

АДАПТАЦИОННЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ИММУННОЙ И НЕЙРОЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМ И МИКРОБНОГО СООБЩЕСТВА КИШЕЧНИКА У ДЕТЕЙ С АУТИЗМОМ И ШИЗОФРЕНИЕЙ

Филиппова Ю.Ю.¹, Полякова Е.А.¹, Бурмистрова А.Л.¹

¹ФГБОУ ВО «Челябинский государственный университет», Челябинск, e-mail: julse@rambler.ru

Цель: оценить адаптационный потенциал основных регуляторных систем, участвующих в поддержании гомеостаза организма, у детей с расстройствами аутистического спектра и шизофренией с использованием метода корреляционной адаптометрии. В исследование включены 82 ребенка с аутизмом, 9 детей с сенестопатической шизофренией и 45 типично развивающихся детей. Концентрацию цитокинов: IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4; нейрогормонов: окситоцина, дофамина, адреналина, норадреналина, кортизола, аденокортикотропного гормона, серотонина, и метаболитов: триптофана и кинуренина, определяли в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. Оценку численности представителей основных 5 типов микробиоты тонкого кишечника (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Fusobacteria*) проводили методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии микробных маркеров. Для статистической обработки использовали метод корреляционной адаптометрии, который позволяет оценить адаптационный потенциал организма (количество и силу связей между физиологическими показателями) с помощью интегрального показателя – веса корреляционного графа (G). В ходе выборочных сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализ с апостериорными попарными сравнениями методом Тьюки. Показано, что у детей с аутизмом, как и у здоровых детей, значение веса корреляционного графа было низким, что отражало малую насыщенность слабыми корреляционными связями между основными регуляторными системами. У детей с шизофренией величина показателя G была значимо выше, чем в остальных группах детей, что говорит о высокой насыщенности внутри- и межсистемными связями (по количеству и силе). Наличие слабых, преимущественно отрицательных взаимодействий между иммунной, нейроэндокринной системами и микробным сообществом кишечника у типично развивающихся детей и детей с аутизмом способствует поддержанию гомеостаза организма в пределах нормы. Тогда как высокая насыщенность сильными корреляционными связями у детей с шизофренией отражает низкий адаптационный потенциал и потерю пластичности основных регуляторных систем.

Ключевые слова: расстройства аутистического спектра, расстройства шизофренического спектра, дети, цитокины, нейрогормоны, микробное сообщество кишечника, корреляционная адаптометрия.

ADAPTIVE POTENTIAL OF THE IMMUNE NEUROENDOCRINE SYSTEMS AND THE INTESTINAL MICROBIAL COMMUNITY IN CHILDREN WITH AUTISM AND SCHIZOPHRENIA

Filippova Yu.Yu.¹, Polyakova E.A.¹, Burmistrova A.L.¹

¹Chelyabinsk State University, Chelyabinsk, e-mail: julse@rambler.ru

Aim: to assess the adaptive potential of the main regulatory systems involved in maintaining the body's homeostasis in children with autism spectrum disorders and schizophrenia using the method of correlation adaptometry. The study included 82 children with autism, 9 children with senestopathic schizophrenia, and 45 typically developing children. Concentration of cytokines: IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4; neurohormones: oxytocin, dopamine, adrenaline, norepinephrine, cortisol, adrenocorticotrophic hormone, serotonin and metabolites: tryptophan and kynurenine in blood plasma were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. For rate of the number of representatives of the main 5 types of small intestine microbiota (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, and *Fusobacteria*) method of gas chromatography - mass spectrometry of microbial markers was used. For statistical processing, the method of correlation adaptometry was used, which make it possible to assess the adaptive potential of the organism (the number and strength of connections between physiological indicators) using an integral indicator - the weight of the correlation graph (G). In the course of selective comparisons, one-way ANOVA was used, with Tukey post-hoc pairwise comparisons. It was shown that in children with autism, as in healthy children, the weight of the correlation graph was low, which reflected a low saturation with weak correlations between the main regulatory systems. In children with schizophrenia, the value of the G index was significantly higher than in other groups of children, which indicates a high saturation within and intersystem connections (in terms of quantity and strength). The presence of weak, predominantly negative interactions between the immune, neuroendocrine systems and the gut microbial

community in typically developing children and children with autism contributes to the maintenance of body homeostasis within normal limits. A high saturation with strong correlations in children with schizophrenia reflects a low adaptive potential and a loss of plasticity of the main regulatory systems.

