

На правах рукописи

Неклюдова Анастасия Константиновна

**Мозговые механизмы обработки ритмических звуков у детей с типичным
развитием и нарушением генов SHANK3 и MECP2**

1.5.5 – физиология человека и животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2024

Работа выполнена в Лаборатории высшей нервной деятельности человека Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН».

Научный руководитель: **Сысоева Ольга Владимировна**
к.п.н., ведущий научный сотрудник Лаборатории высшей нервной деятельности человека ФГБУН «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН»

Официальные оппоненты: **Мачинская Регина Ильинична**
д.б.н., профессор, член-корреспондент РАО, заведующая лабораторией нейрофизиологии когнитивного развития ФГБНУ «Институт развития, здоровья и адаптации ребенка»

Гальперина Елизавета Иосифовна
к.б.н., старший научный сотрудник Института эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург

Ведущая организация: ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»
Министерства науки и высшего образования
Российской Федерации, г Москва.

Защита состоится 15 мая 2024 г., в 14:00 на заседании Диссертационного совета 24.1.046.01 при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН по адресу: 117485, Москва, ул. Бутлерова 5А. С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН», а также на сайте: <https://ihna.ru> Автореферат разослан «_____» 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

д.б.н. Иерусалимский В.Н. 

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Аутизм, или расстройство аутистического спектра (РАС), характеризуется сложностями в социальном взаимодействии, повторяющимся поведением, а также задержкой речи и сенсорными нарушениями. Для многих симптомов РАС, в том числе для нарушений слухового восприятия и развития речи, характерна гетерогенность, что часто затрудняет исследования когнитивных процессов в этой группе (Tager-Flusberg, 2016; Tager-Flusberg и др., 2011).

Существует множество гипотез о причинах возникновения аутизма, и одна из них связана с нарушением работы системы парвальбуминовых интернейронов (Filice и др., 2020). В связи с этим особый интерес представляет изучение слухового стационарного ответа (ССО) — вызванного ответа мозга, регистрируемого с помощью электроэнцефалограммы (ЭЭГ) или магнитоэнцефалограммы (МЭГ) в ответ на предъявление ритмического стимула и соответствующего частоте стимуляции (Galambos и др., 1981). ССО наиболее выражен на частоте 40 Гц (Picton и др., 2003), и на этой частоте активность ССО снижается при блокировке парвальбуминовых интернейронов, что указывает на их участие в генерации данного ответа (Cardin и др., 2009; Metzner и др., 2019). Результаты исследований указывают как на снижение ССО при РАС (De Stefano и др., 2019; Roberts и др., 2021; Seymour и др., 2020; Wilson и др., 2007), так и на отсутствие изменений (Arutiunian и др., 2023; Edgar и др., 2016; Ono и др., 2020; Stroganova и др., 2020). Такое расхождение результатов может быть связано с вышеупомянутой гетерогенностью аутизма. В нашей работе мы предлагаем в качестве возможного решения этой проблемы исследование ССО у детей с генетическими синдромами, ассоциированными с РАС.

Особенный интерес для нас представляют два синдрома, синдром Ретта и синдром Фелан-МакДермид, так как при них наблюдается нарушение работы системы парвальбуминовых интернейронов (Chao и др., 2010; Filice и др., 2016; Ito-Ishida и др., 2015a). Синдром Ретта — нарушение развития, связанное с нарушениями гена *MECP2* на X-хромосоме (Moretti & Zoghbi, 2006), встречается в подавляющем большинстве случаев у девочек (Sarajlija и др., 2015). Заболевание характеризуется нормальным развитием до 6-18 месяцев, после чего наступает стадия регресса, в ходе которой могут быть утеряны ранее приобретенные речевые и моторные навыки. Синдром Ретта ассоциирован с симптомами аутизма в 60% случаев (Richards и др., 2015). Синдром Фелан-МакДермид (ФМД) возникает при аномалиях в гене *SHANK3* и характеризуется гипотонией, задержкой развития или отсутствием экспрессивной речи,

а также в 50-75% случаев пациенты имеют коморбидный диагноз РАС (Sarasua и др., 2014; Soorya и др., 2013, Richards и др., 2015).

Помимо исследования слухового стационарного ответа при нарушениях развития необходимо также определить роль этого ответа в слуховом восприятии при типичном развитии. Исследования показывают, что ССО на частоте 40 Гц связан с окном интеграции стимула и восприятием речи в шуме у взрослых (Ross и др., 2002; Ross & Fujioka, 2016), а также с детекцией паузы в шуме (Ross и др., 2002), что указывает на его участие в тонкой временной обработке информации. При этом, его вовлеченность в слуховое восприятие у детей не изучалась.

При ритмической стимуляции возникает также и второй ответ — устойчивая волна (УВ) — который связывают с восприятием стимула как целостного имеющего тон звука (Gutschalk и др., 2002; Keceli и др., 2012; Krumbholz и др., 2003). Этот ответ становится более выраженным на высоких частотах, появляясь, видимо, на той частоте, когда в ритмическом стимуле начинает слышаться тон, даже если сам стимул состоит из отдельных щелчков. ССО снижается на частотах выше 50 Гц (Brugge и др., 2009), что указывает на то, что два ответа имеют разную частотную специфичность. Психофизические эксперименты показали, что в диапазоне около 30 Гц слуховая система становится более чувствительна к изменениям ритмических стимулов (Krumbholz и др., 2000; Phillips и др., 2012), что, вероятно, связано с переходом от временной обработки информации к спектральной. При этом, на электрофизиологическом уровне этот переход не изучался, и мы в данной работе рассматриваем связь слухового стационарного ответа и устойчивой волны со способностью различать стимулы разной частоты у детей от 5 лет до 18 лет в кросс-секционном исследовании.

Изучение временного и спектрального механизмов обработки ритмической стимуляции у детей с синдромальными формами РАС может выявить, есть ли связь между повреждением конкретного молекулярно-генетического пути с нарушением механизмов генерации ССО или УВ. Также мы сосредоточились на исследовании вовлеченности этих двух механизмов в восприятие ритмических звуков у типично развивающихся детей от 5 до 18 лет. Это позволило предположить, какие именно процессы оказываются нарушенными у детей с генетическими синдромами, ассоциированными с РАС, и выдвинуть вероятные подходы к разделению гетерогенной группы РАС на подгруппы.

Предыдущие исследования показали изменения работы как временного механизма обработки слуховых стимулов (слухового стационарного ответа), так и

спектрального (устойчивой волны) у детей с РАС. В данной работе мы сосредоточились на исследовании этих изменений у детей с генетическими синдромами, при которых велик риск появления аутизма и нарушений речи: синдроме Ретта и синдроме Фелан-МакДермид. Выбор методов соответствовал нашей научной задаче: мы исследовали электрофизиологические ответы при ритмической слуховой стимуляции с разной частотой (16, 27, 40 и 83 Гц). Выбор такого диапазона мы объясняем тем, что ССО и УВ имеют разную частотную специфичность, и с его помощью мы можем проследить переход от частотного диапазона, в котором большую роль играет временной механизм, к тому, где больше становится вовлечен спектральный механизм. Мы можем предположить, что при генетических синдромах этот переход может быть нарушен. Помимо этого, есть данные, что 40-Гц ССО менее выражен в младшем возрасте (Cho и др., 2015), и мы предполагали, что у детей ответ может быть более активен на низких частотах. Конкретные значения частоты (16, 27, 40 и 83 Гц) мы выбирали так, чтобы ни один из стимулов не вызывал гармонику, совпадающую по частоте с другим стимулом.

Цели и задачи исследования

Целью данной работы является исследование мозговых механизмов обработки ритмических звуков у детей с нарушением генов *MECP2* и *SHANK3* и детей с типичным развитием.

