1> (2016).
86. Frohlich, E. E. *et al.* Cognitive impairment by antibiotic-induced gut dysbiosis: Analysis of gut microbiota–brain communication. *Brain Behav. Immunol.* **56**, 140–155. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.02.020> (2016).
87. Kang, J. & Kim, E. Suppression of NMDA receptor function in mice prenatally exposed to valproic acid improves social deficits and repetitive behaviors. *Front. Mol. Neurosci.* **8**, 17. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00017> (2015).
88. Kuo, H. Y. & Liu, F. C. Molecular pathology and pharmacological treatment of autism spectrum disorder-like phenotypes using rodent models. *Front. Cell Neurosci.* **12**, 422. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00422> (2018).
89. Finlay, J. M. *et al.* Effects of prefrontal cortex and hippocampal NMDA NR1-subunit deletion on complex cognitive and social behaviors. *Brain Res.* **1600**, 70–83. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.10.037> (2015).
90. Yuen, E. Y. *et al.* Serotonin 5-HT_{1A} receptors regulate NMDA receptor channels through a microtubule-dependent mechanism. *J. Neurosci.* **25**, 5488–5501. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1187-05.2005> (2005).
91. Yunes, R. A. *et al.* A multi-strain potential probiotic formulation of GABA-producing *Lactobacillus plantarum* 90sk and *Bifidobacterium adolescentis* 150 with antidepressant effects. *Probiot. Antimicrob. Proteins* **12**, 973–979. <https://doi.org/10.1007/s12602-019-09601-1> (2020).
92. El-Ansary, A. GABA and glutamate imbalance in autism and their reversal as novel hypothesis for effective treatment strategy. *Autism Dev. Disorders* **18**, 46–63. <https://doi.org/10.17759/autdd.2020180306> (2020).

Acknowledgements

This work was supported by Proof of Principle PTE/101413-1/2019, PTE ÁOK KA 2013/34039/1; EFOP-3.6.1-16-2016-00004; EFOP-VEKOP; TKP2, PTE-ÁOK-PD-2018-10-2017-09, ÚNKP-20-5-PTE-480 New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology and PTE ÁOK KA-2020-06. The authors

express their grateful thanks to Fanni Géczi, Ildikó Fuchs, Ágnes Gonda, Nina Gyórfi, Mátyás Wahr, Erika Gáspárné Bak, Erika Kvak, Ákos Klonga and Ferenc Wilhelm for their invaluable technical assistance.

Author contributions

K.M., A.T., Z.K. made the study design and conceptualization. K.M. wrote the manuscript. A.T. and Z.K. supervised the research. K.L. provided the VPA animal model. K.M., A.K., E.H., T.O. conducted the behavior experiments. B.K. and A.V. produced the probiotic mixture. A.B., T.M., K.M. performed the SCFA analysis. K.M. E.H. carried out the histological staining and evaluations. R.C. provided intellectual support for the ASD model and the behavioral experiment. M.K., Z.V., L.P. organized the experimental data and conducted the statistical analyses. Z.K. and L.L. critically reviewed the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding

Open access funding provided by University of Pécs.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09350-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to K.M.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022



OPEN

Antibiotics and probiotics-induced effects on the total fatty acid composition of feces in a rat model

Tamás Marosvölgyi^{1,6}, Kitti Mintál^{2,3,6}, Nelli Farkas¹, Zoltán Sipos¹, Lilla Makszin¹, Éva Szabó⁴✉, Attila Tóth^{2,3}, Béla Kocsis⁵, Krisztina Kovács⁵, Edina Hormay^{2,3}, László Lénárd^{2,3}, Zoltán Karádi^{2,3} & Anita Bufa¹

Fatty acids (FAs) play important roles as membrane components and signal transduction molecules. Changes in short chain FA (SCFA) composition are associated with gut microbiota modifications. However, the effect of bacteria-driven changes on the detailed FA spectrum has not been explored yet. We investigated the effect of antibiotics (ABx) and/or probiotics, in four treatment groups on rat stool FA composition. Principal component analysis indicated that the chromatogram profiles of the treatment groups differ, which was also observed at different time points. Linear mixed effects models showed that in the parameters compared (sampling times, treatments, and their interactions), both the weight percentage and the concentration of FAs were affected by ABx and probiotic administration. This study found that the gut microbiome defines *trans* and branched saturated FAs, most saturated FAs, and unsaturated FAs with less carbon atoms. These results are among the first ones to demonstrate the restoring effects of a probiotic mixture on a substantial part of the altered total FA spectrum, and also revealed a previously unknown relationship between gut bacteria and a larger group of FAs. These findings suggest that intestinal bacteria produce not only SCFAs but also other FAs that may affect the host's physiological processes.

Abbreviations

ABx	Antibiotics
ALA	Alpha-linolenic acid
CNS	Central nervous system
FA	Fatty acids
FAME	Fatty acid methyl ester
GC	Gas chromatograph
GI	Gastrointestinal
LCPUFA	Long chain polyunsaturated fatty acid
MUFA	Monounsaturated fatty acid
PCA	Principal component analysis
PCs	Principal components
PM	Probiotic mixture
PUFAs	Polyunsaturated fatty acids
REML	Restricted maximum likelihood
SAT	Saturated fatty acids
SCFAs	Short-chain fatty acids

Fatty acids (FA) are important constituents of all multicellular organisms, primarily as components of the phospholipid bilayers of the cell membranes, and they also have an essential role in normal growth and development. In general, they have a hydrocarbon chain with a carboxyl group at one end and a methyl group at the other

¹Institute of Bioanalysis, Medical School, University of Pécs, Pécs 7624, Hungary. ²Institute of Physiology, Medical School, University of Pécs, Pécs 7624, Hungary. ³Medical and Engineering Multidisciplinary Cellular Bioimpedance Research Group, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs 7624, Hungary. ⁴Department of Biochemistry and Medical Chemistry, Medical School, University of Pécs, Pécs 7624, Hungary. ⁵Department of Medical Microbiology and Immunology, Medical School, University of Pécs, Pécs 7624, Hungary. ⁶These authors contributed equally: Tamás Marosvölgyi and Kitti Mintál. ✉email: szabo.eva.dr@pte.hu

with chain lengths ranging from 2 and close to 30. These chains may be presented in two main forms: saturated fatty acids (SAT) are loaded with hydrogen containing only C–C single bonds and unsaturated fatty acids which contain at least one double bond^{1,2}. Both saturated and unsaturated FAs are elementary nutrients and as components of triacylglycerols they also serve as major energy stores. Branched-chain fatty acids are synthesized by microorganisms (mainly bacteria) from branched-chain amino acids and therefore, they can be mainly found in bacterial membranes, or ruminant-derived lipids, e.g. milk or dairy products³. Depending on their various structures they have unique biological properties and as part of different lipid classes they play central role of diverse physiological processes including lipid and energy metabolism, endothelial functions, homeostatic and inflammatory responses along with having central role in functioning the central nervous system (CNS)^{1,4–7}.

The intestinal microbiome is a collection of highly diverse microbial communities that provide the host with a broad range of fundamental functions, including protection from pathogens, impact the host physiology via metabolites and shaping the activity of the adaptive immune system. The relationship between FAs and the gut microbiome is thought to be bidirectional: the dietary FA intake can influence the type and abundance of gut microbes, while the microbiome also affects the metabolism and absorption of dietary fatty acids^{8,9}. Previous studies have shown that diets differing only in FA composition (high SAT, high monounsaturated fatty acid (MUFA) or high polyunsaturated fatty acid (PUFA) content) are able to efficiently influence the distribution of intestinal microbial populations (as phylum and family levels)^{10,11}.

While the effect of diets containing different types of FAs on the microbiota has been extensively studied^{11–14}, wide-ranging research on the effects of gut microbes on fatty acids are comparatively scarce. Changes in the microbiome can be caused by alterations in the FA profile, however, these studies focus mostly on the short-chain fatty acids (SCFAs)¹¹. Intestinal bacteria could also be able to influence the host FA profile in different tissues since some commensal bacteria can generate bioactive isomers: for instance, conjugated linoleic acid can be produced by *Lactobacilli*^{9,15} and *Bifidobacteria*^{15,16} or can produce *trans* fatty acids, such as vaccenic acid^{15,17}. Furthermore, altered gut microbiota, in particular the genera *Prevotella*, *Lactobacillus* and *Alistipes* can increase capacity to produce saturated long chain FAs and thus affect gut motility¹⁸. During fermentation of non-digestible carbohydrates, the gastrointestinal (GI) microbiota produces a wide range of secondary metabolites, among others SCFAs (acetate, propionate, and butyrate)^{19,20}. However, protein fermentation can also contribute to the SCFAs production, but these are mostly branched-chain FAs such as isobutyrate, 2-methylbutyrate and isovalerate^{8–11,21,22}. SCFAs can have diverse functions, like providing energy for both the microbiota and the enterocytes²³. In addition, SCFAs could enter the circulation and exert their additional health-promoting benefits to the host acting as secondary messengers that regulate gene expression and stimulate gut peptides and hormones^{20,22} and they are able to cross the blood–brain barrier²³. The effect of gut microbiota via the SCFAs is therefore not restricted to the GI tract. Recent research showed that changes in gut microbiota could affect the host physiological, behavioral, and cognitive functions^{24–26}, and therefore there is an emerging need to understand the complex effects of the relationship between the specific composition and activity of gut microbiota (at phyla, genus or species level) and the CNS of the host.

