

Настоящее пособие предназначено исключительно для учебных целей в качестве дополнительного материала для студентов и аспирантов. Распространяется бесплатно, не предназначено для продажи.

Редактор-составитель: И.Ю. Павлов, к.б.н.



<http://www.neuroscience.spb.ru>

Магистерская программа по нейробиологии СПбГУ

<http://tempus.neuroscience.ru>
интернет сайт проекта Tempus

фото на обложке: © Я.С. Ермолюк



Напечатано при финансовой поддержке Tempus
(http://ec.europa.eu/education/external-relation-programmes/doc70_en.htm),
проект JEP_25259_2004

Предисловие

Прогресс в области понимания принципов функционирования мозга в последние десятилетия стал возможен благодаря бурному развитию нейронаук. Выйдя за рамки биологических дисциплин и используя последние технологические достижения, эта область человеческих знаний продолжает стремительно развиваться и практически каждый день приносит все новые и новые открытия. Это, в свою очередь, ставит вопрос о подготовке специалистов, которые будут работать на передовом рубеже науки в будущем.

Данное пособие написано коллективом авторов — активных участников проекта Tempus (ЕС) по созданию магистерской программы по нейронаукам «От нейрона к сознанию» в Санкт-Петербургском государственном университете. Новая магистратура биолого-почвенного факультета СПбГУ открыла свои двери для студентов в сентябре 2006 года благодаря совместным усилиям нескольких кафедр университета при действенном участии европейских экспертов из университетов-партнеров и финансовой поддержке Европейского Сообщества. Это первая магистерская программа по нейронаукам. Ее уникальность состоит не только в том, что она делает акцент на мультидисциплинарности современных наук о мозге, но и в том, что это одна из первых попыток привести отечественное образование в соответствие с международными стандартами обучения. Преподавание на программе ведется на русском и на английском языках, а также использует систему зачетных единиц, применяемых в странах-участниках Болонского процесса. Это дает возможность приобщить студентов к мировой науке и включить их в европейское образовательное пространство.

В настоящий момент в рамках магистерской программы студентам предлагаются два модуля специализации: 1) клеточная нейробиология (cellular neuroscience) и 2) когнитивные нейронауки (cognitive neuroscience). Поэтому данное пособие разбито на две части, посвященные соответственно молекулярно-клеточным аспектам нейронаук и когнитивным направлениям. В ближайшем будущем планируется введение третьего модуля – моделирование нейронных процессов (computational neuroscience). Главы пособия представляют собой обзоры, призванные познакомить читателей с разнообразием проблем современных нейронаук и дать представление о широте изучаемых вопросов.

Мы надеемся, что материалы пособия будут полезны студентам и аспирантам в качестве дополнительного чтения к лекционным и практическим курсам и значительно расширят их научный кругозор.

И. Ю. Павлов

Содержание

Клеточные и молекулярные механизмы

- От разнообразия молекулярных форм к функциональной специализации олигомерных белков (Кривой И. И., Драбкина Т. М., Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) 6
- Структура и функция рецепторов глутамата в норме и условиях его нейротоксического действия (Антонов С. М., Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия) 47
- Механизмы синаптической пластичности в гиппокампе (Павлов И. Ю., UCL Institute of Neurology, Лондон, Великобритания) 68
- Математические модели ионных каналов, нейронов и нейронных популяций (Чижев А. В., Физико-технический институт им. А.Ф.Иоффе РАН, Санкт-Петербург, Россия) 84

Когнитивные нейронауки

- Когнитивное развитие ребенка в первый год жизни:
Поведенческие и электро- физиологические методы исследования (Кушнеренко Е. В., Institute for Research in Child Development, University of East London, Лондон, Великобритания) 104
- Магнито-энцефалография и оптическая топография —
новейшие методы исследования когнитивного развития
младенцев и детей младшего возраста
(Шестакова¹ А. Н., Осадчий¹ А.Е., Кравценюк¹ О.В., Ключарев² В. А.) 126
- Когнитивные исследования внимания (Кануников И. Е., Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) 141
- Неосознаваемое восприятие (Г. А. Куликов, Н. Г. Андреева, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия) 157
- Автоматизм и параллелизм ранних этапов обработки речевой информации мозгом:
нейрофизиологические данные на основе негативности рассогласования (Штыров Ю. Ю., Пулфермюллер Ф., MRC Cognition and Brain Sciences Unit, Кембридж, Великобритания) 169

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия
² FC Donders Center For Cognitive Neuroimaging, Radboud University, Наймехен, Нидерланды

**КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ
МЕХАНИЗМЫ**

От разнообразия молекулярных форм к функциональной специализации олигомерных белков

Существование функциональных белков в виде множественных молекулярных форм, причем встречающихся у одного и того же организма и даже в одной и той же клетке, вначале было установлено в отношении ферментов и долгое время оставалось одним из наиболее интригующих феноменов биологии. Для описания разных молекулярных форм белков, катализирующих одну и ту же биохимическую реакцию, был введен термин «изоферменты» («isozymes») (Markert, Moller, 1959). Позже стало ясно, что разнообразие форм присуще не только ферментам, но едва ли не всем функциональным и регуляторным белкам (рецепторам, ионным каналам, транспортерам и др.). Кроме того, оказалось, что все они имеют олигомерную структуру, т. е. являются мультимолекулярными комплексами, состоящими из набора полипептидных цепей — субъединиц, как правило, кодируемых разными генами. Разный состав или стехиометрия субъединиц определяют разные свойства олигомерного комплекса. Структурная гетерогенность, несомненно, влечет за собой и различие функций, причем, как было сказано, эти разные функции могут осуществляться в пределах одной клетки.

Последние полтора — два десятилетия отмечены стремительным развитием молекулярно-биологических методов исследования. Это привело еще к одному удивительному открытию, придавшему новое измерение проблеме разнообразия молекулярной структуры белков. Оказалось, что каждый тип субъединицы, в свою очередь, может существовать в виде множественных подтипов, каждый из которых кодируется отдельным геном или (реже) является продуктом альтернативного сплайсинга одного и того же гена. Подтипы субъединиц называют изоформами.

Для субъединиц некоторых белков (например, никотинового холинорецептора) уже описано более десятка генов и, возможно, в дальнейшем будут открыты новые. Многочисленные сочетания субъединиц и их типов определяют столь же разнообразные свойства олигомерных белков: их активность, функциональные и фармакологические профили, способность взаимодействовать с молекулами окружения и т. п. Кроме того, разные композиции олигомеров могут определять разнообразие путей модуляции этих белков со стороны регуляторных факторов.

Столь сложная картина молекулярной структуры белков, выполняющих, как еще недавно казалось, одну определенную функцию, создает для исследователей новую реальность, которая уже привела к пересмотру ряда традиционных представлений. Стало очевидным, что без знания субъединичного состава того или иного белка практически невозможно понять природу разнообразия функций этого белка или объяснить экспериментальный феномен, в котором предполагается участие белков с определенной функцией. Стремительно устаревают привычные методические подходы, особенно фармакологические, основанные на представлении о свойствах белков, описанных в прошлом. Особое значение это имеет для нейробиологических исследований в силу весьма ограниченной доступности изучаемых структур.

Выяснение функциональной специализации разных молекулярных форм белков стало одной из самых актуальных проблем клеточной биологии. В перспективе понимание связи между конкретной молекулярной структурой и функцией будет иметь значение для точечной фармакологической коррекции функций.

В данном обзоре прогресс исследований в этой области показан на примере следующих классов белков: никотинового холинорецептора (лиганд-управляемый канал), ацетилхолинэстеразы (фермент), а также Na, K-АТФазы (транспортный белок). Перечисленные белки необходимы для обеспечения синаптической передачи в холинергических синапсах, поддержания ионных градиентов, мембранного потенциала и электрогенеза возбудимых клеток. Тем самым они непосредственно участвуют в приеме, обработке и передаче вне- и внутриклеточных сигналов.

1. Никотиновый холинорецептор

1.1. Общие сведения

Никотиновые холинорецепторы (нХР), опосредующие эффекты нейромедиатора ацетилхолина (АХ), принадлежат к суперсемейству лиганд-управляемых ионотропных рецепторов, включающему в себя также рецепторы ГАМК_A, ГАМК_C, глицина, серотонина типа 5-НТ₃, а также рецепторы глутамата у беспозвоночных (рис. 1). Все эти рецепторы являются олигомерами, т.е. состоят из набора субъединиц, кодируемых разными генами (обзоры: McGehee, Role, 1995; Paterson, Nordberg, 2000; Grutter, Changeux, 2001).

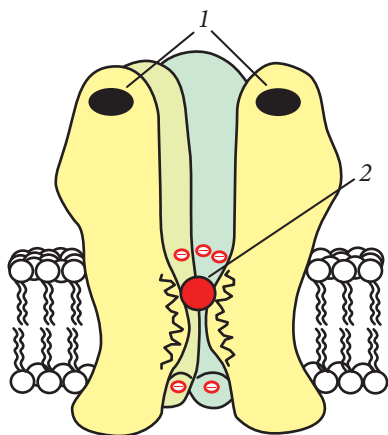


Рис. 1 Общая схема никотинового холинорецептора. 1 — места связывания агонистов (АХ, никотин, карбахоллин) и антагонистов конкурентного типа (d-тубокурарин, α-бунгаротоксин). 2 — место связывания антагонистов неконкурентного типа (проадифен, прокаин, гистрионикотоксин).

Такие вещества как никотин, карбахоллин — синергисты АХ, являются агонистами нХР. Они взаимодействуют с тем же узнающим центром, что АХ, что сопровождается активацией нХР и открыванием ионного канала. Именно с этим специфическим местом связываются конкурентные антагонисты, что приводит к конкурентному блоку нХР. Так действует α-бунгаротоксин и другие α-токсины — полипептиды из змеиного яда, высокоспецифично и необратимо блокирующие нХР. В отличие от α-токсинов, другой специфический конкурентный блокатор нХР d-тубокурарин действует обратимо. Соединения неконкурентного типа действия могут связываться с открытым ионным каналом нХР (проадифен, хлорпромазин, гистрионикотоксин), либо с закрытым ионным каналом (тетраэтиламмоний, производные гуанидина).

Никотиновые рецепторы широко представлены в центральной и периферической нервной системе, где они играют роль постсинаптических рецепторов, ответственных за

синаптическое проведение, а также пресинаптических гетеро- и ауторецепторов, модулирующих эффективность синаптических связей.

В ЦНС эти рецепторы участвуют во многих физиологических и поведенческих функциях (когнитивные процессы, память и обучение, системы естественного подкрепления, нейрональное развитие, мозговой кровотока и метаболизм). Нарушения в системе нХР, как считается, ответственны за патогенез ряда неврологических расстройств (болезней Альцгеймера и Паркинсона, некоторых форм эпилепсии), а также шизофрении. Центральные нХР играют ведущую роль в формировании никотиновой зависимости (Jones et al., 1999; Di Chiara, 2000; Paterson, Nordberg, 2000).

1.2. Никотиновый холинорецептор скелетной мышцы и электрического органа *Torpedo*

Никотиновый холинорецептор скелетной мышцы, опосредующий нервно-мышечную передачу, — первый синаптический рецептор, который был выделен, очищен и подробно исследован на молекулярном уровне (см. Скок и др., 1987). Прогресс этих исследований в значительной степени обязан такой экспериментальной модели, как электрический орган ската *Torpedo*. Плотность нХР в этой структуре очень высока, что делает возможным их выделение в препаративных количествах. Так как электрический орган является эволюционным дериватом нервно-мышечного соединения скелетной мышцы, нХР *Torpedo* высоко гомологичен рецептору скелетной мышцы.

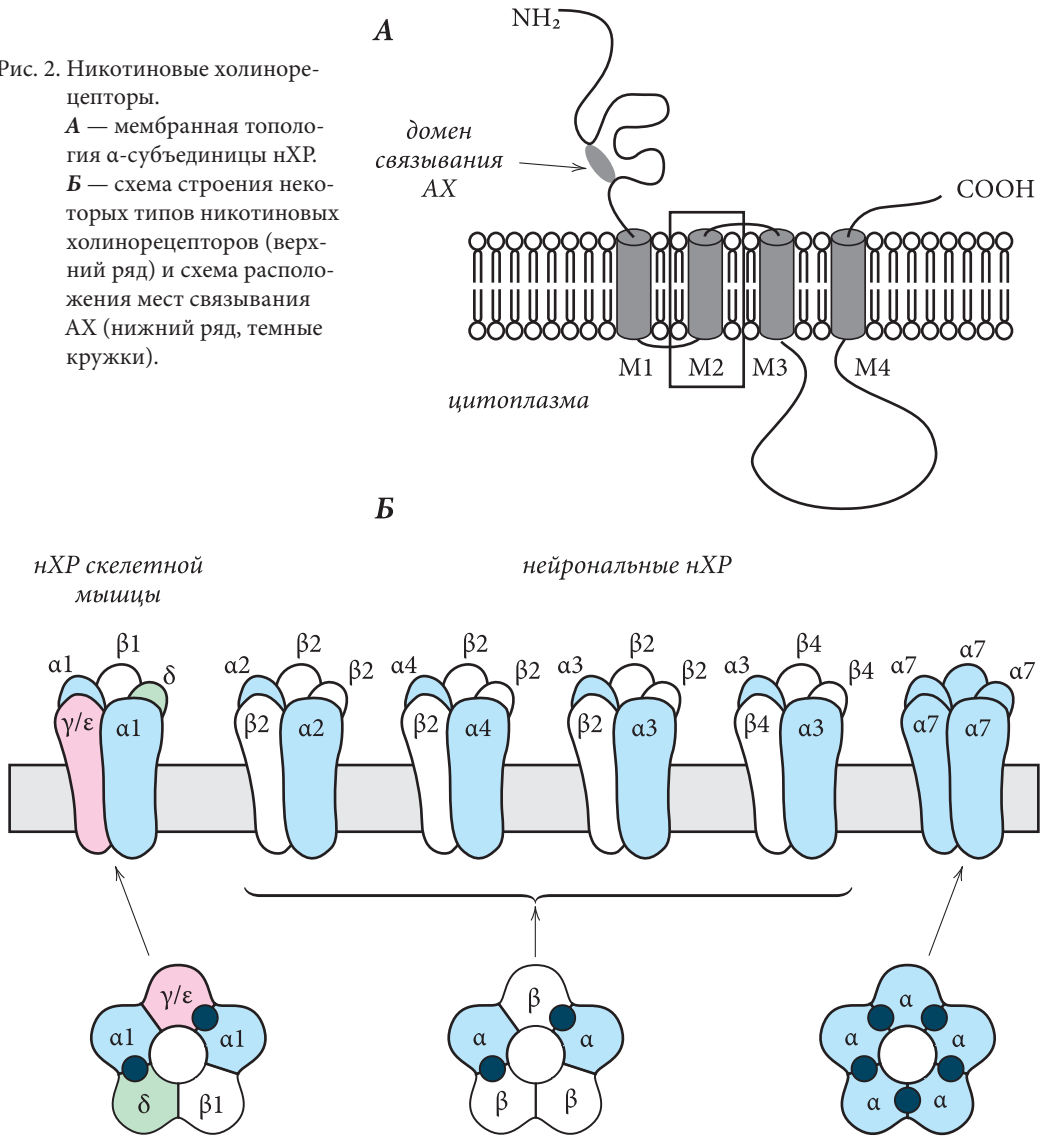
В электрическом органе *Torpedo* нХР представляет собой гетеропентамерный комплекс, состоящий из гомологичных, но функционально различных, кодируемых разными генами субъединиц α , β , γ и δ в стехиометрическом соотношении $(\alpha)_2\beta\gamma\delta$. Полипептидные цепи субъединиц связаны друг с другом нековалентными связями, образуя комплекс с молекулярной массой ~250 кДа в виде псевдосимметричной розетки с каналом, расположенным на центральной оси (Corringer et al., 2000; Grutter, Changeux, 2001).

В скелетной мышце млекопитающих нХР имеет аналогичный субъединичный состав, с той разницей, что γ -субъединица экспрессируется только в эмбриональной мышце. В раннем постнатальном онтогенезе под влиянием нейротрофических факторов в субсинаптических ядрах мышечного волокна происходит репрессия транскрипции гена γ -субъединицы и активация транскрипции гена гомологичной ϵ -субъединицы, отсутствующей у *Torpedo* (Sanes, Lichtman, 1999). Эта замена не влияет на формирование и дифференцировку зрелого рецептора, но обеспечивает поддержание высоко организованной структуры концевой пластинки, в частности, необходимой плотности синаптических нХР. Канал зрелого нХР, содержащего ϵ -субъединицу, обладает более быстрой кинетикой и примерно в 3 раза большей Ca^{2+} -проницаемостью, чем канал эмбрионального нХР с γ -субъединицей.

Так как все субъединицы нХР кодируются родственными генами, они обладают многими общими чертами. Каждая субъединица, представляющая собой интегральный белок, четырежды пересекает мембрану (формируя трансмембранные сегменты М1-М4), имеет внеклеточные N- и C-концевые домены, а также обширную цитоплазматическую петлю, соединяющую трансмембранные сегменты М3 и М4, последовательность которой уникальна для каждого типа субъединиц (рис. 2А).

Давно известно, что для активации нХР требуется последовательное связывание двух молекул АХ, т. е. на рецепторе имеются два места связывания АХ. Маркером мест связывания АХ являются соседние цистеиновые остатки 192 и 193 в составе внеклеточного N-концевого

Рис. 2. Никотиновые холинорецепторы.
 А — мембранная топология α -субъединицы нХР.
 Б — схема строения некоторых типов никотиновых холинорецепторов (верхний ряд) и схема расположения мест связывания АХ (нижний ряд, темные кружки).



домена каждой из двух α -субъединиц (рис. 2А). Ранее считалось, что этот участок и есть собственно место связывания. В настоящее время известно, что в формировании мест связывания и стабилизации связанных лигандов участвуют не только α -субъединицы: место связывания находится между (в интерфейсе) соответствующими локусами α -субъединицы и соседней субъединицы другого типа (рис. 2Б). В рецепторе *Torpedo* и скелетной мышцы места связывания АХ расположены в локусах, образуемых парами $\alpha\delta$ и $\alpha\gamma(\epsilon)$. Благодаря присутствию, помимо α -субъединиц, двух разных субъединиц другого типа, эти два локуса одного рецептора обладают разными характеристиками связывания агонистов и антагонистов.

Петли аминокислотных последовательностей α -субъединицы, участвующие в формировании места связывания, образуют так называемый главный компонент, а петли последовательностей соседней субъединицы — дополнительный компонент места связывания. К настоящему времени методами аффинного мечения и направленного мутагенеза установлен аминокислотный состав этих компонентов (Galzi, Changeux, 2000; Corringer et al., 2000). Оказалось, что в составе α -субъединицы все эти остатки являются ароматическими (Tyr и Trp). Предполагается, что стабилизация агониста обеспечивается взаимодействием его катионной части с π -электронами ароматического кольца, а также электростатическими взаимодействиями с отрицательными зарядами, присутствующими вблизи места связывания (Song, Pedersen, 2000). Центр связывания АХ эволюционно является самым консервативным участком всей молекулярной структуры (Le Novere et al., 2002).

Связывание АХ приводит к конформационным изменениям, в результате которых открывается неселективный катионный канал, пропускающий ионы Na^+ и K^+ и в очень небольшой степени Ca^{2+} ($P_{\text{Ca}}/P_{\text{Na}} \sim 0,2$) (см. McGehee, Role, 1995). Канал формируется трансмембранными сегментами М2 всех пяти субъединиц.

Расшифровка трехмерной структуры нХР показала, что место связывания АХ и ионный канал формируются разными доменами, находящимися на значительном расстоянии друг от друга (2–4 нм). Следовательно, взаимодействие между этими доменами, обеспечивающее открытие канала после связывания агониста, является непрямым, или аллостерическим (Changeux, Edelstein, 2001).

1.3. Разнообразие никотиновых холинорецепторов

Существование разных типов нХР, различающихся по биохимическим, фармакологическим и физиологическим характеристикам, известно давно. На основании этих традиционных подходов долгое время было принято разделять нХР на два главных типа: мышечные и нейрональные.

Первые данные о нейрональных нХР были получены в опытах на симпатических ганглиях (см. Скок и др., 1987). Уже ранние фармакологические исследования ганглионарных нХР показали их фармакологические и биофизические отличия от рецепторов скелетных мышц. Одно из главных различий состоит в том, что ганглионарные рецепторы не чувствительны к α -бунгаротоксину — полипептидному нейротоксину из яда змей семейства аспидовых (род *Bungarus*), который является классическим высокоаффинным блокатором мышечного нХР (K_d в наномолярном диапазоне).

Что касается ЦНС, то здесь картина долгое время оставалась неясной. Прямое исследование нХР и синапсов, в которых передача опосредуется этим типом рецепторов, было затруднено в силу малой доступности этих структур. По аналогии с ганглионарными нХР нечувствительность к α -бунгаротоксину какое-то время считалась характеристическим признаком всех нейрональных нХР. Однако исследования эффектов α -бунгаротоксина в ЦНС, проводившиеся в 1970-е и начале 1980-х годов, показали, что и в пределах нейрональных нХР существует неоднородность. С одной стороны, биохимическими, ауторадиографическими и радиолигандными методами в определенных областях ЦНС были обнаружены места высокоаффинного связывания α -бунгаротоксина. С другой стороны, физиологические исследования не подтверждали соответствия этих локусов синаптическим нХР: за очень редкими исключениями ни чувствительная к никотину синаптическая передача, ни вызванные никотином нейрональные токи не блокировались α -бунгаротоксином,

и наоборот, в ряде областей ЦНС, где обнаружены места связывания α -бунгаротоксина, вообще отсутствовали синаптические контакты (обзоры: Скок и др., 1987; McGehee, Role, 1995). Таким образом, природа и функция мест связывания α -бунгаротоксина в ЦНС долгое время оставались загадочными. Кроме того, непонятно было, как согласовывались многочисленные поведенческие эффекты никотина с относительно малым числом центральных синапсов, в которых передача опосредуется нХР.

Картина во многом прояснилась благодаря развитию методов молекулярной биологии. Середина 1980-х годов, когда была получена первая клональная ДНК α -субъединицы нейронального нХР, считается началом новой эры в исследовании синаптических рецепторов вообще. В пределах каждого класса субъединиц нХР было обнаружено большое разнообразие вариантов (кодируемых разными генами), сочетания которых могут давать гораздо большее разнообразие подтипов нХР, чем было принято считать.

В целом (с учетом рецептора скелетной мышцы) к настоящему времени идентифицированы и клонированы гены 17-ти субъединиц нХР позвоночных. Открытые первыми α - и β -субъединицы нХР скелетной мышцы обозначаются $\alpha 1$ и $\beta 1$. В нервной системе экспрессируются девять α -субъединиц ($\alpha 2$ - $\alpha 10$) и три β -субъединицы ($\beta 2$ - $\beta 4$). При этом только α - (но не β -) субъединицы имеют высокую степень гомологии с соответствующей субъединицей нХР скелетной мышцы. Нейрональные аналоги γ -, δ - и ϵ -субъединиц не обнаружены. Примеры разных типов нХР показаны на рис. 2Б.

