

Received: 2004.07.19
 Accepted: 2004.09.13
 Published: 2004.09.20

Beztlenowa mikroflora jelitowa a patogeneza autyzmu?

Anaerobic intestinal microflora in pathogenesis of autism?

Gayane Martirosian

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiej Akademii Medycznej oraz Katedra i Zakład Histologii i Embriologii Akademii Medycznej w Warszawie

Streszczenie

W pracy omówiono różnice występujące w mikroflorze układu pokarmowego dzieci chorych na autyzm w porównaniu z grupą kontrolną. Zwłaszcza zwrócono uwagę na charakterystykę mikrobiologiczną opisanych po raz pierwszy drobnoustrojów beztlenowo rosnących: *Clostridium bolteae sp. nov.* i *Cetobacterium somerae sp. nov.* występujących w kale dzieci chorych na autyzm. Na podstawie danych literatury medycznej z ostatnich lat dyskutowano hipotezę o możliwych interakcjach mikroflora jelitowa – mózg w kontekście potencjalnego udziału w patogenezie autyzmu toksyn i innych metabolitów bakteryjnych.

Słowa kluczowe:

autyzm • mikroflora jelitowa • *Clostridium bolteae sp. nov.* • *Cetobacterium somerae sp. nov.*

Summary

The present study provides information on differences in the gastrointestinal microflora of children with autism compared with a control group. Special attention was paid to the microbiological characteristic of the new obligate anaerobic microorganisms: *Clostridium bolteae sp. nov.* and *Cetobacterium somerae sp. nov.* observed in stools of children with autism. In light of recent publications, the hypothesis of interactions between intestinal microflora – and the brain based on possible alterations in bacterial toxins and other metabolites in the pathogenesis of autism is discussed.

Key words:

autism • intestinal microflora • *Clostridium bolteae sp. nov.* • *Cetobacterium somerae sp. nov.*

Full-text PDF: http://www.phmd.pl/pub/phmd/vol_58/6385.pdf

Word count: 1311

Tables: –

Figures: –

References: 17

Adres autorki:

Katedra i Zakład Mikrobiologii Lekarskiej Śląskiej Akademii Medycznej, ul. Medyków 18, 40-752 Katowice, e-mail: gmartir@slam.katowice.pl

WSTĘP

Autyzm po raz pierwszy został opisany przez Kanner'a w 1943 roku, jest zaliczany do schorzeń o niewyjaśnionej etiologii [6]. Choroba charakteryzuje się rozprzestrzenianiami się i postępującymi behawioralnymi zaburzeniami, ujawniającymi się zazwyczaj we wczesnym dzieciństwie i utrzymującymi również w wieku dojrzałym [10]. Według danych epidemiologicznych choroba występuje u 10–20 na 10 000 dzieci z czterokrotną przewagą u chłopców [2]. Chociaż u niektórych dzieci opisano anomalie chromosomalne lub zaburzenia metaboliczne, dotąd nie udało się jednak sprecyzować czynników etiologicznych tego schorzenia. Symptomy tak zwanego „regresu autystycznego” występują w około 1/3 przypadków w okresie przed drugim rokiem życia, dziecko przestaje mówić i kontaktować się z otoczeniem [9].

ISTNIEJĄCE HIPOTEZY

Do towarzyszących często autyzmowi objawów jelitowych do niedawna nie przywiązywano zbyt dużej uwagi [17]. Ostatnio pojawiły się w literaturze medycznej publikacje, dotyczące szczegółowych badań mikroflory jelitowej dzieci chorych na autyzm. Wiadomo, że bakterie beztlenowe (w tym z rodzaju *Clostridium spp.*) dominują w mikroflorze jelitowej człowieka. Wiadomo również, że niektóre laseczki mają zdolność do wytwarzania toksyn (enterotoksyn i neurotoksyn). Ellene Bolte w 1998 roku pierwsza zaproponowała hipotezę o roli bakterii w rozwoju autyzmu [1]. Grupa badaczy pod kierunkiem Sydneya Finegolda z UCLA School of Medicine, USA rozwinęła tę hipotezę w dalszym cyklu badań, przyjmując, że część z objawów autyzmu może być związana z wytwarzaniem toksyn lub innych metabolitów przez laseczki z rodzaju *Clostridium spp.*, zasiedlające przewód pokarmowy dzieci chorych na autyzm [12]. Hipoteza ta powstała na podstawie obserwacji rodziców dzieci chorych na autyzm o poprzedzającym chorobę stosowaniu antybiotyków o szerokim zakresie działania, najczęściej z powodu przewlekłego zapalenia ucha środkowego. Po stosowaniu antybiotyków występowała na ogół biegunka, a potem dziecko przestawało mówić, traciło kontakt z otoczeniem i rozwijały się dalsze symptomy autyzmu. Na podstawie wyżej wymienionych obserwacji grupa amerykańskich badaczy [12] wywnioskowała, że częste stosowanie antybiotyków u tych dzieci powoduje zaburzenia mikroflory jelitowej, czyli „colonization resistance factor” [7], co doprowadza do namnożenia się w przewodzie pokarmowym chorobotwórczych gatunków bakterii (jednego lub kilku) wytwarzających neurotoksyny. Neurotoksyny mogą być odpowiedzialne przynajmniej za część objawów klinicznych autyzmu, więc odpowiednio dobrane antybiotyki podane choremu na autyzm, powinny przynajmniej złagodzić symptomy choroby.

