



Трансляционные нейрофизиологические исследования аутизма

Татьяна Строганова

Лаборатория исследований аутизма

Московский Психолого-педагогический Университет

Аутизмы: диагностика и лечение. Настоящее (Waterhouse et al, 2016)

- *РАС – не спектр одного нарушения развития, а множество болезней, имеющих разные этиологию и патогенез.*
- *Сегодняшняя диагностика (МКБ-10; DSM-V) основана на внешних поведенческих симптомах, а не на этиологии и патогенезе болезни и не может помочь ни в постановке дифференциального диагноза, ни в выборе лечения*
- *Фармакологического лечения с доказанной эффективностью нет, успешность поведенческих способов коррекции сомнительна (нет двойных слепых клинических проб с контролем плацебо-эффекта)*
- *Нет способов раннего выявления РАС*
- ***Надежные** объективные биологические маркеры болезней РАС (генетические, физиологические, нейронная активность (фМРТ, ДТТ, ЭЭГ, etc)) отсутствуют*
- **БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ!**

Rev J Autism Dev Disord (2016) 3:302–329
DOI 10.1007/s40489-016-0085-x

REVIEW PAPER

ASD Validity

Lynn Waterhouse¹ • Eric London² • Christopher Gillberg³

Аутизмы: общее нарушение развития мозга

- Обусловлен генетически, но ассоциирован с многими генами
- Может быть вызван нарушением в одном гене - синдромальный аутизм
- Структурные изменения мозга (изменения серого и белого в-ва коры и мозжечка, уменьшение размеров таламуса, верхних олив).
- Как уменьшение так и увеличение связей между нейронными ансамблями.
- Эпилепсия (30%)
- Изменения слухового, зрительного, тактильного восприятия
- Нарушена регуляция уровня бодрствования.
- Сверх-сконцентрированное внимание и трудности его переключения
- Моторные стереотипии



Многочисленные гены, ассоциированные с аутизмом. Каждый обнаружен у малого числа людей с РАС, а также при других нервно-психических заболеваниях. Vortsman et al.

Autism genetics: opportunities and challenges for clinical translation. Nature Review, 2017

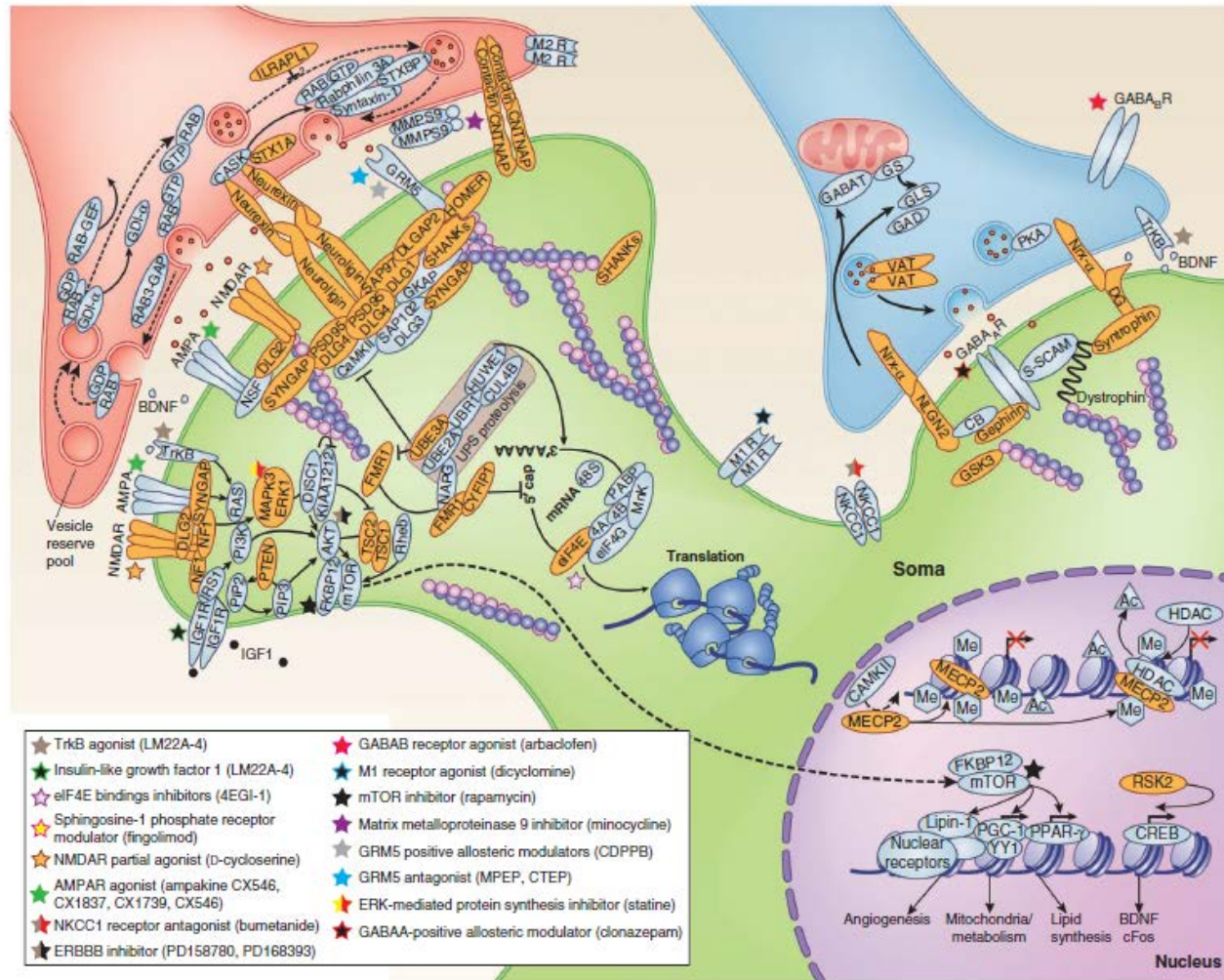
Table 2 | Genes associated with ASDs by sequencing studies

Gene	Chromosomal location	Estimated percentage of individuals with an ASD in whom this variant is identified	ASD penetrance* (rate of ASD in carriers)	Neuropsychiatric pleiotropy [‡] (associated neuropsychiatric phenotypes)	Somatic pleiotropy [‡] (associated somatic phenotypes)
<i>KATNAL2</i> (REF. 37)	18q21.1	0.08	Unknown	Unknown	Unknown
<i>POGZ</i> ³⁷	1q21.3	0.08	Incomplete ¹⁶⁴	ID ^{164,165} , speech delay ¹⁶⁴ , language delay ¹⁶⁴ , schizophrenia ⁶¹	Microcephaly ¹⁶⁴ , obesity ¹⁶⁴ , impaired vision ¹⁶⁴
<i>TBR1</i> (REFS 37,166)	2q24.2	0.08	Unknown	ID ¹⁶⁷	Unknown
<i>ADNP</i> ³⁷	20q13.13	0.10	Complete ¹¹⁸	ID ^{118,165} , ADHD ¹¹⁸	Recurrent infections ¹¹⁸ , short stature ¹¹⁸ , heart defect ¹¹⁸ , hypotonia ¹¹⁸ , hypermetropia ¹¹⁸ , epilepsy ¹¹⁸ , hyperlaxity ¹¹⁸
<i>SYNGAP1</i> (REF. 37)	6p21.32	0.10	Unknown	ID ^{168,169}	Epilepsy ¹⁶⁸
<i>GRIN2B</i> ^{37,166}	12p13.1	0.13	Unknown	ID ¹⁷⁰	Epilepsy ¹⁷⁰
<i>ANK2</i> (REF. 37)	4q25-q26	0.13	Unknown	None reported	Heart arrhythmia ¹⁷¹
<i>ARID1B</i> ³⁷	6q25.3	0.13	Incomplete ¹⁷²	ID ¹⁷² , speech impairment ^{172,173}	Short stature ¹⁷⁴ , hypertrichosis ¹⁷³ , cryptorchidism ¹⁷³ , epilepsy ¹⁷³ , vision impairment ¹⁷³
<i>SCN2A</i> ³⁷	2q24.3	0.13	Incomplete ⁵⁹	ID ⁶⁰ , schizophrenia ⁶¹	Epilepsy ⁶² , episodic ataxia ⁶²
<i>DYRK1A</i> ^{37,166}	21q22.13	0.13	Incomplete ¹⁷⁵	ID ^{175,176} , speech impairment ^{175,176} , ADHD ¹⁷⁵ , anxiety ¹⁷⁵	Microcephaly ^{175,176} , epilepsy ^{175,176} , vision impairment ¹⁷⁵ , short stature ¹⁷⁵ , gastrointestinal symptoms or feeding difficulties ^{175,176}
<i>CHD8</i> (REFS 37,166)	14q11.2	0.21	Incomplete ³²	ID ^{32,177} , schizophrenia ¹⁷⁷ , speech delay ¹⁷⁷ , sleep problems ³²	Macrocephaly ^{32,177} , gastrointestinal symptoms ³²

Ассоциированные с аутизмом мутации образуют генные сети, затрагивают архитектуру и функции нейронов

- *Белки клеточной адгезии и архитектуры синапсов*
 - *Эпигенетические регуляторы нейронной активности*
 - *Регуляторы экспрессии генов*
 - *Архитектура Na⁺ каналов*
 - *Ca²⁺ каналов*
 - *Химическая передача сигнала (нейротрансмиттеры)*
 - *Энергетический обмен в митохондриях*
 - *Регуляция активности микроглии*
 - *Другое*
- *GeneReviews, <http://www.genetest.org>. Copyright, University of Washington, Seattle 1997-2010.*

Передача сигнала в синапсах регулируется многочисленными протеинами и зависит от многих генов.

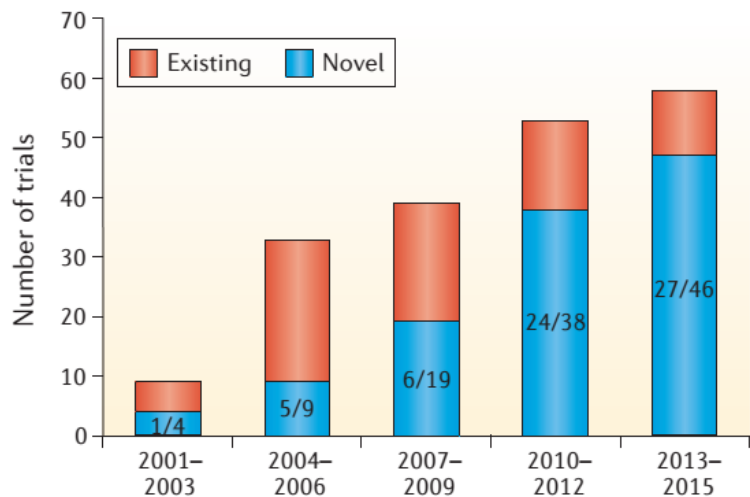


Delorme et al, 2014, Nature Medicine
Progress toward treatments for synaptic defects in autism.

Клинические испытания новых лекарств у пациентов с РАС – двойной слепой контроль эффекта плацебо

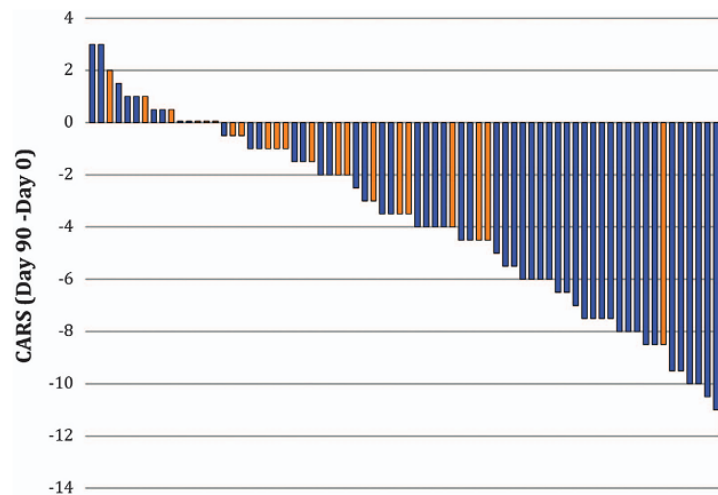
Рост числа испытаний **новых** лекарств
2000 по 2015 гг.