На более ранних этапах исследований в опытах с экспрессией разных субъединиц нейрональных нХР в ооцитах *Xenopus* было показано, что для формирования функционального рецептора необходимо сочетание α - и β -субъединиц. При этом образуются гетеропентамерные комплексы, которые содержат, как и в скелетной мышце, по две α -субъединицы, формирующие места связывания АХ вместе с соседними β -субъединицами, т. е. образуют комплекс $(\alpha)_2(\beta)_3$. Эти рецепторы нечувствительны к α -бунгаротоксину, что соответствует ранним представлениям о свойствах нейрональных нХР (см. обзор McGehee, Role, 1995).

Однако после обнаружения $\alpha 7$ -, $\alpha 8$ - и $\alpha 9$ -субъединиц оказалось, что эти субъединицы образуют гомопентамерные комплексы, т. е. комплексы, состоящие только из идентичных субъединиц (например, $\alpha 7$), формирующих между собой 5 мест связывания АХ (рис. 2Б).

Открытие этих рецепторов приобрело особое значение, когда было установлено, что они, в отличие от гетеропентамерных, высоко чувствительны к α -бунгаротоксину (K_d в диапазоне единиц нМ). Таким образом, была раскрыта загадка мест связывания α -бунгаротоксина в ЦНС. Сегодня известно, что рецепторы $\alpha 7$ чрезвычайно широко представлены в центральной и периферической нервной системе. Они имеют как пост-, так и пресинаптическую локализацию, т. е. одной из их функций является модуляция освобождения медиаторов (McGehee, Role, 1995; Wonnacott, 1997; Vizi, Lendvai, 1999). Из других типов гомоолигомерных нХР рецептор $\alpha 8$ пока обнаружен только в ЦНС цыпленка, $\alpha 9$ и $\alpha 10$ -в некоторых специфических областях ЦНС млекопитающих (Cordero-Erausquin et al., 2000). Рецепторы $\alpha 7$ имеются и в нервной системе беспозвоночных (моллюски, насекомые).

Гомоолигомерные нХР типа $\alpha 7$, помимо их чувствительности к α -бунгаротоксину, обладают и рядом других, в своем роде уникальных свойств, отличающих их от прочих нейрональных нХР. Так, они более чувствительны к никотину, чем к АХ, и имеют более высокую скорость десенситизации. Но, пожалуй, главное отличие состоит в очень высокой проницаемости этих рецепторов для Ca^{2+} : $P_{Ca}/P_{Na} \sim 10-20$. Этот показатель выше, чем у глутаматных рецепторов NMDA-типа ($P_{Ca}/P_{Na} \sim 7$), которые ранее считались самыми Ca^{2+} -проницаемыми синаптическими рецепторами. По-видимому, главная функция $\alpha 7$ -нХР

состоит именно в формировании внутриклеточного Ca^{2+} -сигнала. В настоящее время рецепторы $\alpha 7$ рассматриваются как один из главных регуляторов внутриклеточного Ca^{2+} в нервной системе (McGehee, Role, 1995). Судя по имеющимся данным, Ca^{2+} -ответ на активацию $\alpha 7$ -нХР формируется в результате каскада реакций и имеет как минимум два компонента. Вход Ca^{2+} в клетку через канал рецептора составляет лишь $\sim 10\%$ общего повышения цитозольной концентрации Ca^{2+} . Этот первичный Ca^{2+} -сигнал вызывает дополнительный рост концентрации Ca^{2+} , действуя на другие системы регуляции Ca^{2+} , которые, по-видимому, в разных клетках (или в разных субклеточных компартментах) могут быть разными. Такими системами могут быть внутриклеточные Ca^{2+} -депо разного типа (управляемые риаудиновым рецептором или рецептором IP_3) и/или потенциалозависимые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны, открывающиеся в ответ на деполяризацию, возникающую при активации $\alpha 7$ -нХР (Tanaki et al., 2000; Sharma, Vijayaraghavan, 2001). Последовательное вовлечение разных Ca^{2+} -источников может быть тем механизмом, благодаря которому активация $\alpha 7$ -нХР, несмотря на быструю десенситизацию этого рецептора, вызывает долговременный, значительный по величине Ca^{2+} -сигнал.

В ЦНС $\alpha 7$ -нХР, по-видимому, опосредуют многие физиологические и поведенческие эффекты никотина, а также участвуют в патогенезе болезни Альцгеймера и шизофрении (Jones et al., 1999; Paterson, Nordberg, 2000). Считается, что $\alpha 7$ -нХР (пост- и пресинаптические) холинергических входов, связанных с мезокортико-лимбическими дофаминергическими путями (составляющими часть системы естественного подкрепления), играют ведущую роль в формировании никотиновой зависимости (Jones et al., 1999). Предполагается, что возникающий при активации этих рецепторов Ca^{2+} -сигнал запускает каскад реакций, определяющих долговременные эффекты при хроническом воздействии никотина (Tanaki et al., 2000). На рис. 3 показана локализация разных субъединиц нХР в мозге и их возможная связь с физиологическими, поведенческими и патологическими процессами.

Данные последних лет указывают на то, что $\alpha 7$ -нХР могут играть важную роль в нейроглиальных взаимодействиях. Согласно современным представлениям, между нейронами и глиальными клетками (в частности, астроцитами) существует двусторонняя сигнализация. Астроциты несут на себе рецепторы к таким нейромедиаторам, как глутамат, ГАМК,

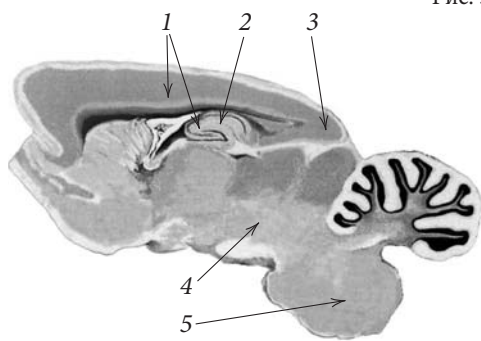


Рис. 3. Локализация субъединиц нХР в мозге крысы и возможная роль нХР, содержащих эти субъединицы, в физиологических, поведенческих и патологических процессах у человека (по: Jones et al., 1999).

1. **Когнитивные процессы.** Кора — $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 4$; Гиппокамп — $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$. Возможная роль в патогенезе болезни Альцгеймера.
2. **Сенсорный поток.** Гиппокамп — $\alpha 7$. Дефицит сенсорного притока играет роль в патогенезе шизофрении.
3. **Развитие.** Слуховая кора — $\alpha 7$; Зрительная кора — не $\alpha 7$.
4. **Система естественного подкрепления.** Мезокортико-лимбические дофаминовые пути — $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\beta 2$, $\beta 3$, $\beta 4$. Возможная роль в формировании никотиновой зависимости
5. **Боль.** Большое ядро шва — $\alpha 4$

глицин, АТФ (относительно АХ сведений до последнего времени не было). Благодаря этому астроциты отвечают на нейрональную активность (сопровождающуюся освобождением

соответствующих медиаторов) осцилляциями внутриклеточной концентрации Ca^{2+} (Ca^{2+} -волнами). С другой стороны, повышение цитозольной концентрации Ca^{2+} в астроцитах гиппокампа приводит к освобождению из них глутамата, который модулирует активность соседних нейронов. Недавно показано, что астроциты гиппокампа крысы экспрессируют $\alpha 7$ -нХР в клеточной культуре и, вероятно, в естественных условиях (Sharma, Vijayaraghavan, 2001). Активация этих рецепторов при действии АХ вызывает в астроцитах Ca^{2+} -сигнал, параметры которого таковы, что могут обеспечить упомянутое выше Ca^{2+} -зависимое освобождение глутамата, влияющее на нейрональную активность. Эти данные показывают, что широко обсуждаемая пресинаптическая модуляция освобождения нейромедиаторов, осуществляемая нХР, в каких-то случаях может опосредоваться секрецией глутамата из астроцитов. Таким образом, пути регуляции синаптической эффективности в ЦНС, в которых участвуют нХР, могут быть гораздо более разнообразными, чем принято считать.

Говоря о роли нХР в нейро-глиальных взаимодействиях, нельзя не упомянуть совершенно новый феномен, недавно обнаруженный в нервной системе улитки *Limnaea stagnalis* и раскрывающий ранее не известный механизм нХР-зависимой модуляции нейрональной активности. Был идентифицирован эндогенный, продуцируемый околосинаптической глиальной клеткой растворимый АХ-связывающий белок, который является полным аналогом внеклеточного лиганд-связывающего домена нХР, но не имеет трансмембранных доменов, формирующих ионный канал (Smit et al., 2001). Этот белок представляет собой гомопентамер, высоко гомологичный соответствующему домену $\alpha 7$ -нХР позвоночных и имеющий близкий фармакологический профиль. АХ, освобождающийся из пресинаптического нейрона и действующий на нХР глиальной клетки, вызывает секрецию этого белка в синаптическую щель, где он связывает избыточный АХ, тем самым подавляя синаптическую передачу. Существует ли подобный механизм у позвоночных, неизвестно.

Благодаря исследованиям, сочетающим молекулярно-биологические и электрофизиологические методы, отмечается растущее число данных о гораздо большем разнообразии молекулярного строения нейрональных нХР, чем считалось еще сравнительно недавно. В частности, это касается гетероолигомерных нХР, которые, по-видимому, могут иметь более сложную композицию, чем сочетание одного типа α -субъединицы с одним типом β -субъединицы. Именно такие сочетания производили в ранних опытах по экспрессии нХР, получая так называемые рецепторы — «дуплексы», составленные из двух одинаковых изоформ α -субъединицы и трех одинаковых изоформ β -субъединицы, например, $(\alpha 2)_2(\beta 3)_3$ (учитывая, что все нХР являются пентамерами, их состав обычно изображают, не воспроизводя полной формулы: $\alpha 2\beta 3$). При этом в зависимости от комбинации типов субъединиц экспрессируемые рецепторы имели различные биофизические (проводимость и кинетика открывания каналов) и фармакологические (аффинность к агонистам и антагонистам) профили (McGehee, Role, 1995). Некоторые из этих параметров соответствуют характеристикам нативных нХР. Так, рецепторы состава $\alpha 4\beta 2$ широко распространены в ЦНС, а $\alpha 3\beta 4$ -в периферической нервной системе. Однако во многих случаях не удавалось получить хорошего соответствия характеристик экспрессированных и нативных нХР. Возможные причины могут заключаться в неспособности ооцитов к сборке правильной композиции нативных рецепторов млекопитающих либо в различиях механизмов посттрансляционной модификации рецепторов.

Другое объяснение следует из новейших данных, которые дают основания полагать, что пентамерные молекулы нХР могут существовать не только в виде «дуплексов», но и «триплексов» или даже еще более сложных сочетаний субъединиц. Так, предполагается, что

есть нативные нХР с композициями $\alpha 3\alpha 5\beta 4$, $\alpha 3\beta 2\beta 4$, $\alpha 6\beta 3\beta 2\beta 4$, $\alpha 3\beta 2\beta 4\alpha 5$ и др. Возможны и такие комбинации, при которых рецептор состоит из трех α - и двух β -субъединиц, например, $\alpha 4\alpha 6\alpha 5(\beta 2)_2$ (см. обзоры: Cordero-Erausquin et al., 2000; Paterson, Nordberg, 2000; Changeux, Edelstein, 2001; Драбкина, Кривой, 2004). Более того, судя по некоторым данным, субъединица $\alpha 7$ может сочетаться с другими субъединицами, т.е. присутствовать в гетероолигомерных комплексах. В экспрессионных системах такие комплексы блокируются α -бунгаротоксином. Если подобные структуры присущи нативным рецепторам, это ставит под сомнение представление о том, что в нервной системе чувствительность к α -бунгаротоксину определяется только гомоолигомерными нХР. И наоборот, в некоторых областях мозга нХР с предполагаемой структурой $\alpha 4\alpha 6\alpha 5(\beta 2)_2$, т.е. не содержащие $\alpha 7$ -субъединицы, блокируются специфическим антагонистом этой субъединицы метилликаонитином в очень низких концентрациях (~ 1 нМ). Другой пример того же рода: некоторые типы нейрональных нХР, экспрессируемые в гетерологических клетках, блокируются атропином — классическим антагонистом мускариновых холинорецепторов (см. обзоры: Changeux, Edelstein, 2001; Драбкина, Кривой, 2004). Все эти данные, помимо своего фундаментального значения, показывают ограниченность применения простых фармакологических тестов при анализе природы тех или иных рецепторов (как и вообще функциональных белков). Следует заметить, что за небольшим исключением, точный состав субъединиц большинства нативных нейрональных нХР неизвестен.

Что касается нервно-мышечного аппарата, то до последнего времени считалось, что нХР представлены здесь единственным — «мышечным» типом. Однако недавно получены данные, свидетельствующие о наличии в диафрагме и некоторых других скелетных мышцах мышцы нХР нейронального типа, идентифицированного как $\alpha 7$ -рецептор (или рецептор, содержащий $\alpha 7$ -субъединицу) с неизвестной функцией (Dezaki et al., 1999). Этот рецептор локализован в синаптическом районе мышечной мембраны, однако, по-видимому, он не участвует в синаптической передаче. Его активация локальной аппликацией АХ вызывает медленное повышение концентрации Ca^{2+} в миоплазме, которое блокируется специфическим блокатором $\alpha 7$ -нХР метилликаонитином. Этот Ca^{2+} -сигнал ограничен областью нервно-мышечного синапса и не принимает участия в активации сократительного аппарата. Как и в нейронах мозга, в формировании этого медленного «несократительного» Ca^{2+} -сигнала в мышце принимает участие не только Ca^{2+} , поступающий снаружи через канал $\alpha 7$ -нХР, но и Ca^{2+} , мобилизуемый из внутриклеточных депо.

Учитывая синаптическую локализацию $\alpha 7$ -нХР в мышце и его способность индуцировать внутриклеточный Ca^{2+} -сигнал, можно предположить участие этого рецептора в каких-то модуляторных процессах, сопряженных с активацией нервно-мышечного синапса.

Возможно, в скелетной мышце присутствуют и другие субъединицы нейрональных нХР. Так, по данным иммуноцитохимических исследований и определения транскриптов мРНК с использованием полимеразной цепной реакции, в зрелых мышцах конечностей крысы экспрессируются $\alpha 4$ - и $\beta 2$ -субъединицы (причем последняя локализована в концевой пластинке) (Sala et al., 1995; Tsuneki et al., 1995).

Давно обсуждается проблема пресинаптических ауторецепторов, модулирующих квантовую секрецию АХ в нервно-мышечном соединении, что является одной из основ синаптической пластичности. На основании многочисленных физиологических и фармакологических данных предполагается, что моторные нервные окончания содержат неоднородный пул никотиновых ауторецепторов, опосредующих регуляцию секреции АХ по механизму положительной и отрицательной обратной связи (Bowman, 1990; Tian et al., 1994; Prior,

Singh, 2000). Это могут быть нХР не только мышечного, но и нейронального типа, однако об их молекулярной структуре до сих пор мало известно. Имеются данные об экспрессии $\alpha 3$ -субъединицы нХР в моторном нервном окончании диафрагмы мыши (Tsuneki et al., 1995). Недавно показана возможность экспрессии мотонейронами различных субъединиц нейрональных нХР, в том числе и $\alpha 7$ -типа (Dehkordi et al., 2004; 2005). Поиск нХР нейронального типа в моторных нервных окончаниях и изучение их роли в пресинаптических эффектах экзогенных и эндогенных агонистов (АХ, холин, никотина) остается весьма актуальной проблемой.

1.4. Кинетика активации никотинового холинорецептора

Исследованию механизма генерации постсинаптического ответа, как одного из основных этапов синаптической передачи, посвящено значительное число работ (см. Скок и др., 1987; Peper et al., 1982; Bowman, 1990). Ниже речь пойдет о наиболее изученном нервно-мышечном соединении позвоночных, где медиатором является АХ.

После освобождения кванта АХ из моторного нервного окончания, молекулы АХ диффундируют через синаптическую щель и взаимодействуют с постсинаптическими нХР, что приводит к кратковременному повышению проводимости постсинаптической мембраны и ее деполяризации. Спонтанное освобождение одного кванта АХ вызывает генерацию миниатюрного потенциала концевой пластинки (МПКП), а одновременное освобождение множества квантов АХ в ответ на потенциал действия в нервной терминали — многоквантовый потенциал концевой пластинки (ПКП). В основе МПКП и ПКП лежат трансмембранные токи: миниатюрный ток концевой пластинки (МТКП) и вызванный ток концевой пластинки (ТКП), соответственно. В основе этих постсинаптических ответов лежит повышение проводимости мембраны для K^+ , Na^+ , отчасти Ca^{2+} , но не для Cl^- , при этом ионы движутся через мембрану в соответствии с их электрохимическими градиентами: Na^+ входит в мышечное волокно, K^+ движется в противоположном направлении. Ионы Na^+ и K^+ движутся через каналы, образующиеся в макромолекулах нХР под воздействием АХ. Эти ионные каналы обладают катионной селективностью и имеют проводимость 20–30 pS каждый.

При взаимодействии кванта АХ с нХР наблюдается вначале быстрый рост, а далее относительно медленное снижение проводимости постсинаптической мембраны. Восходящая фаза ТКП и МТКП имеет S-образную форму, а спад происходит по экспоненциальному закону (рис. 4). Весь процесс занимает несколько миллисекунд. Медиаторный АХ гидролизует ацетилхолинэстеразой (АХЭ), ферментом, локализованным в синаптическом районе (см. подробнее ч. 2 данного обзора) и вещества, угнетающие активность АХЭ, увеличивают длительность ТКП и ПКП. В связи с этим длительное время считалось, что временное течение постсинаптических ответов просто отражает изменение концентрации АХ в синаптической щели в результате диффузии и энзиматического гидролиза. Однако в дальнейшем появились факты, которые было трудно объяснить с этой точки зрения. Так, было установлено, что спад ТКП и МТКП при интактной АХЭ подчиняется экспоненциальному закону, а константа скорости спада зависит от мембранного потенциала и температуры: уменьшается при гиперполяризации и охлаждении и увеличивается при деполяризации и нагревании, причем такая зависимость сохраняется и после угнетения АХЭ. Оказалось также, что некоторые фармакологические агенты способны изменять временной ход ТКП: укорачивать, удлинять, нарушать экспоненциальность спада.

Объяснить характер временного течения постсинаптических токов и его изменение при воздействии различных факторов позволила кинетическая модель активации постсинаптической мембраны, в основу которой положена схема взаимодействия медиатора с нХР, заимствованная из теории ферментативных реакций. Существует множество кинетических

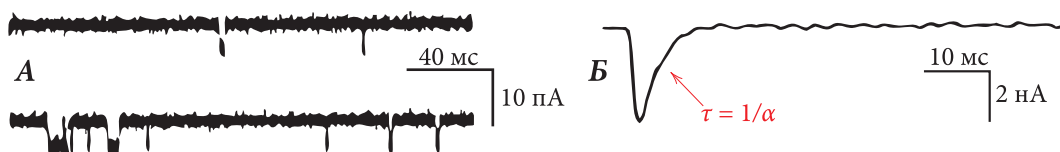


Рис. 4. Сравнение токов одиночных ионных каналов нХР (А) и миниатюрного тока концевой пластинки (Б).

схем, описывающих взаимодействие нХР с агонистами или антагонистами, но все схемы основаны на предположении, что для открывания ионного канала требуется последовательное связывание двух молекул АХ (Bowman, 1990; Prince, Sine, 1999; Wilson, Karlin, 2001). Обычно используют кооперативную модель, в которой связывание одной молекулы агониста облегчает связывание следующей:



Вначале с нХР (R) связывается одна молекула АХ (A) и образуется промежуточный комплекс A_1R (ионный канал закрыт). На следующем этапе к этому комплексу присоединяется еще одна молекула АХ. Только после этого в макромолекуле нХР происходят конформационные изменения и неактивный комплекс A_2R переходит в активированное состояние A_2R^* , при котором открывается ионный канал. k_1 , k_{-1} , k_2 , k_{-2} , α и β — константы скоростей последовательных этапов связывания АХ и активации нХР. Обычно считают, что скорость реакции определяют конформационные изменения как наиболее медленный процесс.

После освобождения кванта АХ из нервной терминали не все молекулы АХ достигают постсинаптических нХР. Часть молекул АХ гидролизует синаптической АХЭ и теряется за счет диффузии. Амплитуда МТКП при нормальном мембранном потенциале составляет около 5 нА, что соответствует приблизительно 1500-2500 открытых ионных каналов. При ингибировании АХЭ больше молекул АХ достигает постсинаптических нХР и амплитуда МТКП возрастает (рис. 5). В соответствии с рассмотренной выше схемой, длительность восходящей фазы МТКП, возникающего в ответ на действие одного кванта АХ, зависит от скорости открывания ионных каналов (константа скорости β). Вследствие того, что активность АХЭ достаточно высока, после связывания кванта АХ с нХР в синаптической щели остается мало свободного АХ, который эффективно устраняется из щели за счет гидролиза и в некоторой степени за счет диффузии. Каналы открываются достаточно синхронно, по-

этому спад МТКП при нормальной активности АХЭ отражает преимущественно уменьшение во времени числа открытых каналов (концентрации комплексов A_2R^*) и определяется скоростью конформационного перехода ионных каналов из открытого состояния в закрытое (константа скорости α). В результате спад МТКП происходит по экспоненциальному закону с постоянной времени $\tau \sim 1/\alpha$, которая составляет в нормальных условиях около 1 мс. Поскольку $\alpha \ll \beta$, спад МТКП значительно медленнее восходящей фазы, составляющей 100–300 мкс.

В рассмотренной модели предполагается, что каждый ионный канал может находиться либо в закрытом, либо в открытом состоянии, причем переходы из одного состояния в другое происходят очень быстро, а вероятность этих переходов определяется константами скоростей, которые зависят от мембранного потенциала и температуры. Это и объясняет высокую потенциалозависимость и температурную чувствительность спада ТКП. Постоянная времени спада ТКП изменяется в e раз при изменении потенциала на 100–120 мВ и имеет значение температурного коэффициента Q_{10} около 3 и более.