STOSOWANIE WANKOMYCYN

Ponieważ potencjalnymi czynnikami wytwarzającymi neurotoksyny są *Clostridium tetani* i *Clostridium botulinum*, a gatunek *Clostridium difficile* jest znany jako toksynotwórczy drobnoustroj namnażający się w jelitach po zastosowaniu różnych antybiotyków, Sandler i wspólr. [12] wybrali do terapii doustnej metronidazol, wankomycynę i bacytracynę biorąc pod uwagę antybiotykowrażliwość rodzaju

Clostridium. Badacze amerykańscy przeprowadzili dokładną analizę objawów klinicznych i behawioralnych łącząc je ze zmianami w mikroflorze jelitowej przed, w trakcie i po podaniu dzieciom wankomycyny. Stosowano dawkę wankomycyny 500 mg/dziennie (w 6 ml płynu) podawaną doustnie po 2 ml trzy razy dziennie w ciągu 8 tygodni. Kał był badany na obecność krwi, komórek zapalnych, toksyn *C. difficile*, a także *Aeromonas hydrophila*, *Cryptosporidium* i obecności innych bakteryjnych patogenów jelitowych i pasożytów.

MIKROFLORA UKŁADU POKARMOWEGO DZIECI CHORYCH NA AUTYZM

Ilościowa analiza mikroflory kałowej była przeprowadzona przez Sandlera i współautorów [12] bardzo dokładnie i polegała na posiewie każdej próbki kału na 27 różnych podłożach wybiórczo-różnicujących, inkubowanych w odpowiedniej atmosferze (tlenowo/beztlenowo, mikroaerofilnie). Wyniki tych badań były zaskakujące. Jeszcze przed podaniem wankomycyny autorom udało się zaobserwować znaczne różnice w mikroflorze kałowej u dzieci chorych na autyzm (badano próbki kału czwórki dzieci) w porównaniu z mikroflorą dorosłych zdrowych osób (104 osoby). Najważniejsza różnica polegała na obecności ziarenkowców beztlenowo rosnących, głównie *Peptostreptococcus spp.* u 93% zdrowych osób dorosłych i kompletnym braku tych drobnoustrojów w kale dzieci chorych na autyzm. Poza tym zaobserwowano krótkoterminową poprawę stanu klinicznego i behawioralnego u większości z badanych dzieci już po trzech dniach od rozpoczęcia terapii wankomycyną. Jednak większość rodziców zgłaszała pogorszenie się stanu dziecka już w ciągu dwóch tygodni po zaprzestaniu podawania wankomycyny, niezależnie nawet od dodatkowej terapii probiotycznej. Dzieci były obserwowane w ciągu 8 miesięcy po zakończeniu podawania wankomycyny. We wszystkich przypadkach (oprócz jednego) zanotowano powrót do stanu klinicznego i behawioralnego podobnego do obserwowanego przed rozpoczęciem terapii wankomycyną.

Następnym krokiem były porównawcze badania mikroflory układu pokarmowego dzieci chorych na autyzm i dzieci zdrowych [3]. Wyniki tych badań wykazały znamienne różnice między mikroflorą jelitową w badanych grupach. Wykazano również znamienne różnice między mikroflorą górnej i dolnej części układu pokarmowego w grupie badanej i kontrolnej. W próbkach materiałów pobranych z żołądka i dwunastnicy dzieci zdrowych nie stwierdzono niesporulujących bakterii beztlenowych i mikroaerofilnych, natomiast z próbek dzieci z autyzmem hodowano te drobnoustroje w liczbach znamienych. W próbkach pobranych od dzieci z autyzmem stwierdzono również obecność 9 różnych szczepów *Clostridium*. Ponieważ początkowym założeniem autorów było poszukiwanie drobnoustrojów, wytwarzających neurotoksyny, które działają na ośrodkowy układ nerwowy przez *nervus vagus* (hipoteza Bolte, 1998) [3], odpowiadający za unerwienie jelita cienkiego, zaczęto poszukiwania ewentualnych czynników objawów autyzmu w górnych odcinkach układu pokarmowego. Różnice zaobserwowano także podczas badań mikrobiologicznych próbek pochodzących z dolnych odcinków przewodu pokarmowego u dzieci chorych na autyzm i w grupie kontrolnej. 23 różne gatunki *Clostridium* i 5 gatunków *Ruminococcus* wyhodowano z próbek kału w grupie badanej i tylko 15