Keywords: autism spectrum disorders, schizophrenia spectrum disorders, children, cytokines, neurohormones, intestinal microbial community, correlation adaptometry.

В настоящее время хорошо известно, что основные регуляторные системы организма: иммунная, нейроэндокринная и микробное сообщество дигестивного тракта, функционируют по принципу внутри- и межсистемного сетевого взаимодействия, демонстрируя высокий уровень пластичности, обеспечивающей коллегиальную адаптацию в условиях стресса [1; 2].

Иммунная и нейроэндокринная системы имеют ряд общих лигандов и рецепторов, таких как рецепторы для нейротрансмиттеров и нейропептидов, цитокинов, хемокинов, факторов роста и др. [1]. Нейроэндокринная регуляция иммунных ответов осуществляется системно через гормональные каскады (гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось, ГГН-ось), регионально через нервные пути в лимфоидные органы и локально через нейротрансмиттеры. Иммунорегуляторное действие на центральную нервную систему (ЦНС) опосредовано резидентными иммунокомпетентными клеткам мозга, Т-лимфоцитами, аутореактивными к антигенам мозга, вегетативной нервной системой через иннервацию симпатического и блуждающего нервов, а также периферическими цитокинами, которые в норме попадают в мозг через области со специализированной пропускной способностью гематоэнцефалического барьера [3]. Недавно показано, что кишечная микробиота, наряду с иммунной системой, способна влиять практически на все функции организма, в том числе выступать в качестве модулятора пластичности мозга, его когнитивных функций и в целом поведения персоны в норме и при патологии [4; 5].

Изменения в молекулярных информационных сигналах и путях коммуникации между иммунной, нейроэндокринной и бактериальной системами могут быть причиной многих патологических состояний, в частности психических расстройств, а эффективная терапия таких заболеваний должна быть направлена на восстановление гомеостаза организма [6; 7]. Обнаружено, что развивающийся мозг особенно чувствителен к изменениям окружающей среды (эндогенным и экзогенным), которые могут значительно нарушить траекторию развития клеток, нейронных сетей и связанное с ними поведение. Дезорганизация работы основных регуляторных систем в до- или постнатальный период, включая материнский стресс, травмы или инфекции, может глубоко модулировать или программировать развивающиеся нейронные сети и в результате приводить к развитию невропатологий, таких как расстройства аутистического спектра (РАС) и шизофренического (РШС) [8].

В меняющейся социальной и физической среде мозг и организм в целом реагируют физиологически и поведенчески для оптимальной адаптации. Физиологически – симпатическая и парасимпатическая системы, ГГН-ось, иммунная система, кишечная микробиота, метаболические гормоны и молекулярные процессы во всех органах, включая мозг, работают нелинейно и способствуют адаптации через «аллостаза» (достижение стабильности через активацию) этих систем. Но одни и те же медиаторы обладают двухфазным действием и могут также способствовать патофизиологии при чрезмерном использовании или когда их активность не сбалансирована друг с другом (аллостатическая нагрузка или перегрузка) [2]. Для комплексной оценки аллостаза организма в норме и при патологии группой ученых был предложен метод корреляционной адаптометрии (КА), в основе которого лежит открытый авторами «эффект группового стресса», проявляющийся увеличением силы связей физиологических показателей организма в ответ на действие стрессоров и, наоборот, снижением силы и числа связей при успешной адаптации системы [9].

Цель исследования: оценить адаптационный потенциал основных регуляторных систем, участвующих в поддержании гомеостаза организма, у детей с расстройствами аутистического спектра и расстройствами шизофренического спектра с использованием метода корреляционной адаптометрии.