Vortsman et al, 2017, Nature Review



Эффект Буметанида

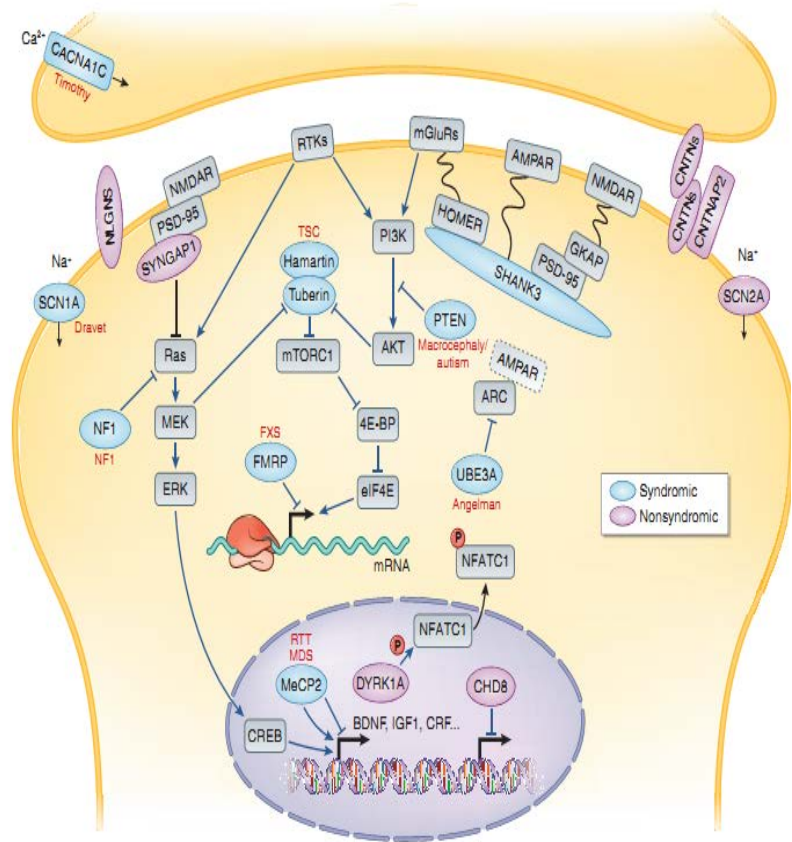
Ben-Ari et al, 2017, Nature



РАС и синдромальный аутизм

DIVERSE GENETIC CAUSES

- Known single gene genetic disorder: 5-7%
 - Fragile X
 - PTEN Macrocephaly Syndrome
 - Tuberous Sclerosis
- Metabolic Conditions: 5%
 - Mitochondrial Disorders
 - PKU
 - Creatinine Deficiency
- De Novo CNVs: 7-20% of individual with idiopathic ASDs
 - 15q11.2-3 duplications; 16p11.2 deletions and dup.
- Cytogenetically visible chromosomal abnormalities: 5% (P-W/Ang., Turner, Trisomy 21)



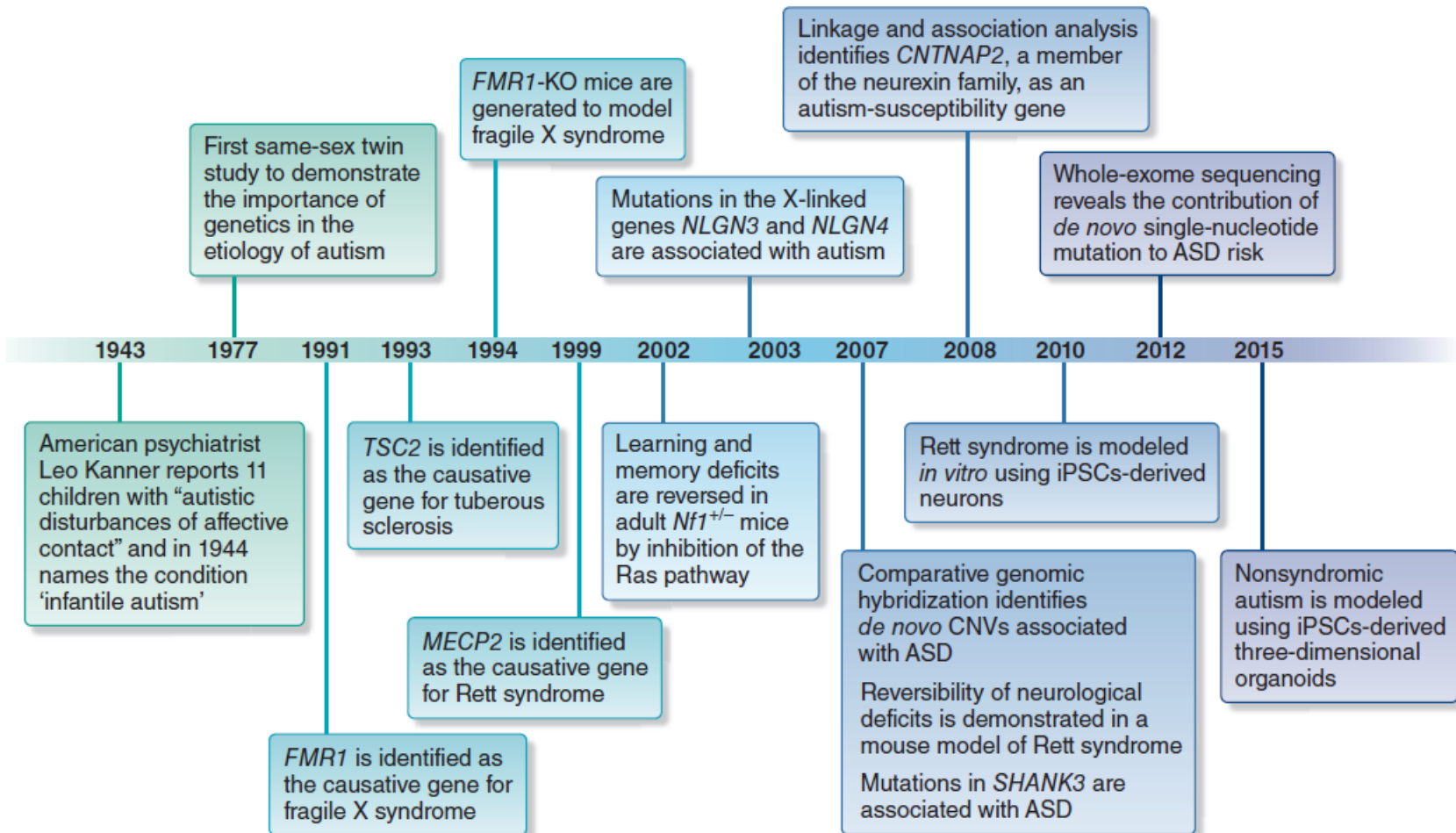
Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders

nature neuroscience

Уроки синдромального аутизма

Sztainberg & Zoghbi

Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders, Nature Neuroscience, 2016



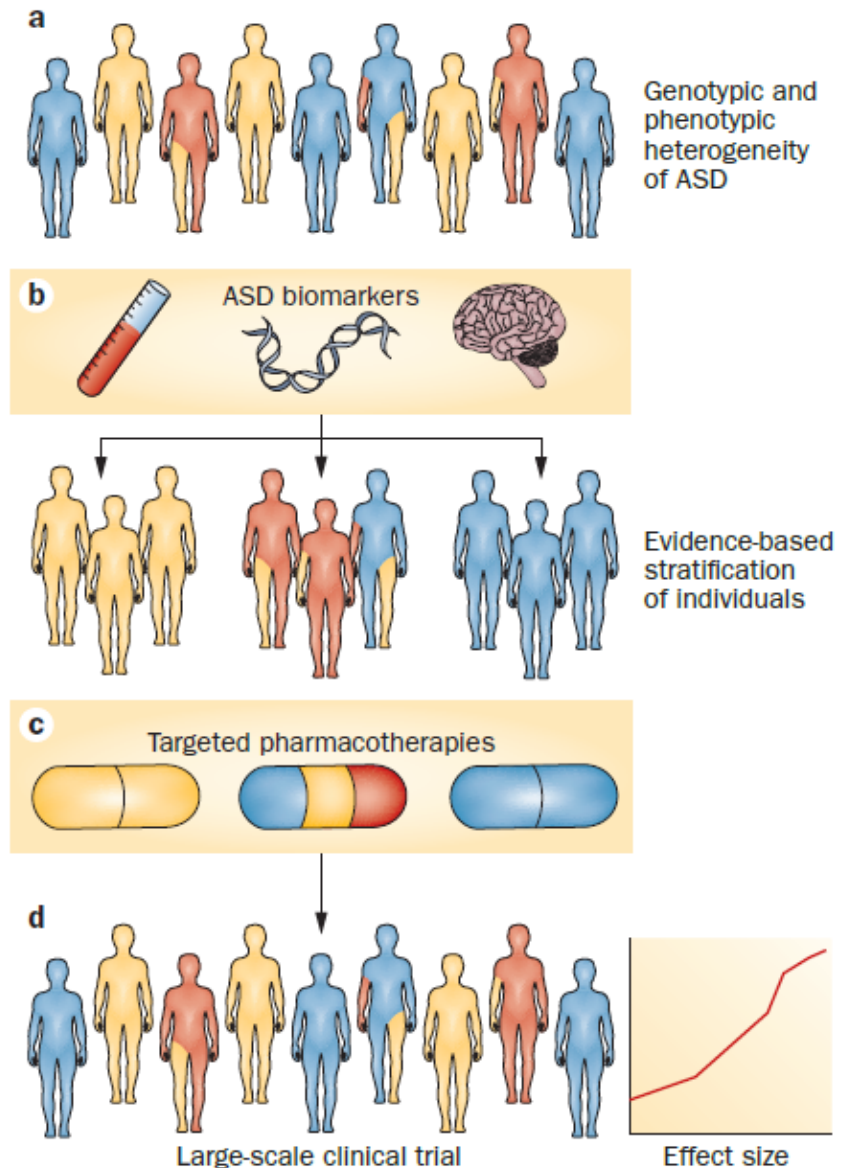
Животные модели синдромальных вариантов аутизма – уроки и обещания на будущее

- *Излечение возможно, если препараты используют*
 - *Направленно, в соответствии с патогенезом*
 - *например для животных с дефицитом белка FMRP - mGluR антагонист mavoglurant*
 - *Для животных и пациентов с туберозным склерозом с мутациями TSC1 и TSC2, PTEN генов – негативная регуляция mTOR пути - rapamycin, everolimus*
 - *в раннем возрасте!*
 - *Первые результаты клинических испытаний новых препаратов для пациентов с PAC (см. Lemonier et al, Translational Psychiatry (2012); Jeste and Geshwind, SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE (2016))*