The composition and function of the GI microbiota is profoundly influenced by a variety of environmental factors such as genetics of the host, age, smoking, diet, exercise, mode of delivery, geographic location, synthetic chemicals, and antibiotic intake^{27,28}. Furthermore, there are other modulations which can be carried out via dietary interventions, antibiotics (ABx) administration, supplementation of probiotics and fecal microbiota transplantation²⁹, which all have a capacity to highly modulate the composition of the gut microbiota. Both prebiotics (non-digestible food ingredients which can selectively stimulate the growth and/or activity of beneficial bacteria), probiotics (non-pathogenic microbes which have beneficial effects on host) and ABx affect the composition of the gut microbiota without directly affecting the FAs in the gut^{30,31}. Therefore, the changes in host FAs that occur because of the above-mentioned factors are likely to be directly related to the microbiome. These interventions could selectively modulate the microbiome composition depending on the combination of probiotic or prebiotic or the ABx class, dose, and the period of exposure^{30,32}. These microbiome influencing factors provide an opportunity to study the aspects of the modifications of the GI bacteria and the influence of these to the host physiology including immune system, metabolism pathways, hormone activation and behavior³³. Since the literature has mainly focused on the effect of ABx and probiotic treatment on the concentration of fecal SCFAs^{34–36}, but to the best of our knowledge the amount of longer chain and *trans* isomers in feces has not yet been investigated, our aim in the present study was to determine the total FA spectrum. Therefore, the rats were given probiotics, ABx and a combination of these to carry out bacterial alterations without modifying the FA profile of the diet. Our further aim was to compare the time course effects of the different treatments on the total FA spectrum of feces (relative and absolute concentrations of short chain, branched chain, saturated, *trans* and cis mono- and polyunsaturated FAs) via gut bacteria.

Results

Changes in the fecal fatty acid composition

The fatty acid composition of fecal samples from four different study groups (Control, ABx, ABx followed by Probiotics, Probiotics) was analyzed before (1st sample), during (2nd sample) and at the end of the treatments (3rd sample), at a total of three time points per group (Fig. 1). While analyzing the effect of the different treatments on the fatty acid methyl esters (FAMES) (C4:0 to C26:0) in the fecal samples, we observed large differences between the chromatograms of the second and the third samplings (Fig. 2). Most of the major components of fatty acids (C16:0, C18:0, C18:1n-9, C18:2n-6) remained detectable in each treatment group, however, these values were lower in the ABx-treated groups (ABx 2nd and 3rd sample, ABx + probiotic 2nd sample) compared to the ABx-untreated groups (control 2nd and 3rd sample, ABx + Probiotic 3rd sample, Probiotic 2nd and 3rd sample). Furthermore, many saturated, branched-chain saturated, monounsaturated and *trans* fatty acids between

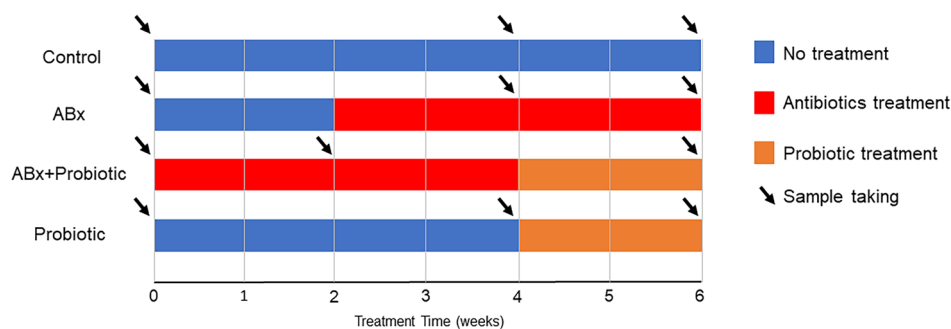


Figure 1. Experimental arrangement of the treatment groups to demonstrate the time and duration of antibiotics and probiotic treatments. ABx: broad-spectrum antibiotics treated group, ABx + Probiotic: broad-spectrum antibiotics- and then probiotic treated group, Probiotic: probiotic treated group, Control: control group without any treatment. Sampling was done three times in each group at the indicated times. First sampling in each group was done at start of the experiment, before treatment was started (baseline data).

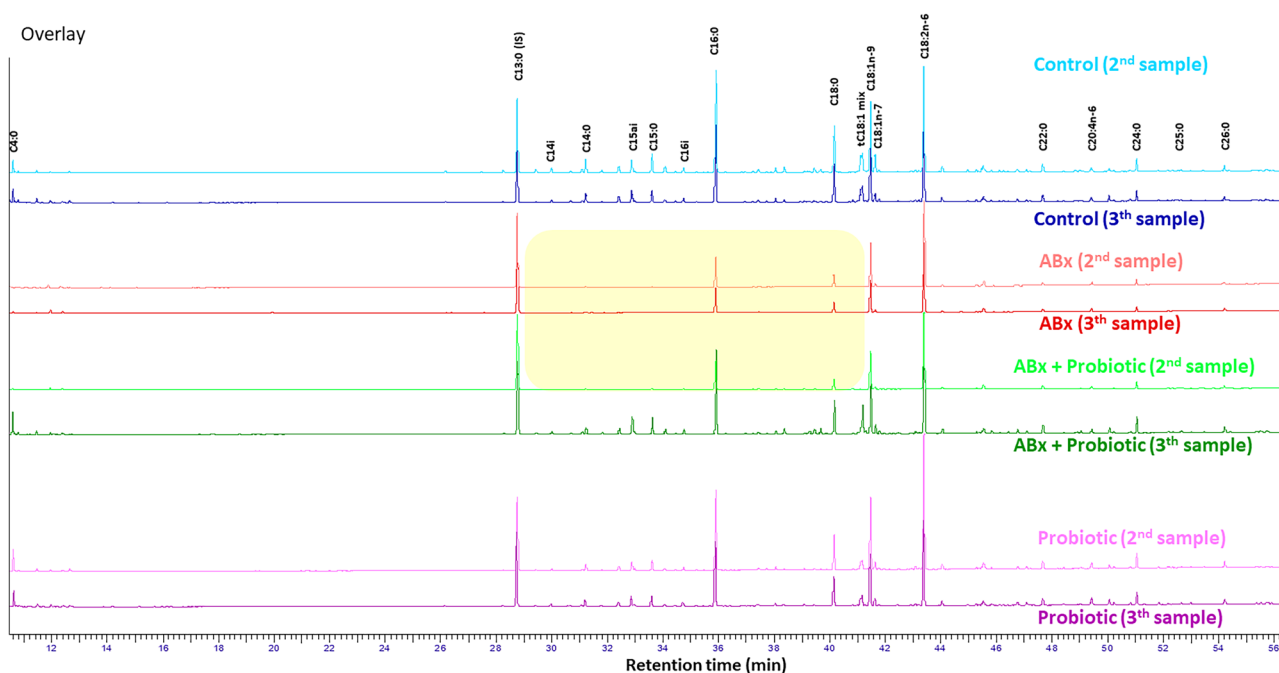


Figure 2. Representative GC chromatograms (from 1–1 identical rat per group) of rat feces between C4:0 and C26:0 fatty acids during the treatments. Chromatograms of fecal samples were graphically normalized to the peak height of the internal standard C13:0.

chain length C14:0–C20:0 were reduced to the limit of detection as a result of ABx treatment (in Fig. 2 shown with yellow background).

A principal component analysis (PCA) was applied to confirm the different characteristics of these chromatograms. This analysis showed that the areas under the chromatogram curve of FAs differed because of the different treatments. The two main principal components (PC1 and PC2) explain 80.1% of the variances of the differences in the chromatograms in the case of the second sampling time. The PCA model clearly separates the samples into two groups. The first group consists of the ABx and the ABx + Probiotic; whereas, the Control and the Probiotic groups are in the second. Although PC1 and PC2 explain only 67.9% of the variances of the differences between the chromatograms in the case of the third sampling time, we can see that the PCA scores of the ABx + Probiotic group are closer to those of the Control and Probiotic groups than those of the ABx group. Whereas the ABx group remains separate from the other groups (Fig. 3).