Справедливость применения подобной модели подтверждается следующим. Анализ параметров быстрых флуктуаций проводимости мембраны, усиливающихся вследствие случайных открываний и закрываний ионных каналов в присутствии постоянной концентрации АХ, позволяет оценить проводимость канала и среднюю продолжительность его открытого состояния. Оцениваемое таким образом время «жизни» ионных каналов действительно оказывается близким значению постоянной времени спада МТКП и зависит от температуры и потенциала мембраны. Исследования с помощью «точечной» фиксации потенциала токов одиночных ионных каналов также показывают, что эти токи имеют вид прямоугольных импульсов относительно стандартной амплитуды (несколько пикоампер), а их длительность варьирует по закону Пуассона со средним значением, соответствующим постоянной времени спада МТКП и ТКП (рис. 4).

Отметим, что вышеизложенное дает лишь весьма упрощенное представление о механизмах активации нХР и работы ионных каналов. В соответствии с современными представлениями, нХР существует в закрытом, открытом и десенситизированном состояниях, взаимопереходящих друг в друга. В этом случае используется более сложная кинетическая схема взаимодействия АХ (L) с нХР (R), учитывающая вероятность перехода в десенситизированное состояние (D), которая описывается аллостерическими константами I .

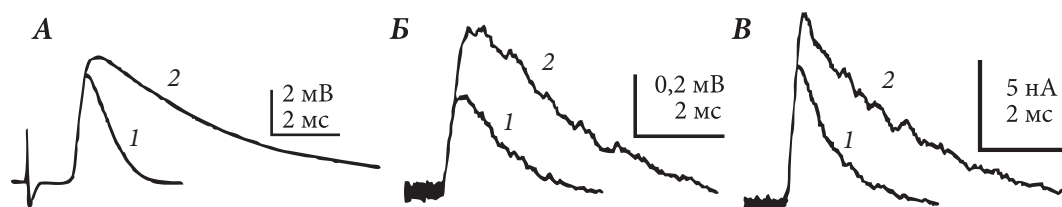
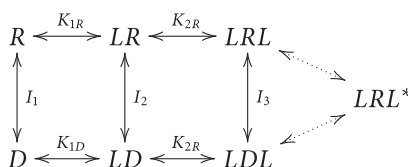


Рис. 5. Временное течение постсинаптических ответов в нервно-мышечном синапсе диафрагмы крысы при нормальной активности АХЭ (1) и после ее блокады фосфорорганическим ингибитором АХЭ армином (2). А — вызванные стимуляцией нерва ПКП; Б — спонтанные МПКП; В — спонтанные МТКП. Данные авторов.

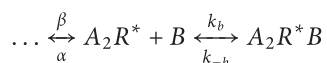


В еще более сложных схемах предполагается, что для открывания канала нХР не обязательно связывание агониста с двумя сайтами: канал может открываться спонтанно, при связывании АХ только с одним сайтом, а также при переходе из состояния десенситизации. Это уже трехмерные схемы (см. Wang, Sun, 2005). Тем не менее, в любом случае вероятность открытого состояния канала максимальна в случае связывания двух молекул агониста.

Десенситизация является важной характеристикой нХР и проявляется в снижении постсинаптического ответа на повторяющееся или продолжительное действие агонистов (Katz, Thesleff, 1957; Magazanik, Vyskocil, 1976; Giniatullin et al., 1989; Wang, Sun, 2005). Выраженность десенситизации зависит от времени экспозиции агонистов и от их концентрации. Важно, что АХ может связываться как с закрытым, так и с десенситизированным состояниями нХР, причем наиболее высокой аффинностью к АХ обладают нХР именно в состоянии десенситизации: аффинность по сравнению с покоящимся состоянием холинорецептора на 2–4 порядка выше (Pаринени, Pedersen, 1997; Wilson, Karlin, 2001). Этот факт очень интересен, учитывая, что роль десенситизации нХР в модуляции синаптической передачи остается не ясной и интенсивно изучается. В частности, большое значение придается состоянию десенситизации нХР для понимания работы ЦНС в норме и при разных патологиях (Wang, Sun, 2005).

Нарушения кинетики ионного канала нХР могут являться основой серьезных заболеваний нервно-мышечного аппарата. Например, в случае т. н. синдрома медленного канала (slow channel syndrome) наблюдается увеличение времени открытого состояния канала нХР и существенное замедление временного течения ТКП; в результате серьезно нарушается нервно-мышечная передача (Vincent et al., 1997).

Нормальное временное течение ТКП нарушается также при действии ряда веществ, обладающих способностью связываться с открытым ионным каналом нХР и блокировать его проводимость. Этот процесс может быть описан следующей схемой:



где B — молекула блокатора, k_b и k_{-b} — соответствующие константы скоростей. В зависимости от типа блокирования наблюдается либо нарушение простого экспоненциального течения спада (спад может быть аппроксимирован двумя-тремя экспонентами), либо при сохранении моноэкспоненциальности спада изменяется его длительность. Кинетические характеристики блокатора могут быть оценены разными способами, в том числе по изменению константы скорости спада ТКП при варьировании концентрации блокирующего вещества. С другой стороны, по характеру влияния фармакологических агентов известной структуры на кинетику спада постсинаптических токов можно исследовать строение и функциональную организацию нХР.

Рассмотренная схема активации постсинаптической мембраны в достаточной мере условна и скорость закрывания ионных каналов хотя и доминирующий, но не единствен-

ный фактор, определяющий временное течение спада постсинаптических токов. Действительно, это справедливо лишь в том случае, когда скорость устранения АХ из синаптической щели за счет гидролиза и диффузии намного превышает скорость закрывания ионных каналов. При этом предполагается, что каждая молекула АХ может связаться с нХР не более одного раза (шансы на повторное связывание невелики). Такое соотношение скоростей наблюдается не всегда. Например, в тонических и медленных фазных мышечных волокнах, характеризующихся относительно низким уровнем функциональной АХЭ, спад МТКП даже при интактной АХЭ определяется не только кинетикой ионных каналов, но и зависит от условий распространения кванта АХ в синаптической щели: ширины щели, плотности распределения нХР и АХЭ, расположения синаптических складок, концентрации АХ в зоне действия кванта. Различие этих условий в пределах синапса является причиной вариабельности длительности отдельных МТКП и в «быстрых» синапсах. Эти и многие другие факты свидетельствуют о возможности повторных связываний АХ с нХР в ходе генерации МТКП при активной АХЭ. Здесь становится важным вопрос роли в регуляции концентрации синаптического АХ различных молекулярных форм АХЭ (см. подробнее 2.2).

2. Ацетилхолинэстераза и ее молекулярные формы

2.1. Общие сведения

Ацетилхолинэстераза — фермент (ЕС 3.1.1.7), чрезвычайно быстро гидролизующий АХ. За счет этого АХЭ обеспечивает нормальное функционирование холинергических синапсов, эффективно удаляя «отработавший» медиатор из синаптической щели. АХЭ в основном функционирует в клетках, вовлеченных в холинергическую синаптическую передачу, но обнаруживается также и в других нейронах, а также в ненервных клетках, например, в эритроцитах (см. обзоры: Massoulie, Bon, 1982; Massoulie, Toutant, 1988; Taylor, 1991). При сильном угнетении активности АХЭ происходит перенакопление АХ в синаптических щелях, вызывающее нарушения синаптической передачи, что приводит к тяжелым последствиям вплоть до смерти. В частности, в нервно-мышечном аппарате при угнетении АХЭ резко замедляется временное течение постсинаптических ответов и нарушается способность мышц удерживать тетанус (рис. 5, 6). Механизм этого нарушения заключается в том, что в условиях сильного ингибирования АХЭ удаление АХ из синаптической щели происходит в основном за счет диффузии. При этом в щели накапливается негидролизованный АХ, спады ритмически следующих ПКП суммируются, что вызывает устойчивую деполяризацию постсинаптической мембраны, инактивацию Na^+ каналов и неспособность мышечного волокна генерировать потенциалы действия (Кривой и др., 1987).

В то же время ингибиторы АХЭ, вызывающие лишь частичное ее торможение и небольшое накопление АХ, применяются в клинике в качестве стимуляторов краткосрочной памяти, а также для лечения различных патологий двигательного аппарата, связанных с нарушениями нервно-мышечной передачи.

АХЭ существует в виде множественных молекулярных форм, имеющих одинаковые каталитические свойства, но значительно различающихся характером сборки субъединиц, скоростью седиментации, а также типом ассоциации с клеточной мембраной (рис. 7).

Каталитическая субъединица АХЭ кодируется единственным геном, в отличие от субъединиц нХР (а также Na, K-АТФазы, о чем сказано ниже). Множественные молекулярные формы АХЭ являются продуктами альтернативного сплайсинга гена этой субъединицы

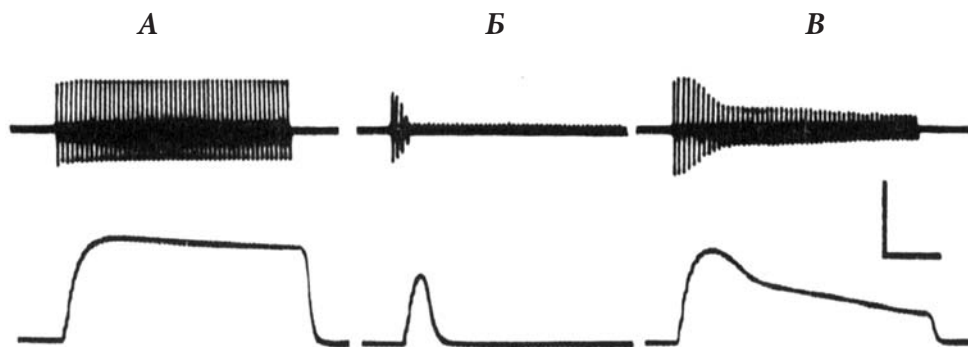


Рис. 6. Примеры записей суммарных мышечных потенциалов действия (вверху) и тетанических сокращений (частота стимуляции нерва 50 имп/с) изолированной диафрагмы крысы при нормальной активности АХЭ (А), через 1 час действия фосфорорганического ингибитора АХЭ армина в концентрации 1 мкМ (Б) и через 1,5 часа отмыwania (В). Калибровка: длительность — 0,25 с; амплитуда суммарных потенциалов действия — 2 мВ; сила — 20 г. Данные авторов.

и посттрансляционной модификации (Taylor, 1991). Дополнительное разнообразие обеспечивается ассоциацией каталитической и структурных субъединиц (см. ниже).

Молекулярные формы АХЭ подразделяются в соответствии с их способностью вступать в гидрофобные взаимодействия на амфифильные и неамфифильные, а также в соответствии с их четвертичной структурой на гомомерные и гетеромерные.

Гомомерные формы АХЭ (они же глобулярные, или G формы) представляют собой амфифильные и неамфифильные мономеры, димеры или тетрамеры каталитической субъединицы, различающиеся коэффициентами седиментации (4S, 6S и 10S). В основном это мембранно-связанные белки с обращенными наружу активными центрами, но они могут существовать и в растворимом виде (рис. 7А).

Гетеромерные формы состоят из тетрамеров каталитической субъединицы, связанных дисульфидной связью со структурными субъединицами разного типа (рис. 7Б).

Среди продуктов альтернативного сплайсинга гена каталитической субъединицы АХЭ выделяют так называемые субъединицы АХЭ_Н и АХЭ_Т, имеющие идентичные каталитические домены, но разные С-концевые последовательности — Н- и Т-пептиды (по названию соответствующих экзонов). Эти пептиды определяют различную посттранскрипционную модификацию и четвертичную структуру АХЭ, и, в конечном счете — локализацию фермента (Massoulie et al., 1993).

С-концевой пептид субъединицы АХЭ_Н содержит один или два цистеина вблизи каталитического домена. Их дисульфидные связи внутри цепи формируют димеры АХЭ (G₂). Этот пептид содержит также участок, опосредующий присоединение гликофосфатидилинозитола, что приводит к образованию мономеров или димеров, ассоциированных с наружной поверхностью клеточной мембраны (G₁ и G₂ на рис. 7А). АХЭ_Н присутствует в нервной и мышечной тканях рыб, рептилий и амфибий, а у млекопитающих экспрессируется только в тканях гематопоэтического происхождения.

Субъединица АХЭ_Т экспрессируется в нервной и мышечной тканях. Ее С-концевой Т-пептид имеет свободный цистеин вблизи С-конца и амфифильную α-спираль, что опре-

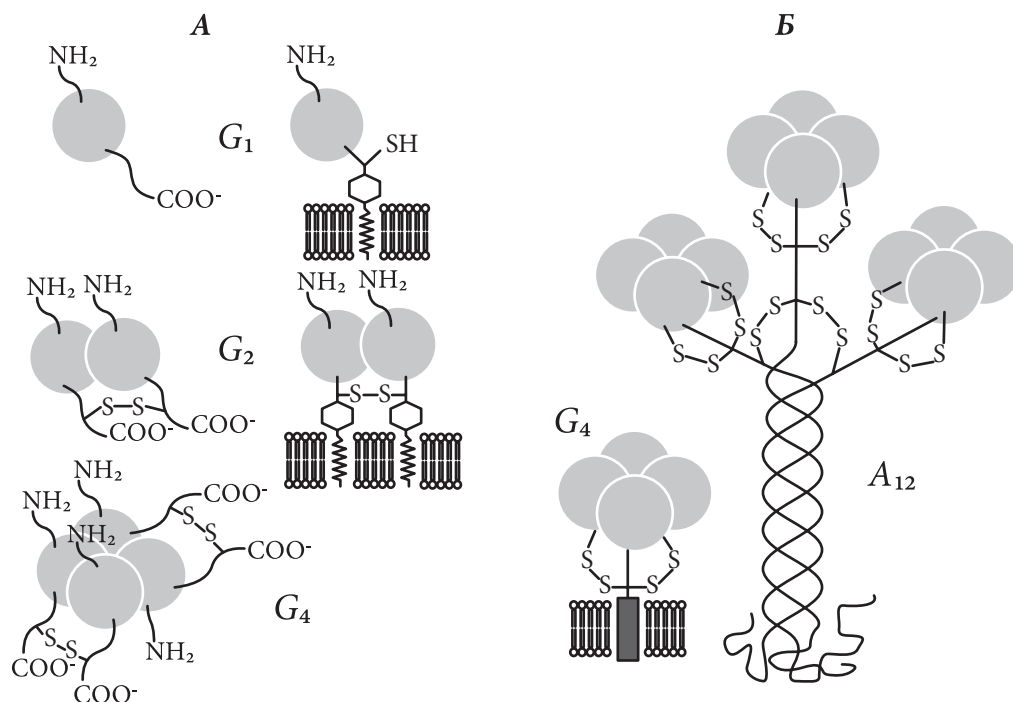


Рис. 7. Схема строения различных молекулярных форм ацетилхолинэстеразы. **А** — мономерные, **Б** — гетеромерные формы. G_1 , G_2 , G_4 — глобулярные формы; A_{12} — асимметричная форма (по: Taylor, 1991, с изменениями).

деляет образование множества четвертичных структур — мономеров, димеров и тетрамеров. Дальнейшее разнообразие молекулярных форм определяется способностью Т-пептида связываться со структурными субъединицами, давая начало гетеромерным формам АХЭ. В нервной системе такой структурной субъединицей служит гидрофобный пептид, прикрепляющий АХЭ к клеточной мембране. В нервно-мышечном соединении структурная субъединица представляет собой коллагеноподобный хвост длиной около 50 нм (называемый коллагеном Q), состоящий из трех спиральных нитей. Этот хвост прикрепляет АХЭ к базальной пластинке внеклеточного матрикса синаптической щели, по-видимому, за счет его ассоциации с протеогликанами. АХЭ этого типа называют асимметричными, или А формами. В асимметричных формах АХЭ с коллагеновым хвостом могут быть ассоциированы один, два или три тетрамера каталитической субъединицы. Такие формы АХЭ имеют коэффициенты седиментации приблизительно 8S, 12–14S и 16–18S. В каждом тетрамере две каталитические субъединицы соединены между собой дисульфидной связью, остальные две ковалентно прикреплены с помощью дисульфидных связей к одной из нитей хвоста (форма A_{12} на рис. 7Б).

Коллагеноподобная структурная субъединица АХЭ кодируется одним геном (Krejci et al., 1997). У человека дефицит асимметричной формы синаптической АХЭ приводит к развитию одного из видов миастении, причем заболевание не связано с нарушением экспрессии

каталитической субъединицы АХЭ. Как оказалось, в основе лежат мутации гена коллагена Q, влияющие на связь с каталитической субъединицей или с базальной пластинкой (Ohno et al., 2000). Обнаружены продукты альтернативного сплайсинга этого гена, которые кодируют домен, взаимодействующий с каталитической субъединицей АХЭ, но не коллагеновый домен. Возможно, такие структурные субъединицы участвуют в формировании других, еще не описанных молекулярных форм АХЭ, хотя нельзя исключить и совершенно иной роли этих продуктов (Krejci et al., 1997).

2.2. Молекулярные формы АХЭ в скелетной мышце

Если структурные особенности изозимов АХЭ к настоящему времени хорошо изучены, то функциональная роль ее молекулярных форм остается во многом неясной.

В нервно-мышечном синапсе основная часть АХЭ сосредоточена на базальной пластинке в синаптической щели и на постсинаптической мембране, незначительная ее часть приходится на пресинаптическую мембрану. Вместе с тем АХЭ обнаруживается также в миосухожильных районах, мышечной тубулярной системе и внесинаптических областях мышечных волокон. В гидролизе АХ, освобождаемого нервным окончанием, участвует только синаптическая, или функциональная АХЭ (см. обзоры: Кривой и др., 1987; Massoulié, Toutant, 1988).

Согласно давней классификации, пулы АХЭ в скелетной мышце подразделяют на функциональный и резервный (нефункциональный). Предполагается, что эти пулы соответствуют ферменту, локализованному снаружи (в синаптической щели), т. е. принимающему участие в гидролизе медиаторного АХ, и внутриклеточному энзиму.

Синаптическая АХЭ представлена как асимметричными, так и глобулярными формами. У разных животных и в разных мышцах соотношение асимметричных и глобулярных форм АХЭ в нервно-мышечном синапсе существенно различается. Например, в диафрагме крысы обнаружено 3 молекулярные формы АХЭ — G_1 , G_4 и A_{12} , причем мономер G_1 обнаруживается исключительно внутриклеточно, тетрамер G_4 в основном внеклеточно, а большая часть формы A_{12} закреплена на базальной пластинке. За поддержание нормальной нервно-мышечной передачи ответственны формы G_4 и A_{12} , (у взрослых животных преобладает A_{12}), тогда как форма G_1 никакого отношения к этому не имеет вследствие ее внутриклеточной локализации (Fernandez et al., 1984; Busker et al., 1994).

В кожно-грудинной мышце лягушки глобулярные формы синаптической АХЭ G_1 и G_2 доминируют над формами A_8 и A_{12} (Anglister et al., 1994).

В синапсе лягушки большинство глобулярных форм АХЭ являются неамфифильными, образующими слабые электростатические взаимодействия, т. е. связь асимметричной АХЭ с базальной пластинкой более прочна, чем ассоциация глобулярной АХЭ с плазматической мембраной (Anglister et al., 1994). Это позволило авторам предположить возможность диффузии глобулярных форм, продуцируемых нервной и мышечной клетками, за пределы синаптического контакта, обеспечивая более широкое распределение этих форм АХЭ в клетке, тогда как асимметричная АХЭ остается прикрепленной на стратегической позиции в местах освобождения медиатора. Предполагается, что разное распределение молекулярных форм АХЭ может отражать их различную роль в регуляции концентрации АХ в синаптической щели.

К аналогичному выводу приводят электрофизиологические исследования на изолированной диафрагме крысы (где к функциональной АХЭ относятся молекулярные формы G_4

и A_{12}), в которых для оценки активности функционального пула АХЭ использовался анализ амплитудно-временных характеристик одноквантовых постсинаптических токов при разной степени ингибирования АХЭ (Кривой, 1998). Было показано, что нормальная синаптическая передача и функционирование нервно-мышечного аппарата в физиологическом диапазоне частот стимуляции нерва сохраняются при снижении активности АХЭ вплоть до 10% от исходного уровня. Это соответствует традиционным представлениям об «избыточности» синаптической АХЭ.

Вместе с тем анализ временных характеристик постсинаптических потенциалов и токов показал возможность повторного связывания медиаторного АХ с нХР, что является указанием на задержку в синаптической щели негидролизованного АХ даже при интактной АХЭ (Кривой и др., 1987; Магазаник, 1988).

Эти данные, противоречащие концепции «избыточности» синаптической АХЭ, вполне объяснимы, если представить, что разные молекулярные формы АХЭ в зависимости от условий играют разную функциональную роль. Можно предположить, что синаптическая АХЭ выполняет двоякую функцию (Кривой, 1998): одновременно обеспечивает не только «релейное» проведение частотной импульсации мотонейронов и надежность нервно-мышечной передачи, но и тонкую пре- и постсинаптическую регуляцию через изменение уровня АХ в синаптической щели. При этом для выполнения первой функции достаточно около 10% от общей активности фермента, тогда как в модуляции участвует основная часть синаптической АХЭ. Каким образом может быть организовано «распределение» этих функций АХЭ, пока сказать трудно, но разные функции осуществляются, скорее всего, различными молекулярными формами этого фермента.

Уровень синаптической АХЭ в мышцах не остается постоянным и меняется в процессе развития, подвержен нейротрофическому контролю, а также зависит от различных эндогенных факторов, причем все виды регуляции селективны для разных молекулярных форм (Massoulié, Bon, 1982; Massoulié, Toutant, 1988; Sketelj et al., 1991; Cresnar et al., 1994). Например, в развивающихся скелетных мышцах вначале преобладают формы G_1 и G_4 , и только на стадии формирования нервно-мышечных контактов появляется форма A_{12} (Massoulié, Bon, 1982). Селективная регуляция активности A_{12} формы АХЭ в развивающихся мышцах происходит при участии β -эндорфина и сходных пептидов (Haynes et al., 1984). Большое значение для поддержания высокого уровня АХЭ имеет электромеханическая активность мышц (Cresnar et al., 1994). При мышечной деятельности, а также в результате денервации (Gregory et al., 1989) избирательно повышается активность G_4 формы АХЭ (Fernandez, Donoso, 1988; Gisiger et al., 1991; Jasmin et al., 1991).

В контроле активности АХЭ на генном уровне путем изменения скорости ее синтеза участвует и сам нейромедиатор АХ (см. Голиков и др., 1985). Показана важная роль функциональных нХР и их взаимодействия с АХ в дифференциальном контроле индивидуальных молекулярных форм АХЭ. Оказывается, активация нХР спонтанно освобождающимся АХ является единственным нейрональным фактором поддержания форм G_1 и G_2 ; уровень формы A_{12} определяется комбинированным эффектом АХ и некой неизвестной пока нейрональной субстанции; индукция формы G_4 инициируется повышением частоты взаимодействия АХ с нХР (Fernandez, Hodges-Savola, 1992). Продукт гидролиза АХ — холин также влияет на активность АХЭ, а значит, может экстренно регулировать деятельность синаптической АХЭ непосредственно в ходе нервно-мышечной передачи в зависимости от ее интенсивности.