Гетерогенность РАС - стратегия клинических испытаний новых препаратов

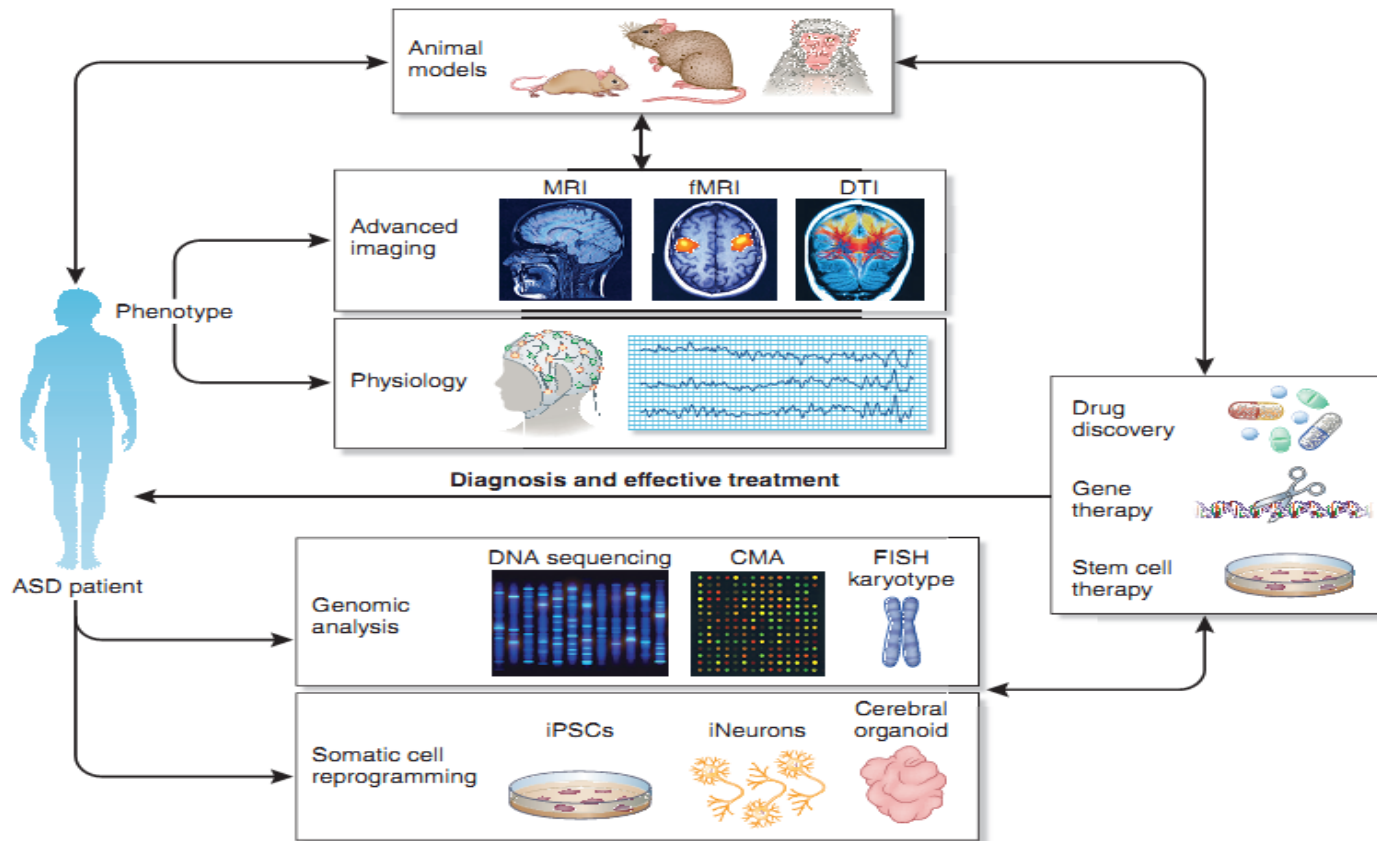
1. Потенциальный нейрофизиологический биомаркер нарушенного нейронного процесса, найденный на животных моделях (оптогенетика, patch-clamp recordings)
2. Трансляционные исследования от животных к человеку и от человека к животным
3. Объединение нейрофизиологических и генетических данных
4. Биологические маркеры для разделения людей с РАС в соответствии с патогенезом
5. Клинические испытания новых препаратов в целевых группах РАС



Зачем нужны нейрофизиологические критерии диагностики

- *Стратификация пациентов с РАС в соответствие с биологическими механизмами нарушений*
- *Клинические испытания новых лекарств должны проводиться в однородной по механизмам нарушения группе пациентов*
- *Эффективность фармакологического вмешательства должна оцениваться объективными методами*
- *Ранняя диагностика РАС по поведению ребенка невозможна на первом году жизни, нейрофизиологические критерии могут не иметь этих ограничений*

Роль нейрофизиологии человека в будущем – трансляционные исследования, направленные на дифференциальную диагностику патологии молекулярно-генетических путей РАС



Lessons learned from studying syndromic autism spectrum disorders

Будущее. Крутой поворот в диагностике и лечении РАС- вызовы

● Биологические исследования

- ◆ *Переход к биологическим критериям диагностики (RDoC – Research Domain Criteria National Institute of Mental Health, 2016)*
- ◆ *Использование геномных технологий и нейро-эндофенотипов для выяснения затронутых у пациента молекулярно-генетических путей, персонализированного подхода к лечению (Loth et al, Nature, 2016. Identification and validation of biomarkers for ASD)*

● Big Data Подход (объединенные базы данных)

- ◆ *Существующие ныне Big Data*
- ◆ *планируемые консорциумы –*

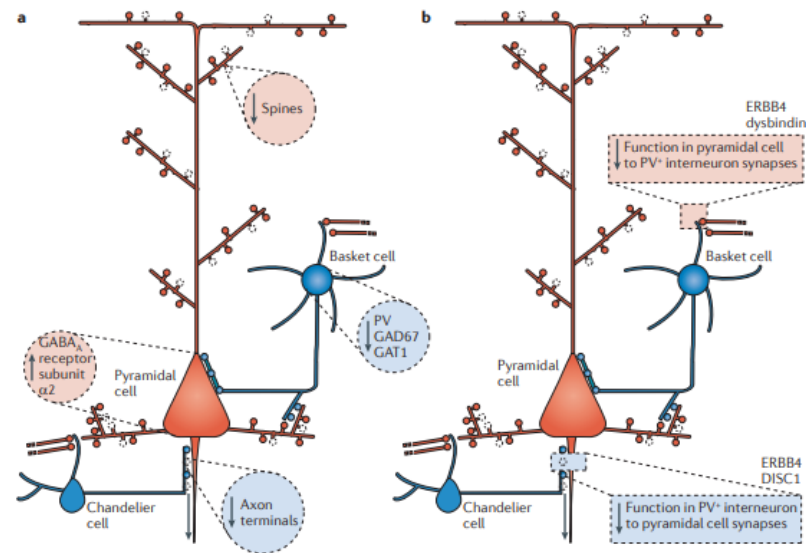
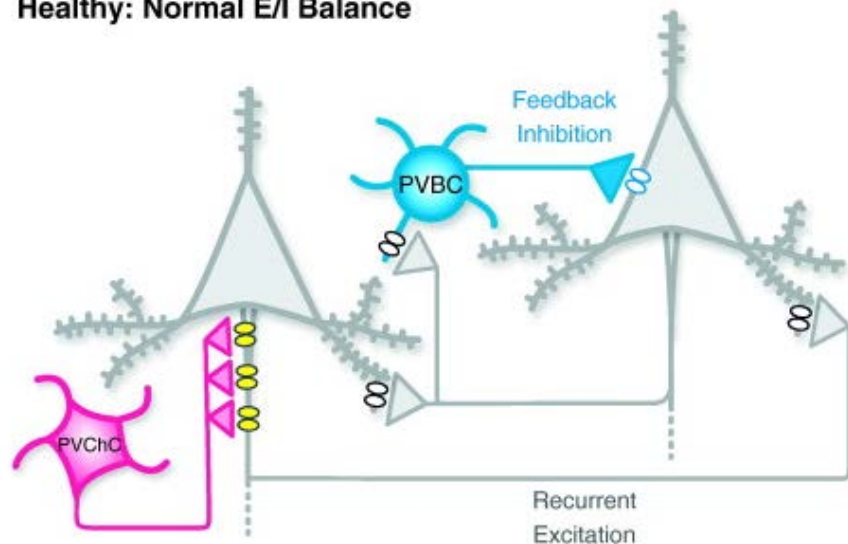
Нарушенный баланс возбуждения/торможения нейронных ансамблей при аутизме: В/Т баланс

- Одна из наиболее влиятельных физиологических теорий, объясняющих загадку аутизма (Rubenstein and Merzenich, 2003)

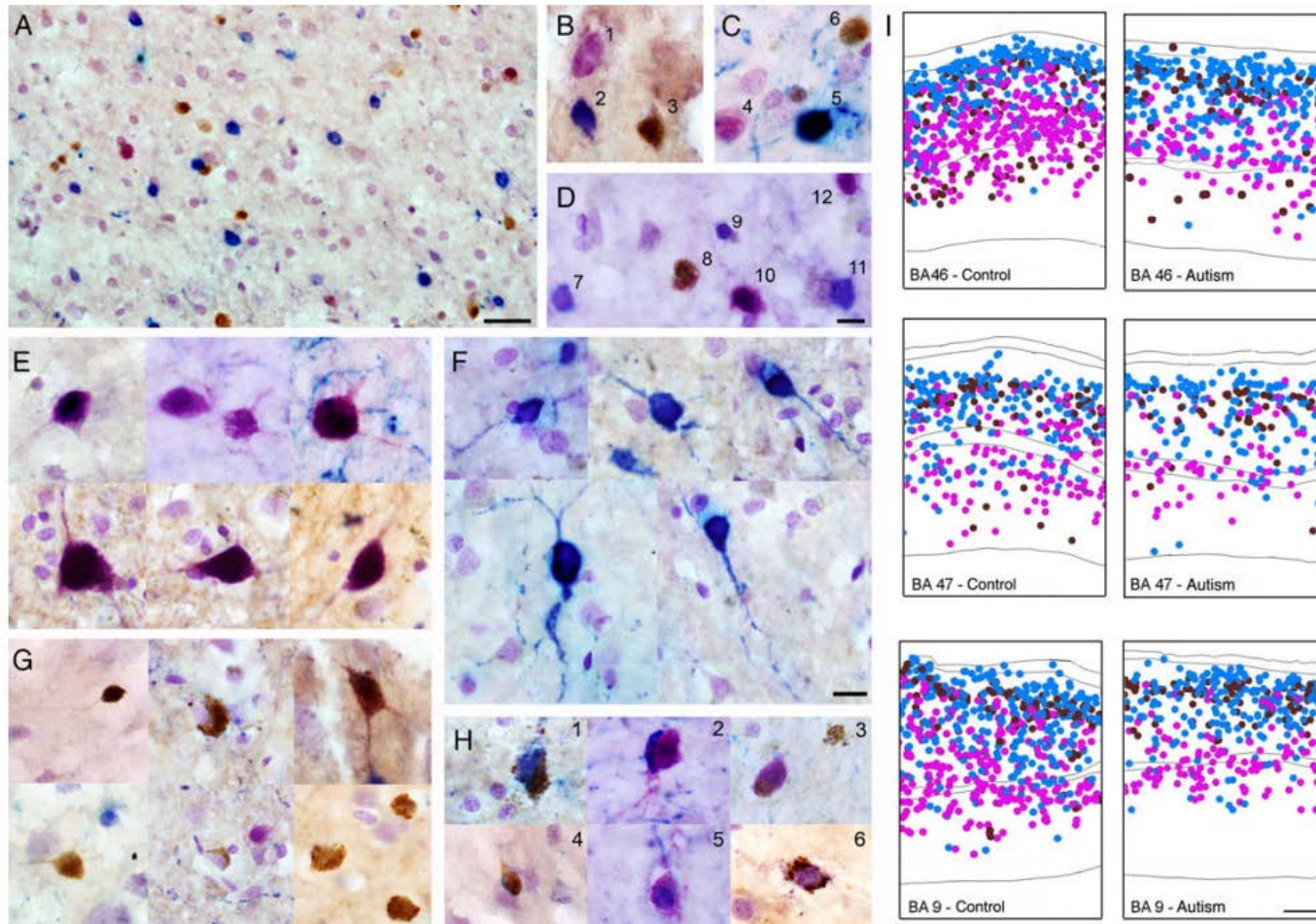
«In autism, hyper-excitabile cortex is ‘noisy’, poorly functionally differentiated, inherently unstable, and therefore susceptible to epilepsy» ...
- Многие гены, ассоциированные с аутизмом, участвуют в поддержании баланса возбуждения и торможения в нейронных сетях мозга (LeBlanc and Fagiolini, 2011)
- Нарушение баланса В/Т в раннем развитии мозга приводит к аномальному формированию нейронных сетей

Гомеостатическая регуляция баланса возбуждения и торможения (В/Т) на уровне межнейронных связей и ее нарушения при генетических поломках. Роль тормозных интернейронов в патогенезе РАС