Mixed model analysis

A nested linear mixed random effect model was used to investigate the differences between the concentrations and the weight percentage ratios of the FA components.

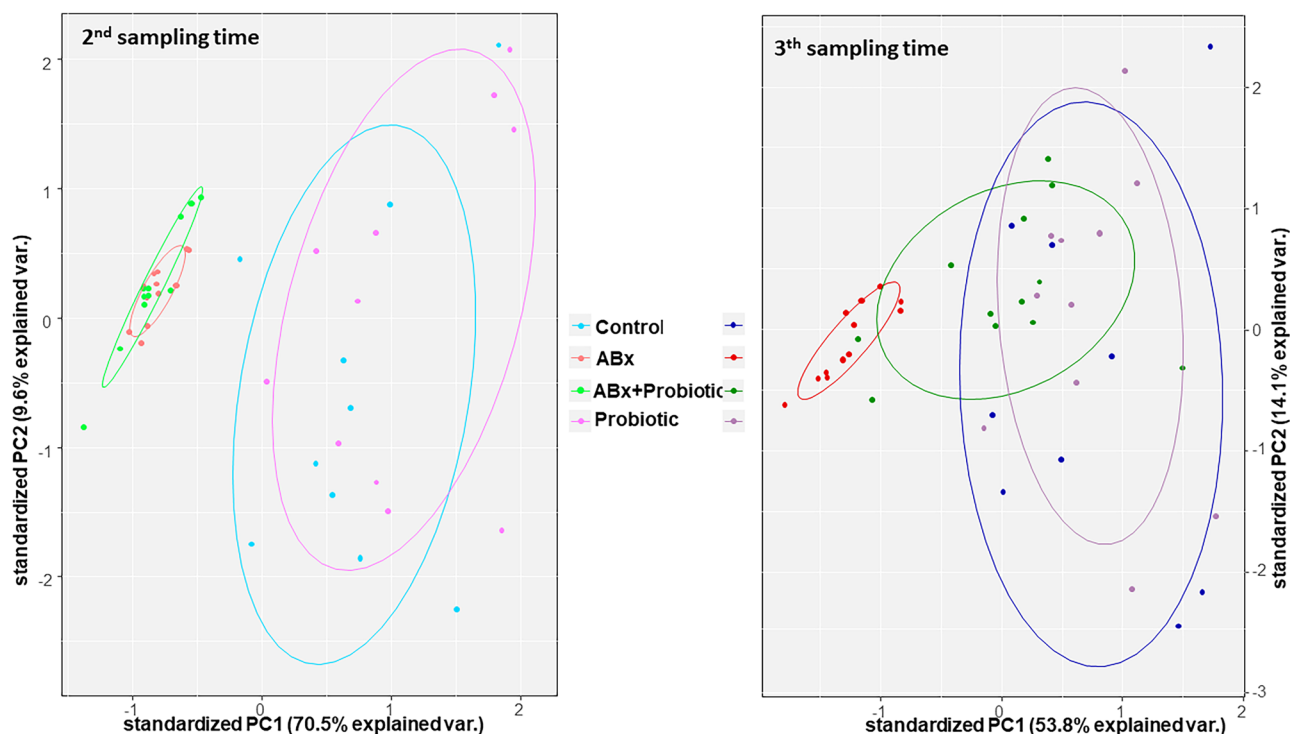


Figure 3. Plots of the two main components (PC1 and PC2) of the principal component analyses. The graphs represent the second and third sampling time, which were made based on the areas under the chromatogram curve data. The colors of the groups correspond to those in the second figure, and the dots represents the rat samples.

The results showed that the main categories of the examined FAs exhibited substantial differences in the parameters we compared (time points of sample taking, treatments and their interactions) both in the analysis of the concentration and weight percentage ratio for total FA content (Table 1). In addition, data of each examined FAs were also analyzed, the results of which are provided in Supplementary Table S1, S2 and S3. There were significant differences between the compared parameters for most FA concentrations tested, indicating that the gut microbiota affected the values of these FAs.

Saturated fatty acids (SAT)

The time points, the treatments and their interaction demonstrated significant differences, indicating that both ABx and subsequent probiotic treatment influenced the concentration (Supplementary Figure S1) and weight percentage ratio (Supplementary Figure S2) of this category (Table 1) suggesting, that GI microbiome played a major role in the production of most of the FAs in this category. Except for C25:0, which only showed tendencies, there were significant differences in the absolute concentrations of FAs between C12:0 and C26:0 between time points, treatment groups and their interaction. This indicates that the treatments were effective in modifying the concentrations of these FAs, in particular, the ABx treatment effectively reduced them, which was subsequently restored after the use of probiotic mixture (Fig. 2 and Supplementary Table S2). For C10:0, there was a significant difference in both absolute and relative concentrations between the time points and treatments, but not in their interaction. This indicates that the ABx treatment reduced the absolute and relative concentration, however, the increase in concentration was not due to the probiotic treatment.

The weight percentage ratios of C14:0, C15:0, C17:0 and C18:0 significantly differed between the time points and between the treatment groups and there was a significant interaction too. Thus, the ABx treatment decreased the weight percentage ratio of these FAs, which the probiotic treatment effectively restored. In the case of weight percent ratio of C26:0, both the time point and the treatment significantly differed, whereas their interaction not. These observed changes were triggered by the administration of the ABx and not the probiotics. (Fig. 1 and Supplementary Table S1–S3).

Short saturated fatty acids (short SATs)

The short saturated fatty acids (short SATs) is a subcategory of SAT, including five FAs (C4:0, C5:0, C6:0, C7:0, C8:0) in this study. This subcategory also presented significant differences in time points, treatments and their interaction, indicating that both FA concentrations (Supplementary Figure S1) and weight percent ratios (Supplementary Figure S2) were modified by the different treatments (Table 1). The absolute concentrations of C4:0, C5:0 and C7:0 differed significantly between the time points and treatment groups with a significant interaction between them. This indicates that ABx treatment effectively reduced the concentration, which was successfully restored after probiotic treatment (Fig. 2 and Supplementary Table S1, S2). The concentrations of C6:0 and C8:0

Fatty acid groups	The nested linear mixed effect model					
	<i>p</i> value for concentrations			<i>p</i> value for weight %		
	Time point	Treatment	Time point x treatment	Time point	Treatment	Time point x treatment
Total FA	1.56×10^{-6}	1.10×10^{-6}	6.91×10^{-7}			
SAT	2.90×10^{-8}	1.21×10^{-13}	3.27×10^{-10}	2.81×10^{-3}	2.20×10^{-11}	4.46×10^{-7}
ShortSAT	5.12×10^{-13}	6.31×10^{-10}	2.54×10^{-10}	6.34×10^{-7}	7.41×10^{-8}	2.11×10^{-3}
Transbranched	1.03×10^{-12}	1.27×10^{-15}	$< 2.20 \times 10^{-16}$	1.54×10^{-6}	2.82×10^{-8}	2.81×10^{-11}
Branched sat	3.58×10^{-11}	$< 2.20 \times 10^{-16}$	$< 2.20 \times 10^{-16}$	1.24×10^{-5}	$< 2.2 \times 10^{-16}$	1.07×10^{-13}
Trans	5.82×10^{-7}	$< 2.20 \times 10^{-16}$	3.55×10^{-14}	2.53×10^{-3}	7.60×10^{-13}	8.06×10^{-8}
cMUFA	8.44×10^{-5}	8.73×10^{-7}	5.80×10^{-4}	0.163	1.14×10^{-6}	6.73×10^{-3}
PUFA	2.04×10^{-2}	3.43×10^{-2}	0.218	1.03×10^{-4}	$< 2.20 \times 10^{-16}$	2.10×10^{-8}
<i>n</i> -6 PUFA	1.94×10^{-2}	3.64×10^{-2}	0.221	1.38×10^{-4}	3.26×10^{-16}	2.23×10^{-8}
<i>n</i> -3 PUFA	4.85×10^{-2}	1.53×10^{-2}	0.214	1.58×10^{-4}	1.78×10^{-14}	9.28×10^{-6}
LCPUFA	2.57×10^{-3}	5.50×10^{-4}	0.127	4.38×10^{-4}	4.49×10^{-6}	1.13×10^{-6}
<i>n</i> -6 LCPUFA	2.62×10^{-3}	5.43×10^{-4}	0.128	4.27×10^{-4}	4.64×10^{-6}	1.09×10^{-6}
<i>n</i> -3 LCPUFA	0.576	0.308	0.797	0.916	0.560	0.915