Для выполнения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Изучить изменения слухового стационарного ответа и устойчивой волны при ритмической стимуляции разной частоты у детей с генетическими синдромами и типично развивающихся детей в возрастном диапазоне от 3 до 18 лет.
2. Исследовать связь слухового стационарного ответа и устойчивой волны с психометрическими характеристиками восприятия ритмических звуков у типично развивающихся детей.

Научная новизна

1. Впервые на основе сопоставления психофизических и ЭЭГ данных у детей с типичным развитием исследована связь между электроэнцефалографическими показателями реакции мозга на ритмическую звуковую стимуляцию разной частоты (слуховым стационарным ответом и устойчивой волной) и параметрами слухового восприятия. Это позволило прояснить роль временного и спектрального механизмов обработки слуховой информации и проследить, при каких характеристиках ритмического стимула происходит переход между ними.

2. Впервые исследованы слуховой стационарный ответ и устойчивая волна как компоненты вызванной электрической активности мозга при слуховой ритмической стимуляции у детей с нарушениями генов *MECP2* и *SHANK3*. Изучение этих электроэнцефалографических показателей при моногенных формах РАС является перспективным с точки зрения выявления связи конкретных молекулярно-генетических нарушений с особенностями мозговых механизмов обработки слуховой информации, обнаруженными в некоторых исследованиях с участием детей с аутизмом

Теоретическая и практическая значимость

В нашем исследовании синдромальные моногенные формы аутизма выступают моделями для изучения нарушения слухового восприятия, что позволяет более детально изучить эту сложную психическую функцию и нейронные механизмы, лежащие в ее основе, что и определяет теоретическую значимость работы. Практическая значимость обусловлена недостатком нейрофизиологических исследований пациентов с нарушениями генов *MECP2* и *SHANK3*, а также возможностью предложить один из способов разделения идиопатического аутизма на подгруппы, связанные с нарушением тех или иных физиологических путей. Более точное понимание связи нарушения двух изучаемых электрофизиологических ответов с генетическими механизмами и психофизическими параметрами позволит использовать их в качестве биомаркеров для дифференциальной диагностики и проверки эффективности терапевтических подходов, а также для оценки нарушений на индивидуальном уровне у неговорящих пациентов, что является важной диагностической задачей.

Положения, выносимые на защиту

1. При типичном развитии у детей в анализе ритмических слуховых стимулов участвуют как минимум два отдельных механизма обработки слуховой информации: временное различение тонкой ритмической структуры и анализ частотной составляющей ритмического звука. Эти механизмы имеют разную чувствительность к частоте стимуляции и коррелируют с двумя параметрами вызванной электрической активности мозга: первый — временной — со слуховым стационарным ответом, который наиболее выражен для частот в диапазоне около 27-40 Гц, а второй — спектральный — с устойчивой волной, которая максимально выражена на частотах от 40 Гц и выше.
2. У детей с нарушениями генов *MECP2* и *SHANK3* вызванная активность мозга, связанная с временным механизмом обработки слуховой информации, имеет

нарушенную частотную динамику. При нарушении гена *MECP2* ответ мозга снижен при стимуляции с частотами 27 и 40 Гц, а при нарушении гена *SHANK3* — при стимуляции с частотой 40 Гц. Выявленные различия ЭЭГ показателей свидетельствуют о возможных нарушениях нейрональных механизмов анализа временной структуры слуховой информации при исследованных генетических синдромах.

3. Активность мозга, связанная со спектральным механизмом обработки ритмической слуховой информации, при мутации гена *MECP2* оказывается снижена в широком диапазоне частот, а при мутации гена *SHANK3* только на частоте 40 Гц.

Степень достоверности и апробация диссертации

Достоверность полученных результатов определяется значительным и достаточным для статистического анализа количеством наблюдений, четкой постановкой цели и задач, использованием в работе современных нейрофизиологических методов исследования, применением адекватных методов сбора, обработки данных и статистического анализа.

Материалы и результаты диссертации были представлены на семинарах и конференциях: на XXV, XXVI, XXVII научных школах- конференциях молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии (ИВНД и НФ РАН, г. Москва, 2021, 2022, 2023), на VII Международном междисциплинарном конгрессе «Нейронаука для медицины и психологии» (г. Судак, 2021), на встрече международного Общества изучения аутизма (Insag 2021), на встрече Общества биологической психиатрии (SOBP 2022), на мировом Конгрессе по психиатрии (2022), на международном Конгрессе по клинической нейрофизиологии (ICCN 2022), на международной конференции «Речь, грамотность и дислексия» (2022), а также неоднократно обсуждались на семинарах лаборатории высшей нервной деятельности человека ИВНД и НФ РАН.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 печатных работ, из них 4 статьи в журналах, рекомендованных ВАК РФ и индексируемых международными базами данных научного цитирования Scopus и Web of Science Core Collection.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 105 страницах машинописного текста, состоит из введения, четырех глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных

обозначений, списка литературы, включающего 181 наименование, а также списка публикаций по теме диссертации. Работа иллюстрирована 2 таблицами и 14 рисунками, имеет 4 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Методы и материалы исследования

В исследовании приняли участие 37 детей с синдромом Ретта (37 девочек) и 11 пациентов с синдромом Фелан-МакДермид (4 девочки). Контрольная группа для синдрома Ретта состояла из 38 детей (16 девочек), а для участников с синдромом Фелан-МакДермид мы выбрали контрольную группу из 11 человек, индивидуально уравнивая по возрасту с участниками из клинической группы (± 4 месяца), так как один из наших показателей был чувствителен к возрастным изменениям. В этой группе был также один взрослый испытуемый, так как один из пациентов с синдромом Фелан-МакДермид был старше 18 лет. Таким образом, здесь контрольная группа состояла из 11 испытуемых (4 девочки/девушки) со средним возрастом 10.8 ± 6.5 в диапазоне от 3.02 до 24.3 лет. Возраст участников, а также результаты проведенных опросов всех групп представлен в Таблице 1.

Записи ЭЭГ у пациентов с синдромом Ретта и синдромом Фелан-МакДермид проводились на базе отделения клинической генетики НИКИ им. Вельтищева РНИМУ им. Н.И. Пирогова и в Институте высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН. Исследование выполнено с соблюдением принципов Хельсинской Декларации, и было одобрено Этическим комитетом при Институте Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии РАН (протокол №3, дата принятия 10.07.2020). Все испытуемые или их законные представители давали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Таблица 1. Демографические данные участников исследования. N (F) — количество участников в группе, в скобках указано количество девочек. SRS (social responsiveness scale) — опросник на социальную отзывчивость. RSS (Rett severity symptom scale) — опросник выраженности симптомов синдрома Ретта.

Группа	N (F)	Возраст	SRS	RSS
синдром Ретта	37 (37)	7.67±3.22, диапазон: 2.83-16.86	-	9.5±3.3
Контрольная группа для синдрома Ретта	38 (16)	11.59±3,66, диапазон: 5.17-17,96	47±26	-
синдром Фелан-МакДермид	11 (4)	10.9±6.5, диапазон: 3.3-24.5 лет	92±34	-
Контрольная группа для синдрома Фелан-МакДермид	11(4)	10.8±6.5, диапазон 3.0-24.3	45±28	-

Эксперимент состоял из двух частей: психофизическое исследование и ЭЭГ-исследование. В психофизическом исследовании принимали участие лишь дети с типичным развитием, так как не все дети из клинических групп могли бы выполнить данное задание. Психофизическая часть включала в себя задание на различение частоты щелчков. Испытуемым предъявлялись две последовательности щелчков (эталонной частоты и меняющейся), и им было необходимо ответить, одинаковые ли стимулы или разные. Частота второго стимула менялась адаптивно в зависимости от ответа: если испытуемый отвечал «одинаковые», то второй стимул отходил на один шаг от эталонного. Процедура повторялась до тех пор, пока испытуемый четыре раза не достигал стимула, который он считал идентичным эталону. После этого шаг был изменен на меньшее значение, и эксперимент продолжался. Пороговым стимулом был тот, что был идентифицирован как «идентичный» в четвертый раз с использованием наименьшего шага. Порог различения частоты щелчков рассчитывался как процент “межкликкового” интервала последнего стимула, предъявленного испытуемому, от “межкликкового” интервала эталонного стимула. В статистическом анализе были использованы логарифмированные значения. Задание состояло из четырех серий, в каждой из которых эталонный стимул предъявлялся на частоте 16, 27, 40 или 83 Гц, то есть различение частоты щелчков происходило “вокруг” этих частот. Также законные представители участников заполняли опросники: шкалу социальной отзывчивости (SRS) для групп типично развивающихся детей, детей с РАС и пациентов с синдромом Фелан-МакДермид и шкалу оценки тяжести симптомов при синдроме Ретта для детей с синдромом Ретта.