Healthy: Normal E/I Balance

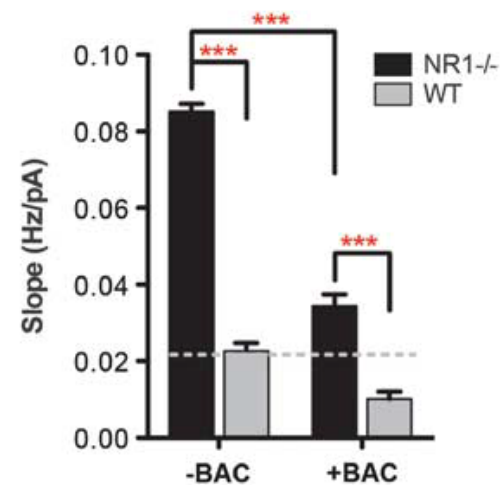
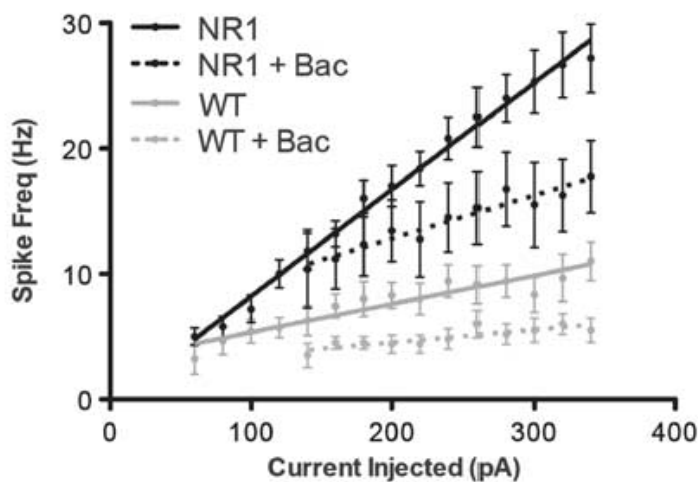
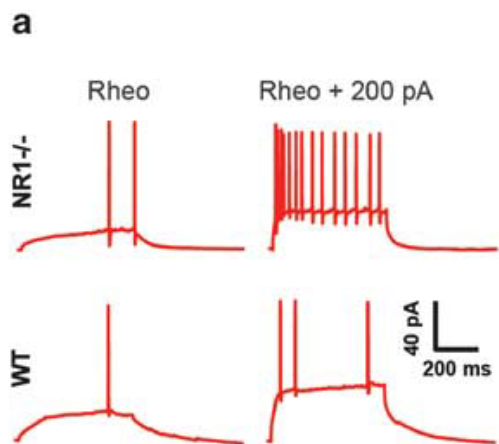


Число PV+ интернейронов (розовый) уменьшено в коре мозга людей с аутизмом (Hashemi et al, CerCor. 2016)



Низкая возбудимость PV+ тормозных нейронов у животных моделей РАС приводит к нарушениям регуляции баланса В/Т при усиливающемся притоке внешнего возбуждения, которую можно частично восстановить баклофеном

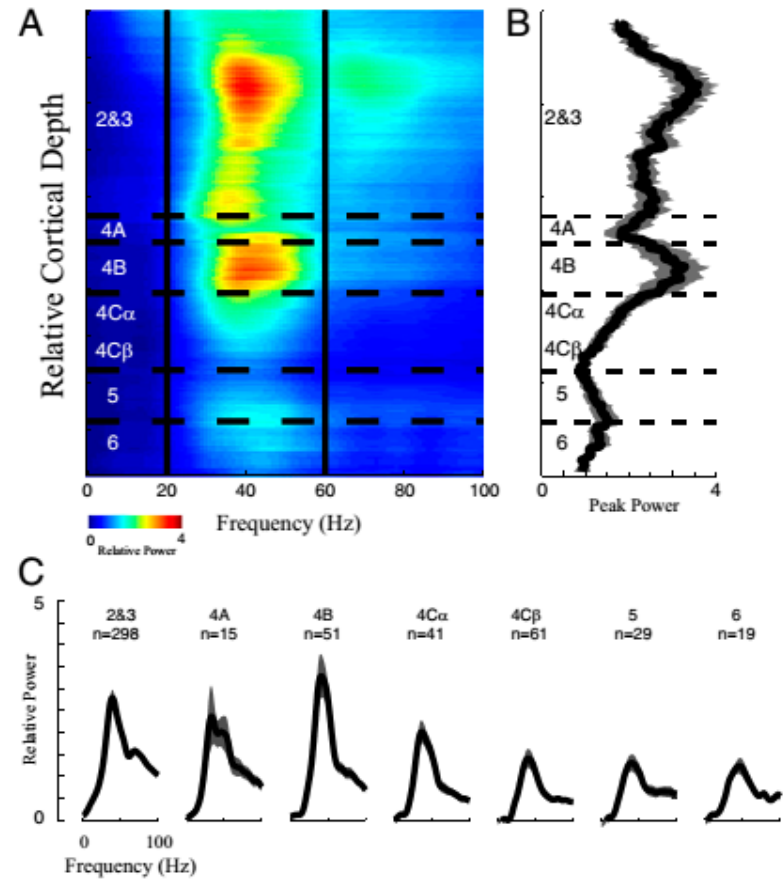
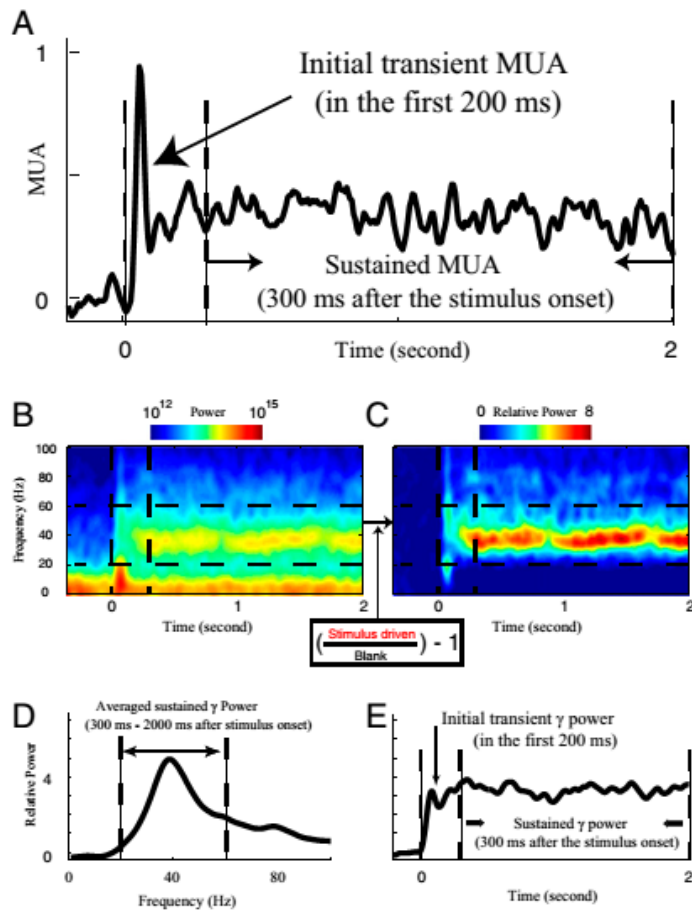
GABA_B-mediated rescue of NMDAR-hypofunction
MJ Gandal *et al*





- *Большинство фармапрепаратов, используемых в клинических испытаниях, направлены на восстановление «нормального» баланса В/Т.*
 - Причинами аутизма могут быть как несбалансированное возбуждение (FRAX) так и несбалансированное торможение (RTT, PTEN)
 - ‘Some people in ‘failed’ drug trial for autism showed benefit...’ (e.g. Arbaclofen, GABA-B agonist)
 - Острая нужда в индивидуально надежных биомаркерах баланса В/Т
- *Как измерить баланс В/Т у человека ?*
- Измеряя концентрацию GABA и Glu МР-спектроскопии (грубая мера доступности тормозного и возбуждающего медиаторов в мозге)
 - При нейрофиброматозе¹ уменьшенный выброс GABA компенсирует резкое увеличение GABA-рецепторов (Gonçalves et al. Molecular Autism, 2017)
- МЭГ гамма осцилляция – прямое измерение суммарной нейронной активности, генерируемой при взаимодействии тормозных и возбуждающих нейронов.

Гамма осцилляции возникают в любой нейронной сети, где есть PV+ тормозные нейроны, максимальны в зрительной коре - (Xing et al, PNAS, 2012)

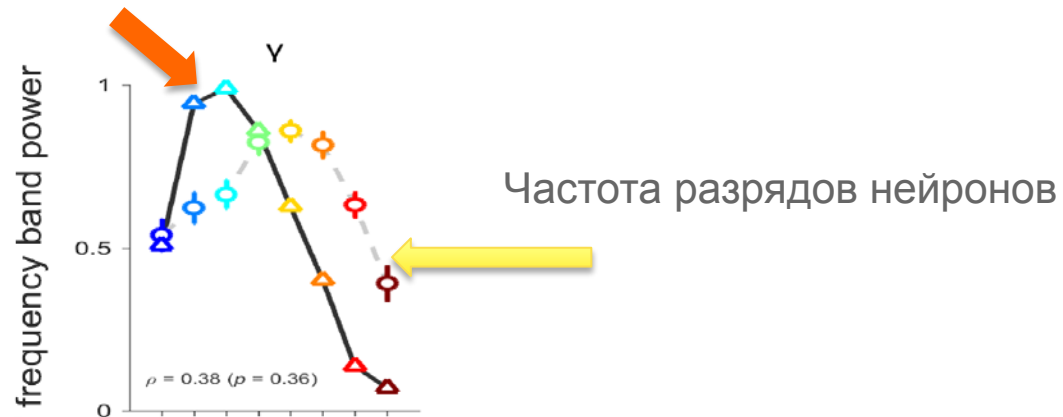


Сила нейронного и гамма-ответа сначала растет, а затем падает при росте внешнего возбуждающего притока – эффективное торможение ограничивает возбуждение зрительной коры

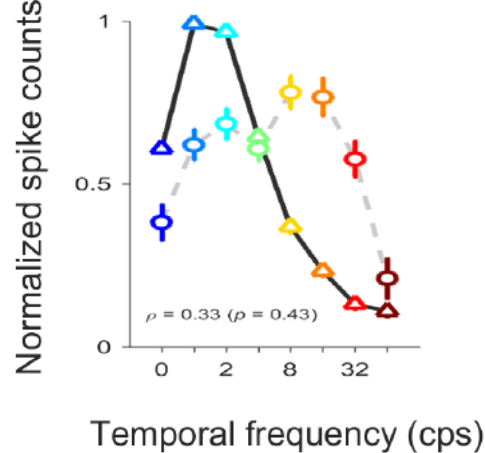
Мощность гамма

50-80 Hz

Monkey 1



Monkey 2



Salelkar, *J Neurophysiol*, 2018

Московский МЭГ-Центр

Elekta Neuromag Vector View

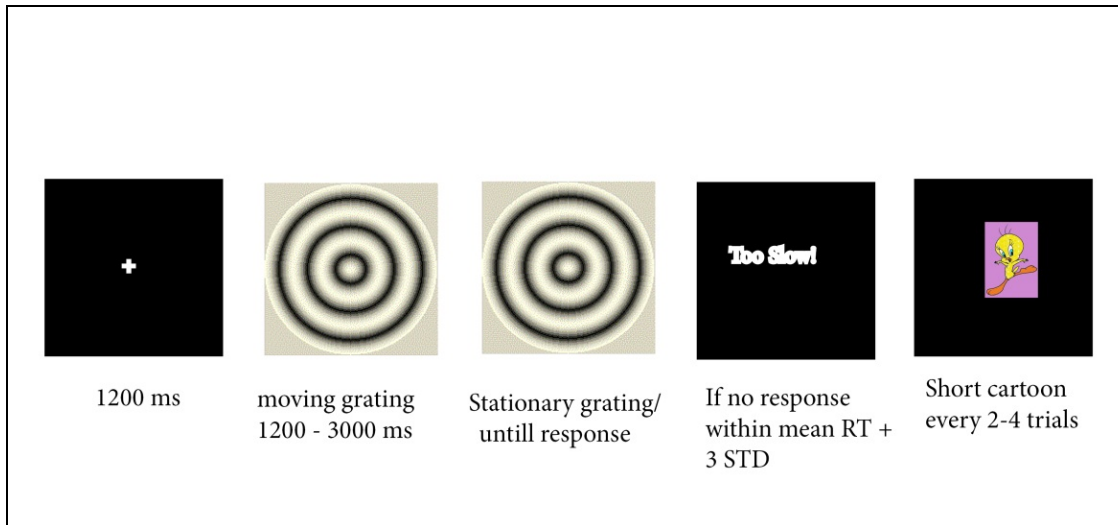


Karolinska NatMEG Centre, Stockholm

Elekta Neuromag TRIUX

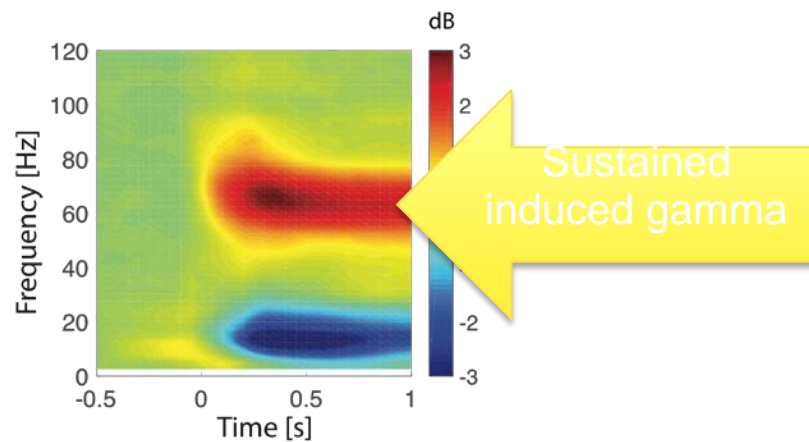


Зрительные МЭГ гамма осцилляции человека, вызванные ускорением движения стимула (экспериментальная парадигма)