Исследованиями последних лет показано, что в скелетном мышечном волокне контроль экспрессии генов АХЭ, накопления транскриптов и белка осуществляется в каждом отдель-

ном ядре строго локально и независимо от других ядер, причем в каждом случае источником регуляторных сигналов является ближайший к данному ядру участок плазматической мембраны (Rossi et al., 2000). Как уже говорилось выше, аналогичный механизм локальной регуляции характерен для экспрессии субъединиц нХР скелетной мышцы (см. 1.2.).

2.3. Другие функции АХЭ

Давно высказывались предположения о каких-то дополнительных функциях АХЭ, не связанных с ее основной каталитической активностью. Эти предположения основывались, в частности, на очень раннем появлении АХЭ в онтогенезе — задолго до синаптогенеза и формирования холинергических путей. Кроме того, АХЭ имеет довольно высокую гомологию с последовательностями, характерными для внеклеточных доменов ряда молекул клеточной адгезии (нейротактина, нейролигина, глиотактина). Недавно предположения о некаталитической функции АХЭ получили подтверждение. Была продемонстрирована морфогенная и синаптогенная активность АХЭ, выражающаяся в усилении роста нейритов и развития синапсов у эмбрионов *Xenopus* после экспрессии в них гена, кодирующего синаптическую АХЭ человека (Sternfeld et al., 1998). Интересно, что за эти два эффекта ответственны разные участки молекулы АХЭ: нейрит-стимулирующий эффект зависел от С-концевого домена, но не от каталитической активности, тогда как для синаптогенного эффекта требовалось наличие как С-концевого домена, так и каталитической активности. Нейрит-стимулирующая активность предположительно может быть обусловлена способностью АХЭ модулировать адгезивные свойства клеток благодаря упомянутой выше гомологии с молекулами клеточной адгезии.

Не исключено, что и этим не ограничиваются функции АХЭ. Так, этот фермент в виде растворимых мономеров присутствует в яде аспидовых змей, где его роль совершенно непонятна, т. к. АХЭ не токсична и не усиливает токсичность других компонентов яда (Cousin et al., 1998).

3. Na, K-АТФаза и ее изозимы

3.1. Общие сведения

Na, K-зависимая АТФаза (ЕС 3.6.1.37), гидролизующая АТФ в присутствии ионов Na^+ и K^+ , является интегральным мембранным ферментом, функционирующим как Na, K-насос. За открытие Na, K-АТФазы (Skou, 1957) и последующие разработки в этой области д-р J. Skou в 1997 году был удостоен Нобелевской премии по химии. Эта ферментная система обнаружена в плазматической мембране практически всех животных клеток. Основная функция Na, K-АТФазы заключается в поддержании трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ за счет активного транспорта ионов. Эти градиенты поддерживают мембранный потенциал и электрическую возбудимость клеток, а также обеспечивают движущую силу ряда других транспортных механизмов. Благодаря своим функциям Na, K-АТФаза играет основную роль в регуляции водно-солевого обмена, является важным фактором, препятствующим развитию гипоксии и утомления. Таким образом, Na, K-АТФаза является важнейшим регулятором клеточных функций, который обеспечивает способность возбудимых клеток воспринимать, кодировать и передавать сигналы, что необходимо для нормального функционирования нервной системы и организма в целом. Снижение активности Na, K-АТФазы

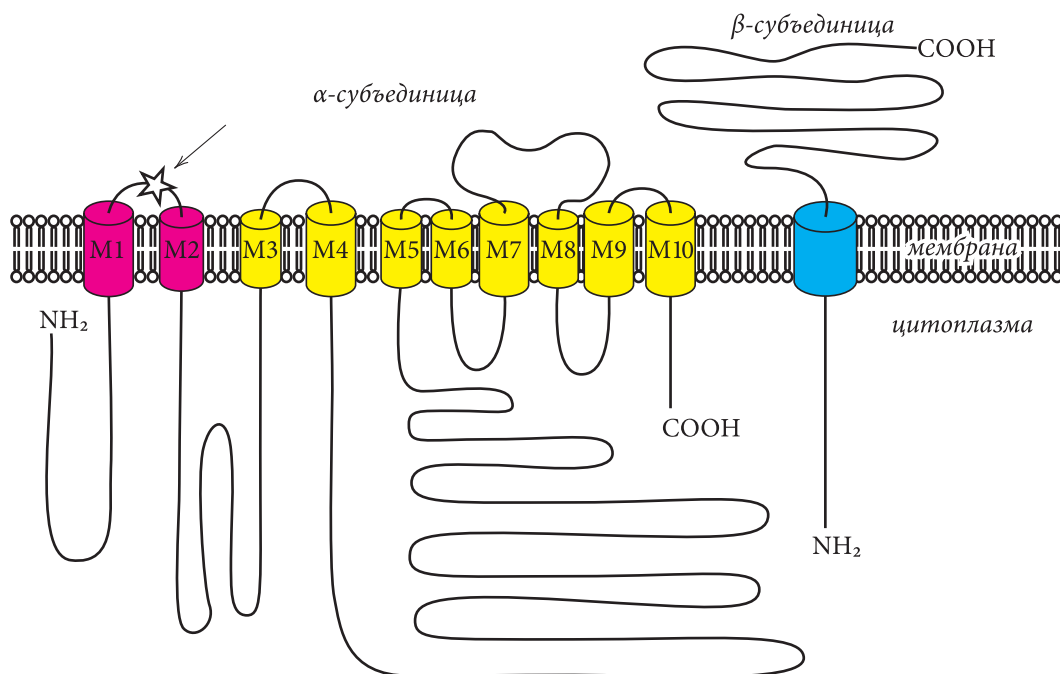


Рис. 8. Мембранная топология α - и β -субъединиц Na, K-АТФазы. Стрелкой отмечен наружный участок, являющийся специфическим рецептором для сердечных гликозидов.

является одним из наиболее общих признаков различных форм патологий, включая сердечно-сосудистые заболевания, диабет, возрастную невропатию и другие формы невропатии (см.: Болдырев, 1985; 1998; Sweadner, 1995; Blanco, Mercer, 1998; Clausen, 1998; Mobasheri et al., 2000; Lopina, 2001).

Na, K-АТФаза состоит из α - и β -субъединиц с молекулярной массой около 110 и 40-60 кДа, соответственно (рис. 8). Нативный фермент является димером, объединяющим два протомерных комплекса $\alpha\beta$. Недавно в некоторых тканях обнаружена γ -субъединица (6,5-10 кДа) Na, K-АТФазы.

Субъединица α — интегральный белок, многократно пронизывающий мембрану (10 трансмембранных доменов) (рис. 8). Эта субъединица содержит места связывания с АТФ и ионами Na^+ и K^+ и отвечает за каталитические и транспортные свойства Na, K-АТФазы. Один из наружных участков α -субъединицы (между трансмембранными доменами M1-M2) является специфическим рецептором для сердечных гликозидов. Субъединица β , представляющая собой гликопротеин, однократно пересекающий мембрану (рис. 8), играет роль шаперона и необходима для созревания, локализации и стабилизации белкового комплекса в плазматической мембране. Возможно также, что субъединица β участвует в модуляции аффинности энзима к Na^+ и K^+ . Функции γ -субъединицы (имеющей один трансмембранный домен) до конца не известны, предположительно она играет модулирующую роль.

3.2. Изоформы субъединиц Na, K-АТФазы

Для млекопитающих в настоящее время известны четыре изоформы α -субъединицы ($\alpha 1$ - $\alpha 4$), три изоформы β -субъединицы ($\beta 1$ - $\beta 3$) Na, K-АТФазы и одна изоформа γ -субъединицы, каждая из которых кодируется собственным геном.

Изоформы α -субъединицы различаются по чувствительности к ионам Na^+ и K^+ , АТФ, гормонам и физиологическим стимулам, а также к специфическому блокатору Na, K-АТФазы убаину и другим сердечным гликозидам. Наибольшее различие в аффинности α изоформ к убаину наблюдается у грызунов: константа блокирования изоформы $\alpha 1$ составляет ~ 10 - 100 мкМ, тогда как для изоформ $\alpha 2$ - $\alpha 4$ эта константа на 2-4 порядка ниже (см. обзор: Dobretsov, Stimers, 2005). Комбинации различных изоформ α - и β -субъединиц обеспечивают дополнительное разнообразие свойств Na, K-АТФазы. Экспрессия разных изоформ регулируется по-разному в зависимости от ткани, типа клетки, стадии развития организма, а также под действием определенных гормонов и, возможно, в зависимости от уровня клеточной активности.

Изоформа $\alpha 1$ обнаружена практически во всех животных клетках. Клетки некоторых тканей экспрессируют только эту изоформу (эритроциты, почки). В большинстве тканей клетки, помимо $\alpha 1$, экспрессируют также одну из изоформ $\alpha 2$ - $\alpha 4$. Изоформа $\alpha 2$ обнаружена в скелетных, гладких и сердечной мышцах, в глиальных клетках и в некоторых нейронах; изоформа $\alpha 3$ преобладает в нервной ткани. Изоформа $\alpha 4$ пока обнаружена только в семенниках и сперме (обзоры: Sweadner, 1995; Blanco, Mercer, 1998; Mobasheri et al., 2000; Lopina, 2001; Dobretsov, Stimers, 2005; Mijatovic et al., 2007).

Принципиально важно, что основную насосную функцию в клетке выполняет изоформа $\alpha 1$, тогда как изоформы $\alpha 2$ - $\alpha 4$ являются вспомогательными (регуляторными). Так, в сердечной мышце изоформа $\alpha 2$ рассматривается как ключевой регулятор кальциевого баланса через систему Na^+ , Ca^{2+} обмена (Mathias et al., 2000). В скелетной мышце изоформа $\alpha 2$ может участвовать в регуляции мышечного электрогенеза (Kivoi et al., 2003; 2006). В мозгу активация изоформы $\alpha 2$ глиальных клеток позволяет, по-видимому, эффективно устранять избыточный внеклеточный K^+ (см: Blanco, Mercer, 1998). Изоформа $\alpha 3$, вероятно, препятствует излишнему накоплению Na^+ в тонких нервных окончаниях при частых разрядах нейронов и, предположительно, участвует в поддержании синаптического проведения в сердечной и скелетной мышце. Физиологическая особенность изоформы $\alpha 4$, необходимой для обеспечения подвижности сперматозоидов, заключается в регуляции уровня H^+ за счет сопряженной работы с системой Na^+ , H^+ -обмена (Woo et al., 2000).

Изоформа $\alpha 1$ Na, K-АТФазы равномерно распределена в плазматической мембране. Характерной особенностью регуляторных изоформ $\alpha 2$ - $\alpha 4$ является их локализация в особо организованных микродоменах, образованных плазматической мембраной и сарко(эндо)плазматическим ретикуломом. В этих компартаментах осуществляется сопряженное функционирование регуляторных изоформ Na, K-АТФазы с транспортными механизмами, зависящими от градиента Na^+ (Ca^{2+} - и H^+ -обменники), с такими клеточными компонентами как митохондрии, а также с ионными каналами и рецепторами (Arnon et al., 2000; Woo et al., 2000; Aizman et al., 2001; Xie, Askari, 2002). Подробнее этот вопрос будет рассмотрен в части 3.4. По-видимому, локализация разных изоформ в специфических компартаментах клетки обеспечивает автономность их регуляции различными факторами. Как показано в кардиомиоцитах морской свинки, изоформа $\alpha 1$ селективно регулируется катехоламинами через β -адренорецепторы и АХ через мускариновые холинорецепторы при участии аденилатци-

клазы и цАМФ-зависимой протеинкиназы А. Изоформа $\alpha 2$ также регулируется катехоламинами, но через $\alpha 1$ -адренорецепторы, сопряженные с фосфолипазой С и фосфоинозитидным путем регуляции при участии протеинкиназы С (Mathias et al., 2000).

Что касается изоформ β -субъединицы Na, К-АТФазы, то об их функциональной специализации известно еще меньше, чем об α -субъединицах. Изоформа $\beta 1$, подобно $\alpha 1$, экспрессируется во всех исследованных тканях; $\beta 2$ широко представлена в почках, скелетных и гладких мышцах, сердце, нервной системе; $\beta 3$ преимущественно экспрессируется в семенниках, но обнаружена также в мозге, почках и других внутренних органах (см. обзоры: Mobasheri et al., 2000; Lopina, 2001).

В отличие от изоформ α -субъединицы, имеющих степень гомологии более 90%, в том числе у очень разных видов, изоформы β -субъединицы гомологичны лишь примерно на 40% даже в пределах одного вида (см. Gloor, 1997; Blanco, Mercer, 1998). В некоторых клетках экспрессируются три изоформы α -субъединицы ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$) и как минимум две изоформы β -субъединицы ($\beta 1$, $\beta 2$), что позволяет предположить сосуществование димеров любых возможных комбинаций (точный состав нативных форм Na, К-АТФазы, как правило, неизвестен). Однако в опытах с экспрессией в гетерологических клетках показано, что не все комбинации изоформ α - и β -субъединиц равновероятны, и существуют различия в средстве разных изоформ α к разным изоформам β . Так, преимущественно образуются наиболее стабильные димеры $\alpha 1\beta 1$ и $\alpha 2\beta 2$ (а также, вероятно, $\alpha 2\beta 1$), но не $\alpha 1\beta 2$. Другие сочетания могут образовываться, только если отсутствует «нужная» изоформа. По-видимому, *in vivo* случайное формирование «нежелательных» комплексов не происходит благодаря пространственному и временному разделению синтеза различных изозимов Na, К-АТФазы, и этот процесс, скорее всего, регулируется на уровне экспрессии генов (Schmalzing et al., 1997).

Димеры Na, К-АТФазы, содержащие разные изоформы β -субъединицы, очень мало различаются по каталитической активности (см. Gloor, 1997). Следовательно, разные изоформы β -субъединицы, имеющие, как сказано выше, существенные различия в структуре, определяют какие-то другие свойства фермента. Учитывая, что эта субъединица играет роль «шаперона», можно предположить, что разные ее изоформы обеспечивают доставку и встраивание соответствующих изозимов Na, К-АТФазы в определенные субклеточные компартменты (Schmalzing et al., 1997).

В этом контексте важно отметить такой интересный факт, что $\beta 2$ изоформа Na, К-АТФазы мозга мыши оказалась идентичной глиальной молекуле адгезии (AMOG, adhesion molecule on glia), которая опосредует связь между астроцитами и нейронами ЦНС (Schmalzing et al., 1992). В опытах *in vitro* эта молекула способна ассоциироваться с α -субъединицей Na, К-АТФазы с образованием функционального фермента. Более того, AMOG обладает нейрит-стимулирующей активностью, и, как оказалось, такими же свойствами обладает $\beta 2$ - (но не $\beta 1$ -) субъединица Na, К-АТФазы (см. Muller-Husmann et al., 1993; Gloor, 1997). Все эти факты дают основание полагать, что $\beta 2$ -субъединица может участвовать и в каких-то других межклеточных взаимодействиях, например, определяющих локализацию изозимов Na, К-АТФазы, содержащих регуляторные изоформы α -субъединицы (а именно с таковыми преимущественно ассоциируется $\beta 2$), в определенных микродоменах.

Наконец, следует упомянуть γ -субъединицу, хотя об ее изоформах мало что известно, и ее роль остается загадочной. В отличие от β -субъединицы, она не является компонентом, необходимым для структурно-функционального созревания Na, К-АТФазы и ее встраивания в мембрану. Напротив, она стабильно встраивается в мембрану только будучи ассоциированной со зрелым комплексом $\alpha\beta$. Субъединица γ имеет высокую степень

гомологии с недавно обнаруженным семейством мембранных белков-каналоформеров, характеризующихся одним трансмембранным доменом (фосфолеманн, CNIF и др.), которые рассматривают в качестве регуляторов ионного транспорта. Возможно, в определенных условиях γ - субъединица может работать как ионный канал независимо от α и β субъединиц Na, K-АТФазы (см. обзоры: Mobasheri et al., 2000; Lopina, 2001).

3.3. Изоформы α -субъединицы Na, K-АТФазы в скелетной мышце

Скелетный нервно-мышечный аппарат чрезвычайно интересен с точки зрения анализа функциональной специализации изозимов Na, K-АТФазы, т.к. здесь экспрессируются три из известных четырех изоформ α -субъединицы Na, K-АТФазы. В скелетных мышечных волокнах и в синаптической шванновской клетке экспрессируются изоформы $\alpha 1$ и $\alpha 2$, в моторных нейронах — изоформы $\alpha 1$ и $\alpha 3$ (Blanco, Mercer, 1998; Mobasheri et al., 2000). Важно отметить, что изоформа $\alpha 3$ локализована в пресинаптической части нервных волокон, обращенной к постсинаптической зоне (Zahler et al., 1996). Установлено также, что изоформа $\alpha 3$ специфически экспрессируется в афферентных и эфферентных аксонах, иннервирующих интрафузальные волокна рецепторов растяжения скелетной мышцы (Dobretsov et al., 2003).

О физиологической роли и функциональной специализации изоформ α -субъединицы Na, K-АТФазы в нервно-мышечном аппарате известно мало. В частности, неясна физиологическая роль изоформ $\alpha 1$ и $\alpha 2$ в поддержании возбудимости и сократительных свойств скелетных мышечных волокон (т.е. свойств, зависящих от трансмембранных градиентов Na^+ и K^+ и мембранного потенциала, обеспечиваемых Na, K-АТФазой). Неясен и удельный вес активности этих изоформ в общем электрогенном вкладе Na, K-насоса, который дополнительно повышает величину мембранного потенциала покоя скелетных мышечных волокон на 10 и более мВ (Hicks, McComas, 1989; Nikolsky et al., 1994; Krivoi et al., 2003). Вместе с тем, активация Na, K-АТФазы принципиально важна для поддержания сократительной функции и работоспособности нервно-мышечного аппарата в условиях действия альтерирующих факторов, например, при утомляющей активности. Так, активация Na, K-АТФазы катехоламинами, инсулином и некоторыми другими гормонами является решающим фактором восстановления работоспособности мышц, парализованных избытком K^+ (см. обзоры: Sejersted, Sjogaard, 2000; Clausen, 2003).

Фракция $\alpha 2$ изоформы Na, K-АТФазы в скелетных мышечных волокнах разного типа и в зависимости от условий варьирует от 35 до 65 % (Haber, Loeb, 1988; Lavoie et al., 1997; Thompson et al., 1999), а по некоторым данным достигает более 80 % (He et al., 2001). Предполагается, что изоформа $\alpha 1$ равномерно распределена в поверхностной плазматической мембране, тогда как изоформа $\alpha 2$ присутствует и в поверхностной мембране, но преимущественно в Т-системе скелетных мышечных волокон вблизи триад (Cougnon et al., 2002).

До недавнего времени роль $\alpha 1$ и $\alpha 2$ изоформ в поддержании электрогенеза и сократительных свойств скелетных мышечных волокон в основном исследовались лишь в опытах на мышцах эмбрионов (Radzyukevich et al., 2004) и мутантных животных (He et al., 2001). Оказалось, что скелетные мышцы мутантных мышшей с подавленной экспрессией $\alpha 2$ изоформы (He et al., 2001), а также эмбриональные скелетные мышцы мышшей вообще без данной изоформы (Radzyukevich et al., 2004) демонстрировали нормальные сократительные характеристики и работоспособность.

Лишь недавно в опытах на зрелых скелетных мышцах нормальных (не мутантных) крыс было показано, что основную роль в поддержании электрогенеза диафрагмальной мышцы играет α_1 изоформа (электрогенный вклад около 15 мВ); вклад в мембранный потенциал покоя α_2 изоформы относительно невелик (~4-5 мВ) (рис. 9). Эти данные соответствуют другим сведениям, согласно которым в покое изоформа α_2 малоактивна в миогенных клетках C2C12 (Higham et al., 1993), а также в астроцитах, где ее вклад становится заметным только при активации глутаматом (Pellerin, Magistretti, 1997). Было установлено также, что даже полное подавление α_2 изоформы убаином хотя и вызывает ряд нарушений в процессе генерации мышечных потенциалов действия, не приводит к нарушениям сократительной функции мышц при одиночной, тетанической и утомляющей стимуляции (Кривой и др., 2006 а).

Многое остается неясным в отношении механизмов регуляции изоформ Na, K-АТФазы в скелетной мышце. Показано, что тиреоидные гормоны, инсулин, глюкокортикоиды, гипокалемия обладают селективным регулирующим влиянием на индукцию или активность именно изоформы α_2 (см. обзоры: Драбкина, Кривой, 2004; McDonough et al., 2002).

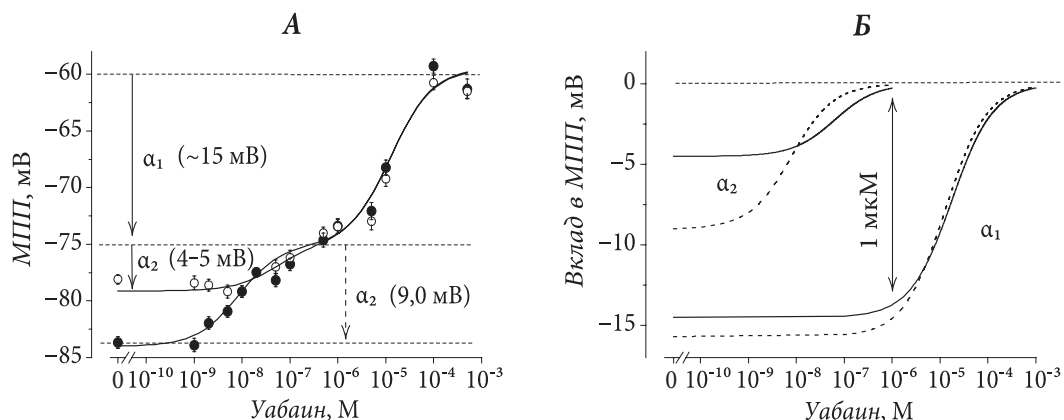


Рис. 9. **А** — зависимость мембранного потенциала покоя (МПП) мышечных волокон диафрагмы крысы от концентрации убаина. Светлые кружки — через 1 час действия убаина; темные кружки — через 15 мин после добавления АХ (100 нМ). Вертикальными стрелками показаны рассчитанные величины вкладов в МПП α_1 и α_2 изоформ Na, K-АТФазы.

Б — зависимости от концентрации убаина вкладов в МПП α_1 и α_2 изоформ, рассчитанные на основе моделирования. Сплошные линии — перед добавлением АХ; пунктирные линии — в присутствии АХ (100 нМ). Данные авторов.