Table 1. Results of the mixed effect models of the main fatty acids categories. *p*-values of the mixed effects models ($p < 0.05$). Abbreviations denote: saturated fatty acid (SAT): ShortSAT + C9:0 + C10:0 + C11:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C23:0 + C24:0 + C25:0 + C26:0; short saturated fatty acid (ShortSAT): 4:0 + C5:0 + C6:0 + C7:0 + C8:0; Transbranched: Branched Sat + TRANS + (tC16:1n-7 + C17i) + (tC17:1n-7 + C18i); Trans: sum of tC18:1 isomers; Branched saturated fatty acids (Branched Sat): C13ai + C14i + C15i + C15ai + C16i; cis monounsaturated fatty acid (cMUFA): C13:1n-1 + C14:1n-5 + C16:1n-9 + C16:1n-7 + C18:1n-9 + C18:1n-7 + C20:1n-9 + C22:1n-9; polyunsaturated fatty acid (PUFA): *n*-3 PUFA + *n*-6 PUFA; *n*-3 PUFA: C18:3n-3 + *n*-3 LCPUFA, *n*-6 PUFA: C18:2n-6 + *n*-6 LCPUFA long-chain polyunsaturated fatty acid (LCPUFA); *n*-3 LCPUFA + *n*-6 LCPUFA; *n*-3 LCPUFA: C20:5n-3; *n*-6 LCPUFA: C20:2n-6 + C20:3n-6 + C20:4n-6 + C22:4n-6 + C22:5n-6.

significantly differed between both the time point and treatment, whereas their interaction not, so ABx treatment reduced their concentration, but the increase in the concentration was not due to the probiotic treatment.

Significant differences in weight percent between time points, treatments and their interaction were only found for C4:0, while for C6:0 and C8:0 only treatment caused a significant change (Fig. 2 and Supplementary Table S1, S3). In the case of C5:0, both the time point and the treatment significantly differed, whereas, their interaction did not. These observed changes were triggered by the administration of the ABx and not the probiotics. In the case of C6:0 and C8:0, only the treatment showed a significant effect meaning that the ABx treatment reduced their weight percentage ratios, but did not change after the probiotic treatment.

Trans and branched fatty acids

This main category consists of three coelutions (tC17:1n-7 + C18i, tC16:1n-7 + C17i and tC18-1mix) and five branched-chain saturated FAs, which showed large differences. There were significant differences in both concentration (Supplementary Figure S1) and weight percent values (Supplementary Figure S2) between time points, treatments and their interactions, so both the ABx and probiotic treatment effectively altered them (Table 1).

Branched saturated fatty acids (branched SATs)

In this subcategory, all the examined branched SATs (C13ai, C14i, C15i, C15ai and C16i) showed strong significant differences between sampling times, treatments and their interactions in both concentration (Supplementary Figure S1) and weight percentage ratio (Supplementary Figure S2) for total FA. These results suggest that altered gut microbiota due to treatments were responsible for the observed alterations. The ABx treatment significantly decreased the levels of identified branched SATs, while after probiotic administration these values returned (Fig. 2 and Supplementary Table S1, S2 and S3).

Trans fatty acids (TFAs)

The ABx treatment significantly decreased both the concentration (Supplementary Figure S1) and the weight percentage ratio of tC18:1 fatty acids (Supplementary Figure S2), but subsequent probiotic administration was able to increase these levels to the level before the treatments (Fig. 2 and Supplementary Table S1, S2 and S3).

Cis monounsaturated fatty acids (cMUFAs)

In the cMUFAs almost all the parameters tested showed significant differences in both absolute concentration (Supplementary Figure S1) and weight percent ratio (Supplementary Figure S2) indicating that ABx treatment and probiotic administration were the main factors influencing these concentrations (Table 1). In this category we examined 8 cMUFAs (C13:1n-1, C14:1n-5, C16:1n-9, C16:1n-7, C18:1n-9, C18:1n-7, C20:1n-9 and C22:1n-9). Except for C22:1n-9, which showed only tendencies, most of these cMUFAs revealed significant differences in concentration values between time points, treatments, and their interactions. Thus ABx treatment significantly

decreased the concentration levels, while the administration of the probiotics restored them (Fig. 2 and Supplementary Table S1, S2).

However, when evaluating the weight percentage ratio, we found significant effects of time and interaction between time and treatments for only three fatty acids (C13:1n-1, C14:1n-5 and C18:1n-9 FAs). The ABx treatment decreased the weight percent ratio of C13:1n-1 and C14:1n-5, and elevated that of the C18:1n-9. On the other hand, probiotic treatment recovered the weight percent ratios for all three FAs to the original state. (Fig. 2 and Supplementary Table S1, S3).

Polyunsaturated fatty acids (PUFAs)

Significant differences were observed in both concentration (Supplementary Figure S1) and weight percent ratio (Supplementary Figure S2) of PUFAs indicating that the FAs of this category were modified by the different treatments (Table 1, Supplementary Table S1, S2 and S3). The PUFAs were splitted in two subcategories: n-3 PUFAs (α -linolenic acid (C18:3n-3, ALA) and C20:5n-3) and n-6 PUFAs (C18:2n-6, C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6 and C22:5n-6) (Supplementary Table S1). In the weight percent ratio, each investigated parameter showed significant differences, thus ABx treatment decreased levels of both n-3 and n-6 PUFAs, which could successfully recovered after the use of probiotic treatment (Supplementary Figure S2, Supplementary Table S3). In contrast, concentration levels were significantly affected by both time point and treatment, but their interaction not. This indicates that the ABx treatment reduced their concentration, but their increase over time was not dependent on the probiotic treatment (Supplementary Figure S1). A further subcategory within PUFAs is the long chain polyunsaturated fatty acids (LCPUFAs) that also can be divided in 2 subgroups: n-6 LCPUFAs (C20:2n-6, C20:3n-6, C20:4n-6, C22:4n-6 and C22:5n-6) and n-3 LCPUFAs (C20:5n-3) (Supplementary Table S1). The LCPUFAs subcategory and the n-6 LCPUFAs subgroup showed similar results as the PUFAs category in both concentration and weight percent ratios, but there were no significant differences in the n-3 LCPUFAs subgroup (Table 1, Supplementary Figure S1-S2).

As C20:5n-3 did not show significant differences, it can be concluded that C18:3n-3 was the determining FA in the n-3 PUFAs category, showing the same significances in the concentration level as its group, however, in the weight percent ratio differences were noted in the interactions of time points and treatments. Among the n-6 PUFAs subcategory, only two FAs (C20:2n-6 and C20:3n-6) presented significant differences in time points, treatments and their interactions in the concentration levels. In those cases, decreased concentration levels were measured after ABx treatment, and probiotic mixture was able to restore it. On the other hand, weight percent ratios of C18:2n-6 and C20:4n-6 were increased after ABx treatment and the following probiotic administration could efficiently restore these altered states.

Fatty acid composition of the pellets

Since the examined FA composition of the feed was not fully provided, we specified the comprehensive FA composition of the rodent chow (Supplementary Table S4) and compared it with the treatment effects, which is illustrated in Fig. 4. The analysis revealed that out of the examined FAs the MUFAs were present in the highest quantity in the rat feed, alongside PUFAs and SATs. In addition, n-6 PUFAs were more dominant than n-3 PUFAs, and, in these categories, the most prevalent fatty acids were C18:2n-6 and C18:3n-3. Among SATs, the highest quantities observed in the rats' food were for C16:0 and C18:0. Short SATs were present only in a small proportion in the food. No Branched SATs were found in the animal feed. Among MUFAs, C18:1n-9 was the most abundant FA in the pellet. Furthermore, within the category of *TFAs*, *t*C18:1 fatty acids were present, but in a small amount.

The obtained results indicate that the FAs present in the rat feces and their changes resulting from the treatments were not influenced by the FA composition of the feed.

Discussion

In this series of experiments, we induced a change in the GI microbiome with ABx and probiotic treatment to examine changes in fecal FAs. To the best of our knowledge, the present paper is the first report on the role of gut bacteria in a detailed fecal FA spectrum in adult rats.