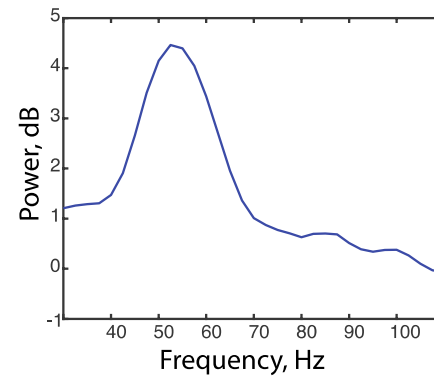


Спектральный анализ МЭГ

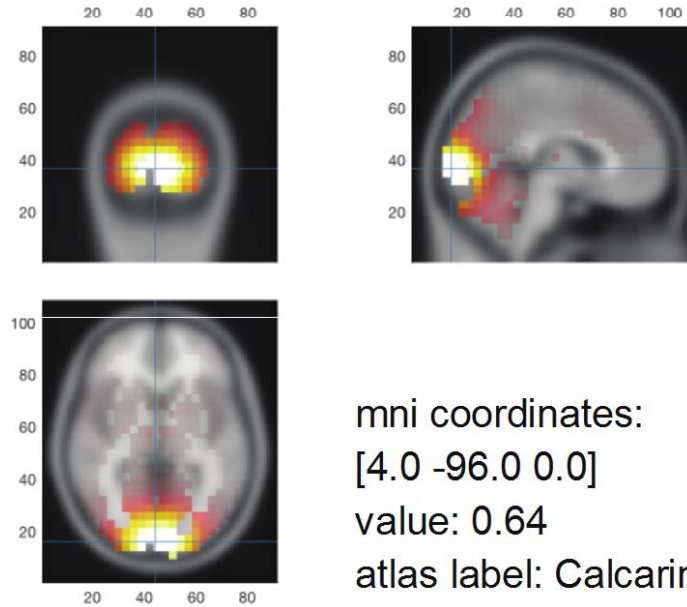
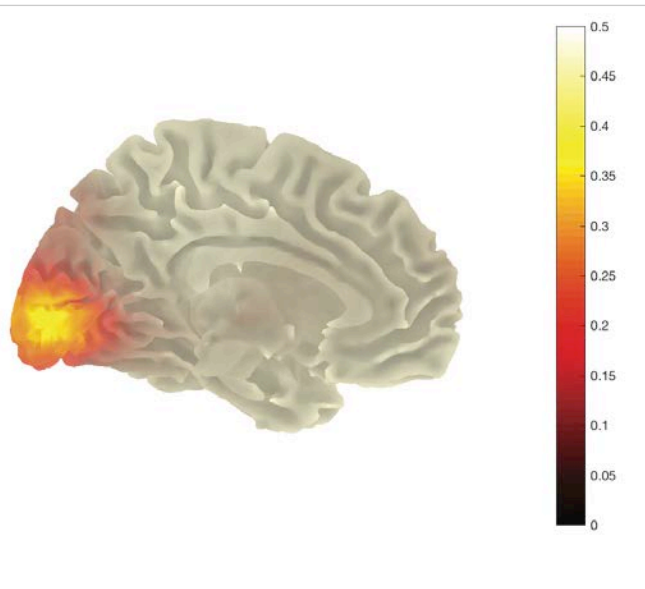
Частотно-временная динамика:



Спектр мощности:



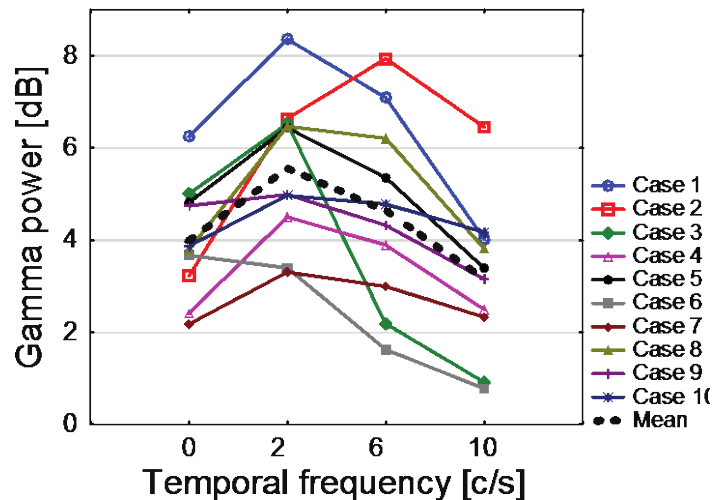
Локализация МЭГ гамма-ответа в зрительной коре методом 'beamforming'



mni coordinates:
[4.0 -96.0 0.0]
value: 0.64
atlas label: Calcarine L.

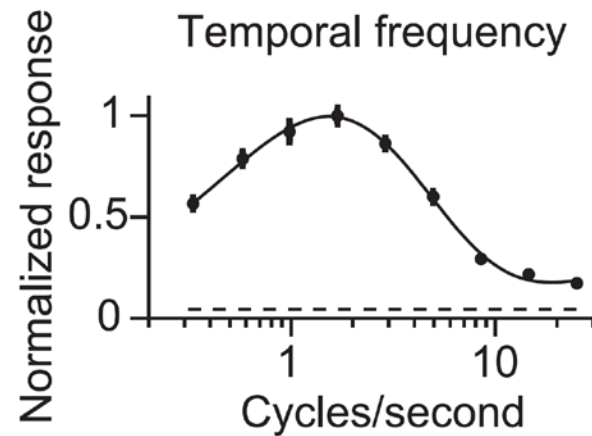
U-образная зависимость мощности гамма в зрительной коре от силы внешнего возбуждающего притока у здорового взрослого человека (увеличение скорости движения)

- МЭГ гамма зрительной коры человека



Orekhova et al, *Sci Rep* 2018

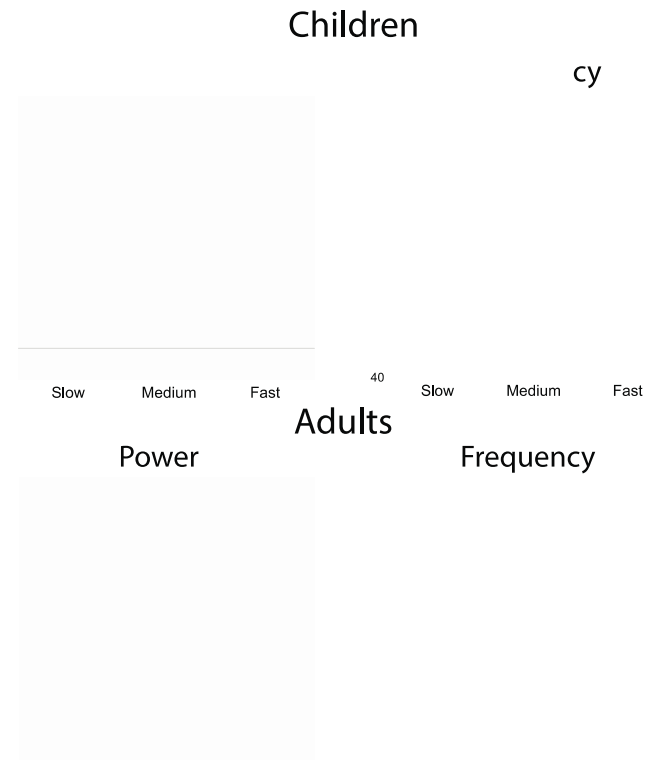
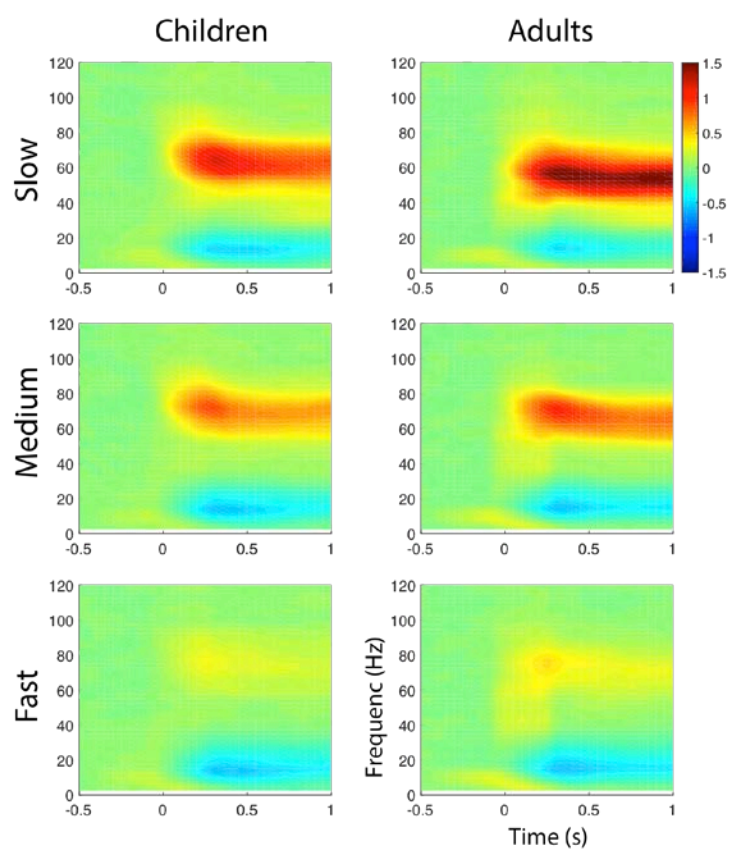
- LFP гамма зрительной коры обезьяны