Запись ЭЭГ проводилась при помощи 28-канального энцефалографа (система Neurotravel) с частотой дискретизации 500 Гц и широкополосным онлайн фильтром в

диапазоне 0.016–70 Гц. Электроды были расположены по международной схеме 10-10, сопротивление электродов не превышало 10 кОм. Запись проводилась монополярно с ушными электродами объединенными для каждого полушария в качестве референтов, нейтральный электрод (земля) был расположен центрально. Во время записи ЭЭГ для поддержания интереса к исследованию испытуемые смотрели видео без звука, и одновременно в наушники им предъявлялись последовательности щелчков с разной частотой (16, 27, 40 и 83 Гц). Форма волны каждого щелчка представляла собой прямоугольный импульс. Длительность каждой последовательности щелчков составляла 500 мс, межстимульный интервал менялся в диапазоне от 500 до 800 мс в псевдослучайном порядке, каждая последовательность предъявлялась 150 раз. Стимулы предъявлялись билатерально с интенсивностью 65 дБ в накладные наушники с помощью программного обеспечения Presentation (NeuroBehavioral Systems, Олбани, Калифорния, США).

Данные были обработаны с помощью алгоритмов библиотеки Fieldtrip (Oostenveld и др., 2010), а также с помощью скриптов, написанных в Matlab. Предобработка включала в себя разделение на эпохи с интервалом 200 мс до начала стимуляции и 1000 мс после, интерполяцию шумных каналов, а также отсечение выбросов амплитуды, превышающих 3 стандартных отклонения внутри данных каждого испытуемого (Delorme и др., 2007; Tost и др., 2021). Последняя процедура повторялась до тех пор, пока значений в данном диапазоне не оставалось.

Для анализа слухового стационарного ответа был проведен частотно-временной анализ с использованием вейвлет-преобразования Морле с шагом в 2 Гц в диапазоне от 1 до 50 Гц для стимуляции на 16, 27 и 40 Гц и в диапазоне от 1 до 90 Гц для стимуляции на 83 Гц. Далее мы рассчитали значения фазовой когерентности (inter-trial phase coherence), которая показывает стабильность фазовой синхронизации во время предъявления стимуляции. Для подсчета фазовой когерентности мы брали 45 случайных предъявлений из данных каждого участника (минимальное количество, которое было доступно у каждого участника исследования), так как эта метрика крайне чувствительна к изменениям количества данных (Cohen, 2014). Далее значения когерентности были усреднены на всем времени стимуляции (0-500 мс), а также в пределах 2 Гц от частоты стимуляции (например, 39-41 Гц для стимуляции с частотой 40 Гц). Для дальнейшего анализа мы выбрали 6 электродов (FC3, FC4, FCz, C3, C4 и Cz), так как на графике топографического распределения именно в них активность была наиболее выражена. Чтобы обнаружить устойчивую волну, мы не применяли фильтр для верхних частот. Артефактные эпохи были удалены по алгоритму,

описанному выше. Далее мы рассчитали среднюю абсолютную амплитуду в интервале 250-550 мс с поправкой на базовую линию в диапазоне -200-0 мс. Временное окно 250-550 мс было выбрано потому, что устойчивый компонент развивается после комплекса вызванных потенциалов и достигает своего пика примерно через 250 мс после начала стимула и остается стабильным во время стимуляции (Stroganova и др., 2020). Для дальнейшего анализа мы также выбрали 6 электродов (FC3, FC4, FCz, C3, C4 и Cz), так как топографическое распределение показало, что значения амплитуды выше именно в этих электродах, а также чтобы проводить релевантное сравнение с данными по ССО.

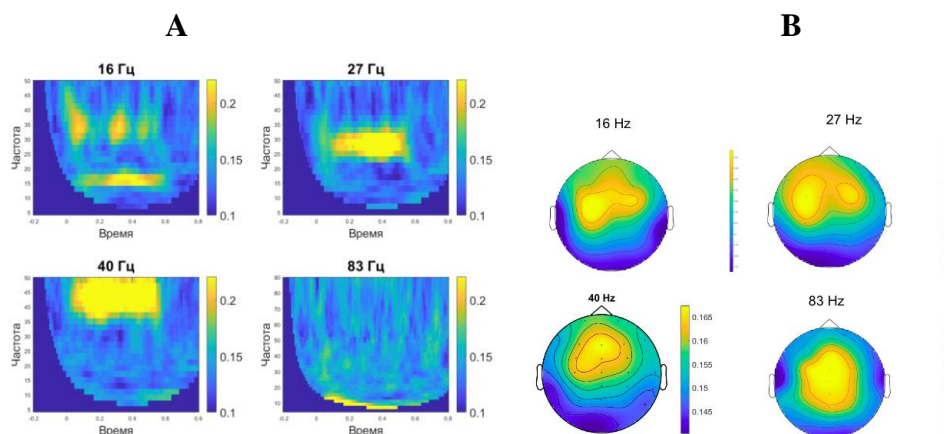
Для статистического анализа порога различения частоты щелчков в контрольной группе мы применили многофакторный дисперсионный анализ ANCOVA 3 типа с Частотой в качестве внутригруппового фактора (четыре уровня: 16, 27, 40 и 83 Гц) и Возрастом в качестве ковариаты. Для исследования значения фазовой когерентности и амплитуды устойчивой волны у контрольной группы мы использовали многофакторный дисперсионный анализ ANCOVA 3 типа с фактором Возраста в качестве ковариаты и фактором Частоты в качестве внутригруппового фактора. Чтобы оценить различие в топографическом распределении значений наших параметров, мы ввели два внутригрупповых фактора: Латеральность с тремя уровнями (“левая” для электродов FC3, C3, “правая” для электродов FC4 и C4, а также “центральная” для электродов FCz и Cz) и Регион (“фронтально-центральный” для электродов FC3, FCz и FC4 и “центральный” для электродов C3, C4 и Cz). Для значений фазовой когерентности не было соблюдено допущение о равенстве дисперсий между группами, что накладывало ограничение на применение анализа ANCOVA, поэтому мы применили логарифмическую трансформацию к этим данным (как в Kurthen I. и др., 2022). Для апостериорного анализа мы применяли попарный Т-тест. Апостериорные корреляции с возрастом были подсчитаны с помощью коэффициента корреляции Пирсона. Чтобы оценить вклад каждой переменной (возраст, амплитуда устойчивой волны и значение фазовой когерентности) в выполнение задания на различение частоты щелчков, мы провели регрессионный анализ. Для этого мы оценили множественную линейную регрессионную модель для каждой частоты отдельно со значениями порога различения частоты щелчков как зависимой переменной и с возрастом, амплитудой устойчивой волны и значением фазовой когерентности в качестве предикторов. Для последних двух показателей данные были усреднены по электродам, которые были отобраны для анализа, а именно FC3, FC4, FCz, C3, C4 и Cz, для избежания проблемы коллинеарности. Для исследования особенностей значения фазовой когерентности и амплитуды устойчивой волны у детей с синдромом Ретта мы добавили межгрупповой фактор Группа

