

## К ВОПРОСУ О ДИАГНОСТИКЕ РАССТРОЙСТВ АУТИСТИЧЕСКОГО СПЕКТРА У ДЕТЕЙ С ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

А.Е. Яковенко

Санкт-Петербургский государственный педиатрический медицинский университет  
Лаборатория микробной хроматографии

*Актуальность.* Распространенность заболевания расстройств аутистического спектра в мире составляет около 1%. Аутизм чаще встречается у мужчин, чем у женщин, и часто встречаются сопутствующие заболевания (более 70% имеют сопутствующие заболевания) [1]

*Расстройства аутистического спектра (РАС)* – это группа гетерогенных неврологических состояний, характеризующаяся ранней манифестацией нарушений социального общения и ограниченным, стереотипным поведением, интересами или деятельностью. Распространенность РАС в мире составляет около 1% [2, 3]; симптомы, как правило, отчетливо выявляются в возрасте 2 лет. В 70% случаев у детей с РАС имеются сопутствующие заболевания [4]. Так, гастроинтестинальные функциональные нарушения ЖКТ у детей с РАС встречаются в 4 раза чаще, чем у нейротипичной популяции).[5] Изучение механизмов, влияющих на ось кишечник-мозг, может приблизить нас к пониманию этиологии аутизма.

*Цель.* Оценить состояние пристеночного микробиома у детей с РАС посредством газовой хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров крови, определить вероятные триггеры РАС у детей с функциональными нарушениями ЖКТ.

*Материалы и методы.* Соотношение микробиоты тонкого кишечника исследовалось посредством хромато-масс-спектрометрии сухой капли крови (ХМС по Г.А. Осипову). Выборка составила 39 детей от полутора до 10 лет, все дети имели устойчивые функциональные нарушения работы ЖКТ. В состав первой (26 человек) группы вошли нормотипичные дети без признаков аутизма и других психо-неврологических дисфункций. У детей из второй группы (13 человек) был ранее диагностирован аутизм по шкале CARS, дети состояли на учете у психиатра. Статистические данные обрабатывались на ПК с использованием пакета программ STATISTICA 12. Использовался ROC – анализ.

*Результаты.* Установлены существенные отличия состояния микробиома верхних отделов кишки у детей с функциональными нарушениями ЖКТ и РАС в сопоставлении с детьми с одними лишь гастроэнтерологическими дисфункциями: преобладание, *Clostridium ramosum*, *Clostridium perfringens*, *Eggerthella lenta* и *Nocardia asteroides*. Содержание *Clostridium ramosum* у детей с диагнозом РАС, страдающих от функциональных нарушений ЖКТ, более чем в 75% случаев превышает референсные значения (2000 10\*5 клеток/грамм). Среднее значение *Clostridium ramosum* для данной группы составляет 3494 10\*5 клеток/грамм. Таким образом, изучение пристеночной микробиоты у детей с признаками аутистических расстройств может использоваться как метод дополнительной, альтернативно диагностики.

*Заключение.* Характерным отличием микробиоты детей с РАС является избыточный рост *Clostridium ramosum*, что может являться важным фактором в ранней диагностике РАС у детей.

*Ключевые слова:* микробиота кишечника и РАС; микробом у детей; диагностика РАС; гастроинтестинальные симптомы у детей; функциональные нарушения ЖКТ у детей; избыточный клостридиальный рост; *Clostridium ramosum*.

*Актуальность.* Распространенность заболевания расстройств аутистического спектра в мире составляет около 1%. Аутизм чаще встречается у мужчин, чем у женщин, и часто встречаются сопутствующие заболевания (более 70% имеют сопутствующие заболевания) [1]

*Расстройства аутистического спектра (РАС)* – это группа гетерогенных неврологических состояний, характеризующаяся ранней манифестацией нарушений социального общения и ограниченным, стереотипным поведением, интересами или деятельностью. Распространенность РАС в мире составляет около 1% [2, 3]; симптомы, как правило, отчетливо выявляются в возрасте 2 лет. В 70% случаев у детей с РАС имеются сопутствующие заболевания [4]. Так, гастроинтестинальные функциональные нарушения ЖКТ у детей с РАС встречаются в 4 раза чаще, чем у нейротипичной популяции).[5] Изучение механизмов, влияющих на ось кишечник-мозг, может приблизить нас к пониманию этиологии аутизма.