i 5 odpowiednio w grupie kontrolnej. Liczba szczepów na jedną próbkę wynosiła 2–10 w grupie badanej i 3–12 – w grupie kontrolnej (średnia liczba szczepów na próbkę wynosiła 6 w obu grupach). Ogólna liczba drobnoustrojów wynosiła 10^2 – 10^9 u dzieci chorych na autyzm i odpowiednio 10^4 – 10^8 w grupie kontrolnej, czyli średnia liczba drobnoustrojów była dziesięciokrotnie wyższa w grupie badanej ($2,1 \times 10^6$ i $1,6 \times 10^5$) [3]. Z kału dzieci chorych na autyzm wyhodowano szczepy, należące do 9 gatunków z rodzaju *Clostridium*, nie izolowano ich z próbek pobranych w grupie kontrolnej. Wśród nich były Gram-dodatnie laseczki wytwarzające subterminalne spory [15]. Kwas octowy i kwas mlekowy były końcowymi produktami rozkładu glukozy przez te bakterie. Nie hydrolizowały one eskuliny, żelatyny i mocznika. Wytwarzały enzymy: kwaśną fosfatazę, α -galaktozydazę, β -galaktozydazę i α -glukozydazę. Wykazywały wrażliwość na krążki identyfikacyjne z kanamycyną (1000 μ g) i kolistyną (10 μ g). Badania wrażliwości na antybiotyki tych drobnoustrojów wykazały wrażliwość lub średnią wrażliwość na bacytracynę (MIC <2 μ g), cefoksytynę (MIC 32 μ g), klindamycynę (MIC <4 μ g), imipenem (MIC <4 μ g), metronidazol (MIC =0,25 μ g), ramoplaninę (MIC <16 μ g), trimetoprim/sulfametoksazol 2/1 (MIC <16 μ g) i wankomycynę (MIC <2 μ g). Bakterie były odporne na ampicylinę (MIC >2 μ g), piperacylinę i tikarcylinę (MIC >256 μ g). Przeprowadzone dokładne badania biochemiczne i genetyczne wykazały odmienne właściwości tych szczepów od znanych dotąd gatunków *Clostridium*. Nazwano je *Clostridium bolteae* sp. nov, honorując amerykańską badaczkę Ellene Bolte [15].

Z kału dzieci chorych na autyzm grupa Finegolda [4] wyhodowała również nieznaną dotąd Gram-ujemną beztlenowo rosnącą (mikroaerotolerancyjną) bakterie. Rosły one dobrze na podłożach zawierających żółć, nie wytwarzały katalazy. Kwas octowy był końcowym produktem metabolizmu tych drobnoustrojów. Bakterie były odporne

na ampicylinę, penicylinę G, ramoplaninę, trimetoprim/sulfametoksazol i wankomycynę, a wrażliwe na cefoksytynę, klindamycynę, imipenem i metronidazol. W oparciu o badania filogenetyczne udowodniono, że reprezentowały one dotychczas nieznaną gatunek bakterii, należący do rodzaju *Cetobacterium*, nazwano je *Cetobacterium somerae* sp. nov (upamiętniając prof. Hannele Jousimies-Somer – fińskiego mikrobiologa) [4].

Następna hipoteza o możliwym toksycznym działaniu produktów metabolizmu bakterii (w tym typowych i nietypowych) zasiedlających jelita powstała na podstawie zaobserwowanego przez rodziców swoistego zapachu kału dzieci chorych na autyzm, przypominającego zapach kulek antymolowych. Zapach ten może być wywołany przez indol lub skatol (3-methyl-indole), wytwarzanych przez drobnoustroje z tryptofanu. Jednak obecność innych czynników, takich jak naftalen lub jego pochodne, również może sprzyjać powstawaniu tego charakterystycznego zapachu [5,8]. Istnieją również inne hipotezy, w tym wskazujące na rolę autoprzeciwciał w autyzmie. Wiele publikacji wskazuje na znaczenie w patogenezie autyzmu autoprzeciwciał przeciw białkom filamentów aksonowych, kwaśnemu białku neurogleju [14], czy zasadowemu białku mielinowemu [13]. Mechanizmy działania podobnych przeciwciał zostały już opisane wcześniej np. w rozwoju reumatoidalnego zapalenia stawów wywołanego przez *Proteus mirabilis* [16], czy rozwoju zespołu Guillaina-Barrégo po zakażeniu *Campylobacter jejuni* [11].