(“типично развивающиеся дети” и “Синдром Ретта”), и провели многофакторный дисперсионный анализ ANCOVA 3 типа с перечисленными выше внутригрупповыми факторами и ковариатой. Для исследования особенностей данных ответов при синдроме Фелан-МакДермид мы использовали ранговый критерий Вилкоксона для связанных выборок, так как количество испытуемых в группе было небольшим. Здесь мы проводили отдельный анализ для каждой из частот, используя при этом усредненные значения по 6 ранее выбранным электродам. Статистический анализ был выполнен с помощью языка программирования R и набором статистических пакетов (RStudio, версия 2023.03.1, пакеты rstatix, lmer).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Механизмы временной и спектральной обработки слуховой информации у детей разного возраста и их связь с восприятием ритмических стимулов

Статистический анализ слухового стационарного ответа у типично развивающихся детей показал существование значимых эффектов Частоты ($F(3,108)=27.561$, $p<0.001$), Региона ($F(1,36)=7.185$, $p=0.01$), а также взаимодействие Частоты и Латеральности ($F(6,216)=4.576$, $p<0.001$) и Возраста и Латеральности ($F(2,72)=3.514$, $p=0.03$). Результаты представлены на Рисунке 1. Наиболее выраженный ответ наблюдался при стимуляции с частотами 27 и 40 Гц, в то время как при 16 Гц ССО был выражен слабее, а при 83 Гц практически не фиксировался. Большие значения наблюдались при отведении от фронтально-центральных электродов по сравнению с центральными, но также была выявлена зависимость Региона электрода с наиболее выраженной активностью от частоты стимуляции: на высоких частотах (40 и 83 Гц) наиболее выраженная активность наблюдалась в центральных электродах, чего не было при стимуляции с частотами 16 и 27 Гц. Помимо этого, мы также обнаружили положительную корреляцию с возрастом для стимуляции с частотой 40 Гц. Результаты представлены на Рисунке 1.



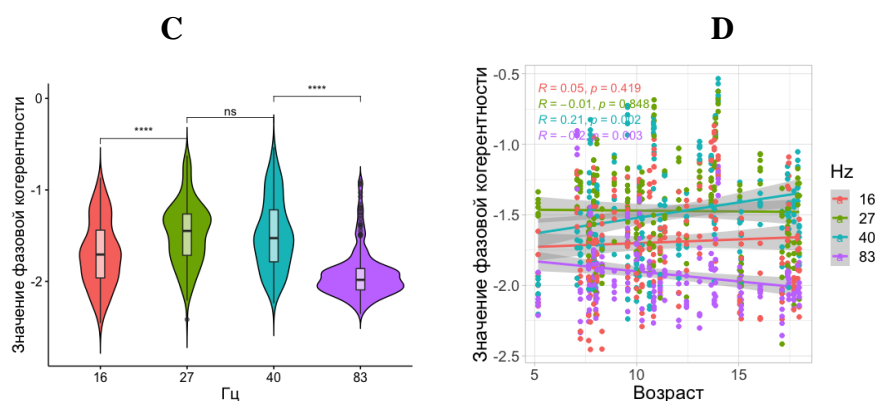


Рисунок 1. Слуховой стационарный ответ в ответ на предъявление щелчков разной частоты у детей контрольной группы. А: Значения фазовой когерентности для различных частот (x — время, сек, y — частота, значения когерентности увеличиваются на шкале градуировано от синего к желтому цвету); В: топографические карты для фазовой когерентности при стимуляции с разной частотой; С: скрипичный график для фазовой когерентности при стимуляции с разной частотой (* означает уровень значимости при $p < 0.05$, *** при $p < 0.0001$, ns — отсутствие значимых результатов (non significant). D: Корреляция фазовой когерентности с возрастом на разных частотах (приведены коэффициенты Пирсона). На графиках С и D значения фазовой когерентности логарифмированы. На рисунках С и D красным цветом обозначены значения при стимуляции с частотой 16 Гц, зеленым — при стимуляции с частотой 27 Гц, бирюзовым — с частотой 40 Гц, а фиолетовым — с частотой 83 Гц.

Статистический анализ амплитуды устойчивой волны у типично развивающихся детей показал существование значимых эффектов Возраста ($F(1,36)=7.725$, $p=0.003$), Частоты ($F(3,108)=35.744$, $p < 0.001$), Региона ($F(1,36)=80.190$, $p < 0.001$), а также взаимодействия Возраста и Латеральности ($F(2,72)=3.419$, $p=0.03$), Частоты и Региона ($F(3, 108)=14.77$, $p < 0.001$), а также Латеральности и Региона ($F(2,72)=15.366$, $p < 0.001$). Результаты представлены на Рисунке 2. Устойчивая волна постепенно увеличивала амплитуду при переходе от стимуляции 16 Гц к 27 Гц и от 27 к 40 Гц, но при этом не от 40 к 83 Гц. Мы можем предположить, что УВ тем больше увеличивает амплитуду, чем больше последовательность щелчков приобретает характеристики тона, при этом достигая своего порога при стимуляции частотой в диапазоне около 40 Гц. В предыдущих исследованиях было показано увеличение амплитуды УВ при повышении частоты стимуляции у взрослых испытуемых (Gutschalk и др., 2004; Keceli и др., 2015), мы же в нашей работе впервые подтвердили, что эта закономерность характерна для детей. Кроме того, в нашем исследовании было показано, что устойчивая волна становится менее выражена в более старшем возрасте, что также наблюдалось в предыдущем исследовании (Arutiunian и др., 2022). В наших данных УВ была более выражена в правом полушарии для фронтально-центральных электродов и в левом — для центральных электродов, при том во фронтально-центральных

электродах ее выраженность, в целом, была выше, чем в центральных. В предыдущих исследованиях наблюдалась правосторонняя специализация устойчивой волны на всех частотах (Keceli и др., 2015; Stroganova и др., 2020).