*Целью* данного исследования является оценка состояния пристеночного микробиома у детей с РАС посредством газовой хромато-масс-спектрометрии микробных маркеров крови, определить вероятные триггеры РАС у детей с функциональными нарушениями ЖКТ.

*Материалы и методы.* Одним из действенных методов изучения пристеночного микробиома является газовая хроматомасс-спектрометрия (ГХ-МС) [6, 7]

Проба сухой капли используется для детектирования микроорганизмов по видоспецифичным высшим жирным кислотам (ЖК) клеточной стенки сходен с генетическим анализом (ПЦР, определение последовательности нуклеотидов 16sРНК и пр.) [8, 9]

Соотношение микробиоты тонкого кишечника исследовалось посредством хромато-масс-спектрометрии сухой капли крови (ХМС по Г.А. Осипову). Выборка составила 39 детей от полутора до 10 лет, все дети имели устойчивые функциональные нарушения работы ЖКТ. В состав первой (26 человек) группы вошли нормотипичные дети без признаков аутизма и других психо-неврологических дисфункций. Дети из второй группы (13 человек) наблюдались у психиатра с диагнозом РАС, использовалась шкала оценки детского аутизма (CARS).

Статистическая обработка проводилась с использованием IBM SPSS Statistics 26 методом ROC анализа, а также методом дискриминантного анализа.

Площадь под ROC-кривой, соответствующей взаимосвязи *Clostridium ramosum* и РАС, составила  $0,927 \pm 0,044$  (95% ДИ 0,840-1,000). Полученная модель была статистически значимой ( $p < 0,001$ ).

Пороговое значение *Clostridium ramosum* в точке cut-off равно 1109,22. При *Clostridium ramosum* равном или превышающем данное значение прогнозировался высокий риск РАС. Чувствительность и специфичность метода составили 90,0% и 92,3% соответственно.

В результате проведенного дискриминантного анализа с шаговым отбором предикторов, на 4 шаге была получена дискриминантная модель, представляющая собой уравнение:

$$F = -1,436 + 0,027 * X_{cc} - 0,075 * X_{cp} + 0,001 * X_{cr} + 0,136 * X_{ps}$$

где:

F – значение дискриминантной функции;

X<sub>cc</sub>- *Clostridium coccoides*

X<sub>cp</sub>- *Clostridium perfringens*

X<sub>cr</sub>- *Clostridium ramosum*

X<sub>ps</sub>- *Prevotella spp*

В соответствии с полученными значениями центроидов, константа дискриминации для функции F, разделяющая пациентов с РАС и без РАС составляла 0,74. Таким образом, в случае значения F ниже 0,74 предполагается отсутствие РАС, при значениях F выше 0,74 – РАС.

Взаимосвязь функций F с признаком принадлежности пациентов к одной из групп наличию РАС была статистически значимой ( $p < 0,001$ ).

Чувствительность при прогнозировании РАС 90,9% (10 случаев из 11), а специфичность 100,0%.

Для определения прогностической устойчивости модели была проведена перекрестная проверка, по результатам которой чувствительность при прогнозировании РАС снизилась до 81,8% (9 случаев из 11). Незначительное снижение чувствительности модели при перекрестной проверке позволяет сделать вывод об ее устойчивости, адекватности, обуславливает возможность практического применения на новых выборках исследуемых.

Результаты. Выявлены значимые, характерные отличия микробиоты у детей с диагнозом РАС и функциональными нарушениями ЖКТ, и у детей с одними гастроинтестинальными симптомами без РАС. Значимость представляют 3 вида микроорганизмов: *Clostridium ramosum*, *Clostridium perfringens* и *Nocardia asteroides*, так как они выявлялись у детей с РАС в значимо большем количестве, чем без такового и 3 вида микроорганизмов- *Streptococcus spp*, *Clostridium tetani*, *Streptomyces spp* – в меньшем. Особую значимость представляет бактерия *Clostridium ramosum* с уровнем статистической значимости  $p < 0,001$ .

*Clostridium ramosum* – анаэробная, неподвижная, тонкая, спорообразующая, грамположительная бактерия, входящая в состав кишечной микробиоты человека и редко ассоциирующаяся с его болезнями [10]. Влияние клостридий на РАС связывают со способностью этих бактерий продуцировать фенолы, дериваты p-крезола и индола, потенциально токсичные для человека [11].