Холиномиметики также селективно влияют на α_2 изоформу Na, K-АТФазы в скелетной мышце. Хорошо известно, что АХ в наномолярной концентрации вызывает не деполяризацию, а гиперполяризацию скелетных мышечных волокон за счет активации Na, K-АТФазы (Vyskocil et al., 1983; Nikolsky et al., 1994). Было показано, что гиперполяризующий эффект 100 нМ АХ и никотина в диафрагме крысы реализуется за счет увеличения электрогенного вклада именно α_2 изоформы Na, K-АТФазы без изменения вклада изоформы α_1 (рис. 9), а в основе эффекта лежит функциональное взаимодействие между нХР и Na, K-АТФазой (Кравцова и др., 2008; Кривой и др., 2006 а; Krivoi et al., 2006). При хроническом действии

негидролизуемый аналог АХ карбахолин избирательно стимулирует индукцию изоформы $\alpha 2$ в культуре скелетных мышечных клеток C2C12 (Kragenbrink et al., 1996), вызывая их гиперполяризацию. Интересно отметить, что в мозге крысы другой хронически действующий агонист нХР — никотин, также селективно влияет на экспрессию изоформы $\alpha 2$, но противоположным образом (Wang et al., 1994).

В целом, имеющиеся данные легли в основу представлений о модуляции электрогенеза скелетной мышцы холинергическими лигандами, действующими в наномолярной концентрации, за счет селективной активации $\alpha 2$ изоформы Na, К-АТФазы (Кривой и др., 2006 а, б; Кравцова и др., 2008; Krivoi et al., 2006).

Многочисленные данные показывают, что в условиях разных форм нарушения двигательной активности скелетных мышц наблюдается снижение экспрессии Na, К-АТФазы (Clausen, 2003; 2008), однако неясно, что происходит в этих условиях с функционированием ее индивидуальных изоформ. По последним данным мышечная сократительная активность является важным фактором регуляции количества $\alpha 2$ изоформы Na, К-АТФазы в саркомере (Kristensen et al., 2008). Установлено также, что снижение потенциала покоя и возбудимости камбаловидной мышцы крысы в условиях моделирования гравитационной разгрузки обусловлено снижением электрогенного вклада Na, К-АТФазы, причем преимущественно ее $\alpha 2$ изоформы (Кривой и др., 2008).

Недавние исследования показали, что специфические ингибиторы Na, К-АТФазы убаин (синтетический препарат) и маринобуфагенин (изолирован из паротидных желез жабы *Bufo marinus*) за счет действия на $\alpha 2$ изоформу Na, К-АТФазы увеличивают силу сокращений диафрагмы крысы (положительный инотропный эффект) на ~15% с ЭК50 = 1.2 нМ и 0,3 нМ соответственно (рис. 10) (Кривой и др., 2006 а, в). Эти концентрации соответствуют уровню циркулирующих эндогенных дигиталисоподобных ингибиторов Na, К-АТФазы, среди которых обнаружены убаин- и маринобуфагенин-подобные вещества (см. подробнее 3.5).

Таким образом, даже полная блокада $\alpha 2$ изоформы Na, К-АТФазы, а также снижение экспрессии, либо полное отсутствие этой изоформы, не приводят к критическим нарушениям возбудимости и сократительной функции скелетных мышц, в том числе при утомляющих нагрузках. Из этого следует, что основную роль в поддержании электрогенеза и работоспособности скелетной мышцы играет $\alpha 1$ изоформа, тогда как роль изоформы $\alpha 2$ заключается в какой-то более тонкой регуляции. Полученные данные позволяют предположить, что это может быть регуляция электрогенеза и сократительной функции мышцы эндогенными и экзогенными холинергическими лигандами и дигиталисоподобными ингибиторами, циркулирующими в наномолярном диапазоне.

В регуляции эффективности нервно-мышечной передачи, по-видимому, участвует и пресинаптическая изоформа $\alpha 3$, однако о возможном механизме этой регуляции известно очень мало. Показано лишь, что убаин-чувствительная изоформа α -субъединицы Na, К-АТФазы может играть роль в частотно-зависимой модуляции квантового освобождения медиатора из нервных окончаний (Maeno et al., 1995).

3.4. Na, К-АТФаза и сердечные гликозиды

Регулирующее действие на активность Na, К-АТФазы оказывают сердечные гликозиды, широко применяемые в настоящее время в клинике сердечно-сосудистых заболеваний.

Официальная история применения сердечных гликозидов в лечении хронической сердечной недостаточности начинается с 1785 г., когда была опубликована работа английского

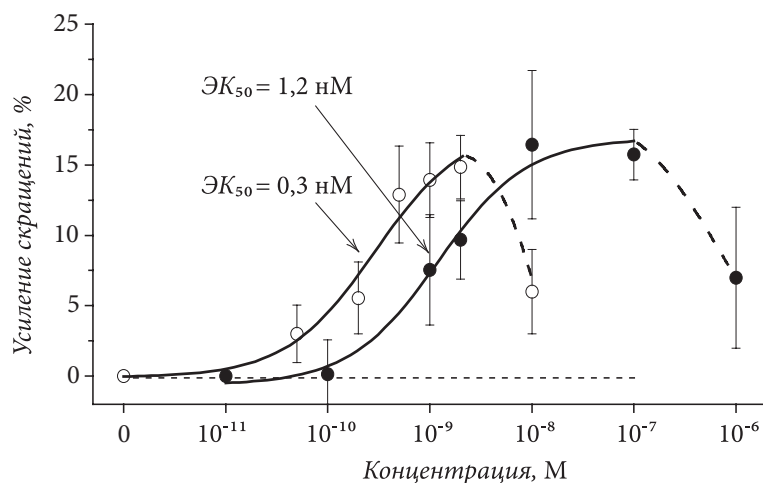


Рис. 10. Зависимость увеличения силы одиночных сокращений диафрагмы крысы (в % к контролю) от концентрации убаина (темные кружки) или маринобуфагенина из паротидных желез *Bufo marinus* (светлые кружки) через 1 час действия этих веществ. Прямая стимуляция мышц. Сплошные линии рассчитаны по уравнению Хилла. Данные авторов.

ботаника, практикующего врача В. Уайтеринга, где рекомендовалось назначать экстракт наперстянки при лечении отеков, и было охарактеризовано действие листьев этого растения на сердечную мышцу. Однако в народной медицине экстракты некоторых растений применяли для лечения различных заболеваний, связанных с нарушениями водно-солевого баланса и сердечно-сосудистой системы, уже начиная с 15 века до нашей эры. Например, препараты из экстракта морского лука (*Scilla maritima*) использовались в качестве лекарственных средств древними египтянами, греками и римлянами. Экстракты морского лука упоминаются в древних книгах и рекомендуются в собраниях сочинений Гиппократ (около 400 лет до нашей эры) в качестве лекарственного средства против диуреза.

В настоящее время в качестве действующего начала в экстракте наперстянки (*Digitalis*) и ряда других растений идентифицированы так называемые сердечные гликозиды (убаин, строфантин, дигоксин, дигитоксин и др.). Интересно отметить, что в Восточной народной медицине в тех же целях издавна применяли экстракты из кожи некоторых жаб рода *Bufo* (Blaustein, 1993; Mijatovic et al., 2007).

Несмотря на то, что уже известно более 400 сердечных гликозидов, все они имеют сходное химическое строение. Это сложные органические соединения, молекула которых состоит из несхаристой части (агликон или генин) и сахаров (гликон). Основой агликона является стероидная структура, связанная у большинства гликозидов с ненасыщенным лактонным кольцом. Носителем характерного кардиотонического действия сердечных гликозидов служит стероидный скелет агликона, причем лактонное кольцо исполняет роль протетической группы (небелковая часть сложных белковых молекул).

Гликон может быть представлен разными сахарами: D-дигитоксозой, D-глюкозой, D-цимарозой, L-рамнозой и др. Число сахаров в молекуле может варьироваться от одного до четырех. Растворимость сердечных гликозидов, их проницаемость через клеточную мем-

брану, сродство к белкам плазмы и тканей, а также степень активности и токсичности зависит от сахаристого остатка (гликона).

В зависимости от строения ненасыщенного лактонного кольца все сердечные гликозиды делятся на две группы: карденолиды, в состав которых входит пятичленное кольцо (убаин, гликозиды наперстянки, строфанта и др.), и буфадиинолиды с шестичленным лактонным

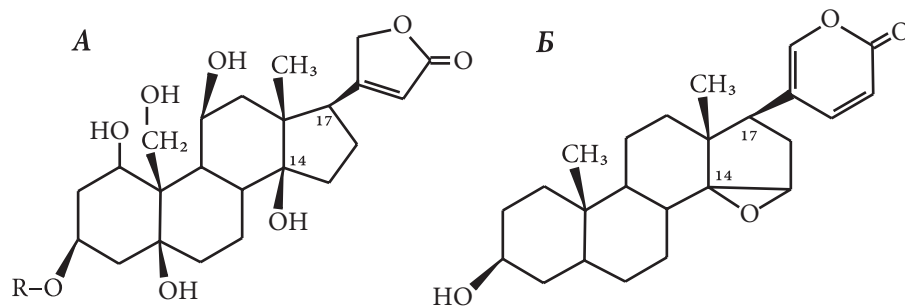


Рис. 11. Структурные формулы убаина, где R- рамноза (А) и маринобуфагенина (Б).

кольцом (например, маринобуфагенин из паротидных желез жабы *Bufo marinus*) (рис. 11).

Сердечные гликозиды высоко токсичны в высоких концентрациях, но в низких дозах оказывают положительное инотропное действие и широко применяются в клинике сердечных заболеваний. Физиологическое действие сердечных гликозидов обусловлено их способностью связываться с Na, K-АТФазой и ингибировать ее в большинстве тканей с очень высокой аффинностью. Как уже сказано выше (см. рис. 8), местом связывания (рецептором) сердечных гликозидов является наружный участок аминокислотной цепи α -субъединицы фермента.

Длительное время считалось, что механизм положительного инотропного действия сердечных гликозидов, проявляющегося в усилении сокращений сердца, заключается в частичном ингибировании Na, K-АТФазы, что приводит к повышению концентрации Na^+ в цитозоле клетки. Это ведет к подавлению экскреции Ca^{2+} из клетки через ферментную систему $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ -обмена, в результате чего повышается внутриклеточное содержание Ca^{2+} . Это, в свою очередь, вызывает увеличение концентрации Ca^{2+} в саркоплазматическом ретикулуме, что приводит к повышенному выбросу Ca^{2+} в ответ на приходящий потенциал действия и, как следствие, к усилению сокращений сердца (см. обзор: Clausen, 1998).

В соответствии с последними данными, Na, K-АТФаза вовлечена в гораздо более сложную систему регуляции внутриклеточного Ca^{2+} -сигнала и других клеточных процессов в кардиомиоцитах. Показано, что сердечные гликозиды вызывают медленные колебания уровня Ca^{2+} , но не во всем цитозоле, а только в участках кластеризации Na, K-АТФазы с $\text{Na}^+, \text{Ca}^{2+}$ - (Na^+, H^+ -) обменниками, различными Ca^{2+} -каналами и рецепторами в местах тесного прилегания плазматической мембраны к сарко(эндо)плазматическому ретикулуму и митохондриям. Это так называемая модель «Plasmerosome» (Blaustein, Golovina, 2001; Scheiner-Bobis, Schoner, 2001; Schoner, Scheiner-Bobis, 2007). В соответствии с этой моделью при частичном ингибировании Na, K-АТФазы (прежде всего, регуляторных изоформ $\alpha 2/\alpha 3$) в этих узких примембранных пространствах с ограниченной диффузией происходит накопление Na^+ и, как следствие, — накопление Ca^{2+} в результате уменьшения экстрезии

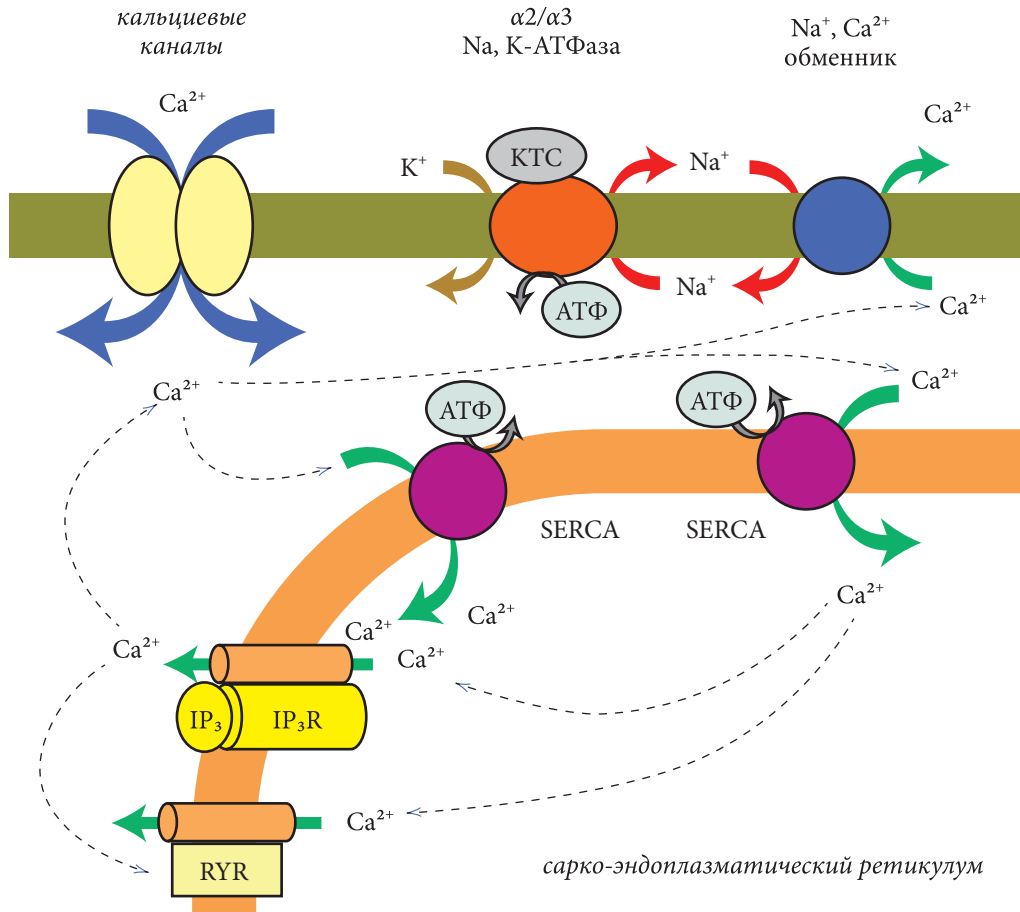


Рис. 12. Гипотетическая схема участия Na, K-АТФазы и сердечных гликозидов (кардиотонических стероидов, КТС) в регуляции локальной концентрации Ca^{2+} в кардиомиоците. SERCA — Ca^{2+} -АТФаза сарко(эндо)плазматического ретикулума; IP₃R — рецептор инозитолтрифосфата; RYR — рианодиновый рецептор. Подробности в тексте.

последнего Na⁺, Ca²⁺-обменником. Значительное увеличение локальной концентрации Ca^{2+} достигается также за счет его входа через потенциалозависимые и депо-зависимые Ca^{2+} -каналы плазматической мембраны. В сложной системе регуляции локальной концентрации Ca^{2+} , влияющей на силу сокращений сердечной и гладких мышц, участвуют также Ca^{2+} -АТФаза сарко(эндо)плазматического ретикулума, IP₃- и рианодиновый рецепторы (рис. 12).

В пользу того, что положительный инотропный эффект осуществляется именно за счет $\alpha 2$ изоформы Na, K-АТФазы, свидетельствуют исследования на генетически модифицированных мышцах. У мышей, экспрессирующих $\alpha 2$ изоформу, резистентную к сердечным гликозидам, убаин не вызывал положительный инотропный эффект в сердечной и гладкой мышцах (Dostanic et al., 2003; 2005). Отметим, что положительный инотропный эффект

сердечных гликозидов был также показан и в скелетных мышцах (Yamamoto et al., 1981; He et al., 2001). Механизм, через который осуществляется данный эффект, остается не известным, однако, по некоторым данным, он также реализуется с вовлечением $\alpha 2$ изоформы Na, K-АТФазы (Кривой и др., 2006 а,в).

Важно, что медленные Ca^{2+} осцилляции влияют не только на силу мышечных сокращений, но и через такие факторы, как AP-1 и NF- κ B, также на геном и экспрессию белков. Именно подобными Ca^{2+} осцилляциями объясняют влияние сердечных гликозидов на пролиферацию и дифференцировку клеток, а также на экспрессию изозимов Na, K-АТФазы.

Необходимо отметить, что сердечные гликозиды в низких концентрациях могут активировать работу Na, K-АТФазы. В многочисленных исследованиях было установлено активирующее действие гликозидов в наномолярных концентрациях (Gao et al., 2002; Balzan et al., 2007). Однако механизм, через который осуществляется активация Na, K-АТФазы, пока остается не известным.

В последнее время получены многочисленные данные о дополнительной (не насосной) функции Na, K-АТФазы как сигнальной молекулы. Эта функция реализуется за счет функционального и прямого молекулярного взаимодействия с разнообразными соседними белками. Предполагается, что за счет этой сигнальной функции сердечные гликозиды и их эндогенные аналоги регулируют самые разнообразные клеточные функции (синтез белка, пролиферацию, дифференцировку и гибель клеток, сократительные свойства и др.), оказывают противораковое действие (Крылов и др., 1999; Xie, Askari, 2002; Aperia, 2007; Kotova et al., 2006; Kulikov et al., 2007; Mijatovic et al., 2007; Schoner, Scheiner-Bobis, 2007).

В соответствии с одной из гипотез (Xie, Askari, 2002), предполагается существование двух популяций Na, K-АТФазы: одна функционирует как ионный насос, другая за счет сопряжения с соседними мембранными белками участвует в мембранной и внутриклеточной сигнальной трансдукции. Как показано для кардиомиоцитов, этот сигнальный каскад начинается с взаимодействия убаина с Na, K-АТФазой, далее включает в себя фосфорилирование рецептора эпидермального фактора роста через Src-киназу, активацию Ras и MAP-киназы, а также усиление продукции свободных радикалов кислорода в митохондриях. Результатом является активация фосфолипазы C, транскрипционных факторов AP-1 и NF- κ B, регуляция экспрессии генов и синтеза белков. Наиболее вероятными физиологическими стимулами запуска такого каскада являются эндогенные дигиталисоподобные ингибиторы Na, K-АТФазы (см. подробнее 3.5) и изменения внеклеточной концентрации K^+ .

Согласно разрабатываемой в последнее время т.н. модели «Signalosome» (Schoner, Scheiner-Bobis, 2007), все изоформы каталитической α -субъединицы могут являться компонентами сигнального комплекса, состоящего из Na, K-АТФазы, рецептора эпидермального фактора роста и Src-киназы. В состав этих комплексов также входят нейрональная NO-синтаза, Na^+ , Ca^{2+} -обменник, Ca/Mg-АТФаза и Ca^{2+} каналы L-типа (Daniel et al., 2006). В пользу этой гипотезы говорят обнаруженные на α -субъединице Na, K-АТФазы сайты связывания для кавеолина, анкирина, фосфоинозитид-3-киназы (Yudowski et al., 2000; Xie, Cai, 2003).

Предполагается, что связывание с молекулой Na, K-АТФазы ее специфического лиганда (молекулы сердечного гликозида) приводит к изменению конформации фермента, которое передается белкам окружения и запускает сигнальный комплекс. Этот комплекс способен запускать далее целый ряд сигнальных каскадов, участвовать в регуляции экспрессии генов и синтеза белков через активацию транскрипционного фактора NF- κ B, а также участвовать в рециклировании плазматической мембраны. За счет такой организации передачи сигнала

даже сверхнизкие концентрации сердечных гликозидов, не вызывая общего изменения активности Na, K-АТФазы, способны вызывать самые разнообразные физиологические реакции. И в этом случае предполагается, что физиологическими стимулами запуска такого сигнального комплекса являются сердечные гликозиды экзогенной или эндогенной природы (Schoner, Scheiner-Bobis, 2007).

В соответствии с гипотезой «Signalosome», сердечные гликозиды приводят к изменению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} за счет конформационных изменений Na, K-АТФазы. Так, установлено, что наномолярные концентрации убаина вызывают выброс Ca^{2+} из депо в результате конформационных изменений N-конца α -субъединицы Na, K-АТФазы, непосредственно взаимодействующего с IP_3 рецептором саркоплазматического ретикулума (Miyakawa-Naito et al., 2003; Zhang et al., 2006). В состав комплекса Na, K-АТФазы и IP_3 рецептора может входить и фосфолипаза C. Активированная Src-киназой фосфолипаза C может расщеплять мембранный фосфолипид фосфатидилинозитол-4,5-дифосфат на два соединения, служащие внутриклеточными мессенджерами: IP_3 и диацилглицерин. Гидрофильный IP_3 диффундирует в цитоплазму и вызывает освобождение Ca^{2+} из внутриклеточных депо (саркоплазматический ретикулум, митохондрии), что приводит к усилению сокращений в ответ на приходящий потенциал действия (Yuan et al., 2005). Оставшийся в мембране диацилглицерин активирует протеинкиназу C, которая также участвует в регуляции внутриклеточной концентрации Ca^{2+} за счет регуляции активности Ca^{2+} -каналов L-типа и системы Na^+ , Ca^{2+} -обмена. Повышенный выброс Ca^{2+} из депо может быть и результатом запуска MAP-киназного каскада при активации убаином комплекса в составе Na, K-АТФазы, Src киназы и рецептора эпидермального фактора роста. Активированная в результате ERK1/2 киназа может фосфорилировать Ca^{2+} -каналы и Na^+ , Ca^{2+} -обменник, увеличивая, таким образом, положительную инотропию сердца (Mohammadi et al., 2003).

Предполагается, что сигнальную функцию Na, K-АТФаза осуществляет в так называемых кавеолах (Schoner, Scheiner-Bobis, 2007), представляющих собой инвагинации плазматической мембраны, характеризующиеся специфической липидной композицией (Крутецкая и др., 2003; Parton, Simons, 2007). В скелетной и сердечной мышце маркером кавеол является белок кавеолин-3. По-видимому, в кавеолах сосредоточена не вся Na, K-АТФаза. Так, например, в сердечной мышце лишь около 20-30% $\alpha 1$ и $\alpha 2$ изоформ Na, K-АТФазы располагаются в кавеолах, где они ко-локализуются с кавеолином-3 (см. Kristensen et al., 2008).

Известно, что снижение активности Na, K-АТФазы сопровождается разного рода патологические состояния мозга и рассматривается как один из механизмов некротической и апоптотической нейродегенерации. Однако умеренное ингибирование Na, K-АТФазы специфическим блокатором убаином оказывает нейропротекторное действие в некоторых моделях нейродегенерации (Isaev et al., 2000). Наконец, есть данные о нейропротекторной роли сверхнизких концентраций (0.01 нМ) убаина, не вызывающих снижения активности Na, K-АТФазы. Предположительно, это действие реализуется именно за счет сигнальной функции Na, K-АТФазы при участии эндогенного антиапоптотического пептида Bcl2 (Golden, Martin, 2006). И здесь снова обсуждается возможная роль эндогенных дигиталисоподобных ингибиторов Na, K-АТФазы как физиологического модулятора этого сигнального пути.