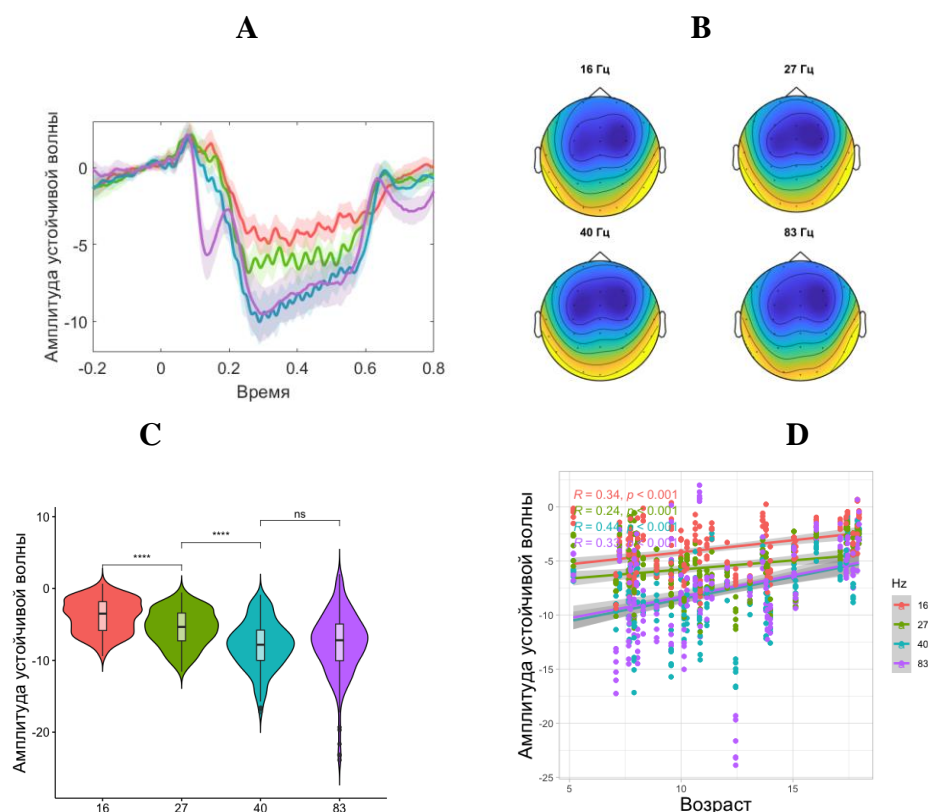


Рисунок 2. Устойчивая волна у детей контрольной группы. А: Устойчивая волна для различных частот (по оси X — время, сек, по оси Y — амплитуда устойчивой волны, мкВ), светлыми областями показаны 95% доверительные интервалы; В: топографические карты для устойчивой волны при стимуляции с разной частотой; С: скрипичный график для амплитуды устойчивой волны при стимуляции с разной частотой (* означает уровень значимости при $p < 0.05$, *** при $p < 0.0001$, ns — отсутствие значимых результатов (non significant), D: корреляция амплитуды устойчивой волны с возрастом для разных частот (коэффициент Пирсона). На рисунках А, С и D красным цветом обозначены значения при стимуляции с частотой 16 Гц, зеленым — при стимуляции с частотой 27 Гц, бирюзовым — с частотой 40 Гц, а фиолетовым — с частотой 83 Гц.

Анализируя поведенческие результаты задания на различения частоты щелчков, мы выявили значимое влияние фактора Частота ($F(3,93)=36.433$, $p < 0.001$) и увидели резкое снижение порога при различении частоты в диапазоне около 27 Гц и около 40 Гц. Можно предположить, что этот процесс поддерживается двумя разными механизмами: временным на низких частотах (до ~30 Гц) и спектральным на высоких (выше ~30 Гц), и при переходе между этими частотными диапазонами различение стимулов становится более нюансированным. С помощью регрессионного анализа мы

проанализировали вовлеченность ССО и УВ в процесс различения щелчков в различных частотных диапазонах, и выявили, что ССО является предиктором успешности выполнения задания при различении частоты в диапазоне около 27 Гц, а УВ — в диапазоне около 40 Гц. Результаты представлены в Таблице 2 и Рисунке 3.

Таблица 2. Значения регрессионной модели для порога различения частоты щелчков (ПРЧЩ) как зависимой переменной и Возраста, значений фазовой когерентности слухового стационарного ответа (ССО) и амплитуды устойчивой волны (УВ) как регрессов. R2 значение приведено скорректированным. *означает уровень значимости при $p < 0.05$, *** при $p < 0.0001$.

Частота стимуляции	ПРЧЩ ~ Возраст+ССО+УВ	Возраст	ССО	УВ
16 Гц	F(3,43)=1.102, $p=0.36$, $R^2=0.01$	$p=0.08$	$p=0.95$	$p=0.66$
27 Гц	F(3,43)=6.194, $p=0.001$, $R^2=0.27$	$p=0.01^*$	$p=0.005^*$	$p=0.36$
40 Гц	F(3,43)=4.588, $p=0.007$, $R^2=0.18$	$p=0.002^*$	$p=0.57$	$p=0.006^*$
83 Гц	F(3,32)=0.1, $p=0.95$, $R^2=-0.07$	$p=0.68$	$p=0.93$	$p=0.64$

Изменения с периодичностью 16-83 Гц связаны с различными фонетическими и лингвистическими характеристиками сложных звуков и речи. Так, изменения в пределах 20-50 Гц были связаны с изменением времени начала озвончения (voice onset time), что связывают с различением взрывных согласных (“д”, “т”, “б”, “п”) (Sharma & Dorman, 1999; Steinschneider и др., 1999; Eggermont, 2015). Временной механизм, показателем работы которого является ССО, может быть вовлечен в этот процесс. В то же время изменения на более высоких частотах — 50-500 Гц — связаны с восприятием тона (pitch perception), что на уровне восприятия речи может быть передано как различение интонации (Rosen, 1992). Здесь может быть задействован спектральный анализ, на ЭЭГ представленный устойчивой волной.

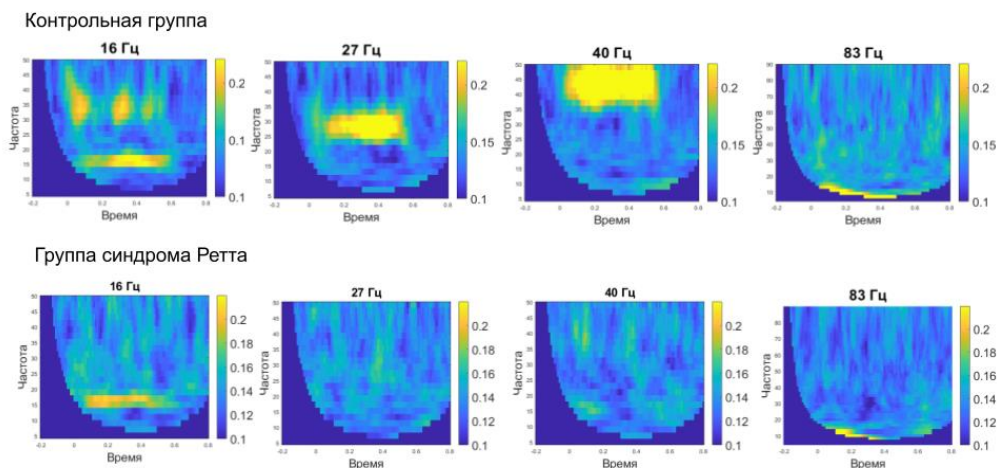
Временной и спектральный механизмы обработки ритмических звуков у детей с нарушением гена *MECP2* и нарушением гена *SHANK3*

Слуховой стационарный ответ

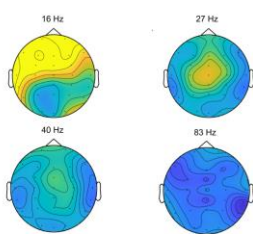
В нашем исследовании у детей с синдромом Ретта (нарушение гена *MECP2*) и синдромом Фелан-МакДермид (нарушение гена *SHANK3*) наблюдались атипичные развитие и закономерности работы слухового стационарного ответа.

Статистический анализ ССО у детей с синдромом Ретта показал существование значимых эффектов Группа ($F(1,66)=13.328$, $p<0.001$), а также взаимодействия факторов Группа и Частота ($F(3,198)=7.199$, $p<0.001$), и Частоты, Группы и Латеральности ($F(6,396)=3.053$, $p=0.01$). У детей с синдромом Ретта ССО был наиболее снижен при стимуляции с частотой 27 и 40 Гц. На 16 Гц ответ хоть и был менее выражен, чем в контрольной группе, но отличался не так сильно, как на 27 и 40 Гц, что может говорить о частичной сохранности механизма обработки ритмических звуков на этой частоте. Помимо этого, мы не обнаружили закономерностей частоты ССО от латеральности, которую видели в группе типично развивающихся детей, что также говорит о нарушении данного ответа. Результаты представлены на Рисунке 3.