Содержание *Clostridium ramosum* у детей с диагнозом РАС, страдающих от функциональных нарушений ЖКТ, в 75% случаев превышает референсные значения ( $2000 \cdot 10^5$  клеток/грамм). Среднее значение *Clostridium ramosum* для данной группы составляет  $3494 \cdot 10^5$  клеток/грамм. Нами была выявлена взаимосвязь между тяжестью течения РАС и уровнем количеством *Clostridium ramosum* в пристеночной микробиоте исследуемых детей. Ниже приведены клинические случаи.

Случай 1. Мальчик М., г.р. 2015, диагноз: РАС (атипичное, тяжелое течение), отставание развития, 5 лет на момент обращения. Наблюдается психиатром СПбГПМУ, диагноз РАС подтвержден. Жалобы со слов матери. Не отзывается на чужие просьбы, приходит на голос мамы только для удовлетворения потребностей (поест, погулять, посмотреть мультики). В большей степени ориентируется на интонацию. С другими детьми не играет, редко проявляет к ним интерес, может подойти потрогать за лицо, взять за руку, смотрит в лицо. Не агрессивен, просит внимания от старших, при этом может схватить за руку прохожего на улице.

Со стороны ЦНС: задержка психического развития, аутоагрессия, стереотипии, афазия, нарушение циркадного ритма, инсомния. Со стороны ЖКТ: функциональные нарушения (диарея) неясного генеза.

Моторное и психическое развитие в соответствии с возрастом до 1.3 лет. Затем - резкий откат в развитии с потерей всех навыков.

Мать обратилась за помощью гастроэнтерологу в Многопрофильный центр СПбГПМУ в январе 2021 года. Методом сухой капли 10.02.2021 был проведен анализ ГХ-МСМ, по результатам обследования заявленным способом *Clostridium ramosum* 7392 кг/л\*10\*5. Повышение по сравнению с референтом в 3,696 раз. Гастроэнтерологический симптомокомплекс вызван повышенным бактериальным ростом, в частности, повышение содержания *Clostridium ramosum* было наиболее значительным, как и тяжесть психоневрологических нарушений у ребенка. В настоящее время наблюдается неврологом и психиатром по месту жительства, получает коррекционную помощь и медикаментозную поддержку.

Случай 2. Пациент С., 2014 г.р. (полных 6 лет), диагноз: ЗППР с элементами РАС. Наблюдается психиатром СПбГПМУ по поводу этого заболевания. На момент обращения к гастроэнтерологу в Многопрофильный центр СПбГПМУ 13.11.2020.

Со слов матери: С раннего детства страдал запорами. Развивался согласно возрасту, около 3 лет произошел откат в развитии, перестал есть, замкнулся в себе, начал всего бояться, речь ухудшилось, появилась нервозность, неусидчивость, улучшилось понимание обращенной речи. На момент обращения: гиперактивный, незначительно нарушена коммуникация, темповая задержка речевого развития. Гиперчувствительность: чрезмерная реакция на шум и другие внешние раздражители. Занимается с дефектологом. Со стороны ЖКТ: функциональные расстройства (запор).

ХМС от 01.12.2020. По результатам обследования заявленным способом *Clostridium ramosum* 3490 кг/л\*10\*5, повышение по сравнению с референсным значением в 1,745 раза. Функциональные нарушения ЖКТ также обусловлены избыточным бактериальным ростом, содержание *Clostridium ramosum* превалирует, но не столько значительно, как в Примере 1. Проявления РАС умеренные, элементы коммуникации присутствуют не в полной мере, психиатром СПбГПМУ был диагностирован РАС с ЗППР. В настоящее время наблюдается неврологом по месту жительства, получает коррекционную помощь.

Случай 3. Мальчик 4 года, без нарушений со стороны ЦНС, развитие в соответствии с возрастом. Мать обратилась к гастроэнтерологу в Многопрофильный центр СПбГПМУ в апреле 2021 г. в связи с функциональными нарушениями со стороны ЖКТ (абдоминальные боли, неустойчивый стул). По данным ХМС от 5.05.2021 уровень *Clostridium ramosum* 475 кг/л\*10\*5 (23,75% от референсного значения). По данными исследования был выявлен синдром избыточного бактериального роста, при этом уровень *Clostridium ramosum* не превышал референсного значения. Диагноз РАС отвергнут. Ребенок развивается в соответствии с возрастом, посещает дошкольное учреждение обычной направленности.