3.5. Эндогенные аналоги сердечных гликозидов (эндогенные дигиталисоподобные ингибиторы Na, K-АТФазы)

То, что α -субъединица Na, K-АТФазы служит специфическим рецептором для сердечных гликозидов растительного происхождения, привело (по аналогии с открытием эндорфинов и энкефалинов) к появлению гипотезы о существовании эндогенных лигандов к этому рецептору, являющихся физиологическими модуляторами активности Na, K-АТФазы. Накоплен значительный клинический и экспериментальный материал, подтверждающий существование в различных тканях и биологических жидкостях человека и других млекопитающих эндогенных дигиталисоподобных факторов (ЭДПФ), что открывает новые перспективы в лечении сердечной недостаточности, а также артериальной гипертензии.

В настоящее время из разных тканей животных и человека выделены такие кардиотонические стероиды как убаин, дигоксин, маринобуфагенин, телочинобуфагенин, вырабатываемые надпочечниками и ЦНС (Hamlyn et al., 1991; Blaustein, 1993; Tamura et al., 1998; Doris, Bagrov, 1998; Lichtstein, Rosen, 2001; Schoner, 2002; Schoner, Scheiner-Bobis, 2007).

Эндогенный убаин. Стереоизомер убаина растительной природы — первый выделенный и идентифицированный эндогенный дигиталисоподобный фактор из плазмы крови (Hamlyn et al., 1991). Решающим доказательством эндогенной природы стероида было обнаружение путей его синтеза в организме. В экспериментах *in vitro* на клеточной культуре надпочечников быка кортикальные клетки вырабатывали эндогенный убаин в количествах, которые в десятки раз превышают содержание убаина в этих клетках. Таким образом, было продемонстрировано, что кора надпочечников (*zona fasciculata*) является местом синтеза и/или хранения эндогенного убаина. Кора надпочечников не является единственным местом продукции эндогенного убаина. Эндогенный убаин также был обнаружен в гипоталамусе и гипофизе (Blaustein, 1993; Hamlyn, 1998; Schoner, 2002). Уровень циркулирующего убаина в крови в физиологических условиях составляет менее 1 нМ (см. обзор: Dobretsov, Stimers, 2005).

По полученным недавно данным никотин и АХ, а также антихолинэстеразный агент эзерин вовлечены в процесс стимуляции секреции эндогенного убаина в адренокортикальных клетках крысы (Gooz et al., 2004).

При гипоксии (снижение парциального давления кислорода в организме), при увеличении концентрации ионов Na^+ в плазме крови, а также при физической нагрузке отмечено существенное повышение концентрации эндогенного убаина в крови. Такие заболевания, как хроническая почечная недостаточность, гипертензия, острая сердечная недостаточность, преэклампсия также сопровождаются повышением концентрации эндогенного убаина. Возможно, такие изменения уровня кардиотонического стероида, приводящие к быстрому увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в кардиомиоцитах, могут рассматриваться в качестве защитного механизма сердца от перегрузок (Schoner, Scheiner-Bobis, 2007).

Дигоксин. Помимо убаина, из организма млекопитающих был выделен и другой фактор карденолидной природы — дигоксин. Из 100 тонн мочи человека было выделено 7,9 микрограмм данного вещества (Tamura et al., 1998; Schoner, 2002). Позднее из надпочечников быка было выделено соединение, похожее на дигоксин. Было установлено, что концентрация эндогенного дигоксина повышается при почечной недостаточности, а также при длительной физической нагрузке. Концентрация дигоксина в плазме крови у людей, переживших инфаркт миокарда, повышена в 2,5 раза по сравнению со здоровыми людьми (обзор: Schoner,

2002). Интересно что, дигоксин подавляет развитие гипертензии, которую вызывает убаин. В настоящее время не известно, почему эти два специфических ингибитора Na, K-АТФазы (убаин и дигоксин) вызывают различные физиологические эффекты. Долгое время пути биосинтеза эндогенного дигоксина оставались малоизученными, что не исключало возможность его поступления с пищей. Только в последние годы были охарактеризованы пути биосинтеза, доказывающие эндогенную природу дигоксина. Были идентифицированы предшественники этого стероида: (1,2-14C) ацетат и (4-14C) холестерин (Qazzaz et al., 2004).

Маринобуфагенин. Из мочи и плазмы крови человека и некоторых млекопитающих был выделен ингибитор Na, K-АТФазы буфодиенолидной природы, подобный маринобуфагенину из паротидных желез жабы *Bufo marinus* (Fedorova, Bagrov, 1997; Bagrov et al., 1998; Doris, Bagrov, 1998; Schoner, 2002). Основным органом, продуцирующим это вещество у жаб, являются кожные и, особенно, паротидные железы. Имеются данные, свидетельствующие о том, что у млекопитающих маринобуфагенин, как и дигоксин, синтезируется в коре надпочечников из предшественника холестерина (Doris, Bagrov, 1998; Dmitrieva et al., 2000; Schoner, 2002). Уровень маринобуфагенина в плазме крови жабы *Bufo marinus* находится в микромолярных концентрациях, что на порядки превышает дозы, летальные для человека и других млекопитающих. Уровень циркулирующего маринобуфагенина в крови у крысы в физиологических условиях составляет от 0,2 до 0,5 нМ (см. обзор: Dobretsov, Stimers, 2005).

В отличие от убаина, маринобуфагенин, по ряду данных, обладает более высокой аффинностью к убаин-резистентной $\alpha 1$ изоформе Na, K-АТФазы у крыс. Показано, что в концентрациях, наблюдаемых *in vivo*, маринобуфагенин обладает выраженной вазоконстрикторной активностью и высокой аффинностью к $\alpha 1$ изоформе Na, K-АТФазы, основной изоформы в почках (Fedorova et al., 2000), что может быть важным в условиях сердечной недостаточности (Fridman et al., 2002). В то же время в исследованиях, проведенных на скелетной мышце, где экспрессируется $\alpha 1$ и $\alpha 2$ изоформы, показано ингибирующее воздействие маринобуфагенина на $\alpha 2$ изоформу Na, K-АТФазы (Кривой и др., 2006 в).

Помимо перечисленных выше, из тканей животных и человека был выделен ряд других факторов карденолидной, буфодиенолидной и пептидной природы (Doris, Bagrov, 1998; Reinés et al., 2000; Schoner, 2002; Mijatovic et al., 2007), а также пока не идентифицированные ЭДПФ (Mandel et al., 2003).

Здесь необходимо отметить, что ЭДПФ могут по своим свойствам существенно отличаться от своих аналогов растительного происхождения, как это показано, например, для эндогенного убаина, который угнетает почечную $\alpha 1$ изоформу Na, K-АТФазы крыс в 1000 раз эффективнее синтетического убаина (Ferrandi et al., 1992).

Помимо рассмотренных выше механизмов действия сердечных гликозидов, обсуждается и другой механизм действия ЭДПФ, который важен для нервной системы и обусловлен способностью этих веществ вызывать деполяризацию клетки за счет частичного угнетения активности Na, K-АТФазы. Предполагается, что, влияя на электрогенез клеток, ЭДПФ могут участвовать в регуляции их возбудимости и уровня секреции медиаторов. Подобное действие ЭДПФ, помимо прочего, может быть важным и в механизме различного рода аффективных расстройств нервной системы (см. обзор: Lichtstein, Rosen, 2001).

В целом, ЭДПФ можно рассматривать в качестве факторов, поддерживающих клеточный гомеостазис. В то же время чрезмерные колебания уровня эндогенных ингибиторов Na, K-АТФазы в крови могут провоцировать развитие некоторых патологических состояний, в том числе гипертоническую болезнь, инфаркт миокарда и др. (см. обзоры: Doris, Bagrov, 1998; Schoner, 2002).

Важно, что полученные к настоящему времени результаты позволяют рассматривать изоформы α -субъединицы Na, K-АТФазы как подтипы рецепторов, специфичных для различных ЭДПФ. То есть, учитывая тканеспецифичность этих изоформ, различные ЭДПФ могут являться селективными регуляторами изоформ Na, K-АТФазы в разных тканях. По ряду данных эндогенные убаин и маринобуфагенин можно расценивать как избирательные лиганды соответственно к изоформам $\alpha 3$ и $\alpha 1$ Na, K-АТФазы сосудов крысы (Fedorova et al., 2000). Из сыворотки крови человека получен убаин-подобный фактор с большей аффинностью к изоформе $\alpha 1$ Na, K-АТФазы почек собаки по сравнению с изоформой $\alpha 3$ из мозга свиньи (Butt et al., 2000). Из перитонеального диализата больных некоторыми формами почечной недостаточности выделен ЭДПФ, аффинный к изоформам $\alpha 2$ в скелетной мышце и $\alpha 3$ в мозгу крысы (Тао et al., 1997). Выявление селективных ингибиторов изоформ α -субъединицы Na, K-АТФазы (в том числе эндогенной природы) важно не только для понимания механизмов регуляции этих изоформ в разных тканях, но и для решения ряда клинических проблем.

Заключение

Приведенные данные показывают, что на современном этапе исследований олигомерных белков знания о строении их молекул, а также об особенностях экспрессии кодирующих их генов во многом опережают знания о функциях, которые выполняют различные молекулярные формы этих белков. На примере рассмотренных в обзоре представителей разных классов белков, обслуживающих, казалось бы, весьма различные клеточные процессы, можно видеть многие общие принципы организации молекулярных механизмов физиологических функций. Факты, демонстрирующие, что тот или иной белок, известный как рецептор или фермент, участвует еще в каких-то процессах, могут многое дать для понимания упомянутых механизмов, если учесть, что представления об «основных» функциях белка — не более чем отражение ограниченности наших знаний о сложнейшем комплексе молекулярных взаимодействий в клетке и организме.

В каком микроокружении работает тот или иной белок в определенной физиологической ситуации и/или на определенной стадии развития? Какие сигналы и под влиянием каких физиологических потребностей контролируют экспрессию генов, кодирующих разные изоформы субъединиц, участвующих в формировании олигомерного комплекса? Какие сигналы управляют доставкой той или иной молекулярной формы белка в нужное время в нужное место? Какие «дополнительные» функции (кажущиеся несвойственными с точки зрения привычных подходов) может осуществлять белок или его отдельные субъединицы? Ответы на эти вопросы находятся в ряду ключевых для понимания функционального значения разнообразия молекулярных форм самых разных белков.

Работа поддержана грантами РФФИ 04-04-49535а и 07-04-01027а.

Список литературы

- Болдырев А. А. (1985) Биологические мембраны и транспорт ионов. М.: Изд-во МГУ. 208 с.
- Болдырев А. А. (1998) Na/K-АТФаза — свойства и биологическая роль. Соросовский образовательный журнал. 4: 2-9.
- Голиков С. Н., Долго-Сабуров В. Б., Елаев Н. Р., Кулешов В. И. (1985) Холинергическая регуляция биохимических систем клетки. М.: Медицина. 224 с.
- Драбкина Т. М., Кривой И. И. (2004) От разнообразия молекулярных форм к функциональной специализации олигомерных белков. Никотиновый холинорецептор, ацетилхолинэстераза и Na⁺, K⁺-АТФаза. Цитология. 46 (2): 89-104.
- Кравцова В. В., Драбкина Т. М., Прокофьев А. В., Кубасов И. В., Васильев А. Н., Кривой И. И. (2008) Действие никотина на электрогенный вклад изоформ Na, K-АТФазы и сократительные характеристики скелетной мышцы крысы. Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. 94 (10): 1181-1190.
- Кривой И. И. (1998) Холинергическая модуляция нервно-мышечной передачи. Автореф. докт. дис. Санкт-Петербург: 40 с.
- Кривой И. И., Драбкина Т. М., Васильев А. Н., Кравцова В. В. (2006 а) О роли убаин-чувствительной $\alpha 2$ изоформы Na⁺, K⁺-АТФазы в скелетной мышце крысы. Биол. мембраны. 23 (2): 139-147.
- Кривой И. И., Драбкина Т. М., Васильев А. Н., Кравцова В. В., Мандел Ф. (2006 б) Анализ взаимодействия никотинового холинорецептора и Na⁺, K⁺-АТФазы в скелетной мышце крысы и мембранном препарате электрического органа *Torpedo*. Росс. физиол. журнал им. И. М. Сеченова. 92 (2): 191-203.
- Кривой И. И., Драбкина Т. М., Кравцова В. В., Васильев А. Н., Ващинкина Е. В., Прокофьев А. В., Кубасов И. В. (2006 в) Роль $\alpha 2$ -изоформы Na⁺, K⁺-АТФазы в положительном инотропном эффекте убаина и маринобуфагенина в диафрагме крысы. Биофизика. 51 (5): 906-911.
- Кривой И. И., Кравцова В. В., Алтаева Э. Г., Кубасов И. В., Прокофьев А. В., Драбкина Т. М., Никольский Е. Е., Шенкман Б. С. (2008) Снижение электрогенного вклада Na-K-АТФазы и мембранного потенциала покоя как возможный механизм накопления ионов кальция в волокнах m. soleus крысы при кратковременной гравитационной разгрузке. Биофизика. 53 (6): 1051-1057.
- Кривой И. И., Кулешов В. И., Матюшкин Д. П. (1987) Нервно-мышечный синапс и антихолинэстеразные вещества. Л.: Изд-во ЛГУ. 240 с.
- Крылов Б. В., Дербенев А. В., Подзорова С. А., Людыно М. И., Кузьмин А. В., Изварина Н. Л. (1999) Морфин уменьшает чувствительность к потенциалу медленных натриевых каналов. Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 85 (2): 225-236.
- Крутецкая З. И., Лебедев О. Е., Курилова Л. С. (2003) Механизмы внутриклеточной сигнализации. СПб.: Изд-во СПбГУ. 208 с.
- Магазаник Л. Г. (1988) Следовые постсинаптические реакции в нервно-мышечных соединениях. Журн. эволюц. биохим. и физиол. 24 (5): 657-667.
- Скок В. И., Селянко А. А., Деркач В. А. (1987) Нейрональные холинорецепторы. М.: Наука. 343 с.
- Aizman O., Uhlen P., Lal M., Brismar H. & Aperia A. (2001) Ouabain, a steroid hormone that signals with slow calcium oscillations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98: 13420-13424.
- Anglister L., Haesaert B. & McMahan U. J. (1994) Globular and asymmetric acetylcholinesterase in the synaptic basal lamina of skeletal muscle. J. Cell Biol. 125: 183-196.
- Aperia A. (2007) New roles for an old enzyme: Na, K-ATPase emerges as an interesting drug target. J. Intern. Med. 261: 44-52.
- Arnon A., Hamlyn J. M. & Blaustein M. P. (2000) Ouabain augments Ca²⁺ transients in arterial smooth muscle without raising cytosolic Na⁺. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 279: H679-H691.

- Bagrov A. Y., Fedorova O. V., Dmitrieva R. Y., Howald W. N., Hunter A. P., Kuznetsova E. A. & Shpen V. M. (1998) Characterization of a urinary bufodienolide Na⁺, K⁺-ATPase inhibitor in patients after acute myocardial infarction. *Hypertens.* 31: 1097-1103.
- Balzan S., D'Urso G., Nicolini G., Forini F., Pellegrino M. & Montali U. (2007) Erythrocytes sodium pump stimulation by ouabain and an endogenous ouabain-like factor. *Cell. Biochem. Funct.* 25: 297-303.
- Blanco G. & Mercer R. W. (1998) Isozymes of the Na-K-ATPase: heterogeneity in structure, diversity in function. *Am. J. Physiol.* 275: F633-F655.
- Blaustein M. P. (1993) Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. *Am. J. Physiol.* 264 (33): C1367-C1387.
- Blaustein M. P. & Golovina V. A. (2001) Structural complexity and functional diversity of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores. *Trends Neurosci.* 24: 602-608.
- Bowman W. C. (1990) Pharmacology of neuromuscular function. Butterworth & Co (Publishers) Ltd. 316.
- Busker R. W., Zijlstra J. J., Van der Wiel H. J. & Van Helden H. P. M. (1994) The functional role of molecular forms of acetylcholinesterase in neuromuscular transmission. *Neurochem. Res.* 19: 713-719.
- Butt A. N., Tennant B. P., Gillingwater S. D., Shepherd P. S. & Swaminathan R. (2000) Binding of ouabain and human ouabainlike substance to different Na⁺, K⁺-ATPase isoforms. *Hypertens. Res.* 23: 45-50.
- Changeux J.-P. & Edelstein S. J. (2001) Allosteric mechanisms in normal and pathological nicotinic acetylcholine receptors. *Curr. Opin. Neurobiol.* 11: 369-377.
- Clausen T. (1998) Clinical and therapeutic significance of the Na⁺, K⁺ pump. *Clinical Sci.* 95: 3-17.
- Clausen T. (2003) Na⁺-K⁺ pump regulation and skeletal muscle contractility. *Physiol. Rev.* 83: 1269-1324.
- Clausen T. (2008) Role of Na⁺, K⁺-pumps and transmembrane Na⁺, K⁺-distribution in muscle function. *Acta Physiol.* 192: 339-349.
- Cordero-Erausquin M., Marubio L. M., Klink R. & Changeux J. P. (2000) Nicotinic receptor function: new perspectives from knockout mice. *Trends Pharmacol. Sci.* 21: 211-217.
- Corringer P. J., Le Novere N. & Changeux J. P. (2000) Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40: 431-458.
- Cougnon M. H., Moseley A. E., Radzyukevich T. L., Lingrel J. B. & Heiny J. A. (2002) Na, K-ATPase α - and β -isoform expression in developing skeletal muscles: $\alpha 2$ correlates with t-tubule formation. *Eur. J. Physiol.* 445: 123-131.
- Cousin X., Bon S., Massoulie J. & Bon C. (1998) Identification of a novel type of alternatively spliced exon from the acetylcholinesterase gene of *Bungarus fasciatus*. *J. Biol. Chem.* 273: 9812-9820.
- Cresnar B., Crne-Finderle N., Breskvar K. & Sketelj J. (1994) Neural regulation of muscle acetylcholinesterase is exerted on the level of its mRNA. *J. Neurosci. Res.* 38: 294-299.
- Daniel E. E., El-Yazbi A. & Cho W. J. (2006) Caveolae and calcium handling, a review and a hypothesis. *J. Cell Mol. Med.* 10: 529-544.
- Dehkordi O., Haxhiu M. A., Millis R. M., Dennis G. C., Kc P., Jafri A., Khajavi M., Trouth C. O. & Zaidi S. I. (2004) Expression of alpha-7 nAChRs on spinal cord-brainstem neurons controlling inspiratory drive to the diaphragm. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 141: 21-34.
- Dehkordi O., Millis R. M., Dennis G. C., Coleman B. R., Johnson S. M., Changizi L. & Trouth C. O. (2005) Alpha-7 and alpha-4 nicotinic receptor subunit immunoreactivity in genioglossus muscle motoneurons. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 145:153-161.
- Dezaki K., Tsuneki H. & Kimura I. (1999) Methyllycaconitine-sensitive neuronal nicotinic receptor-operated slow Ca²⁺ signal by local application or perfusion of ACh at the mouse neuromuscular junction. *Neurosci. Res.* 33: 17-24.
- Di Chiara G. (2000) Role of dopamine in the behavioral actions of nicotine related to addiction. *Eur. J. Pharmacol.* 393: 295-314.

- Dmitrieva R. I., Bagrov A. Y., Lalli E., Sassone-Corsi P., Stocco D. M. & Doris P. A. (2000) Mammalian bufadienolide is synthesized from cholesterol in the adrenal cortex by a pathway that is independent of cholesterol side-chain cleavage. *Hypertension*. 36: 442-448.
- Dobretsov M., Hastings S. L., Sims T. J., Stimers J. R. & Romanovsky D. (2003) Stretch receptor-associated expression of $\alpha 3$ isoform of the Na^+ , K^+ -ATPase in rat peripheral nervous system. *Neuroscience*. 116: 1069-1080.
- Dobretsov M. & Stimers J. R. (2005) Neuronal function and alpha3 isoform of the Na/K-ATPase. *Front. Biosci.* 10: 2373-2396.
- Doris P. A. & Bagrov A. Y. (1998) Endogenous sodium pump inhibitors and blood pressure regulation: an update on recent progress. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 218: 156-167.
- Dostanic I., Lorenz J. N., Schultz J. E. J., Grupp I. L., Neumann J. C., Wani M. A. & Lingrel J. B. (2003) The $\alpha 2$ -isoform of Na, K-ATPase mediates ouabain-induced cardiac inotropy in mice. *J. Biol. Chem.* 278: 53026-53034.
- Dostanic I., Paul R. J., Lorenz J. N., Theriault S., Van Huysse J. W. & Lingrel J. B. (2005) The $\alpha 2$ -isoform of Na, K-ATPase mediates ouabain-induced hypertension in mice and increased vascular contractility in vitro. *Physiol. Heart Circ. Physiol.* 288: 177-485.
- Fedorova O. V. & Bagrov A. Y. (1997) Inhibition of Na/K ATPase from rat aorta by two Na/K pump inhibitors, ouabain and marinobufagenin: evidence of interaction with different α -subunit isoforms. *Am. J. Hypertens.* 10: 929-935.
- Fedorova O. V., Lakatta E. G. & Bagrov A. Y. (2000) Endogenous Na, K pump ligands are differentially regulated during acute NaCl loading of Dahl rats. *Circulation*. 102: 3009-3014.
- Fernandez H. L. & Donoso J. A. (1988) Exercise selectively increases G4 acetylcholinesterase activity in fast-twitch muscle. *J. Appl. Physiol.* 65: 2245-2252.
- Fernandez H. L. & Hodges-Savola C. A. (1992) Trophic regulation of acetylcholinesterase isoenzymes in adult mammalian skeletal muscle. *J. Neurochem. Res.* 17: 115-124.
- Fernandez H. L., Inestrosa N. C. & Stiles J. R. (1984) Subcellular localization of acetylcholinesterase molecular forms in endplate regions of adult mammalian skeletal muscle. *Neurochem. Res.* 9: 1211-1230.
- Ferrandi M., Minotti E., Salardi S., Florio M., Bianchi G. & Ferrari P. (1992) Ouabain-like factor in Milan hypertensive rats. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 263: F739-F748.
- Fridman A. I., Matveev S. A., Agalakova N. I., Fedorova O. V., Lakatta E. G. & Bagrov A. Y. (2002) Marinobufagenin, an endogenous ligand of alpha-1 sodium pump, is a marker of congestive heart failure severity. *J. Hypertens.* 20: 1189-1194.
- Gao J., Wymore R. S., Wang Y., Gaudette G. R., Krukenkamp I. B., Cohen I. S. & Mathias R. T. (2002) Isoform-specific stimulation of cardiac Na/K pumps by nanomolar concentrations of glycosides. *J. Gen. Physiol.* 119: 297-312.
- Galzi J. L. & Changeux J.-P. (2000) Neuronal nicotinic receptors: molecular organization and regulations. *Neuropharmacol.* 34: 563-582.
- Giniatullin R. A., Khamitov G., Khazipov R., Magazanik L. G., Nikolsky E. E., Snetkov V. A. & Vyskocil F. (1989) Development of desensitization during repetitive end-plate activity and single end-plate currents in frog muscle. *J. Physiol.* 412: 113-122.
- Gisiger V., Sherker S. & Gardiner P. F. (1991) Swimming training increases the G4 acetylcholinesterase content of both fast ankle extensors and flexors. *FEBS Lett.* 278: 271-273.
- Gloor S. M. (1997) Relevance of Na, K-ATPase to local extracellular potassium homeostasis and modulation of synaptic transmission. *FEBS Letters.* 412: 1-4.
- Golden W. C. & Martin L. J. (2006) Low-dose ouabain protects against excitotoxic apoptosis and up-regulates nuclear BCL-2 *in vivo*. *Neuroscience*. 137: 133-144.