Материалы и методы исследования

В исследование были включены 82 ребенка с диагнозом РАС, проходивших немедикаментозную реабилитацию в социально-реабилитационном центре «Здоровье» г. Челябинска; и 9 детей с сенестопатической шизофренией (F20.8, группа РШС), находящихся на диспансерном учете в Областной клинической специализированной психоневрологической больнице № 1 г. Челябинска. В зависимости от сходства/различий значений исследуемых биологических параметров с детьми с шизофренией, дети с РАС были разделены на 2 группы, условно названные нами РАС-тип (52 ребенка, отличающихся по биологическому фенотипу от РШС) и РАС-шизотип (30 детей, схожих по биологическому фенотипу с РШС). В качестве условно здорового контроля в исследование включено 45 типично развивающихся детей (ТРД). У всех родителей или законных представителей детей, включенных в исследование, получено информированное согласие. Работа одобрена этическим комитетом Челябинского государственного университета (протокол № 1 от 16.05.2016 г.) [10].

Материалом для исследования служила венозная кровь. Концентрацию цитокинов: IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4 (ЗАО «Вектор-Бест», Новосибирск); нейрогормонов: окситоцина (Peninsula Laboratories International, США), дофамина, адреналина, норадреналина (IBL International, Германия), кортизола (ООО «Хема», Россия), адренокортикотропного гормона – АКТГ (Biomerica, Германия), серотонина (IBL International, Германия), и

метаболитов: триптофана и кинуренина (Immundiagnostik AG, Германия), определяли в плазме крови методом твердофазного иммуноферментного анализа на анализаторе Multiscan EX (Labsystems, Финляндия) [10].

Определение абсолютного числа представителей основных 5 типов микробиоты тонкого кишечника (*Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Fusobacteria*) проводили методом газовой хроматографии - масс-спектрометрии микробных маркеров (ГХМС ММ) в цельной периферической крови с помощью газового хромато-масс-спектрометра «Маэстро» (ООО «Интерлаб», Россия), как было описано ранее [11].

В ходе статистической обработки применяли метод КА, который позволяет оценить адаптационный потенциал организма (количество и силу связей между физиологическими показателями основных регуляторных систем) с помощью интегрального показателя – веса корреляционного графа (G). Для этого вычисляли парные коэффициенты корреляции Спирмена, интервальную оценку G проводили методом складного ножа. В ходе выборочных сравнений использовали однофакторный дисперсионный анализ, проведенный на псевдозначениях складного ножа с апостериорными попарными сравнениями методом Тьюки. Для расчетов использованы базовые средства программно-статистической среды R (version 3.6.1, пакет Stats). Графические построения выполнены в пакете Corplot для R.

Результаты исследования и их обсуждение

В работе проведена оценка периферических уровней некоторых показателей основных регуляторных систем организма: иммунной (цитокины – IL-6, IL-1 β , IFN- γ , TNF- α , IL-10, IL-4), нейроэндокринной (гормоны – окситоцин, дофамин, адреналин, норадреналин, кортизол, АКТГ, серотонин, и метаболиты – триптофан, кинуренин) и микробного сообщества кишечника (типы – *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* и *Fusobacteria*) у ТРД, детей с РАС и РШС с помощью метода КА.

В результате анализа для каждой обследованной группы детей: ТРД, РАС-тип, РАС-шизотип и РШС, был получен интегральный показатель адаптационного потенциала организма – вес корреляционного графа (G), который включал в себя суммарное количество и силу связей между показателями цитокинов, нейрогормонов и микроорганизмов. Результаты представлены в таблице.