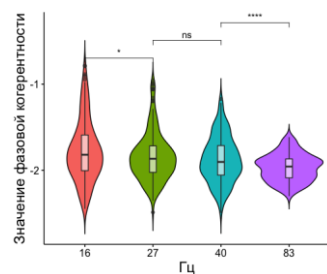
A



B



C



D

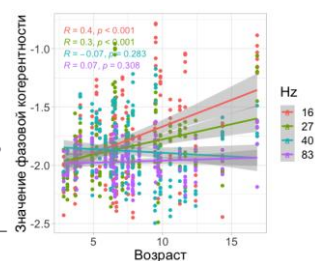
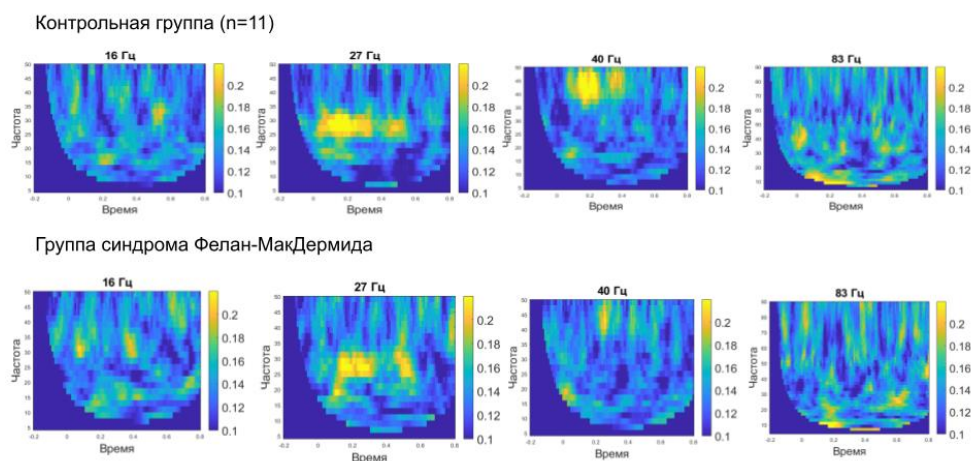


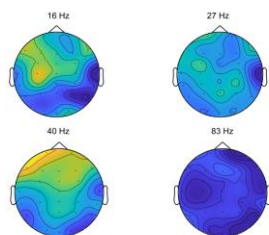
Рисунок 3. Слуховой стационарный ответ у детей с синдромом Ретта. А: Значения фазовой когерентности для различных частот в группе синдрома Ретта и контрольной группе (по оси X отображено время, по оси Y — частота, более желтый цвет на шкале означает большее значение когерентности); В: топографические карты для фазовой когерентности при стимуляции с разной частотой в группе синдрома Ретта; С: скрипичный график для фазовой когерентности при стимуляции с разной частотой (* означает уровень значимости при $p<0.05$, *** при $p<0.0001$, ns — отсутствие значимых результатов (non significant). D: Корреляция фазовой когерентности с возрастом на разных частотах (приведены коэффициента Пирсона). На графиках С и D значения фазовой когерентности логарифмированы.

Статистический анализ слухового стационарного ответа у детей с синдромом Фелан-МакДермид показал специфическое снижение данного ответа на частоте 40 Гц ($p=0.03$). При этом, между частотами внутри группы детей с синдромом ССО не различался, что говорит об отсутствии большей эффективности временного ответа на частотах 27 и 40 Гц, что наблюдалось в контрольной группе. Результаты представлены на Рисунке 4.

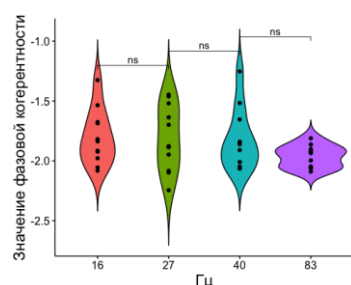
А



В



С



Д

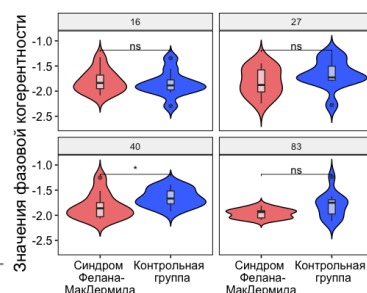


Рисунок 4. Слуховой стационарный ответ у детей с синдромом Фелан-МакДермид: **А:** Значения фазовой когерентности для различных частот в контрольной группе и группе Фелан-МакДермид (x — время, y — частота, более желтый цвет на шкале означает большее значение когерентности); **В:** топографические карты для фазовой когерентности при стимуляции с разной частотой для группы синдрома Фелана-МакДермида; **С:** скрипичный график для фазовой когерентности при стимуляции с разной частотой **Д:** значения фазовой когерентности в сравнении с контрольной группы для каждой из частот, (* означает уровень значимости при $p<0.05$, *** при $p<0.0001$, ns — отсутствие значимых результатов (non significant). На графиках **С** и **Д** значения фазовой когерентности логарифмированы. На рисунке **С** красным цветом обозначены значения при стимуляции с частотой 16 Гц, зеленым — при стимуляции с частотой 27 Гц, бирюзовым — с частотой 40 Гц, а фиолетовым — с частотой 83 Гц.

Нарушение ССО на частоте, близкой к частоте, ассоциированной с работой парвальбуминовых интернейронов (т.е., в диапазоне около 40 Гц), при синдроме Ретта и синдроме Фелан-МакДермид также может быть связано с нарушением работы системы парвальбуминовых интернейронов. В исследованиях на животных моделях синдрома Ретта было показано их нарушение (Chao и др., 2010, Ito-Ishida и др., 2015). В ряде исследований было показано, что нарушение гена *Shank3* приводит к снижению экспрессии парвальбумина (Filice и др., 2016), а также уменьшению размера и количества парвальбуминовых интернейронов (Gogolla и др., 2014). Одним из аспектов, который может быть нарушен из-за снижения активности парвальбуминовых нейронов, является изменение временной точности ответа пирамидных клеток, что было обнаружено при нарушении работы гена *Shank3* (Filice и др., 2020). В работе Engineer с соавторами было показано, что у мышей с поврежденным геном *Shank3* была снижена скорость “срабатывания” нейрона (firing rate) при быстром предъявлении различных стимулов (Engineer и др., 2018). Ритм в диапазоне около 40 Гц также связывают с процессом “связки элементов во времени” (temporal binding) (Singer & Gray, 1995). Было показано, что при нарушении работы генов *Shank3* и *Mesp2* фиксируется снижение мультисенсорной интеграции в островковой зоне (Gogolla и др., 2014). Эти данные позволяют предположить, что нарушение работы парвальбуминовой системы, которая наблюдается при синдроме Ретта и синдроме Фелан-МакДермид, затрудняет формирование образов сложных объектов, что в слуховой модальности может быть критично для развития речи.

Устойчивая волна

Статистический анализ амплитуды устойчивой волны у детей с синдромом Ретта показал существование значимых эффектов факторов Группы ($F(1,72)=61.517$, $p<0.001$), Частоты ($F(3,216)=4.040$, $p=0.008$), Региона ($F(1,72)=5.327$, $p=0.02$), взаимодействия Региона и Группы ($F(1,72)=22.867$, $p<0.001$), Группы, Частоты и Региона ($F(3,216)=2.709$, $p=0.04$), а также Возраста, Частоты и Латеральности ($F(6,432)=2.315$, $p=0.04$). Результаты представлены на Рисунке 5.