Czy jakość i liczba drobnoustrojów w przewodzie pokarmowym wpływają na rozwój autyzmu i czy istnieją interakcje mikroflora jelitowa – mózg? Czy działanie autoprzeciwciał jest ważne w patogenezie autyzmu? Są to pytania na razie bez jednoznacznej odpowiedzi. Pytania wymagające wyjaśnienia w przyszłości w badaniach z zastosowaniem najnowszych technik mikrobiologicznych i molekularnych.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bolte E.R.: Autism and Clostridium tetani. Med. Hypotheses, 1998; 51: 133–144
- [2] Bryson S.E.: Brief report: epidemiology of autism. J. Autism. Dev. Disord., 1996; 26: 165–167
- [3] Finegold S.M., Molitoris D., Song Y., Liu C., Vaisanen M.L., Bolte E., McTeague M., Sandler R., Wexler H., Marlowe E.M., Collins M.D., Lawson P.A., Summanen P., Baysallar M., Tomzynski T.J., Read E., Johnson E., Rolfe R., Nasir P., Shah H., Haake D.A., Manning P., Kaul A.: Gastrointestinal microflora studies in late-inset autism. Clin. Infect. Dis., 2002; 35: S6–S16
- [4] Finegold S.M., Vaisanen M.L., Molitoris D.R., Tomzynski T.J., Song Y.L.C., Collins M.D., Lawson P.A.: *Cetobacterium somerae* sp. nov. from human feces and emended description of the genus *Cetobacterium*. Syst. Appl. Microbiol., 2003; 26: 177–181
- [5] Fordtran J.S., Scroggie W.B., Polter D.E. Colonic absorption of tryptophan metabolites in man. J. Lab. Clin. Med., 1964; 64: 125–132
- [6] Kanner L.: Autistic disturbances of effective contact. Nerv. Child., 1943; 2: 217–250
- [7] Martirosian G.: Zrękomobiloniaste zapalenie jelit: epidemiologia, etiologia, diagnostyka. Praca habilitacyjna. Warszawa, 1996
- [8] Moore J.G., Jesson L.D., Osborne D.N.: Gas-chromatographic and mass-spectrometric analysis of the odor of human feces. Gastroenterol., 1987; 93: 1321–1329
- [9] Rapin I.: Autism. N. Engl. J. Med., 1997; 337: 97–100
- [10] Rutter M.: Autistic children: infancy to childhood. Hemin. Psychiatry, 1970; 2: 435–450
- [11] Prendergast M.M., Willison H.J., Moran A.P.: Human monoclonal immunoglobulin M antibodies to ganglioside GM1 show diverse cross-reactivities with lipopolysaccharides of *Campylobacter jejuni* strain associated with Guillain-Barre syndrome. Infect. Immun., 1999; 67: 3698–3701
- [12] Sandler R.H., Finegold S.M., Bolce E.R., Buchanan C.P., Maxwell A.P., Vaisanen M.L., Nelson M.N., Wexler H.M.: Short-term benefits from oral vancomycin treatment of regressive-onset autism. J. Child. Neurol., 2000; 15: 429–435
- [13] Singh V.K., Warren R.P., Odell J.D., Warren W.L., Cole P.: Autoantibodies to myelin basic protein in children with autistic behavior. Brain. Behav. Immun., 1993; 7: 97–103
- [14] Singh V.K., Warren R., Averett R., Ghaziuddin M.: Circulating autoantibodies to neural and glial filament proteins in autism. Pediatr. Neurol., 1997; 17: 88–90
- [15] Song Y., Liu C., Molitoris D.R., Tomzynski T.J., Lawson P.A., Collins M.D., Finegold S.M.: *Clostridium bolteae* sp. nov., isolated from human sources. System. Appl. Microbiol., 2003; 26: 84–89
- [16] Tiwana H., Wilson C., Alvarez A., Abuknesha R., Bansal S., Ebringer A.: Cross-reactivity between the rheumatoid arthritis-associated motif EQKRAA and structurally related sequences found in *Proteus mirabilis*. Infect. Immun., 1999; 67: 2769–2775
- [17] Wakefield A.J., Anthony A., Murch S.H., Thomson M., Montgomery S.M., Davies S., O'Leary J.J., Berelowitz M., Walter-Smith J.A.: Enterocolitis in children with developmental disorders. Am. J. Gastroenterol., 2000; 95: 2285–2295