Интервальная оценка величины веса корреляционного графа G в группах ТРД, детей с РАС и РШС (M[95%ДИ])

Показатели	ТРД	РАС-тип	РАС-шизотип	РШС
	1	2	3	4
Объем выборки <i>n</i>	45	52	30	9
<i>G</i> Ig, скл. нож, выбросы	18,11	18,57	17,47	43,24
95% ДИ Ig, скл. нож, выбросы	[15,35; 21,36]	[15,83; 21,77]	[15,23; 20,05]	[31,27; 59,79]
Однофакторный дисперсионный анализ				
Источник изменчивости	Сумма квадратов <i>SS</i>	Степени свободы <i>df</i>	<i>F</i> -критерий	Оценка значимости <i>P</i>
Между группами	8193,0	4	8,87	<0,001
Внутри групп	31601,8	133	–	–
Общая	39794,8	136	–	–
Апостериорные сравнения методом Тьюки				
		<i>P</i> ₂₋₁ >0,999	<i>P</i> ₃₋₁ =0,979 <i>P</i> ₃₋₂ =0,975	<i>P</i>₄₋₁<0,001 <i>P</i>₄₋₂<0,001 <i>P</i>₄₋₃<0,001

Примечание: *P*₂₋₁ – различия между группами ТРД и РАС-тип; *P*₃₋₁ – различия между группами ТРД и РАС-шизотип; *P*₃₋₂ – различия между группами РАС-тип и РАС-шизотип; *P*₄₋₁ – различия между группами ТРД и РШС; *P*₄₋₂ – различия между группами РАС-тип и РШС; *P*₄₋₃ – различия между группами РАС-шизотип и РШС. Статистически значимые различия выделены полужирным шрифтом.

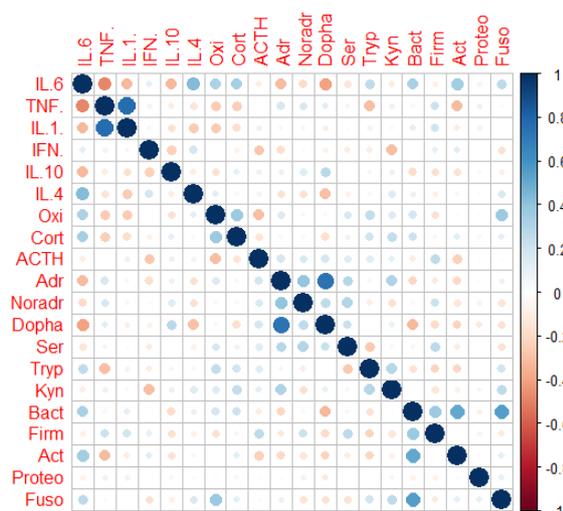
Как видно из таблицы, величина *G* у детей с РАС (независимо от типа) не отличалась от аналогичного показателя группы ТРД. Напротив, у детей с РШС величина показателя *G* была в 2,5 раза выше, чем в группах детей ТРД, РАС-тип и РАС-шизотип, причем различия были высоко статистически значимыми (*P*<0,001). Такое значение интегрального показателя (*G*) говорит о высокой насыщенности связями (по количеству и силе) внутри и между основными регуляторными системами у детей с РШС.

Для определения, какие показатели/связи вносят наибольший вклад в величину веса корреляционного графа и могут влиять на развитие невропатологии, для каждой из групп детей была построена тепловая карта корреляций (рисунок А-Г).

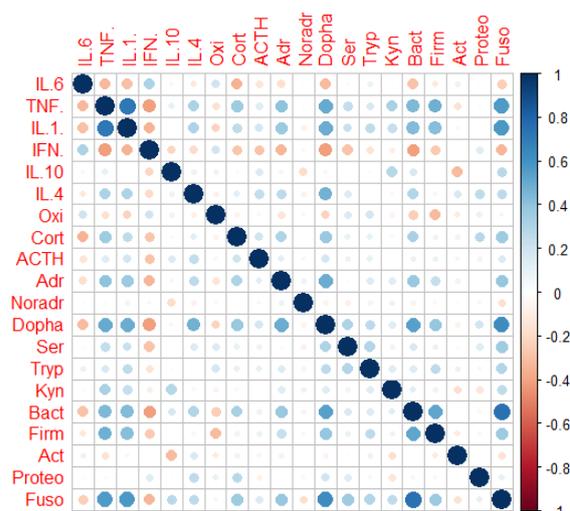
Как видно из рисунка, между исследуемыми показателями в группах ТРД и детей с РАС (групп РАС-тип и РАС-шизотип) возможно образование 190 корреляционных взаимодействий, а в группе РШС – 171 корреляции, т.к. численность типа *Fusobacteria* у всех детей с РШС была ниже чувствительности обнаружения метода ГХ-МС ММ (<10⁵ КОЕ/мл) и не имела дисперсии, поэтому данный показатель был исключен из анализа.