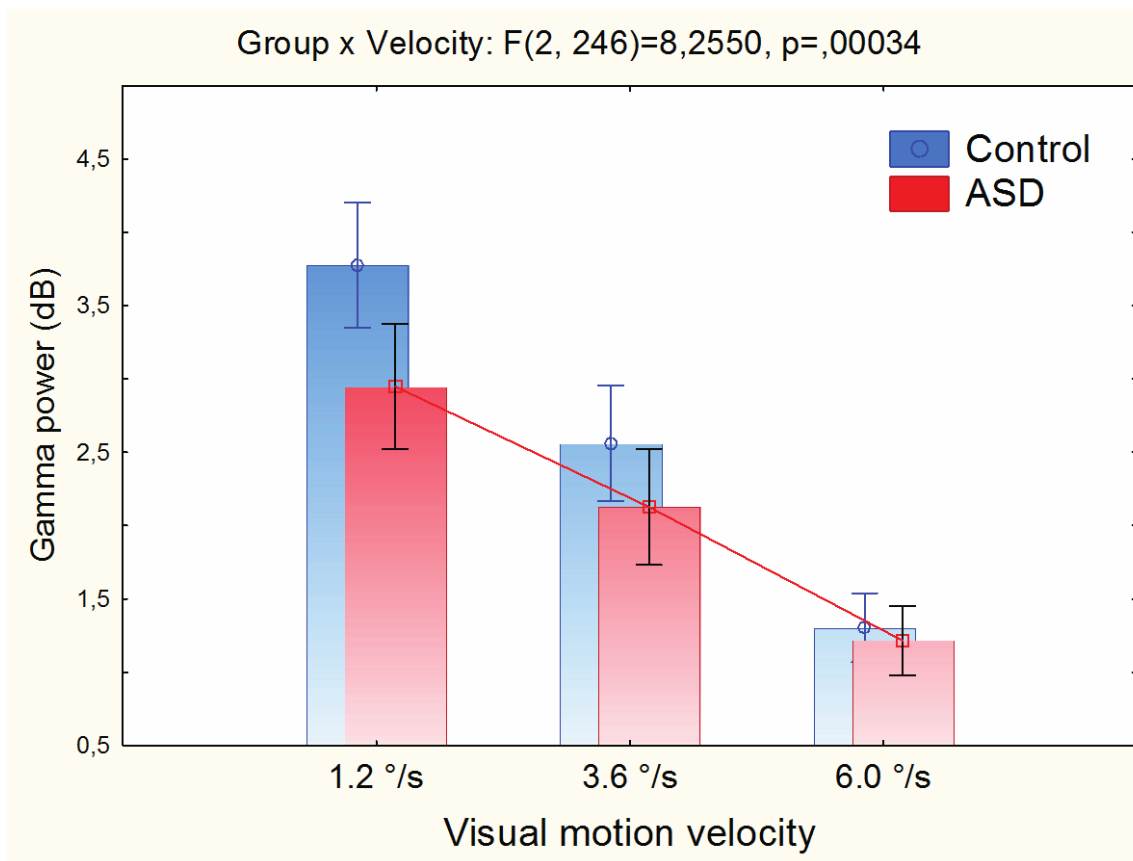
Jia et al, *J Neurosci*, 2011



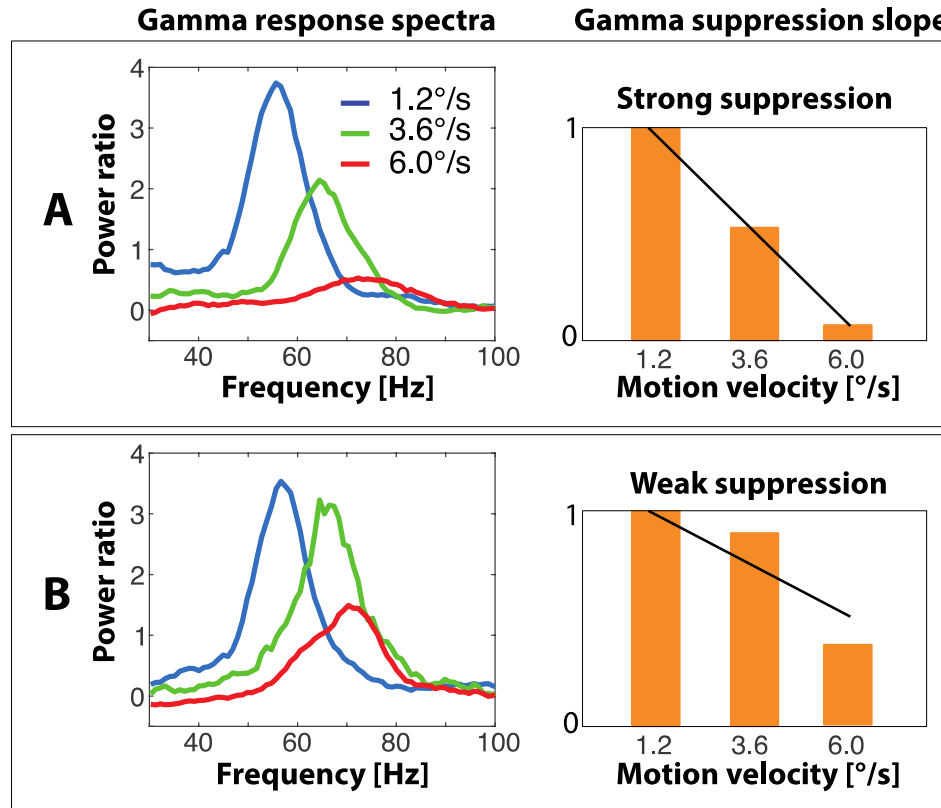
В норме у всех детей (N=68) и у всех взрослых людей (N=43) усиленное возбуждение приводит к снижению силы гамма-ответа - эффективная работа PV+ тормозных нейронов



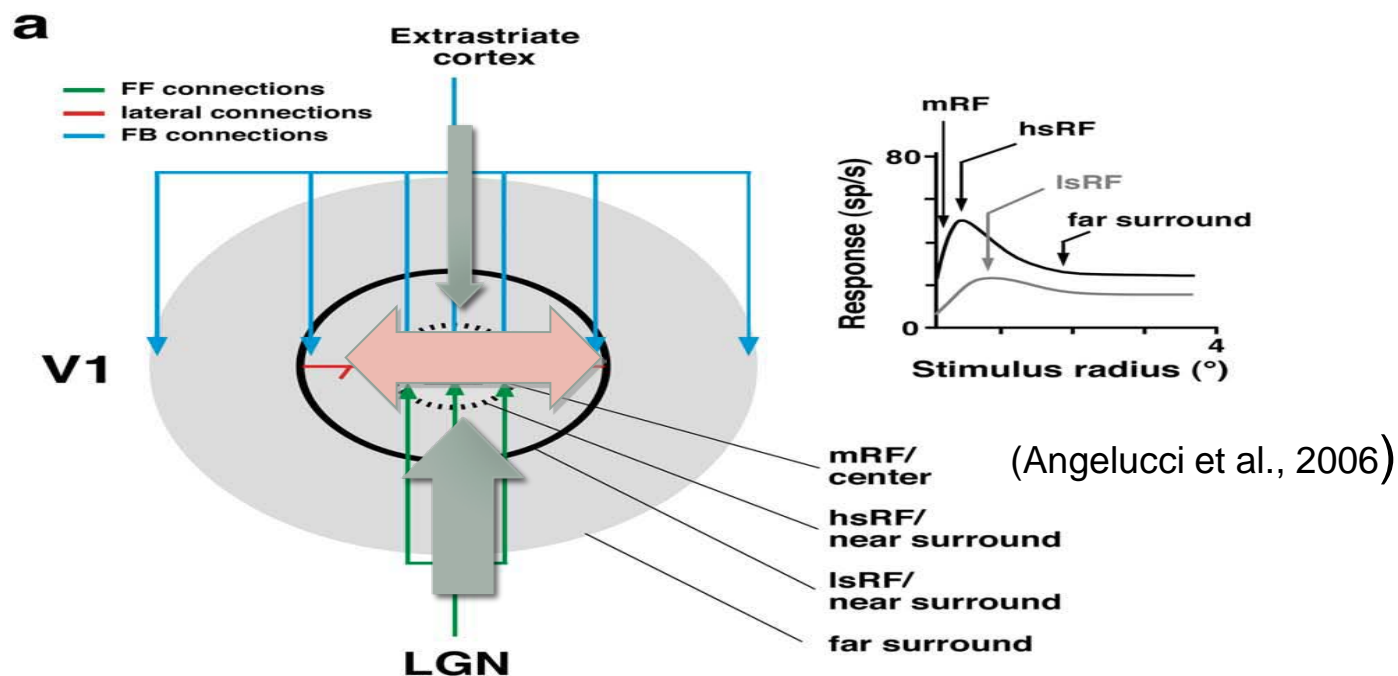
Подавление гамма ответа при высокой интенсивности внешнего входа снижено у детей (N=56) и взрослых (N=23) с РАС на групповом уровне



Gamma Suppression Slope (GSS)

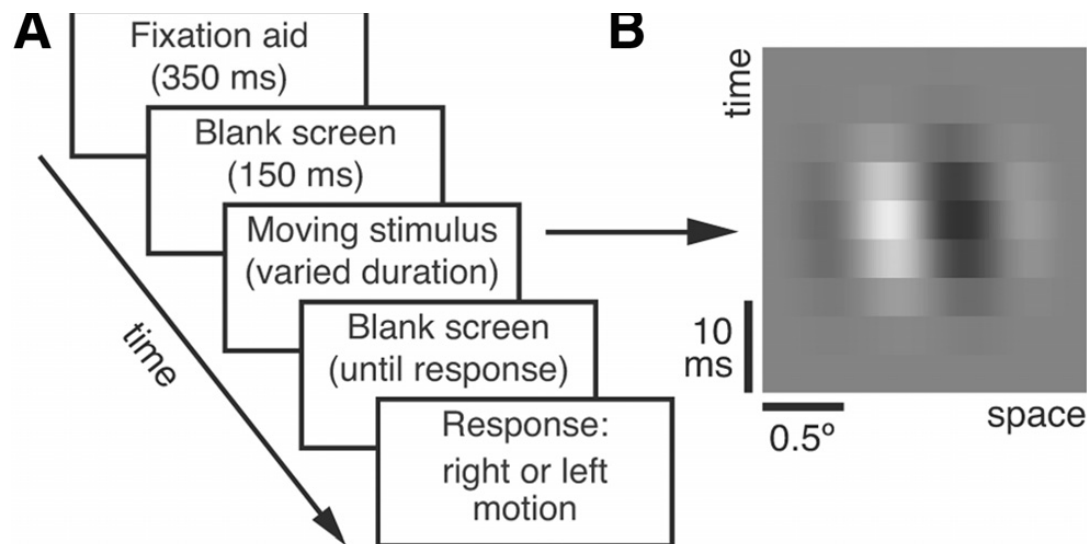


Дефицит локального торможения в зрительной коре должен приводить к плохому определению направления движения малых объектов



Дефицит локального торможения в корковых колонках (PV+ нейроны)

Функциональные последствия тормозного дефицита при аутизме

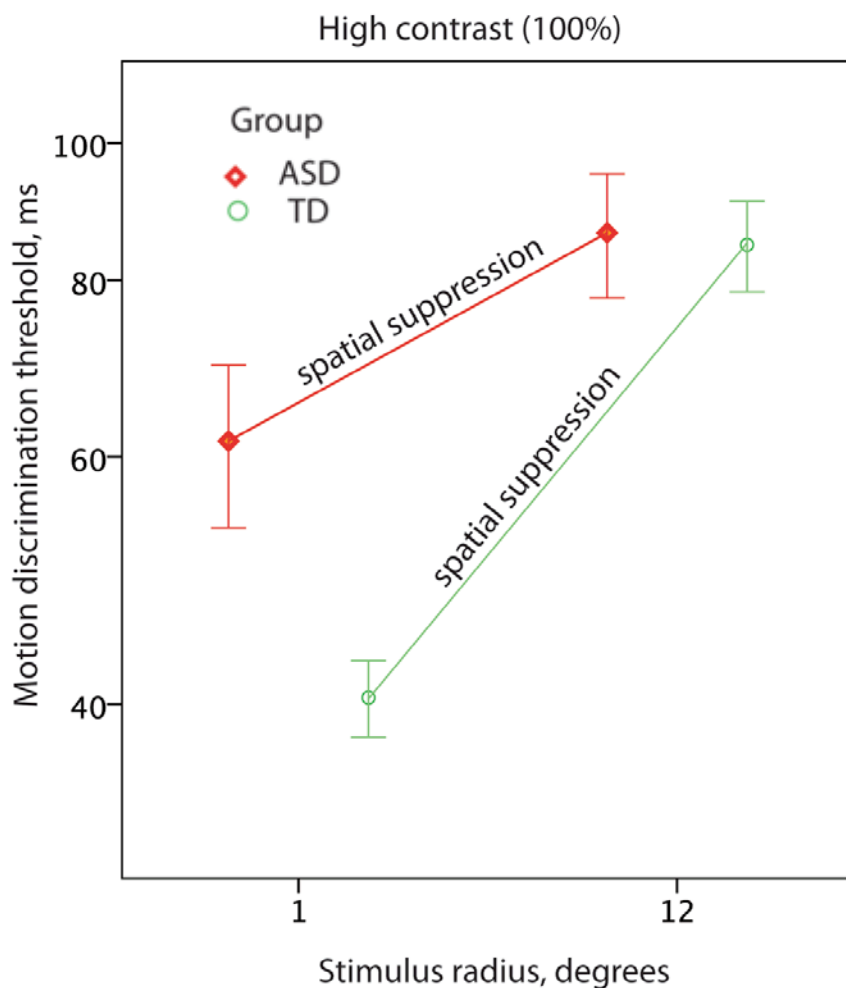


Стимулы двух размеров:
 Маленький (1°) и большой (12°).
Два условия контраста:
 Низкий (1%) или высокий (100%)
Задача:
 Определить направление движения



Процедура:
 The duration was adjusted depending on the participant's response using two interleaved one-up two down staircases (8.3 ms step) that converged on 71% correct performance.