There is increasing evidence that GI microbiome has a huge impact on regulating fat storage and energy metabolism, helps to absorb minerals and influences FA production^{9,16,18}. Moreover, it plays a crucial role in regulating immune homeostasis, as well as CNS-associated neurophysiological and -psychological functions and behavior^{37,38}. It is worth noting that not only just SCFAs are produced exclusively by bacteria, but also concentration of some FAs with a longer, odd-numbered carbon atoms, such as C15:0 and C17:0, are also affected by the microbiome¹⁸. Furthermore, some microbial species are able to metabolize C18:2n-6 and C18:3n-3⁹ and convert them to conjugated linoleic acids and other *trans* fatty acids such as *trans* vaccenic acid (C18:1n-7t)¹⁷.

As the composition of the microbiome can be influenced by early colonization and a number of other environmental factors^{27,28}, the present study included rats born at the same time in the same place with the same genetic background, consuming the same food, and were randomly assigned to groups before the treatments. Thus, we assume that microbiota composition did not differ significantly between the groups of animals before the start of the experiment.

To investigate the effect of the microbiome on FA production we selected an ABx treated animal model. This wide spectrum, high dose treatment was able to deplete some gut bacterial community^{39,40}, providing us a good opportunity to examine the bacterial effect on the whole FA spectrum in adulthood. ABx treatment can provoke extensive dysbiosis and the disappearance of SCFAs confirm the vanishing of the gut bacteria^{34,36}. It is well known that fecal SCFAs are produced by the gut microbiota⁸⁻¹¹, but our current results suggest that many other important saturated and unsaturated FAs across the entire FA spectrum are also produced by GI bacteria.

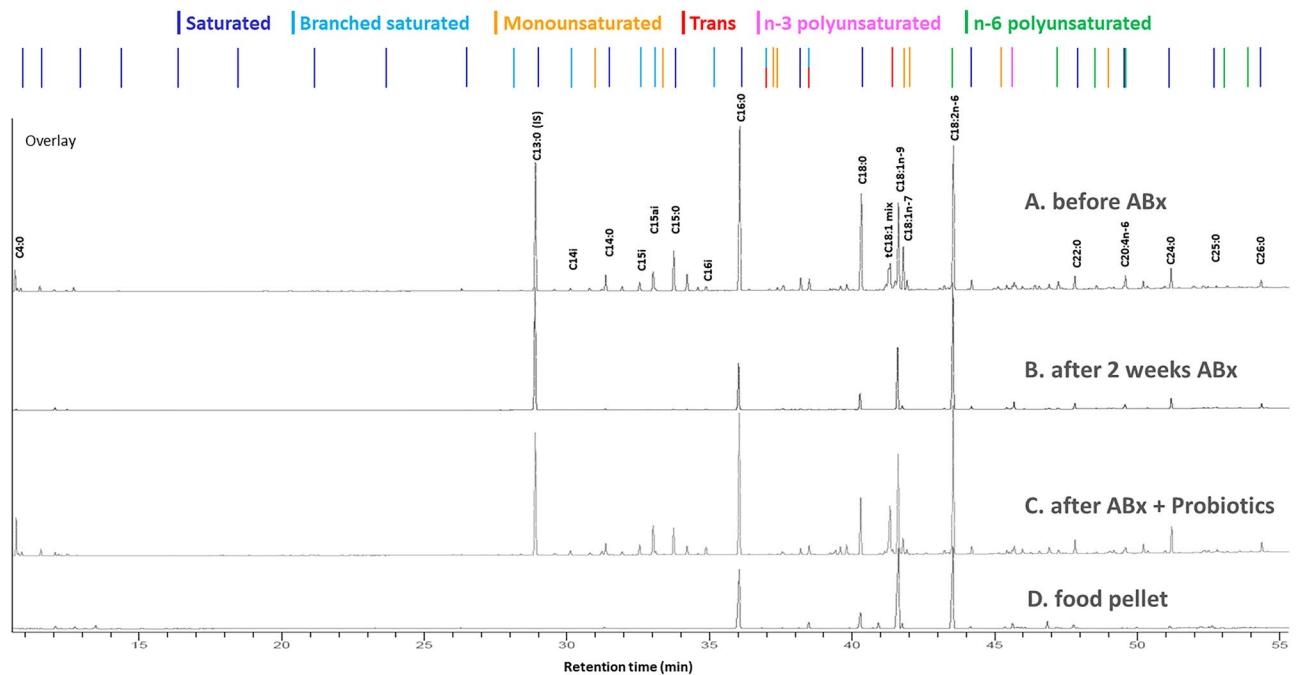


Figure 4. Changes in the chromatograms of fatty acids between C4:0 and C26:0 in the feces of a treated rat from the ABx + Probiotic group at baseline (A), after two weeks of antibiotic treatment (B), then after probiotic treatment (C) and the chromatogram of dry rodent food (D). In the upper part of the figure, the order of the individual fatty acids is indicated by colors corresponding to the different fatty acids families (dark blue: saturated, light blue: branched saturated, orange: monounsaturated, red: trans, pink: n-3 polyunsaturated, and green: n-6 polyunsaturated fatty acids). The chromatograms of fecal samples were graphically normalized to the peak height of the internal standard C13:0.

Previous studies have shown, that gut microbes play major role in the production of short SATs, of which C4:0 and C5:0 are the most important and play a critical role in both peripheral and central functions being involved in anti-inflammatory effects and playing a beneficial role in a variety of diseases^{41,42}. Within the longer chain SATs, our finding revealed that the majority of these FAs are produced by intestinal bacteria, and not just those with odd-numbered carbon atoms as would be assumed based on former studies. Interestingly, C16:0 also showed reduced concentration after ABx treatment despite being one of the main FA components of the rodent's chow. The amount of all determined branched SATs was also significantly reduced after ABx treatment, confirming the finding of a recent study that branched saturated FAs originate from bacterial degradation of proteins⁴³ and that lack of bacteria may generate the absence of branched SATs, that may be present in several metabolic disorders⁴⁴. Although previous studies have shown that bacteria are the primary producers of branched-chain fatty acids, the extent of their absorption in the human body and their fate remains unclear. These fatty acids are present in various human tissues in a low concentration and may have metabolic health benefits, including lipid-lowering, and anti-inflammatory properties^{3,45}. However, extensive research is still needed to understand their mechanism of action.

The majority of the analyzed cMUFAs were decreased after ABx treatment suggesting that the GI microbiome is responsible for the production of these FAs. However, there is no data on whether cMUFAs produced in the gut has any effect on health, or whether cMUFAs in the gut are not due to dietary intake, i.e., produced by gut bacteria.

The investigated n-3 PUFAs and most of the n-6 PUFAs, such as C18:2n-6, which was present in higher amounts in the rodents' chow, did not show a decrease in their concentration after ABx treatment, corroborating the common assumption that these FAs are greatly modulated by dietary intake^{46,47}. Among the minor components, there was a slight reduction in the concentrations of C22:4n-6 and C22:5n-6 however, we assume that these differences are actually due to their low concentrations. Surprisingly, the concentrations of C20:2n-6 and C20:3n-6 were also influenced by gut bacteria. Although so far only a few studies have investigated the relationship between the microbiome and these n-6 PUFAs in rumen fluid, plasma, and hepatic cells⁴⁸⁻⁵⁰, we could demonstrate a similar but only partial relationship, that the microbiome is responsible for the production of C20:2n-6 and C20:3n-6 in the gut, and not the dietary intake.

In our study, we determined not only absolute but also relative concentration changes. Our results showed, that in the majority of FAs both concentrations decreased after two weeks of ABx treatment. However, for weight percent, some FAs required a relative increase, such as in our case C20:4n-6 and C18:1n-9, while their absolute concentration also decreased after ABx treatment, so the contradiction between the two results is only apparent.