А) ТРД

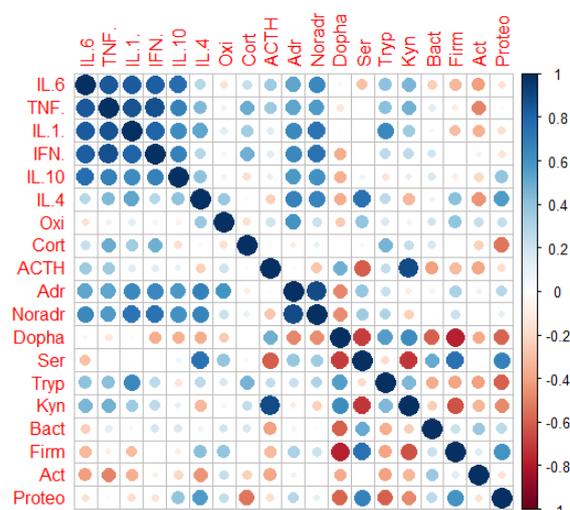
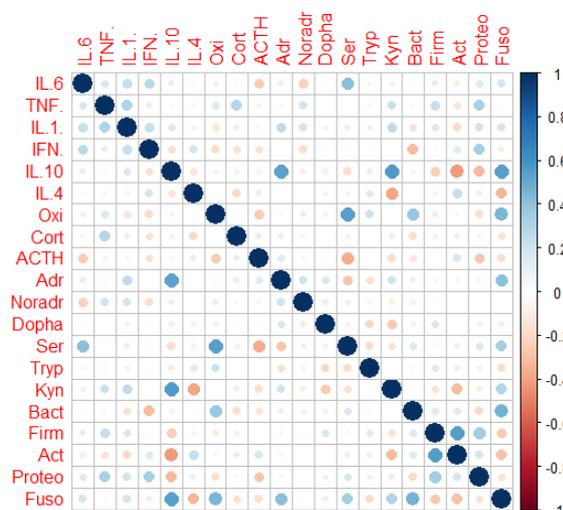
Б) РАС-тип



В) РАС-шизотип



Г) РШС



Тепловая карта корреляций между показателями основных регуляторных систем организма в группах ТРД (А), РАС-тип (Б), РАС-шизотип (В), РШС (Г)

Примечание: Oxi – окситоцин, Cort – кортизол, ACTH – АКТГ, Adr – адреналин, Noradr – норадреналин, Dopha – дофамин, Ser – серотонин, Tryp – триптофан, Kyn – кинуренин, Bact – *Bacteroidetes*, Firm – *Firmicutes*, Act – *Actinobacteria*, Proteo – *Proteobacteria*, Fuso – *Fusobacteria*. В группе РШС показатель *Fusobacteria* не имел дисперсии, поэтому не был включен в анализ.

Интересно отметить, что в группах ТРД и детей с РАС практически отсутствуют связи средней и высокой силы (больше 0,4): 10/ 8/ 14 из 190 для ТРД/ РАС-тип/ РАС-шизотип соответственно, тогда как у детей группы РШС половина корреляций (80 из 171) имеют среднюю или высокую силу (рисунок).

У ТРД можно выделить 4 кластера связей средней силы, которые необходимы для физиологического стресс-ответа: 1 кластер – корреляции между провоспалительными цитокинами (положительная – между «цитокинами тревоги» - TNF- α и IL-1 β и отрицательная – между IL-6, который может выступать как противовоспалительный агент, и TNF- α); 2 кластер – положительные корреляции между моноаминами – адреналином, норадреналином и

дофамином, как показатель их конверсии; 3 кластер – положительные связи внутри сообщества микроорганизмов – между типом *Bacteroidetes* и типами *Actinobacteria* и *Fusobacteria*, что обеспечивает полное использование пищевых ресурсов, перерабатываемых для них типом *Firmicutes*. Связи средней силы между системами слабо выражены и представлены отрицательным взаимодействием IL-6 с дофамином и положительными корреляциями IL-6 с бактериями типов *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* и *Fusobacteria* (рис. А).