У детей с РАС на групповом уровне снижена дирекциональная чувствительность, зависящая от эффективности работы PV+ тормозных нейронов (Sysoeva et al, FIN, 2017)

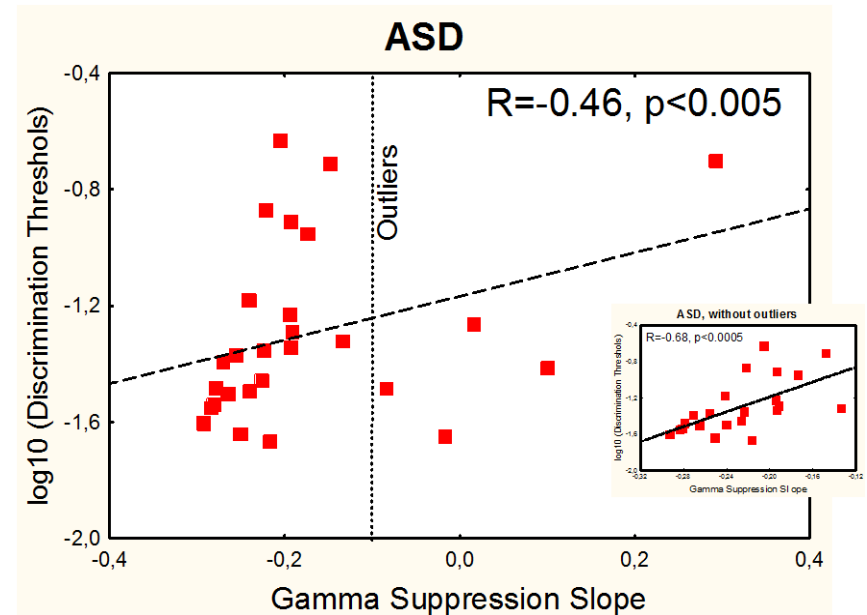
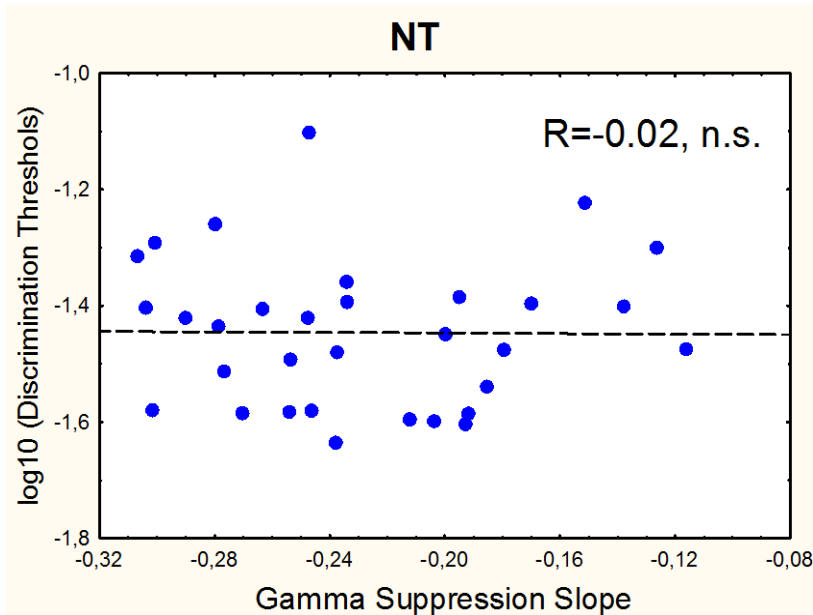


- ANOVA: Size by Group interaction: $F(1, 82) = 10.28, p = 0.002, \eta^2 = 0.111$

ASD Children have

- Worsened sensitivity to direction discrimination for small stimuli type
- Smaller Spatial Suppression index

У детей с РАС – слабое подавление гамма-ответа при высокой интенсивности входа - слабая чувствительность к движению стимула – неэффективное локальное торможение

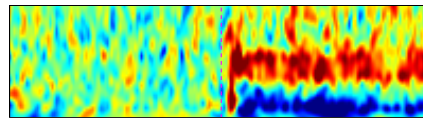


Stroganova et al, in preparation

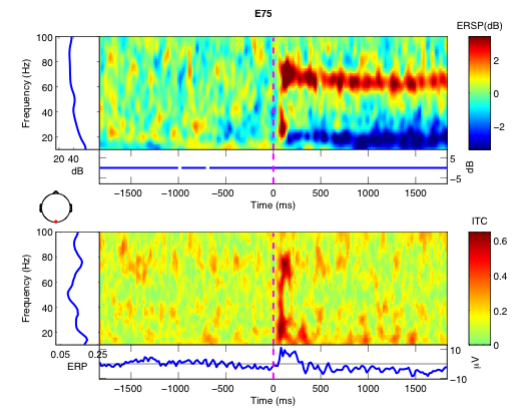
Аналогичные пробы можно проводить у младенцев, используя гамма-ответ в качестве ранних диагностических критериев тормозного контроля баланса В/Т и критериев эффективности фармакологических препаратов



1.8 цикл/сек



6.25 цикл/сек



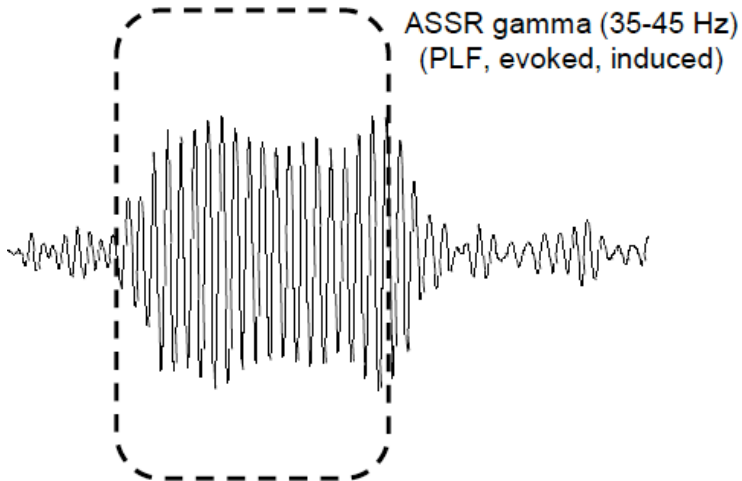
Дети 6 мес с высоким риском РАС ?

Orekhova et al, unpublished

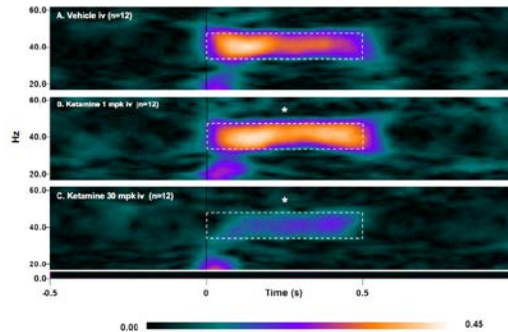
The 40-Hz auditory steady-state response: a selective biomarker for cortical NMDA function

Digavalli V. Sivarao

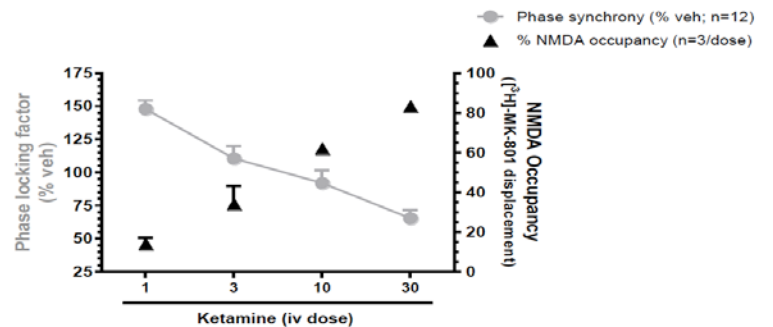
Genetically Defined Diseases, Bristol-Myers Squibb Co., Wallingford, Connecticut



(Carlen et al , 2012; Nakao et al , 2014; Sivarao et al.,2013; 2015; 2016).



Модель блокады
NMDAR Sivarao et al,
Nature, 2016

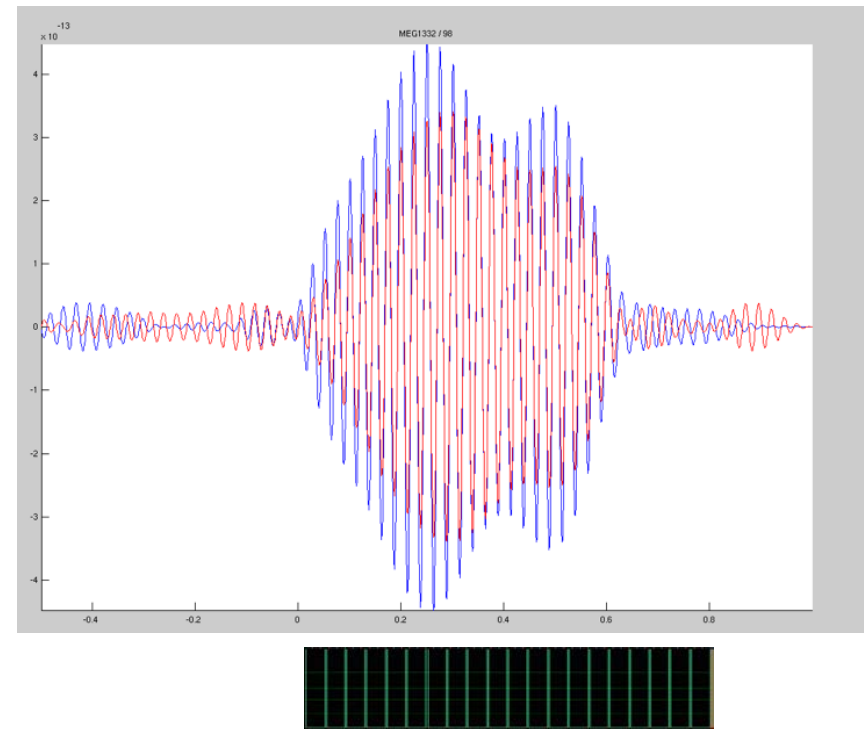
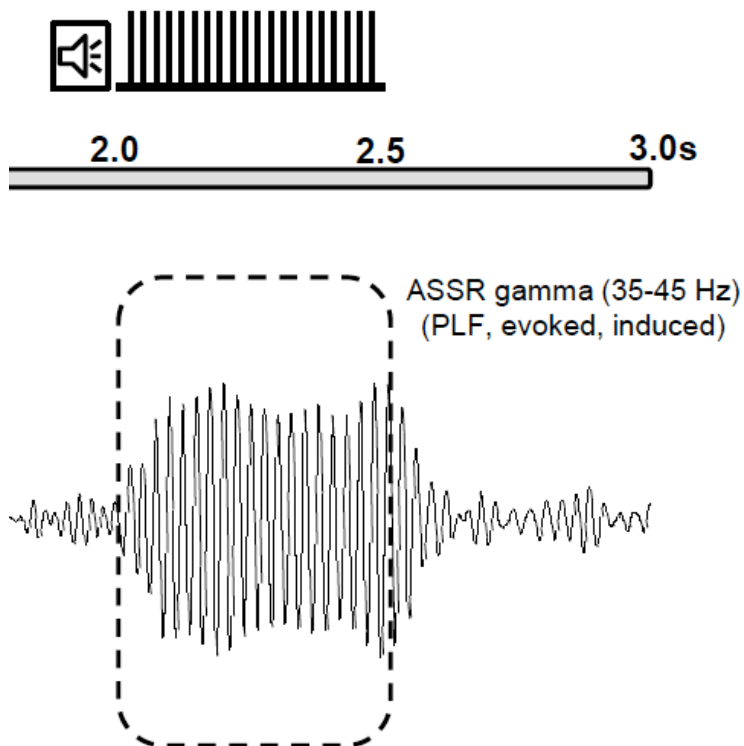