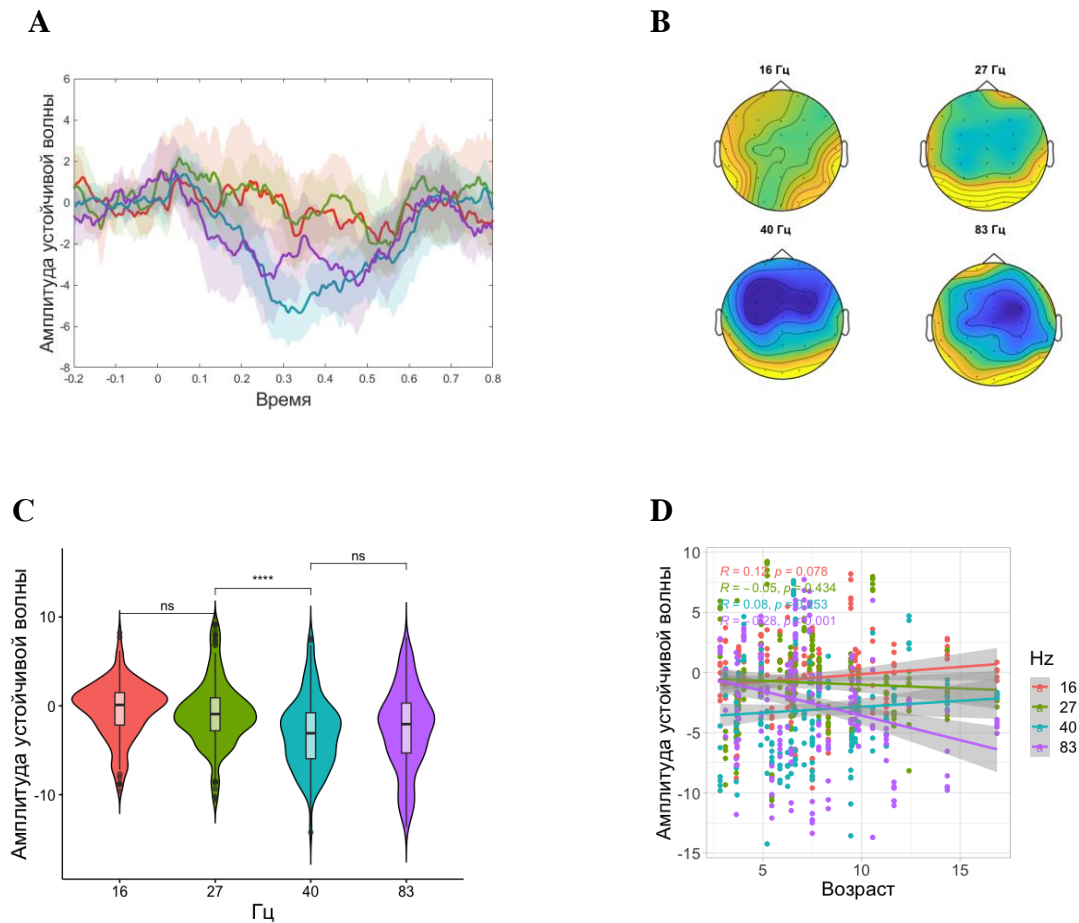


Рисунок 5. Устойчивая волна в группе детей с синдромом Ретта. А: Устойчивая волна для различных частот (по оси X отображено время, сек, по оси Y — амплитуда устойчивой волны, мкВ), светлыми областями показаны 95% доверительные интервалы; В: топографические карты для устойчивой волны при стимуляции с разной частотой; С: скрипичный график для амплитуды устойчивой волны при стимуляции с разной частотой (* означает уровень значимости при $p < 0.05$, *** при $p < 0.0001$, ns — отсутствие значимых результатов (non significant), D: корреляция амплитуды устойчивой волны с возрастом для разных частот (коэффициент Пирсона). На рисунках А, С и D красным цветом обозначены значения при стимуляции с частотой 16 Гц, зеленым — при стимуляции с частотой 27 Гц, бирюзовым — с частотой 40 Гц, а фиолетовым — с частотой 83 Гц.

Устойчивая волна при синдроме Ретта также, как и в контрольной группе, становилась более выраженной на высоких частотах (40 и 83 Гц), тем не менее, амплитуда была снижена на всех частотах по сравнению с контрольной группой, что говорит о том, что спектральный механизм различения тона в ритмических стимулах может быть нарушен при этом синдроме. Методологически сложно оценить на поведенческом уровне, действительно ли у пациентов с синдромом Ретта нарушено восприятие тона, однако косвенным свидетельством этого может служить ухудшение

просодических характеристик вокализации у детей с этим заболеванием (Rokorny и др., 2018). Важной особенностью данного ответа при синдроме Ретта является увеличение его амплитуды с возрастом на частоте 83 Гц, то есть тогда, когда последовательность щелчков приобретает отчетливо слышимый тон. Статистический анализ амплитуды устойчивой волны у детей с синдромом Фелан-МакДермид показал значимые различия с группой типично развивающихся детей лишь для 40 Гц ($r=0.441$, $p=0.04$, см. Рисунок 8). Закономерность увеличения амплитуды с частотой в группе детей с синдромом была сохранена. Результаты представлены на Рисунке 6.

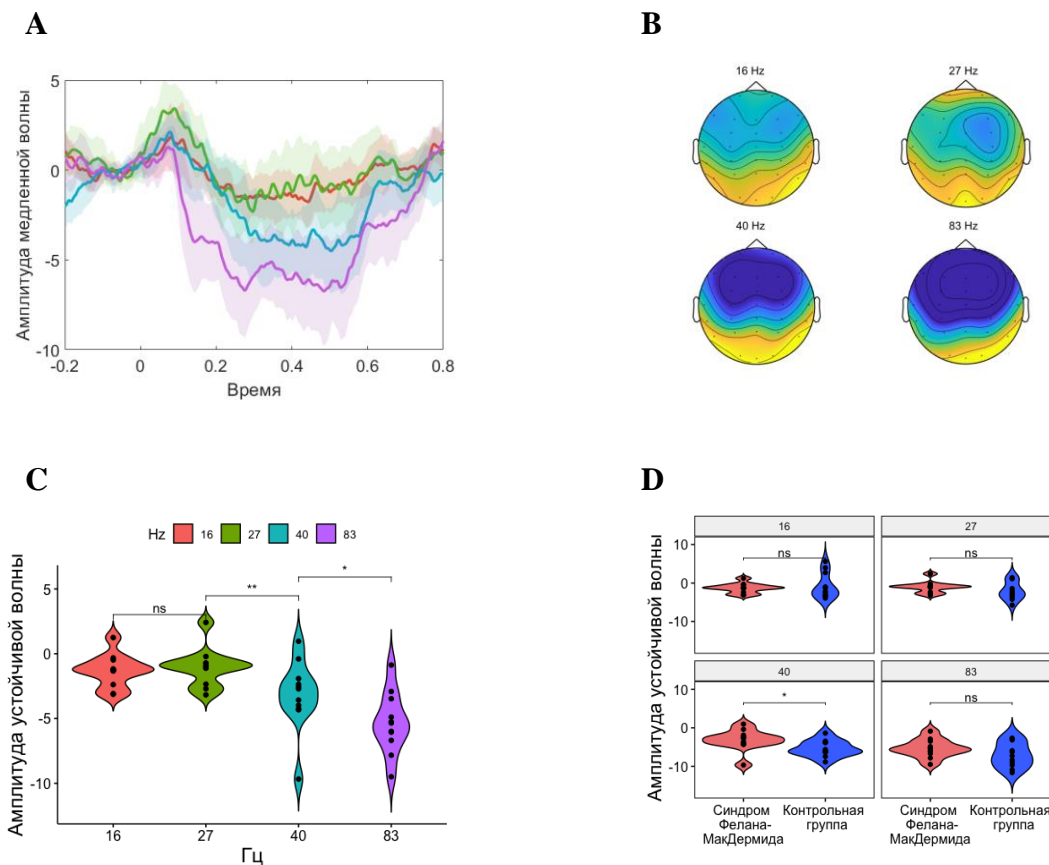


Рисунок 6. Устойчивая волна у детей с синдромом Фелана-МакДермида: А: Устойчивая волна для различных частот (x — время, сек, y — амплитуда устойчивой волны, мкВ), светлыми областями показаны 95% доверительные интервалы; В: топографические карты для устойчивой волны при стимуляции с разной частотой; С: скрипичный график для амплитуды устойчивой волны при стимуляции с разной частотой; D: значения фазовой когерентности в сравнении с контрольной группы для каждой из частот, (* означает уровень значимости при $p < 0.05$, *** при $p < 0.0001$, ns — отсутствие значимых результатов (non significant). На рисунках А и С красным цветом обозначены значения при стимуляции с частотой 16 Гц, зеленым — при стимуляции с частотой 27 Гц, бирюзовым — с частотой 40 Гц, а фиолетовым — с частотой 83 Гц.