In this study, two weeks of broad-spectrum ABx treatment was sufficient to greatly reduce GI bacteria. Therefore, it would be important to prevent the adverse side effects of intensive ABx medication, including altered fecal FA distribution. We used our probiotic mixture because it contained bacterial populations with health-promoting

effects, such as *Lactobacillus spp.*, most strains of which have great potential to reduce inflammation and alleviate ABx-induced GI side effects^{51–53}, and *Bifidobacterium spp.*, which also have immunomodulatory effects and can be beneficial to the digestive and even the nervous system^{52,54,55}. In addition, our aim was to restore the gut microbiota in a short time and to study the effect of this probiotic mixture on the detailed FA spectrum. As we hypothesized, probiotic administration was able to initiate the reestablishment of bacterial populations and promoted changes in the concentration of several FAs. Our results confirmed, that ABx treatment decreases the concentration of fecal SCFAs, whereas the following probiotic treatment (including *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains) increases both the concentration of these FAs and fecal bacterial abundance and diversity³⁵. However, our mixture was unable to restore the concentration of each FA to baseline. We hypothesized that in these cases (C6:0, C10:0, C11:0, C16:1n-9 and C16:1n-7) other bacterial genus species or additional microbial interactions may be involved, and accordingly, we confirmed that *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.*, were clearly not responsible for the production of these FAs. Nevertheless, most of the FAs, whose concentrations had been altered by the microbiome depletion, returned to their initial state after probiotic administration, which confirmed that *Bifidobacterium spp.* and *Lactobacillus spp.* were able to induce the production of these FAs or perhaps they interacted with other bacteria to cause this change, which is a currently existing phenomenon⁵⁶. Research lately has begun to explore the possible relationship between the microbiome and fecal metabolites, such as FAs. A recent study showed a strong positive correlation between *Lactobacillus* strains and fecal C18:2n-6 and C12:0 in a rat model of short bowel syndrome, while other bacterial strains (e.g. *Ruminococcus*) showed a negative correlation⁵⁷. Based on our results, we hypothesized that our probiotic mixture had a crucial role in the production of branched SATs, most SATs and even several MUFAs, and PUFAs, and therefore, by administering these strains after ABx treatment, a significant part of the fecal FA spectrum could be restored. The fact, that the weight percent ratios were also restored means that the probiotic administration may have contributed to the changes in these proportions in the proper direction. Since all groups of animals were fed the same diet with the same FA composition, it can be assumed that any FAs whose concentrations changed during the treatments were produced by the gut bacteria and not derived from the diet.

The used microbiome alterations and the study design allowed us to determine the influence of the intestinal bacteria on the fecal FA composition, however, the present study has several strengths and limitations.

One strength of this paper is that the rats included in this study were of the same age and sex at the start of the study, so the confounding effects of age and sex were excluded, and the litter effect was also statistically corrected. Another strength is that, contrary to previous studies, not only SCFAs but the full spectrum of FAs was determined from stool samples. Since we also determined the FA composition of the food pellet, we confirmed that most of the determined FAs are not derived from the diet but are the result of gut bacterial metabolism.

On the other hand, this study has several limitations. First, we did not determine the gut microbiota present in fecal samples. Thus, our results only indirectly indicate the effect of gut microbiota on the FA composition of feces. Based on the results of previous highly extensive studies^{31,32,35} we can say that the ABx treatment we used also greatly reduced the intestinal microbiota³⁹, which returned after the probiotic treatment. However, we cannot say which strains are responsible for the changes or whether there is a change in the composition of the microbiome before and after ABx and probiotics treatment. The use of a broad-spectrum treatment consisting of several types of ABx can also be a limiting factor, as different strains of gut bacteria react differently to various ABx^{31,32}. However, the purpose of the present study was primarily to investigate the effect of a great reduction of gut microbiota, which was best accomplished with a broad-spectrum ABx mixture³⁹. Thus, further systematic studies are necessary to understand more extensively the role of the microbiome on the FAs production and simultaneously deeper comprehending the relationship between these mechanisms and how they affect the physiological functions.

This is one of the first papers to analyze the role of gut bacteria on the detailed FA composition of stool samples from adult rats. The results demonstrated that, in addition to SCFAs, a number of other saturated and unsaturated FAs as well as *trans* and branched-chain saturated FAs are determined by gut bacteria in rat stool. To the best of our knowledge, this study is among the first ones to demonstrate that ABx treatment reduces the concentration of FAs in rat feces and that a specific probiotic mixture can restore this disturbed FA spectrum. Thus, this study not only provides evidence for the role of intestinal bacteria in the production of specific FAs, but it also supports a new approach to treat disorders resulting from a shift in the ratio and concentration of FAs. In conclusion, this study provides preliminary evidence that the gut microbiome appears to have a greater influence on both the quantitative and qualitative FA composition of feces than previously thought and that certain specific probiotic bacterial combinations are able to effectively restore the healthy feces conditions, indicating the potential therapeutic value of these probiotics.

Methods

Animals

In the present study, in total, 44 male Wistar laboratory rats were used (10 weeks old at the beginning of treatment)³⁶. To exclude sex as an additional independent variable, only male rats were used in this research. Animals were kept individually in a temperature- and light-controlled room (12:12 h light–dark cycle; 21 ± 2 °C; humidity 55–60%). All experimental groups received the same laboratory food pellets (LT/R standard rodent food pellet, Innovo Kft, Isaszeg, Hungary) (Supplementary Table S5) and tap water ad libitum. The animals were cared for in accordance with the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary ((BA02/2000–07/2023 Pécs University, Medical School; Hungarian Government Decree, 40/2013. (II. 14.); NIH Guidelines, 1997; European Community Council Directive 86/609/EEC 1986, 2006; European Directive 2010/63/EU of the European Parliament). The present study is reported in accordance with ARRIVE guidelines.

The ABx treated groups were given broad-spectrum ABx mixture for 4 weeks (10 weeks old at the beginning of treatment) to greatly reduce the gut microbiota³⁹. The ABx mixture was dissolved in their drinking water and comprised of ampicillin (1 g/L), vancomycin (500 mg/L), ciprofloxacin HCl (20 mg/L), imipenem (250 mg/L) and metronidazole (1 g/L). The probiotic receiving groups were given our specific probiotics mixture (PM) via oral gavage every day for 2 weeks. It contained four beneficial bacterial species (*Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*) of specified cfu/d (colony forming units/day). This mixture is proprietary knowledge licensed by the University of Pécs (422.lbh.5.(2019.09.05)). The strains were provided by the Leibniz Institute, DSMZ-German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH, Germany. After the strains were received in freeze-dried form, we started to cultivate them. *Lactobacillus spp.* strains were cultivated in 100–100 mL liquid Rogosa medium (OXOID Ltd. UK) for 2 nights at 37 °C in a shaker incubator at 200 rpm. Then the fluids were centrifuged at 4 °C with 5.000 rpm for 5 min. The sediment was resuspended in physiological saline solution till reaching the final volume. *Bifidobacterium spp.* strains were cultivated on fastidious anaerobic agar CE plates and broth (Neogen Europe Ltd. UK). Anaerobic conditions were produced in an anaerobic jar with GENbag anaer (BioMérieux SA France). After 2 days of cultivation, the colonies from the plates were collected by loop and resuspended in physiological saline solution till reaching the final volume. The prebiotic mixture was produced from day to day shortly before its use in experiment. More details about the cultivation can be found in our previous publication³⁶. Throughout the whole experiment water and food consumption were measured every day. Fresh fecal pellets were collected under controlled conditions before and after the treatments to monitor the changes of the FAs. The samples were collected at three different times (before, during and after treatments) in each group (Fig. 1).

Fatty acid analysis

The feces samples were analyzed by the slightly modified method of Lopez-Lopez⁵⁸. From each sample, approximately 100 mg fecal content was placed in 16 × 125 mm test tubes sealed with Teflon-lined caps. We added 40 µl solution containing 60 mg methyl tridecanoate (C13:0) in 20 ml of n-hexane to each tube with the sample. We added 3 ml of methanol:hexane 4:1 (V/V) and 1–2 mg pyrogallol to the samples, then these samples were frozen for half an hour. 300 µl of acetyl chloride was slowly added to the frozen samples. The tubes were subjected to methanolysis at 100 °C for 1 h. After the tubes cooled down, 5 ml of 6% K₂CO₃ solution was slowly added to stop the reaction and to neutralize the mixture. The tubes were vortex-mixed and centrifuged at 3000 × g for 10 min. The supernatant hexane layer was then transferred to a 2 ml screw-top vial with a micropipette. After this step, hexane was added until reaching the liquid level of 1 ml. The samples were stored in a –80 °C freezer until injection into the gas chromatograph (GC).

The FA analyses were carried out on a PerkinElmer Clarus 690 gas chromatograph with a flame ionization detector (PerkinElmer, USA) fitted with a Rt-2560 capillary column (100 m × 0.25 mm i.d. × 0.20 µm film thickness, Restek). Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.3 ml/min. The injection port was adjusted at 225 °C and split injection mode was used, the injection ratio was 20:1. The injection volume was 2 µl. The detector temperature was 300 °C. The initial oven temperature was 100 °C held for 4 min and ramped up to 250 °C at 3 °C/min and held for 25 min.

The fatty acid methyl esters (FAMES) were analyzed based on the area under the curve calculated using TotalChrom software by PerkinElmer. Fatty acid identification was based on the retention times of external standards (PUFA3 (Supelco, St. Louis, MO, USA); GLC-674, -642, -643, -569b, -481, and -473 (Nu-Check-Prep, Elysian, MN, USA); C16:1n-9-ME (Larodan AB, Solna, Sweden) and The Bacterial Acid Methyl Esters CP Mixture (Matreya LLC., State College, PA, USA), Supplementary Table S6). The peaks were identified by comparing them with authentic mixtures of the weighed FAME methyl ester. The individual FA response factors determined from these weighed standards and the percentage area under the curve (relative concentration; w/w%) were used to calculate the weight percentage of each determined FA⁵⁹. The quantification of the FA concentrations of wet feces was based on the tridecanoic acid, as internal standard (absolute concentration; µg FA /100 mg wet feces).