Auditory Steady State Response (ASSR) in rats and humans

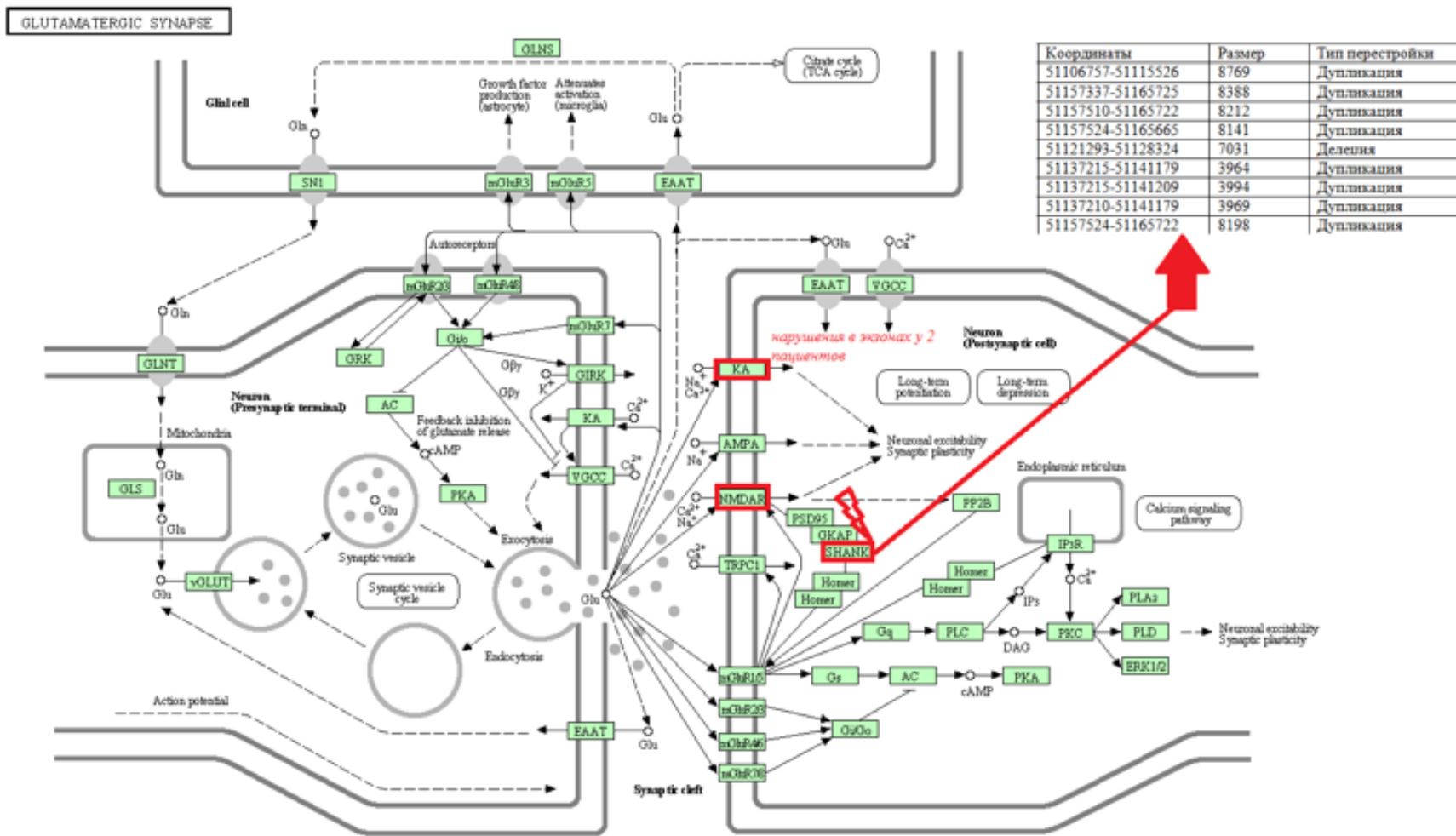
Animals: epidural electrodes rat
(Sivarao et al., 2016)

Humans: MEG (our study)
Typically developing children (blue) ASD (red)

35 детей нормы и 64 ребенка с РАС

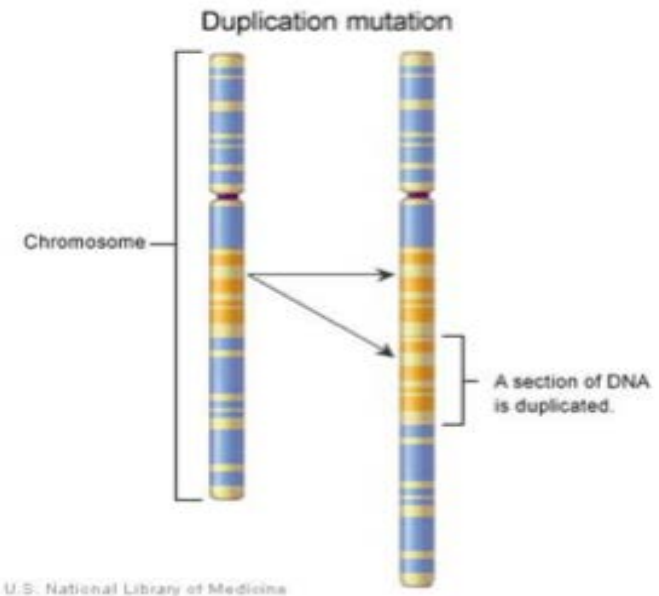


Shank3: a key scaffolding element determining postsynaptic density of **NMDA receptors** in the excitatory glutamatergic synapses



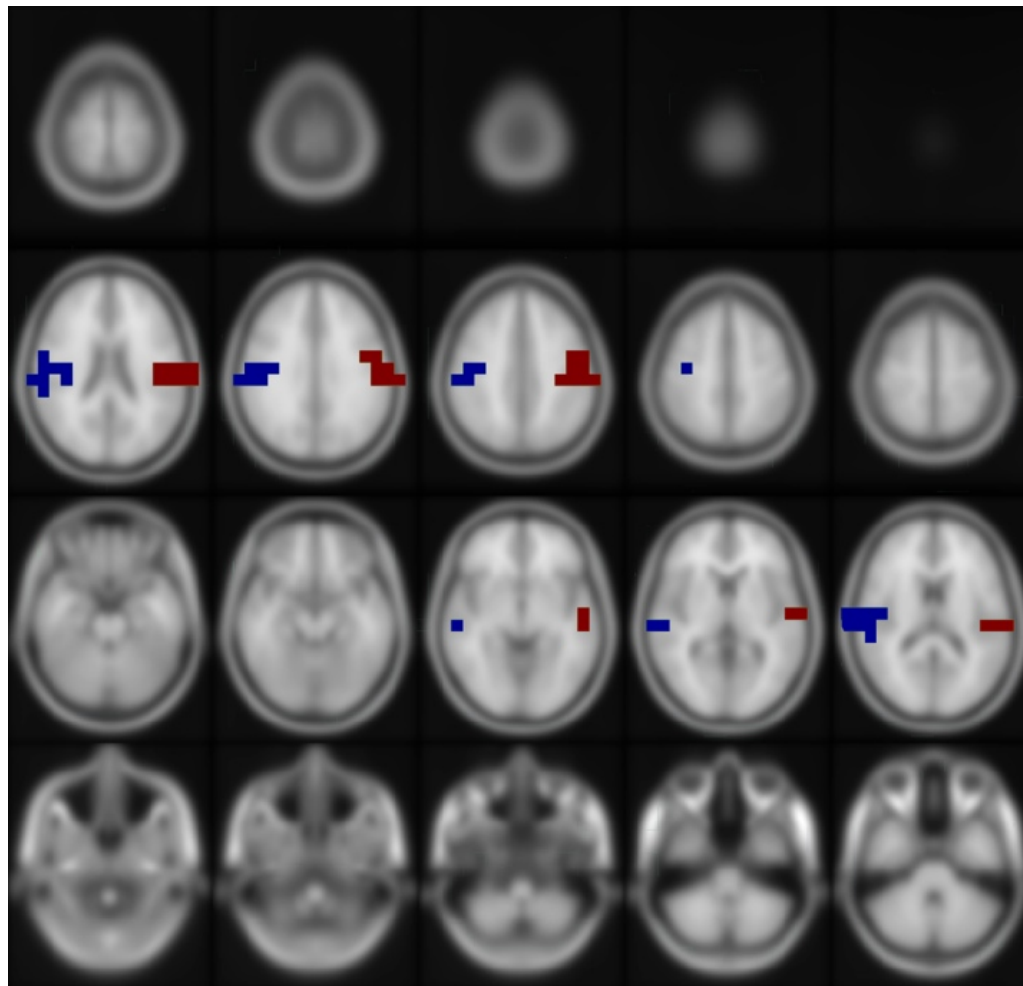
Выборки детей

- Типично развивающиеся дети (N = 35)
 - возраст: 7-15 лет (11 ± 2)
 - IQ: 120 ± 10
- Дети с РАС (N = 56)
 - возраст: 7-15 лет (10 ± 2)
 - IQ: 80 ± 20
- Дети с РАС, имеющие дупликации
 - в экзоне гена Shank3 (N = 8);
 - возраст: 7-15 лет (11 ± 2)
 - IQ: 78 ± 18

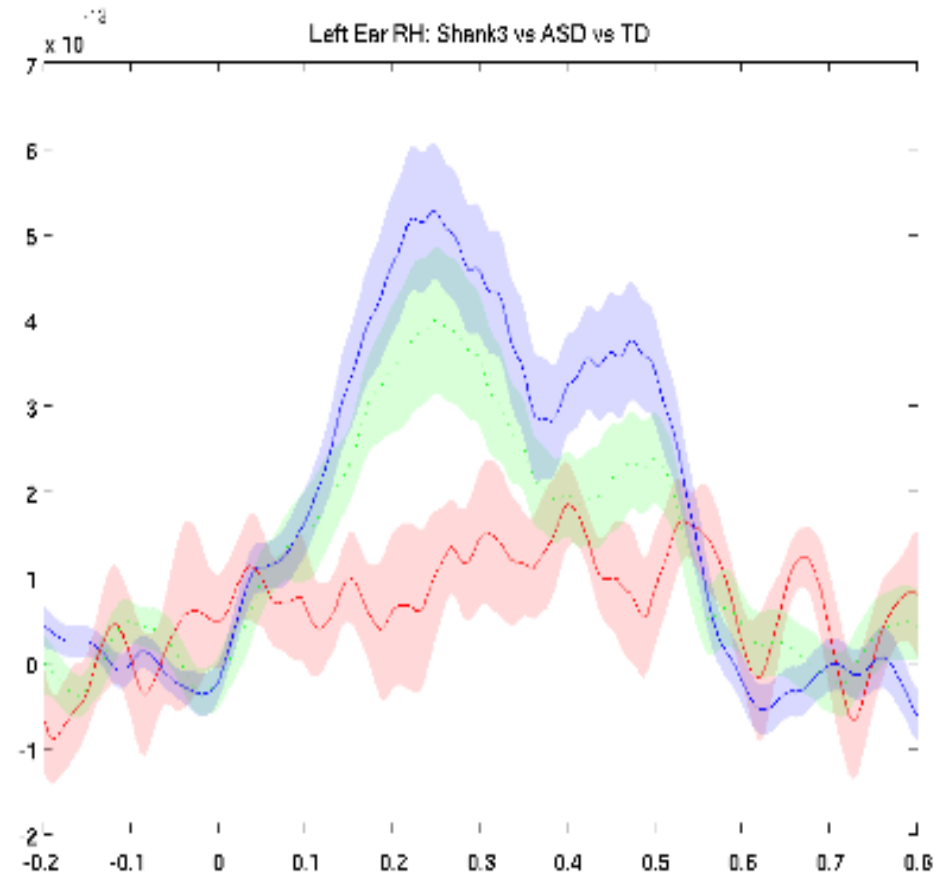
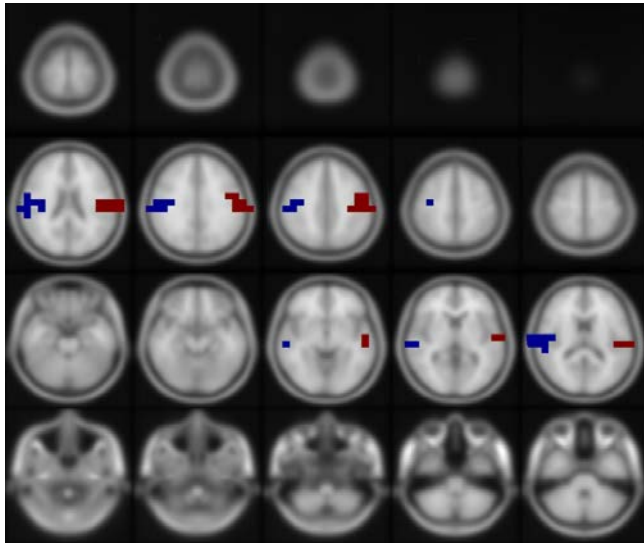


- whole genome sequencing (SNP/array) revealed 8 cases of intragenic copy number variation (CNV)

Локализация ASSR в слуховой коре мозга человека (МЭГ данные)



Это возможно! Слуховой резонанс на частоте гамма ритмов подавлен как на моделях с блокадой NMDAR, так и у особой группы детей с РАС, имеющих мутации гена SHANK3



СПАСИБО!

- дети и их родители, участвовавшие в исследованиях
- Грант Российского Научного Фонда, без чьей поддержки исследования были бы остановлены
- Зарубежные партнеры

- Иван Юров
- Елена Орехова
- Анна Буторина
- Марина Цетлин
- Ольга Сысоева
- Илья Галюта
- Галина Чухутова
- Андрей Прокофьев
- Молодые сотрудники, аспиранты и студенты, участвующие в работе