В целом можно отметить, что в группе ТРД преобладают отрицательные взаимодействия слабой силы (рис. А). Авторами показано, что сложное взаимодействие и избыточность систем отрицательной обратной связи приводят к более тонкому уровню контроля и большей гибкости, что позволяет организму адаптироваться к изменяющимся условиям окружающей среды [7].

Для детей группы РАС-тип (рис. Б) характерно наименьшее, по сравнению с остальными группами, число средних и сильных связей (8 из 190), представленных в основном межсистемными взаимодействиями. У детей группы РАС-тип, так же как у ТРД, сохранена корреляция между «цитокинами тревоги» - TNF- α и IL-1 β , но без их балансировки IL-6, а также положительная корреляция между бактериями типов *Bacteroidetes* и *Fusobacteria*. Эти связи поддержаны положительным взаимодействием внутри нейрогормональной системы между окситоцином и серотонином, а также положительными корреляциями IL-4/дофамин, дофамин/*Proteobacteria*, кортизол/*Proteobacteria* и отрицательной – IL-6/кортизол (рис. Б). Низкое число средних и сильных корреляционных связей у детей группы РАС-тип может свидетельствовать о функциональной инертности основных регуляторных систем. Однако, как показано авторами [12], взаимодействие между окситоцином и серотонином через серотониновые рецепторы играет критическую роль в нормальном развитии социального поведения у детей, что может найти отражение в ранее показанной нами схожести биологических фенотипов ТРД и детей РАС-тип [10].

В группе детей РАС-шизотип можно отметить отсутствие сильных взаимодействий внутри цитокиновой системы и кластер связей адреналина: положительные - с норадреналином и дофамином и отрицательную – с триптофаном (рис. В). И это неудивительно, т.к. известно, что моноамины обеспечивают защитную реакцию «бой/бегство» при действии стрессоров, при этом влияя на снижение уровней молекул социальной коммуникации - окситоцина, и серотонина (метаболита триптофана) [13]. Кроме того, наибольшее количество корреляций (5) средней силы у детей группы РАС-шизотип обнаружено у IL-10, который важен для поддержания гомеостаза организма с помощью тонкой настройки иммунного ответа на микроорганизмы (толерантность для нормобиоты и элиминация патогенов) [14]: положительные – с кинуренином и микроорганизмами типа

Fusobacteria и отрицательные – с бактериями типов *Firmicutes*, *Actinobacteria* и *Proteobacteria* (рис. В).

Для детей группы РШС характерно большое число (80 из 171) корреляций средней и высокой силы. Внутри иммунной системы обнаружены только положительные связи между всеми изученными цитокинами (как про-, так и противовоспалительными), которые поддержаны положительными корреляциями цитокинов с адреналином и норадреналином (рис. Г). Отсутствие отрицательных обратных связей внутри цитокиновой системы может быть связано с наличием воспаления и гиперреактивностью иммунной системы, часто наблюдаемой у детей с РШС [15]. В системе моноаминов серотонин практически полностью противопоставлен дофамину (по направленности связей) и образует отрицательную корреляцию с триптофаном (метаболитом, из которых он образуется) и положительные – со всеми типами микроорганизмов кишечника. Обращает на себя внимание практически полное отсутствие связей средней и высокой силы внутри сообщества микроорганизмов кишечника (кроме положительных корреляций между типами *Firmicutes* и *Actinobacteria*, а также между *Bacteroidetes* и *Firmicutes*) (рис. Г).