Statistics

For classifying the sample's GC chromatograms Principal Component Analysis (PCA) was applied. The input data for the PCA was the area under the curve of the components. PCA transforms data into a lower dimensional space by converting the data to a new, orthogonal coordinate system called principal components (PCs). PCs are sorted according to the amount of variance captured, in such a way that those that have similar variance occur near one another. If the chemical variations are similar, their scores should be close to each other on a plot of PC1 against PC2. The PCA model was fitted using Eigen value decomposition method.

To detect the effect of the treatments in time on the FA composition and concentration we applied a nested linear mixed random effect model, where the ID of the rats were used as a random factor and the nested effect was the litter. In case of modeling the changes in the concentrations we used log transformation to ensure a proper model fit. In all models we used the time point of the sample taking, treatments and their interaction as explanatory factors and the models were adjusted to the baseline values. The input data for the mixed model were the calculated concentration on the log scale and the calculated percentage of FAs. The models were fitted by using the Restricted Maximum Likelihood (REML) approach and the estimates were given with the Satterthwaite's method.

All analyses were done with R statistical software (version 4.2.1; packages:lme4, lmerTest; R Core Team, Vienna, Austria)^{60,61}. A result was set as significant if the *p* value was under 0.05.

Ethical approval

All animal experiments were conducted according to federal and local ethical guidelines, and the protocols were approved by the National Scientific Ethical Committee on Animal Experimentation of Hungary

((BA02/2000–07/2023, Pécs University, Medical School; Hungarian Government Decree, 40/2013. (II. 14.); NIH Guidelines, 1997; European Community Council Directive 86/609/EEC 1986, 2006; European Directive 2010/63/EU of the European Parliament). The present study is reported in accordance with ARRIVE guidelines.

Consent for publication

All authors have read the manuscript and approved to be co-authors on the manuscript and have substantial contribution in the manuscript.

Data availability

We confirm that all information is included in the manuscript or in the supplementary information files.

Received: 10 November 2023; Accepted: 13 March 2024

Published online: 19 March 2024

References

- Zárate, R., Jaber-Vazdekis, N., Tejera, N., Pérez, J. A. & Rodríguez, C. Significance of long chain polyunsaturated fatty acids in human health. *Clin. Trans. Med.* <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0153-6> (2017).
- Rustan, A. C. & Dreven, C. A. Fatty Acids: Structures and Properties. In *Encyclopedia of Life Sciences* (John Wiley and Sons, Ltd., Chichester, 2005). <https://doi.org/10.1038/npg.els.0003894>.
- Taormina, V. M., Unger, A. L., Schiksnis, M. R., Torres-Gonzalez, M. & Kraft, J. Branched-chain fatty acids—an underexplored class of dairy-derived fatty acids. *Nutrients* <https://doi.org/10.3390/nu12092875> (2020).
- Nakamura, M. T., Yudell, B. E. & Loo, J. J. Regulation of energy metabolism by long-chain fatty acids. *Prog. Lipid Res.* **53**, 124–144. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.12.001> (2014).
- Flock, M. R. & Kris-Etherton, P. M. Diverse physiological effects of long-chain saturated fatty acids. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* **16**, 133–140. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e328359e6ac> (2013).
- Baker, E. J., Yusof, M. H., Yaqoob, P., Miles, E. A. & Calder, P. C. Omega-3 fatty acids and leukocyte-endothelium adhesion: Novel anti-atherosclerotic actions. *Mol. Aspects Med.* **64**, 169–181. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.08.002> (2018).
- de Bus, I., Witkamp, R., Zuillhof, H., Albada, B. & Balvers, M. The role of n-3 PUFA-derived fatty acid derivatives and their oxygenated metabolites in the modulation of inflammation. *Prostaglandins Other Lipid Med.* <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2019.106351> (2019).
- Kuziel, G. A. & Rakoff-Nahoum, S. The gut microbiome. *Curr. Biol.* **32**, R257–R264. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2022.02.023> (2022).
- Fu, Y. *et al.* Associations among dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids, the gut microbiota, and intestinal immunity. *Mediators Inflamm.* **1–11**, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/8879227> (2021).
- Robertson, R. C. *et al.* Maternal omega-3 fatty acids regulate offspring obesity through persistent modulation of gut microbiota. *Microbiome* <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0476-6> (2018).
- Patterson, E. *et al.* Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. *Br. J. Nutr.* **111**, 1905–1917. <https://doi.org/10.1017/s0007114514000117> (2014).
- Zhuang, P. *et al.* Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids differentially alter gut microbiome and reverse high-fat diet-induced insulin resistance. *Mol. Nutr. Food Res.* <https://doi.org/10.1002/mnfr.201900946> (2020).
- Wood, K. E., Mantzioris, E., Gibson, R. A., Ramsden, C. E. & Muhlhauser, B. S. The effect of modifying dietary LA and ALA intakes on omega-3 long chain polyunsaturated fatty acid (n-3 LCPUFA) status in human adults: A systematic review and commentary. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **95**, 47–55. <https://doi.org/10.1016/j.plefa.2015.01.001> (2015).
- Dahl, W. J., Rivero Mendoza, D. & Lambert, J. M. Diet, nutrients and the microbiome. In *The Microbiome in Health and Disease Progress in Molecular Biology and Translational Science* 237–263 (2020). <https://doi.org/10.1016/bs.pmbts.2020.04.006>.
- O’Shea, E. F., Cotter, P. D., Stanton, C., Ross, R. P. & Hill, C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int. J. Food Microbiol.* **152**, 189–205. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.05.025> (2012).
- Wall, R. *et al.* Metabolic activity of the enteric microbiota influences the fatty acid composition of murine and porcine liver and adipose tissues. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 1393–1401. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2008.27023> (2009).
- Druart, C. *et al.* Role of the lower and upper intestine in the production and absorption of gut microbiota-derived PUFA metabolites. *PLoS ONE* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087560> (2014).
- Zhao, L. *et al.* Saturated long-chain fatty acid-producing bacteria contribute to enhanced colonic motility in rats. *Microbiome* <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0492-6> (2018).
- Peng, M. & Biswas, D. Short chain and polyunsaturated fatty acids in host gut health and foodborne bacterial pathogen inhibition. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57**, 3987–4002. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1203286> (2016).
- Alexander, C., Swanson, K. S., Fahey, G. C. & Garleb, K. A. Perspective: Physiologic importance of short-chain fatty acids from nondigestible carbohydrate fermentation. *Adv. Nutr.* **10**, 576–589. <https://doi.org/10.1093/advances/nmz004> (2019).
- Smith, E. A. & Macfarlane, G. T. Dissimilatory amino Acid metabolism in human colonic bacteria. *Anaerobe* **3**, 327–337. <https://doi.org/10.1006/anae.1997.0121> (1997).
- Koh, A., De Vadder, F., Kovatcheva-Datchary, P. & Bäckhed, F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. *Cell* **165**, 1332–1345. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.041> (2016).
- Holscher, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* **8**, 172–184. <https://doi.org/10.1080/19490976.2017.1290756> (2017).
- Wang, H.-X. & Wang, Y.-P. Gut Microbiota-brain Axis. *Chin. Med. J.* **129**, 2373–2380. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.190667> (2016).
- Silva, Y. P., Bernardi, A. & Frozza, R. L. The role of short-chain fatty acids from gut microbiota in gut-brain communication. *Front. Endocrinol.* <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.00025> (2020).
- Mayer, E. A., Knight, R., Mazmanian, S. K., Cryan, J. F. & Tillisch, K. Gut microbes and the brain: Paradigm shift in neuroscience. *J. Neurosci.* **34**, 15490–15496. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.3299-14.2014> (2014).
- Lee, K. H., Song, Y., Wu, W., Yu, K. & Zhang, G. The gut microbiota, environmental factors, and links to the development of food allergy. *Clin. Mol. Allergy* <https://doi.org/10.1186/s12948-020-00120-x> (2020).
- Gomaa, E. Z. Human gut microbiota/microbiome in health and diseases: a review. *Antonie van Leeuwenhoek* **113**, 2019–2040. <https://doi.org/10.1007/s10482-020-01474-7> (2020).
- Sasmata, A. O. Modification of the gut microbiome to combat neurodegeneration. *Rev. Neurosci.* **30**, 795–805. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2019-0005> (2019).