- Gooz M., Toth M., Vakkuri O., Gooz P., Smolka A. J., de Chatel R. & Szalay K. S. (2004) Endogenous ouabain-like factor (OLF) secretion is modulated by nicotinic mechanisms in rat adrenocortical cells. *Life Sci.* 74: 2111-28.
- Gregory E. J., Hodges-Savola C. A. & Fernandez H. L. (1989) Selective increase of tetrameric (G4) acetylcholinesterase activity in rat hindlimb skeletal muscle following short-term denervation. *J. Neurochem.* 53: 1411-1418.
- Grutter T. & Changeux J.-P. (2001) Nicotinic receptors in wonderland. *Trends Biochem. Sci.* 26: 459-462.
- Haber R. S. & Loeb J. N. (1988) Selective induction of high- ouabain -affinity isoform of Na⁺-K⁺-ATPase by thyroid hormone. *Am. J. Physiol.* 255: E912-E919.
- Hamlyn J. M. (1998) Observation of the nature, biosynthesis, secretion and significance of endogenous ouabain. *Clin. Exp. Hypertens.* 20: 523-533.
- Hamlyn J. M., Blaustein M. P., Bova S., DuCharme D. W., Harris D. W., Mandel F., Mathews W. R. & Ludens J. H. (1991) Identification and characterization of a ouabain-like compound from human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 6259-6263.
- Haynes L. W., Smith M. E. & Smyth D. G. (1984) Evidence for the neurotrophic regulation of collagen-tailed acetylcholinesterase in immature skeletal muscle by β -endorphin. *J. Neurochem.* 42: 1542-1551.
- He S., Shelly D. A., Moseley A. E., James P. F., James J. H., Paul R. J. & Lingrel J. B. (2001) The α 1- and α 2-isoforms of Na-K-ATPase play different roles in skeletal muscle contractility. *Am. J. Physiol. Reg. Integ. Comp. Physiol.* 281: R917-R925.
- Hicks A. & McComas A. J. (1989) Increased sodium pump activity following repetitive stimulation of rat soleus muscles. *J. Physiol.* 414: 337-349.
- Higham S. C., Melikian J., Karin N. J., Ismail-Beigi F. & Pressley T. A. (1993) Na, K-ATPase expression in C2C12 cells during myogenesis: minimal contribution of α 2 isoform to Na, K transport. *J. Membrane Biol.* 131: 129-136.
- Isaev N. K., Stelmashook E. V., Halle A., Harms C., Lautenschlager M., Weih M., Dirnagl U., Victorov I. V. & Zorov D. B. (2000) Inhibition of Na⁺, K⁺-ATPase activity in cultured rat cerebellar granule cells prevents the onset of apoptosis induced by low potassium. *Neurosci. Letters.* 283: 41-44.
- Jasmin B. J., Gardiner P. F. & Gisiger V. (1991) Muscle acetylcholinesterase adapts to compensatory overload by a general increase in its molecular forms. *J. Appl. Physiol.* 70: 2485-2489.
- Jones S., Sterling S. & Jerrel L. Y. (1999) Nicotinic receptors in the brain: correlating physiology with function. *Trends Neurosci.* 22: 555-561.
- Katz B. & Thesleff S. (1957) A study of desensitization produced by acetylcholine at the motor endplate. *J. Physiol.* 138: 225-250.
- Kotova O., Al-Khalili L., Talia S., Hooke C., Fedorova O. V., Bagrov A. Y. & Chibalin A. V. (2006) Cardiotonic steroids stimulate glycogen synthesis in human skeletal muscle cells via a Src- and ERK1/2-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 281 29: 20085-20094.
- Kragenbrink R., Higham S. C., Sansom S. C. & Pressley T. A. (1996) Chronic stimulation of acetylcholine receptors: differential effects on Na, K-ATPase isoforms in a myogenic cell line. *Synapse.* 23: 219-223.
- Krejci E., Thomine S., Boschetti N., Legay C., Sketelj J. & Massoulié J. (1997) The mammalian gene of acetylcholinesterase-associated collagen. *J. Biol. Chem.* 272: 22840-22847.
- Kristensen M., Rasmussen M. K. & Juel C. (2008) Na⁺-K⁺ pump location and translocation during muscle contraction in rat skeletal muscle. *Pflugers Arch. — Eur. J. Physiol.* DOI 10.1007/s00424-008-0449-x.
- Krivoi I. I., Drabkina T. M., Kravtsova V. V., Vasiliev A. N., Eaton M. J., Skatchkov S. N., & Mandel F. (2006) On the functional interaction between nicotinic acetylcholine receptor and Na⁺, K⁺-ATPase. *Pflugers Arch. — Eur. J. Physiol.* 452(6): 756-765.

- Krivoi I. I., Vasiliev A. N., Kravtsova V. V., Dobretsov M. & Mandel F. (2003) Porcine kidney extract contains factor(s) that inhibit the ouabain-sensitive isoform of Na,K-ATPase ($\alpha 2$) in rat skeletal muscle: a convenient electrophysiological assay. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986: 639-641.
- Kulikov A., Eva A., Kirch U., Boldyrev A. & Scheiner-Bobis G. (2007) Ouabain activates signaling pathways associated with cell death in human neuroblastoma. *Biochim. Biophys. Acta.* 1768: 1691-1702.
- Lavoie L., Levenson R., Martin-Vasallo P. & Klip A. (1997) The molar ratios of α and β subunits of the Na^+ - K^+ -ATPase differ in distinct subcellular membranes from rat skeletal muscle. *Biochem.* 36: 7726-7732.
- Le Novère N., Grutter T. & Changeux J.-P. (2002) Models of the extracellular domain of the nicotinic receptors and of agonist- and Ca^{2+} -binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 3210-3215.
- Lichtstein D. & Rosen H. (2001) Endogenous digitalis-like Na,K-ATPase inhibitors, and brain function. *Neurochem. Res.* 26: 971-978.
- Lopina O.D. (2001) Interaction of Na,K-ATPase catalytic subunit with cellular proteins and other endogenous regulators. *Biochemistry (Moscow).* 66: 1122-1131.
- Maeno T., Hara N., Enomoto K., Ichinose M. & Sawada M. (1995) Effects of inhibitors of ouabain-sensitive Na^+/K^+ -ATPase and Li^+ ions on the neuromuscular transmission of the frog. *Japan J. Physiol.* 45: 397-410.
- Magazanik L. G. & Vyskocil F. (1976) Desensitization at the neuromuscular junction. In «Motor innervation of muscle», ed. Thesleff. 151-176.
- Mandel F., Vasiliev A. N. & Krivoi I. I. (2003) Using the Na,K-ATPase itself for the large scale isolation and purification of endogenous digitalis-like factors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 986: 617-619.
- Markert C. L. & Moller F. (1959) Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species-specific patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 45: 753-763.
- Massoulié J. & Bon S. (1982) The molecular form of cholinesterase in vertebrates. *Ann. Rev. Neurosci.* 5: 57-106.
- Massoulié J., Pezzementi L., Bon S., Krejci E. & Vallette F.M. (1993) Molecular and cellular biology of cholinesterases. *Progr. Neurobiol.* 41: 31-91.
- Massoulié J. & Tautant J.-P. (1988) Vertebrate cholinesterases: structure and types of interaction. *Handbook of Experimental Pharmacology.* Berlin: Springer-Verlag. 86: 167-224.
- Mathias R. T., Cohen I. S., Gao J. & Wang Y. (2000) Isoform-specific regulation of the Na^+ - K^+ pump in heart. *News Physiol. Sci.* 15: 176-180.
- McDonough A. A., Thompson C. B. & Youn J. H. (2002) Skeletal muscles regulates extracellular potassium. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 282: F967-F974.
- McGehee D. S. & Role L. W. (1995) Physiological diversity of nicotinic acetylcholine receptors expressed by vertebrate neurons. *Ann. Rev. Physiol.* 57: 521-546.
- Mijatovic T., Van Quaquebeke E., Delest B., Debeir O., Darro F. & Kiss R. (2007) Cardiotonic steroids on the road to anti-cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta.* 1776: 32-57.
- Miyakawa-Naito A., Uhlén P., Lal M., Aizman O., Mikoshiba K., Brismar H., Zelenin S. & Aperia A. (2003) Cell signaling microdomain with Na,K-ATPase and inositol 1,4,5-trisphosphate receptor generates calcium oscillations. *J. Biol. Chem.* 278 (50): 50355-50361.
- Mobasheri A., Avila J., Cozar-Castellano I., Brownleader M. D., Trevan M., Francis M. J.O., Lamb J. F. & Martin-Vasallo P. (2000) Na^+ , K^+ -ATPase isozyme diversity; comparative biochemistry and physiological implications of novel functional interactions. *Biosci. Reports.* 20: 51-91.
- Mohammadi K., Liu L, Tian J., Kometiani P., Xie Z. & Askari A. (2003) Positive inotropic effect of ouabain on isolated heart is accompanied by activation of signal pathways that link Na^+/K^+ -ATPase to ERK1/2. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41: 609-614.
- Muller-Husmann G., Gloor S. & Schachner M. (1993) Functional characterization of β isoforms of murine Na,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 268: 26260-26267.

- Nikolsky E. E., Zemkova H., Voronin V. A. & Vyskocil F. (1994) Role of non-quantal acetylcholine release in surplus polarization of mouse diaphragm fibres at the endplate zone. *J. Physiol.* 477: 497-502.
- Ohno K., Engel A. G., Brengman J. M., Shen X. M., Heidenreich F., Vincent A., Milone M., Tan E., Demirci M., Walsh P., Nakano S. & Akiguchi I. (2000) The spectrum of mutations causing end-plate acetylcholinesterase deficiency. *Ann. Neurol.* 47: 162-170.
- Papineni R. V.L. & Pedersen S. E. (1997) Interaction of d-tubocurarine analogs with the mouse nicotinic receptor. *J. Biol. Chem.* 272: 24891-24898.
- Parton R. G. & Simons K. (2007) The multiple faces of caveolae. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 185-194.
- Paterson B. & Nordberg A. (2000) Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Progr. Neurobiol.* 61: 75-111.
- Pellerin L. & Magistretti P. J. (1997) Glutamate uptake stimulates Na^+ , K^+ -ATPase activity in astrocytes via activation of a distinct subunit highly sensitive to ouabain. *J. Neurochem.* 69: 2132-2137.
- Peper K., Bradley R. J. & Dreyer F. (1982) The acetylcholine receptor at the neuromuscular junction. *Physiol. Rev.* 62: 1271-1340.
- Prince R. J. & Sine S. M. (1999) Acetylcholine and epibatidine binding to muscle acetylcholine receptors distinguish between concerted and uncoupled models. *J. Biol. Chem.* 274: 19623-19629.
- Prior C. & Singh S. (2000) Factors influencing the low-frequency associated nicotinic ACh autoreceptor-mediated depression of ACh release from rat motor nerve terminals. *Br. J. Pharmacol.* 129 (6): 1067-1074.
- Qazzaz H. M., El-Masri M. A. & Valdes R. J. (2000) Secretion of a lactone-hydrogenated ouabain-like effector of sodium, potassium-adenosine triphosphatase activity by adrenal cells. *Endocrinology.* 141: 3200-3209.
- Radzyukevich T. L., Moseley A. E., Shelly D. A., Redden G. A., Behbehani M. M., Lingrel J. B., Paul R. J. & Heiny J. A. (2004) The Na^+ - K^+ -ATPase $\alpha 2$ -subunit isoform modulates contractility in the perinatal mouse diaphragm. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287: C1300-C1310.
- Reinés A., Peña C., de Lores R. & Arnaiz G. (2000) Kinetics of Na^+ , K^+ -ATPase inhibition by an endogenous modulator (II-A). *Neurochem. Res.* 25: 121-127.
- Rossi S. G., Vazquez A. E. & Rotundo R. L. (2000) Local control of acetylcholinesterase gene expression in multinucleated skeletal muscle fibers: individual nuclei respond to signals from the overlying plasma membrane. *J. Neurosci.* 20: 919-928.
- Sala K., Kimura I., Santoro G., Kimura M. & Fumagali G. (1995) Expression of two neuronal nicotinic receptor subunits in innervated and denervated adult rat muscle. *Neurosci. Lett.* 215: 71-74.
- Sanes J. R. & Lichtman J. W. (1999) Development of the vertebrate neuromuscular junction. *Ann. Rev. Neurosci.* 22: 389-442.
- Scheiner-Bobis G. & Schoner W. (2001) A fresh facet for ouabain action. *Nature Med.* 7: 1288-1289.
- Schmalzing G., Kroner S., Schachner M. & Gloor S. (1992) The adhesion molecule on glia (AMOG/ $\beta 2$) and $\alpha 1$ subunits assemble to functional sodium pumps in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 267: 20212-20216.
- Schmalzing G., Ruhl K. & Gloor S. M. (1997) Isoform-specific interactions of Na, K-ATPase subunits are mediated via extracellular domains and carbohydrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 1136-1141.
- Schoner W. (2002) Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur. J. Biochem.* 269: 2440-2448.
- Schoner W. & Scheiner-Bobis G. (2007) Endogenous and exogenous cardiac glycosides and their mechanisms of action. *Am. J. Cardiovasc. Drugs.* 7 (3): 173-189.
- Sejersted O. M. & Sjogaard G. (2000) Dynamics and consequences of potassium shifts in skeletal muscle and heart during exercise. *Physiol. Rev.* 80: 1411-1481.
- Sharma G. & Vijayaraghavan S. (2001) Nicotinic cholinergic signaling in hippocampal astrocytes involves calcium-induced calcium release from intracellular stores. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 4148-4153.

- Sketelj J., Crne-Finderle N., Ribaric S. & Brzin M. (1991) Interactions between intrinsic regulation and neural modulation of acetylcholinesterase in fast and slow skeletal muscles. *Cell. Mol. Neurobiol.* 1: 35-54.
- Skou J.C. (1957) The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. *Biochem. Biophys. Acta.* 23: 394-401.
- Smit A. B., Syed N. I., Schaap D., van Minnen J., Klumperman J., Kits K. S., Lodder H., van der Schors R. C., van Eik R., Sorgedraeger B., Brejc K., Sixma T. K. & Geraerts W.P.M. (2001) A glia-derived acetylcholine-binding protein that modulates synaptic transmission. *Nature.* 411: 261-268.
- Song X.Z. & Pedersen S.E. (2000) Electrostatic interactions regulate desensitization of the nicotinic acetylcholine receptor. *Biophys. J.* 78: 1324-1334.
- Sternfeld M., Ming G., Song H., Sela K., Timberg R., Poo M. & Soreq H. (1998) Acetylcholinesterase enhances neurite growth and synapse development through alternative contributions of its hydrolytic capacity, core protein, and variable C termini. *J. Neurosci.* 18: 1240-1249.
- Swadner K. J. (1995) Na, K-ATPase and its isoforms. In: *Neuroglia*. New York, Oxford: Oxford Univ. Press. 259-272.
- Tamura M., Landon E. J. & Inagami T. (1998) Na⁺, K⁺-ATPase inhibitors in rat urine: origins and physiological significance. *Clinic. Exp. Hypertens.* 20: 543-550.
- Tanaki H., Klink R., Lena C., Korn H. & Changeux J.-P. (2000) Calcium mobilization elicited by two types of nicotinic acetylcholine receptors in mouse substantia nigra pars compacta. *Eur. J. Neurosci.* 12: 2475-2485.
- Tao Q.F., Hollenberg N.K., Price D.A. & Graves S.W. (1997) Sodium pump isoform specificity for the digitalis-like factor isolated from human peritoneal dialysate. *Hypertension.* 29: 815-821.
- Taylor P. (1991) The cholinesterases. *J. Biol. Chem.* 266: 4025-4028.
- Thompson C.B., Choi C., Youn J.H. & McDonough A.A. (1999) Temporal responses of oxidative vs. glycolytic skeletal muscles to K⁺ deprivation: Na⁺ pumps and cell cations. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 276: C1411-C1419.
- Tian L., Prior C., Dempster J. & Marshall I.G. (1994) Nicotinic antagonist-produced frequency-dependent changes in acetylcholine release from rat motor nerve terminals. *J. Physiol.* 476: 517-529.
- Tsuneki H., Kimura I., Dezaki K., Kimura M., Sala C. & Fumagalli G. (1995) Immunohistochemical localization of neuronal nicotinic receptor subtypes at the pre- and postjunctional sites in mouse diaphragm muscle. *Neurosci.Lett.* 196: 13-16.
- Vincent A., Newland C., Croxen R. & Beeson D. (1997) Genes at the junction — candidates for congenital myasthenic syndromes. *Trends Neurosci.* 20: 15-22.
- Vizi E. S. & Lendvai B. (1999) Modulatory role of presynaptic nicotinic receptors in synaptic and non-synaptic chemical communication in the central nervous system. *Brain Res. Rev.* 30: 219-235.
- Vyskocil F., Nikolsky E. & Edwards C. (1983) An analysis of the mechanisms underlying the nonquantal release of acetylcholine at the mouse neuromuscular junction. *Neurosci.* 9 (2): 429-435.
- Wang L., McComb J.G., Weiss M. H., McDonough A. A. & Zlokovic B. V. (1994) Nicotine downregulates $\alpha 2$ isoform of Na, K-ATPase at the blood-brain barrier and brain in rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 199: 1422-1427.
- Wang H. & Sun X. (2005) Desensitized nicotinic receptors in brain. *Brain Res. Rev.* 48: 420- 437.
- Wilson G.G. & Karlin A. (2001) Acetylcholine receptor channel structure in the resting, open, and desensitized states probed with the substituted-cysteine-accessibility method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 1241-1248.
- Wonnacott S. (1997) Presynaptic nicotinic ACh receptors. *Trends. Neurosci.* 20: 92-98.
- Woo A.L., James P.F. & Lingrel J.B. (2000) Sperm motility is dependent on a unique isoform of the Na, K-ATPase. *J. Biol. Chem.* 275: 20693-20699.
- Xie Z. & Askari A. (2002) Na⁺/K⁺-ATPase as a signal transducer. *Eur. J. Biochem.* 269: 2434-2439.

- Xie Z. & Cai T. (2003) Na⁺-K⁺-ATPase-mediated signal transduction: from protein interaction to cellular function. *Mol. Interv.* 3: 157-168.
- Yamamoto S., Fox A. A. & Greeff K. (1981) Inotropic effects and Na⁺, K⁺-ATPase inhibition of ouabain in isolated guinea-pig atria and diaphragm. *Eur. J. Pharmacol.* 71: 437-446.
- Yuan Z., Cai T., Tian J., Ivanov A., Giovannucci D. & Xie Z. (2005) Na/K-ATPase tethers phospholipase C and IP₃ receptor into a calcium-regulatory complex. *Mol. Biol. Cell.* 16 (9): 4034-4045.
- Yudowski G. A., Efendiev R., Pedemonte C. H., Katz A. I., Berggren P. O. & Bertorello A. M. (2000) Phosphoinositide-3 kinase binds to a proline-rich motif in the Na⁺, K⁺-ATPase alpha subunit and regulates its trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97: 6556-6561.
- Zahler R., Sun W., Ardito T., Zhang Z., Kocsis J. D. & Kashgarian M. (1996) The α3 isoform protein of the Na⁺, K⁺-ATPase is associated with the sites of cardiac and neuromuscular impulse transmission. *Circulation Res.* 78: 870-879.
- Zhang S., Malmersjö S., Li J., Ando H., Aizman O., Uhlén P., Mikoshiba K. & Aperia A. (2006) Distinct role of the N-terminal tail of the Na, K ATPase catalytic subunit as a signal transducer. *J. Biol. Chem.* 281: 21954-21962.

Структура и функция рецепторов глутамата в норме и условиях его нейротоксического действия

В настоящее время сформировались представления о том, что глутамат (Glu) — анион глутаминовой кислоты, является основным возбуждающим медиатором в синапсах центральной нервной системы (ЦНС) млекопитающих (Curtis, Johnston, 1974; Watkins, Evans, 1981), а так же в нервно-мышечных синапсах членистоногих (Магазаник и др., 1984; Антонов, 1989). Вопреки нормальной функции передачи возбуждения с одного нейрона на другой, в условиях длительного действия Glu и чрезмерной активации его рецепторов могут развиваться патологические состояния, связанные с гибелью нейронов. Как нормальная медиаторная функция, так и запуск цепной реакции нейродегенеративных процессов осуществляется через активацию одних и тех же рецепторов глутамата. Знание этих процессов представляется важным как с точки зрения теоретической науки, так и практической медицины. Установлено, что гиперактивация глутаматных рецепторов, следствием которой является нейродегенерация, проявляется в таких острых патологических состояниях мозга, как инсульт и связанная с ним ишемия, аномальная активность возбуждающих связей (судорожные состояния и болезнь Паркинсона), при нарушении целостности клеток (черепно-мозговая травма), а также при хронических нейродегенеративных заболеваниях, например, болезнь Альцгеймера (Meldrum, 1993; Lipton, 1999).

Нейродегенерация является заключительным этапом комплексной дисфункции нервной ткани. В ходе её развития происходят значительные нарушения в системе биосинтеза нейромедиаторов, их аккумуляции в синаптических пузырьках, захвате в нервные терминалы и глиальные клетки. Эти процессы имеют пресинаптическую локализацию, так как происходят в пресинаптических нейронах и глиальных клетках, являющихся источником глутамата в ЦНС. Их нарушения вызывают существенное повышение свободной концентрации глутамата в межклеточном пространстве. К постсинаптическим факторам нейродегенерации относятся: активация различных типов рецепторов глутамата и деполяризация нейронов, нарушение мембранных ионных градиентов и вход значительного количества Ca^{2+} в клетки, который запускает летальные процессы внутриклеточной сигнализации, приводящие к активации апоптотических путей гибели нейронов (Choi, 1992; Khodorov, 2004).