При этом, в группе детей с этим синдромом мы обнаружили увеличение амплитуды при стимуляции 83 Гц по сравнению со стимуляцией 40 Гц, чего не наблюдалось у типично развивающихся детей, у которых, вероятно, на 40 Гц устойчивая амплитуда уже достигала своего максимума. Это может также указывать на то, что дети с синдромом Фелан-МакДермид начинают слышать ритмический сигнал как тон на более высоких частотах, чем дети из контрольной группы и что эта закономерность характерна и для более широкой группы детей с РАС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе мы показали возможность изучения синдромальных форм аутизма для выделения конкретных физиологических путей, которые могут быть связаны с появлением аутизма, а также их связь с поведенческими параметрами. Такой подход может не просто помочь пролить свет на этиологию аутизма и предложить новые терапевтические мишени, но также и сделать вклад в решение фундаментального вопроса о связи генов, мозга и поведения. Помимо этого, он предоставляет возможность выделить эндофенотип, характерный для конкретных генетических нарушений, что поможет связать генетические нарушения и фенотипические проявления болезни или какого-либо состояния (Gottesman & Gould, 2003; Walters & Owen, 2007). Эндофенотип может выступать объективным маркером изменений вследствие той или иной терапии, а также выступать критерием для разделения большой гетерогенной группы РАС на подгруппы с известным физиологическим механизмом, лежащим в основе появления симптоматики.

При синдроме Ретта и синдроме Фелан-МакДермид было обнаружено избирательное нарушение слухового стационарного ответа в диапазоне около 40 Гц. Это может быть связано с тем, что при данных синдромах нарушена система парвальбуминовых интернейронов, которые вовлечены в генерацию ответа на данной частоте. Мы предполагаем, что данный показатель может стать параметром для выделения подгруппы РАС, причиной появления которого является нарушение системы парвальбуминовых интернейронов. Также, мы впервые исследовали закономерности устойчивой волны при синдроме Ретта и синдроме Фелан-МакДермид. Наши результаты показали снижение амплитуды этого ответа при синдроме Ретта на всех частотах, но при этом сохранение закономерности увеличения амплитуды с частотой при переходе от 27 Гц к 40 Гц. Интересно, что на самой высокой частоте, 83 Гц амплитуда ответа с возрастом увеличивалась. При синдроме Фелан-МакДермид устойчивая волна отличалась от контрольной группы лишь при стимуляции с частотой

40 Гц, и закономерность увеличения амплитуды на высоких частотах также сохранялась.

Помимо этого, мы изучили вовлеченность данных механизмов в слуховое восприятие ритмических стимулов у типично развивающихся детей. Временной механизм наиболее активен на частоте 27 и 40 Гц, а на частоте 27 Гц вовлечен в различение частоты щелчков. Спектральный механизм становится более активным с повышением частоты стимуляции, а на частоте 40 Гц участвует в различении частоты щелчков. При этом, именно при переходе от различения щелчков при 27 Гц к 40 Гц различать две последовательности щелчков становится проще. При подключении спектрального ответа ритмический стимул приобретает тон, и за счет этого восприятие становится более нюансированным. Понимание роли данных механизмов в слуховом восприятии у типично развивающихся детей может помочь выявить причину задержку речевого развития у детей с нарушениями развития, а также предложить цели для возможной терапии и объективные параметры, по которым можно фиксировать успешность данной терапии.

ВЫВОДЫ

1. У детей с типичным развитием в анализе ритмических слуховых стимулов участвуют как минимум два механизма. Первый из них, временной механизм, на ЭЭГ отражается в параметрах слухового стационарного ответа, который связан с различением частоты щелчков при стимуляции в диапазоне около 27 Гц. Второй — спектральный механизм — ассоциирован с устойчивой волной, и связан с различением щелчков в диапазоне около 40 Гц, где наблюдается более тонкое различение ритмических звуков.
2. Значения фазовой когерентности слухового стационарного ответа наиболее сильно снижены в диапазоне около 27-40 Гц при нарушении гена *MECP2* и 40 Гц при нарушении гена *SHANK3*, что может быть связано с нарушением работы парвальбуминовых интернейронов, наблюдающимся при данных заболеваниях.
3. Амплитуда устойчивой волны снижена при нарушении гена *MECP2* на всех частотах, а при нарушении гена *SHANK3* снижена при стимуляции с частотой 40 Гц, при этом наблюдается увеличение амплитуды на более высоких частотах.
4. Изучение генетических синдромов, ассоциированных с аутизмом и нарушением речи, может позволить выделить нейрофизиологические пути и соответствующие им электроэнцефалографические биомаркеры, лежащие в основе отдельных подгрупп аутизма.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Neklyudova A**, Kuramagomedova R, Voinova A , Sysoeva O, Atypical brain responses to 40- Hz click trains in girls with Rett syndrome: Auditory steady- state response and sustained wave //Psychiatry and Clinical Neurosciences. – 2024.
2. Portnova G, **Neklyudova A**, Voinova V, Sysoeva O. Clinical EEG of Rett Syndrome: Group Analysis Supplemented with Longitudinal Case Report //Journal of Personalized Medicine. – 2022. – Т. 12. – №. 12. – С. 1973.
3. **Neklyudova A.** и др. Electrophysiological and behavioral evidence for hyper-and hyposensitivity in rare genetic syndromes associated with autism //Genes. – 2022. – Т. 13. – №. 4. – С. 671.
4. **Neklyudova A. K.** и др. 40-Hz Auditory Steady-State Response (ASSR) as a Biomarker of Genetic Defects in the SHANK3 Gene: A Case Report of 15-Year-Old Girl with a Rare Partial SHANK3 Duplication // International Journal of Molecular Sciences. – 2021. – Т. 22. – №. 4. – С. 1898.

Тезисы:

1. Сысоева О.В., **Неклюдова А.К.** Реакция навязывания ритмической стимуляции в ответе мозга как нейрофизиологический маркер развития восприятия тонкой слуховой структуры слухового сигнала у детей: Сборник тезисов XXIV съезда физиологического общества имени И.П. Павлова — Санкт-Петербург, 2023.
2. **Неклюдова А.К.**, Сысоева О.В., Слуховой стационарный ответ у детей с синдромальным и идиопатическим аутизмом, XXVII научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной деятельности и нейрофизиологии: сб. науч. тр. – Москва : Квант Медиа, 2023. – С. 88-89
3. **Neklyudova A.** и др. P427. Sustained Negative Wave in Response to 40 Hz Auditory Stimulation in Rett Syndrome //Biological Psychiatry. – 2022. – Т. 91. – №. 9. – С. S260.
4. **Neklyudova, A.**, Rebreikina, A., Voinova, V., Martynova, O., & Sysoeva, O. (2022). WE-217. Auditory steady-state response (ASSR) in children with the SHANK3 gene disruption. Clinical Neurophysiology, 141, S99.
5. **Неклюдова А.К.**, Сысоева О.В., Слуховой стационарный ответ как показатель развития восприятия речи в шуме и различения частот у детей, XXVI научная школа-конференция молодых ученых по физиологии высшей нервной

деятельности и нейрофизиологии: сб. науч. тр. – Москва : Квант Медиа, 2022. – С. 211-214

6. **Неклюдова А.К.** “Характеристики мозгового ответа при 40-Гц слуховой стимуляции при синдроме Ретта”, XVII Международный Междисциплинарный Конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, 30 мая-10 июня 2021 г.). – 2021. – С. 232–233.