30. Pandey, K. R., Naik, S. R. & Vakil, B. V. Probiotics, prebiotics and synbiotics—a review. *J. Food Sci. Technol.* **52**, 7577–7587. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1921-1> (2015).
31. Langdon, A., Crook, N. & Dantas, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. *Genome Med.* <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0294-z> (2016).
32. Iizumi, T., Battaglia, T., Ruiz, V. & Perez Perez, G. I. Gut Microbiome and Antibiotics. *Arch. Med. Res.* **48**, 727–734. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2017.11.004> (2017).
33. Moloney, R. D., Desbonnet, L., Clarke, G., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. The microbiome: stress, health and disease. *Mammalian Genome* **25**, 49–74. <https://doi.org/10.1007/s00335-013-9488-5> (2013).
34. Zhao, X. *et al.* Sensitive and simplified detection of antibiotic influence on the dynamic and versatile changes of fecal short-chain fatty acids. *Plos One* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167032> (2016).
35. Pauline, M. *et al.* Probiotic treatment vs empiric oral antibiotics for managing dysbiosis in short bowel syndrome: Impact on the mucosal and stool microbiota, short-chain fatty acids, and adaptation. *J Parenter. Enteral Nutr.* **46**, 1828–1838. <https://doi.org/10.1002/jpen.2377> (2022).
36. Mintál, K. *et al.* Novel probiotic treatment of autism spectrum disorder associated social behavioral symptoms in two rodent models. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-022-09350-2> (2022).
37. Kao, A. C. C., Hartly, S. & Burnet, P. W. J. in *Gut Microbiome and Behavior International Review of Neurobiology* 21–48 (2016).
38. Borre, Y. E., Moloney, R. D., Clarke, G., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. The Impact of Microbiota on Brain and Behavior: Mechanisms & Therapeutic Potential. In *Microbial Endocrinology: The Microbiota-Gut-Brain Axis in Health and Disease Advances in Experimental Medicine and Biology* Ch. 17, 373–403 (2014). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0897-4_17.
39. Hoban, A. E. *et al.* Behavioural and neurochemical consequences of chronic gut microbiota depletion during adulthood in the rat. *Neuroscience* **339**, 463–477. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2016.10.003> (2016).
40. Babu, A. K. S. *et al.* Gut microbiota depletion using antibiotics to investigate diet-derived microbial metabolites: An efficient strategy. *Mol. Nutr. Food Res.* <https://doi.org/10.1002/mnfr.202300386> (2024).
41. Yuille, S., Reichardt, N., Panda, S., Dunbar, H. & Mulder, I. E. Human gut bacteria as potent class I histone deacetylase inhibitors in vitro through production of butyric acid and valeric acid. *Plos One* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201073> (2018).
42. Chen, R. *et al.* Transplantation of fecal microbiota rich in short chain fatty acids and butyric acid treat cerebral ischemic stroke by regulating gut microbiota. *Pharmacol. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.104403> (2019).
43. Trefflich, I., Dietrich, S., Braune, A., Abraham, K. & Weikert, C. Short- and branched-chain fatty acids as fecal markers for microbiota activity in vegans and omnivores. *Nutrients* <https://doi.org/10.3390/nu13061808> (2021).
44. Choi, B. S. Y. *et al.* Feeding diversified protein sources exacerbates hepatic insulin resistance via increased gut microbial branched-chain fatty acids and mTORC1 signaling in obese mice. *Nat. Commun.* <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23782-w> (2021).
45. Gozdik, P., Magkos, F., Sledzinski, T. & Mika, A. Monomethyl branched-chain fatty acids: Health effects and biological mechanisms. *Progress in Lipid Research* **90**, ARTN 101226 <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2023.101226> (2023).
46. Schuchardt, J. P., Huss, M., Stauss-Grabo, M. & Hahn, A. Significance of long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFAs) for the development and behaviour of children. *Eur. J. Pediatrics* **169**, 149–164. <https://doi.org/10.1007/s00431-009-1035-8> (2009).
47. Kulkarni, A., Zhao, A., Yang, B., Zhang, Y. & Linderborg, K. M. Tissue-specific content of polyunsaturated fatty acids in (n-3) deficiency state of rats. *Foods* <https://doi.org/10.3390/foods11020208> (2022).
48. Di Rienzi, S. C. *et al.* The microbiome affects liver sphingolipids and plasma fatty acids in a murine model of the Western diet based on soybean oil. *J. Nutr. Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2021.108808> (2021).
49. Albouery, M. *et al.* Soluble fiber inulin consumption limits alterations of the gut microbiota and hepatic fatty acid metabolism caused by high-fat diet. *Nutrients* <https://doi.org/10.3390/nu13031037> (2021).
50. Xu, C. *et al.* Multi-omics analysis reveals a dependent relationship between rumen bacteria and diet of grass- and grain-fed yaks. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.642959> (2021).
51. Aghamohammad, S. *et al.* Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of *Lactobacillus* spp. as a preservative and therapeutic agent for IBD control. *Immunity, Inflammation and Disease* **10**, <https://doi.org/10.1002/iid3.635> (2022).
52. Kaźmierczak-Siedlecka, K., Roviello, G., Catalano, M. & Polom, K. Gut microbiota modulation in the context of immune-related aspects of *Lactobacillus* spp. and *Bifidobacterium* spp. *Gastrointestinal Cancers. Nutrients* <https://doi.org/10.3390/nu13082674> (2021).
53. Ng, Q. X. *et al.* Use of *Lactobacillus* spp. to prevent recurrent urinary tract infections in females. *Med. Hypotheses* **114**, 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2018.03.001> (2018).
54. Cui, S. & Hu, Y. Multistrain probiotic preparation significantly reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a double-blind placebo-controlled study. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **5**, 238–244 (2012).
55. He, B.-L., Xiong, Y., Hu, T.-G., Zong, M.-H. & Wu, H. *Bifidobacterium* spp. as functional foods: A review of current status, challenges, and strategies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2054934> (2022).
56. Zhang, D. *et al.* Fecal microbiota and its correlation with fatty acids and free amino acids metabolism in piglets after a *Lactobacillus* strain oral administration. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00785> (2019).
57. Huang, Y., Jiao, J., Yao, D., Guo, F. & Li, Y. Altered fecal microbiome and metabolome profiles in rat models of short bowel syndrome. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1185463> (2023).
58. López-López, A., Castellote-Bargalló, A. I. & López-Sabater, M. C. Comparison of two direct methods for the determination of fatty acids in infant feces. *Anal. Biochem.* **282**, 250–255. <https://doi.org/10.1006/abio.2000.4616> (2000).
59. Szabó, É. *et al.* trans Octadecenoic acid and trans octadecadienoic acid are inversely related to long-chain polyunsaturates in human milk: results of a large birth cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.* **85**, 1320–1326. <https://doi.org/10.1093/ajcn/85.5.1320> (2007).
60. Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B. & Christensen, R. H. B. lmerTest Package: Tests in linear mixed effects models. *J. Stat. Softw.* **82**, <https://doi.org/10.18637/jss.v082.i13> (2017).
61. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. Fitting linear mixed-effects models Using lme4. *J. Stat. Softw.* **67**, <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01> (2015).

Author contributions

T.M. made contributions to the data acquisition and G.C. analysis, drafted the work and was a major contributor in writing the manuscript. K.M. designed the experiments, performed the experiments, interpreted the results and was a major contributor in writing the manuscript. N.F. performed the statistical analysis, interpreted the data and was a contributor in writing the manuscript. Z.S. was a contributor in statistical analysis. L.M. was a contributor in statistical analysis. É.S. integrated the data, interpreted the results and was a major contributor in writing the manuscript. A.T. made substantial contributions to design of the work. B.K. contributed to design of the work and the implementation of the experiments, provided the probiotic mixture. K.K. contributed to the implementation of the experiments. E.H. contributed to the implementation of the experiments, took part in the care of the animals. L.L. made contributions to the conception and substantively revised the manuscript. Z.K. made contributions to the conception and substantively revised the manuscript. A.B. made contributions

to the conception, interpreted the results and was a major contributor in writing the manuscript. All authors discussed the results and commented on the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding

Open access funding provided by University of Pécs. This work was supported by Proof of Principle PTE/101413-1/2019 (KM), EFOP-3.6.1-16--2016-00004 (ZK, KM, AT); EFOP-VEKOP EFOP-3.6.3-VEKOP-16--2017-00009 (AT, ZK, KM); TKP2 (LL, AT, ZK).

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57046-6>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to É.S.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024