Повышение уровня содержания *Clostridium ramosum* в тонкой кишке характерно для микробиоты детей, страдающих РАС.

Обсуждение. Способ ГХ-МС для анализа микробиоты детей с РАС был выбран не случайно, позволяет определять в анализируемой пробе крови исследуемого клеточные липиды микробов и на их основе одновременно идентифицировать широкий спектр микроорганизмов, локализованных на щеточной кайме эпителия тонкой кишки, в т.ч. анаэробов. Метод доступен, широко применяется в практическом здравоохранении, как альтернатива культуральным и дорогостоящим молекулярно-биологическим методам. Между тем, особенности микробиоты тонкой кишки при РАС сегодня не изучены.

В обеих группах наблюдался значительный сдвиг кишечной микрофлоры, что в очередной раз подтверждает значимую роль микробиоты в развитии дисфункций ЖКТ. Методики исследования микробиоты чрезвычайно разнородны, по этой причине по данной тематике нет мета-анализов, которые помогли бы обобщить имеющиеся данные. Необходимо проведение дальнейших исследований микробиоты при РАС.

Заключение. Дисфункция ЖКТ была характерна для обеих групп, однако у детей с РАС наблюдались характерные особенности микробиоты в сравнении с первой группой: значимо больший рост *Clostridium ramosum*, *Clostridium perfringens* и *Nocardia asteroides* и сниженное количество *Clostridium tetani*, *Streptococcus spp* и *Streptomyces spp*. Содержание *Clostridium ramosum* у детей с диагнозом РАС, страдающих от функциональных нарушений ЖКТ, более чем в 75% случаев превышает референсные значения (2000 10\*5 клеток/грамм). Среднее значение *Clostridium ramosum* для данной группы составляет 3494 10\*5 клеток/грамм. Таким образом, изучение пристеночной микробиоты у детей с признаками аутистических расстройств может использоваться как метод дополнительной, альтернативно диагностики.

Список литературы:

1. Gyawali S, Patra BN. Autism spectrum disorder: Trends in research exploring etiopathogenesis. *Psychiatry ClinNeurosci*. 2019 Aug;73(8):466-475. doi: 10.1111/pcn.12860.

2. Johnson D, Letchumanan V, Thurairajasingam S, Lee LH. A Revolutionizing Approach to Autism Spectrum Disorder Using the Microbiome. *Nutrients*. 2020 Jul 3;12(7):1983. doi: 10.3390/nu12071983.
3. Kang D.W., Park J.G., Ilhan Z.E., Wallstrom G., LaBaer J., Adams J.B., et al. Reduced incidence of *Prevotella* and other fermenters in intestinal microflora of autistic children. *PLoS One*. 2013; 8(7): e68322. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068322>
4. Madra M, Ringel R, Margolis KG. Gastrointestinal Issues and Autism Spectrum Disorder. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am*. 2020 Jul;29(3):501-513. doi: 10.1016/j.chc.2020.02.005.
5. Meng-Chuan Lai, Michael V Lombardo, Simon Baron-Cohen. Autism. *Lancet*. 2014 Mar 8;383(9920):896-910. doi: 10.1016/S0140-6736(13)61539-1
6. Saurman V, Margolis KG, Luna RA. Autism Spectrum Disorder as a Brain-Gut-Microbiome Axis Disorder. *DigDisSci*. 2020 Mar;65(3):818-828. doi: 10.1007/s10620-020-06133-5.
7. The relationship among gastrointestinal symptoms, problem behaviors, and internalizing symptoms in children and adolescents with autism spectrum disorder. *Front Psychiatry*. 2019;10:194
8. Осипов Г.А., Бойко Н.Б., Новикова В.П., Гриневич В.Б., Федосова Н.Ф., Цех О.М., Токарева Е.В., Земскова Е.А. Методика масс-спектрометрии микробных маркеров как способ оценки пристеночной кишечной микробиоты при заболеваниях органов пищеварения. Санкт-Петербург, 2013.