Заключение

Таким образом, наличие слабых, преимущественно отрицательных взаимодействий между иммунной, нейроэндокринной системами и микробным сообществом кишечника у ТРД и детей с РАС способствует поддержанию гомеостаза организма в пределах нормы. Тогда как высокая насыщенность сильными корреляционными связями у детей с РШС отражает низкий адаптационный потенциал и потерю пластичности основных регуляторных систем.

Список литературы

1. Taub D.D. Neuroendocrine interactions in the immune system. *Cell Immunology*. 2008. Vol. 252. No. 1-2. P. 1-6. DOI: 10.1016/j.cellimm.2008.05.006.
2. McEwen B.S. Neurobiological and systemic effects of chronic stress. *Chronic Stress (Thousand Oaks)*. 2017. Vol. 1. DOI: 10.1177/2470547017692328.
3. Procaccini C., Pucino V., De Rosa V., Marone G., Matarese G. Neuro-endocrine networks controlling immune system in health and disease. *Frontiers in Immunology*. 2014. Vol. 5. P. 143. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00143.
4. Nisticò R., Salter E., Nicolas C., Feligioni M., Mango D., Bortolotto Z.A., Gressens P., Collingridge G.L., Peineau S. Synptoimmunology - roles in health and disease. *Molecular Brain*. 2017. Vol. 10. No. 1. P. 26. DOI: 10.1186/s13041-017-0308-9.

5. Tang W., Meng Z., Li N., Liu Y., Li L., Chen D., Yang Y. Roles of gut microbiota in the regulation of hippocampal plasticity, inflammation, and hippocampus-dependent behaviors. *Frontiers Cellular and Infection Microbiology*. 2021. Vol. 10. P. 611014. DOI: 10.3389/fcimb.2020.611014.
6. Dantzer R. Neuroimmune interactions: from the brain to the immune system and vice versa. *Physiological Reviews*. 2018. Vol. 98. No. 1. P. 477-504. DOI: 10.1152/physrev.00039.2016.
7. Billman G.E. Homeostasis: the underappreciated and far too often ignored central organizing principle of physiology. *Frontiers in Physiology*. 2020. Vol. 11. P. 200. DOI: 10.3389/fphys.2020.00200.
8. Bilbo S.D., Schwarz J.M. The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2012. Vol. 33. No. 3. P. 267-286. DOI: 10.1016/j.yfrne.2012.08.006.
9. Горбань А.Н., Смирнова (Петушкова) Е.В. Эффект группового стресса и Корреляционная адаптометрия. [Электронный ресурс]. URL: <http://adaptometry.narod.ru/Index.htm> (дата обращения: 16.03.2021).
10. Бурмистрова А.Л., Филиппова Ю.Ю. Конгруэнтность и фенотипическая пластичность иммунной и нервной систем у детей с расстройствами аутистического спектра в сравнении с расстройствами шизофренического спектра // *Медицинская иммунология*. 2020. Т. 22. № 4. С. 703-716. DOI: 10.15789/1563-0625-CAP-1968.
11. Филиппова Ю.Ю., Бурмистрова А.Л. Когнитивная ось старости: воспаление – микробиота тонкого кишечника // *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии*. 2017. № 5. С. 3-9. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-5-3-9.
12. Nagano M., Takumi T., Suzuki H: Critical roles of serotonin-oxytocin interaction during the neonatal period in social behavior in 15q dup mice with autistic traits. *Science Reports*. 2018. Vol. 8. No. 1. P. 13675. DOI: 10.1038/s41598-018-32042-9.
13. Porges S.W. The polyvagal perspective. *Biological Psychology*. 2007. Vol. 74. No. 2. P. 116-43. DOI: 10.1016/j.biopsycho.2006.06.009.
14. Khandaker G.M., Cousins L., Deakin J., Lennox B.R., Yolken R., Jones P.B. Inflammation and immunity in schizophrenia: implications for pathophysiology and treatment. *Lancet Psychiatry*. 2015. Vol. 2. No. 3. P. 258-270. DOI: 10.1016/S2215-0366(14)00122-9.
15. 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*. 2018. Vol. 25. No. 5-6. P. 285-299. DOI: 10.1159/000492113.