Учитывая эти обстоятельства ниже речь пойдет о структуре центральных глутаматергических синапсов, рецепторов глутамата, о механизмах модуляции их активности, функционировании в норме и условиях длительного воздействия глутамата, а также о механизмах нейродегенерации, другими словами — гибели нейронов.

Строение и функционирование глутаматергических синапсов

Первые сообщения о способе взаимодействия нервных клеток через специфические контакты или синапсы появились в 1893 году. Открытие синапсов связывают с именем испанского ученого Рамона-и-Кахала, который, используя методику импрегнации нейронов

серебром, предложенную итальянским ученым Гольджи, обнаружил, что подавляющее большинство нейронов имеют два функционально разных отростка: дендрит и аксон (цитирование по Ramon y Cajal, 1952). Им впервые была обоснована морфологическая самостоятельность нейронов и глиальных клеток, а так же показано, что в нервной системе отсутствуют синцитиальные отношения (Куффлер, Николс, 1979). Прошло полвека после открытий Рамона-и-Кахала, прежде чем физиологи утвердились в понимании того, что в основе поляризации лежит передача информации через химические синапсы, а ключевым компонентом такой передачи является существование в мембране нейрона синаптических рецепторов.

При изучении влияния различных веществ на электрическую активность нейронов изолированного спинного мозга Куртис и Ваткинс сформировали гипотезу о медиаторной роли дикарбоновых аминокислот (Curtis, Johnston, 1974). Наиболее сильный эффект в их экспериментах оказывали L-аспарагиновая, L-глутаминовая и L-цистеиновая аминокислоты. В результате дальнейших экспериментов было установлено, что основным возбуждающим медиатором в синапсах ЦНС позвоночных является глутамат, и для него выполняются все основные требования, необходимые для признания вещества нейромедиатором. Определяющим феноменологическим признаком медиаторной роли глутамата послужило открытие для него специфических рецепторов.

Глутаматергический синапс, как и другие химические синапсы, представляет собой сложное структурное образование, состоящее из пресинаптической мембраны (чаще всего это концевое разветвление аксона), постсинаптической мембраны (чаще всего это участок мембраны тела или дендрита другого нейрона), а так же синаптической щели (рис. 1). Важным элементом синапса являются глиальные клетки, которые осуществляют локальный гомеостазис в синаптической щели, для выполнения главной функции передачи синаптического сигнала.

Еще до того, как были выяснены многие существенные особенности процесса высвобождения медиатора, было установлено, что пресинаптические окончания могут проявлять состояния спонтанной секреторной активности. Постоянно выделяемые небольшие порции медиатора вызывают в постсинаптической клетке так называемые спонтанные, миниатюрные постсинаптические потенциалы. Изучая работу нервно-мышечного синапса лягушки, английские ученые Фетт и Катц в 1950 году обнаружили, что без всякого действия на нерв в мышце в области постсинаптической мембраны сами по себе через случайные промежутки времени возникают небольшие колебания потенциала, амплитудой примерно в 0,5 мВ (Fatt, Katz, 1950). Открытие не связанного с приходом нервного импульса, выделения медиатора помогло установить квантовый характер его высвобождения, то есть получилось, что в химическом синапсе медиатор выделяется и в покое, но изредка и небольшими порциями. Дискретность выражается в том, что медиатор выходит из окончания не диффузно, не в виде отдельных молекул, а в форме многомолекулярных порций (или квантов), в каждой из которых содержится несколько тысяч молекул.

Принцип работы химического синапса состоит в том, что потенциал действия (ПД) вызывает нейросекреторный процесс, который заключается в синхронном выделении медиатора из большого числа везикул. Синхронизация достигается деполяризацией нервной терминали и открыванием электровозбудимых Ca^{2+} каналов, через которые Ca^{2+} входят в пресинаптическое окончание и приводит к слиянию пузырьков с местами освобождения в пресинаптической мембране. В результате этого, медиатор секретируется из синаптических пузырьков в синаптическую щель не в виде отдельных молекул, а в форме много-

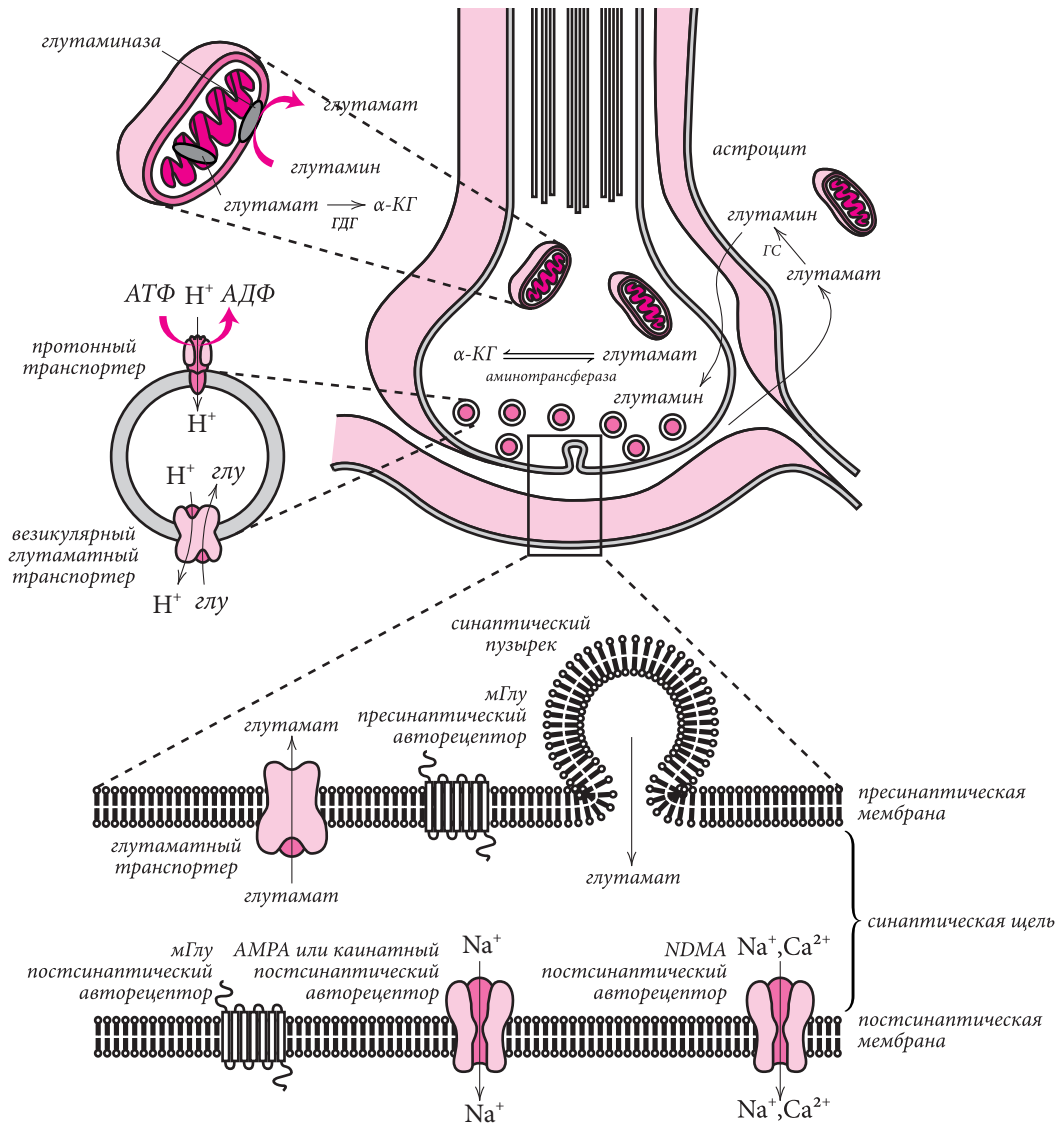


Рис. 1. Схематическое изображение структуры и функциональных особенностей глутаматергических синапсов.

молекулярных порций (или квантов), в каждой из которых содержится несколько тысяч молекул.

Синаптическая щель в химических синапсах составляет в среднем 20 нм. Здесь медиатор связывается с белками — рецепторами, которые встроены в постсинаптическую мембрану. После взаимодействия с молекулами медиатора рецепторы активируются и их каналы открываются, что сопровождается возникновением ионного тока и изменением мембранного потенциала постсинаптического нейрона. В результате если мембранный потенциал

сдвигается в сторону порога генерации ПД (происходит деполяризация), то говорят о возбуждающем действии медиатора. И наоборот, если мембранный потенциал становится более отрицательным — происходит гиперполяризация, говорят о тормозном действии медиатора.

Глутамат — заменимая аминокислота, не проникает через гематоэнцефалический барьер, т. е. не поступает в мозг через кровь. Молекула глутаминовой кислоты имеет достаточно простую структуру $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{NH}_2)-\text{COOH}$. Её синтез осуществляется в мозге, главным образом внутринейронно, хотя малая доля общего пула Glu находится и в астроцитах. Glu может быть синтезирован из альфа-кетоглутарата путем прямого восстановительного аминирования или трансаминирования из глутамина ферментом глутаминазой, а также из орнитина ферментом орнитинаминотрансферазой. Авторадиографические исследования показывают широкое распространение глутаматергических синапсов в большинстве отделов ЦНС, и в частности, в коре больших полушарий, обонятельных луковицах, гиппокампе, черной субстанции, мозжечке, стриатуме, среднем мозге, гипоталамусе и спинном мозге.

Переносчики Glu, которые являются интегральными белками плазматической мембраны, осуществляют транспорт — захват Glu из синаптической щели, т. е. его перенос внутрь глиальных клеток и нейронов, поддерживая тем самым низкую концентрацию этого медиатора в синаптической щели (Антонов, 2001; Ноздрачев, и др., 2001). Захват Glu против химического градиента (в цитозоле глиальных клеток и нейронов его концентрация может достигать 10 мМ) происходит благодаря энергии трансмембранных ионных градиентов. Поскольку самый большой электрохимический градиент между внеклеточной и внутриклеточной средой поддерживается для Na^+ и K^+ (примерно 140 мМ Na^+ во внеклеточной среде и около 10 мМ внутри клеток; и наоборот 130 мМ K^+ внутри клеток и порядка 3 мМ снаружи) молекулы Glu котранспортируются в клетку с ионами Na^+ , что сопровождается выходом ионов K^+ . Это доказывается тем, что замена ионов Na^+ на ионы Li^+ в наружной среде блокирует транспорт Glu (Антонов, 1989). Попав в цитозоль нейронов, Glu закачивается в синаптические везикулы с помощью протонзависимых везикулярных транспортеров (рис. 1). Путь Glu из астроцитов в нейроны сопровождается метаболическими превращениями. В астроцитах фермент глутаминсинтаза превращает Glu в глутамин. Важно, что билипидные мембраны проницаемы для глутамина, и то, что он не способен активировать рецепторы Glu (GluR). Глутамин, попав во внеклеточное пространство, захватывается нейронами. Фермент глутаминаза, находящийся в митохондриях нейронов, превращает глутамин в Glu, и он снова может закачиваться в везикулу, возвращаясь в медиаторный пул (Петров и др., 1997).

Классификация и структурно-функциональная организация GluR

Глутаматергические механизмы представлены примерно в 40% нервных клеток, а оставшаяся часть выпадает на долю всех других нейромедиаторов (серотонина, ацетилхолина, допамина и др.). Поскольку их значение для функционирования ЦНС позвоночных сложно переоценить, здесь будет рассмотрена топология, молекулярные свойства, механизмы активации и модуляции рецепторов глутамата (GluR), а также особенности функционирования одного из их подтипов — NMDA-рецепторов (NMDAR). Последние вовлечены во многие физиологические процессы, как в онтогенетическом развитии мозга, так и у взрослых животных, включая формирование нейронных связей, обучение и память. Кроме того,

NMDAR участвуют в патогенезе многих заболеваний, сопряженных с ишемией, вызывающей гибель нейронов, и другими нейродегенеративными расстройствами. Многообразие функций GluR напрямую определяется их молекулярной организацией.

В настоящее время установлено существование 4 типов рецепторов глутамата, среди которых 3 типа являются ионотропными и 1-метаботропным. Ионотропные рецепторы представляют собой управляемые лигандом ионные каналы. Современная классификация ионотропных рецепторов основана на их разной чувствительности к действию агонистов глутамата: N-метил-D-аспартату (NMDA), 2-амино-3(3-гидрокси-5-метилизоксазол-4-ил) пропионату (AMPA) и каинату (КА). Однако в живых организмах все эти типы рецепторов активируются глутаматом и, возможно, аспартатом, которые являются эндогенными возбуждающими нейромедиаторами.

Ионотропные рецепторы глутамата очень разнообразны, как по составу входящих в них субъединиц, так и по свойствам формируемых ими ионных каналов. Субъединичный состав рецепторов определяет фармакологические и физиологические свойства ионных каналов.

Клонирование позволило определить аминокислотные последовательности рецепторных субъединиц, формирующих ионный канал и их топологию в мембране. Канал всех GluR формируется четырьмя субъединицами. AMPA рецепторы (AMPA) могут быть сформированы разными сочетаниями четырех видов субъединиц, каинатные рецепторы (KAR) — пятью, а NMDAR — шестью. Всего количество клонированных на настоящий момент субъединиц — 17. Для большинства субъединиц возможен альтернативный сплайсинг, редактирование, приводящее к изменению аминокислотной последовательности. Все это увеличивает число возможных подтипов GluR и тем самым расширяет набор функциональных отличий, которыми они могут обладать (McBain, Mayer, 1994; Dingledine et al., 1999).

NMDAR представляет собой цельный рецепторно-ионофорный комплекс, включающий несколько сайтов регуляции: место специфического связывания медиатора (L-глутамата, Glu), место специфического связывания коагониста (глицина, Gly) и аллостерические модуляторные сайты, расположенные как во внеклеточной области рецептора (полиаминовый, H^+ , Zn^{2+} и Mg^{2+}), так и в ионном канале (сайты связывания проходящих ионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} ; полиаминов, Mg^{2+} и Zn^{2+} , а также многочисленных синтетических блокаторов каналов; рис. 2). Показано, что NMDA рецептор является гетеромерной структурой и состоит из трех типов субъединиц (NMDAR1, NMDAR2A, -2B, -2C, -2D и NMDAR3). Роль NMDAR3-субъединицы не совсем ясна. В основном одна рецепторная молекула содержит две NMDAR1 и две NMDAR2. Субъединица NMDAR1 является обязательной для формирования рецептора, так как в ее отсутствие, рецептор неспособен активироваться. Гетерогенность NMDAR в различных нейронах определяется функциональными и структурными различиями субъединиц NMDAR2. Субъединичный состав NMDAR может изменяться в зависимости от мозговой области, этапа развития нервной системы и степени активности синаптических связей.

Для любого типа субъединиц GluR топология расположения в мембране одинакова. Рисунки 2 демонстрирует строение NMDAR. Каждая субъединица имеет три трансмембранных домена (M1, M3 и M4) и один внутримембранный домен M2. N конец расположен внеклеточно, а C конец — внутриклеточно. В образовании канала участвуют M2 домены четырех субъединиц. Сайт связывания Glu находится на двух (S1 и S2) доменах расположенных на N конце перед M1 доменом и на M3-M4 петле, соответственно, причем эти домены принадлежат NMDAR2 субъединицам. Те же самые места на субъединицах NMDAR1

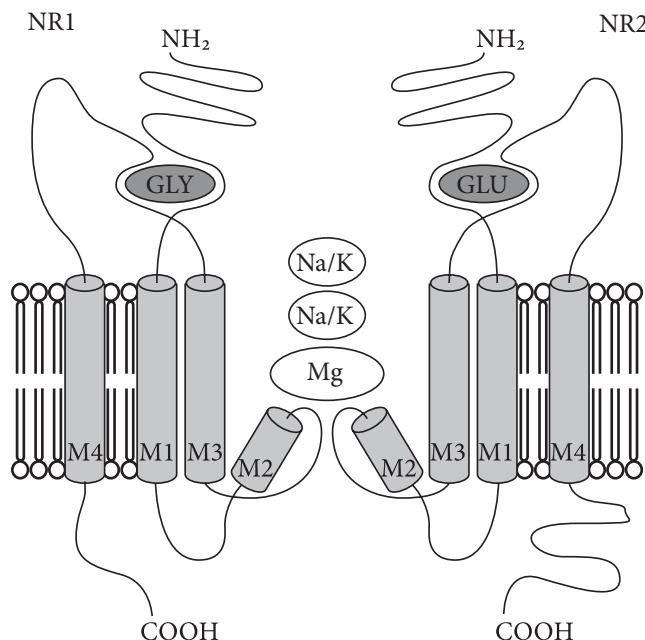


Рис. 2. Молекулярная структура NMDAR. Топология субъединиц (NR1 и NR2) рецептора в плазматической мембране. NH₂ — N-конец субъединиц, COOH — C-конец субъединиц. М-мембранные сегменты молекулы. Glu и Gly — места связывания глутамата и глицина. Овалами показаны области координации проходящих ионов и Mg²⁺ в местах связывания внутри ионной поры.

служат местом связывания глицина (Gly). В зависимости от конкретного субъединичного состава NMDAR приобретают различные свойства. Различия затрагивают как проводимость и селективность ионных каналов, так и их кинетику активации и десенситизации. Например, рецепторы содержащие NMDAR2A субъединицы десенситизируются быстрее, чем NMDAR2D.

К истинным агонистам и конкурентным антагонистам NMDA рецепторов относятся соединения, способные избирательно взаимодействовать непосредственно с Glu-связывающим местом рецептора — участком узнавания медиатора. В отличие от них, неконкурентные антагонисты блокируют канал NMDAR, связываясь с его каналоформирующими структурами. К агонистам NMDAR помимо L-глутамата относятся сама NMDA, иботеновая кислота, (RS)-(тетразол-5-ил), аспартат и другие. К антагонистам конкурентного типа действия относятся DL-AP5, DL-AP7, CPP, NPC17742 и другие. Они взаимодействуют с местами узнавания Glu, предотвращая его связывание и активацию рецептора (Петров и др., 1997).

Глицин является коагонистом исключительно для NMDAR (Johnson, Ascher, 1987). Его эффект проявляется при низких концентрациях (ED₅₀ составляет 10–30 μM). Связывание Gly NMDAR1 субъединицей приводит к существенному повышению вероятности активации канала. Частично этот процесс может объясняться уменьшением скорости десенситизации NMDA рецептора. Gly в концентрации 1–10 μM увеличивает амплитуду ответов клеток на NMDA. При полном отсутствии глицина рецептор не активируется или слабо

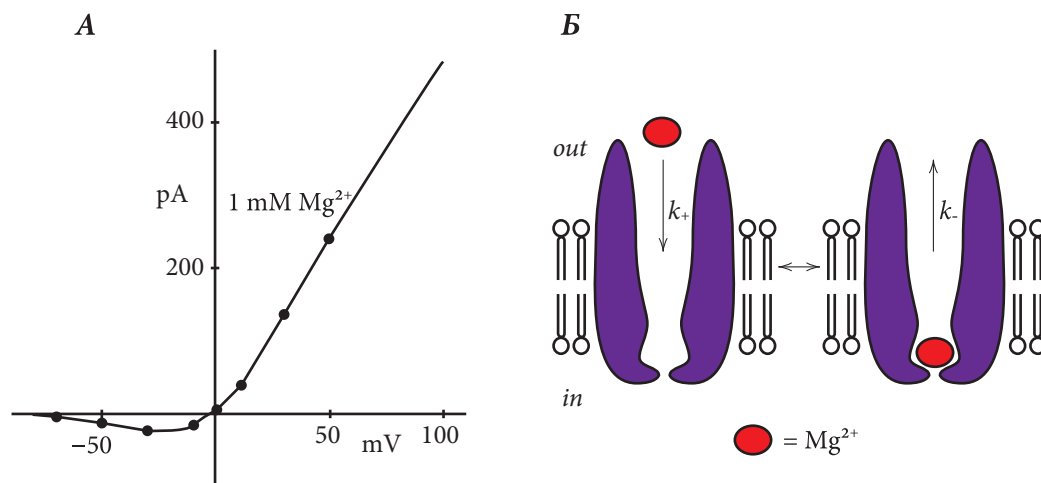


Рис. 3. Блокада канала NMDAR наружным Mg^{2+} . А) вольт-амперная характеристика интегрального тока через NMDAR. Входящий ток почти полностью блокирован. Б) модель блокады. Ион Mg^{2+} , взаимодействуя с каналом, предотвращает прохождение ионов.

активируется L-глутаматом. Агонистом Gly на NMDAR является D-серин, который так же, как и глицин, может иметь эндогенную природу. Одним из эндогенных антагонистов может служить естественный метаболит триптофана — кинуреновая кислота. Она синтезируется в глиальных клетках и содержится в большом количестве в нервной ткани. Блокада кинуреновой кислотой NMDA-индуцированных ответов может сниматься добавлением глицина или D-серина.

Существенное влияние на функцию GluR оказывают посттрансляционные модификации, важнейшей из которых является фосфорилирование рецепторных субъединиц. В норме в мозгу от 10 до 70% NMDAR1 и NMDAR2 субъединиц NMDA рецепторов фосфорилированы по нескольким сайтам. Изменение соотношения фосфорилированных и не фосфорилированных рецепторов в значительной мере определяет возможности тонкой регуляции глутаматергической синаптической передачи.

Пути регуляции активности NMDA рецепторов в ЦНС многообразны. Одним из важнейших эндогенных модуляторов является Mg^{2+} , который может проявлять несколько типов действия. В частности, наружный Mg^{2+} способен потенцировать активность NMDA рецепторов, повышая сродство глицина к рецептору, и посредством глицин — независимого механизма. В определенных условиях Mg^{2+} также проникает через каналы NMDA рецепторов. Наиболее важным представляется потенциалозависимый блок входящих токов NMDAR наружным Mg^{2+} , приводящий к тому, что для интегральных токов становится характерным выходящее выпрямление (рис. 3 А). Кроме того, кислотность среды (содержание в ней H^+), ионы Zn^{2+} и полиамины (спермин и спермидин) способны взаимодействовать с NMDAR, изменяя эффективность их функционирования (McBain, Mayer, 1994; Dingledine et al., 1999).

Механизм блокирующего действия Mg^{2+} заключается в том, что этот ион входит в открытый канал и взаимодействует с дискретным местом связывания (Mayer et al., 1984; Nowak et al., 1984), тем самым препятствуя прохождению моновалентных катионов Na^+ , K^+ и Ca^{2+} — основных носителей тока (рис. 3 Б). В дальнейшем блокирующий ион в большинстве случаев диссоциирует обратно во внеклеточный раствор, хотя при существенной гиперполяризации мембраны часть ионов может проникать через канал внутрь клетки. Место связывания наружного Mg^{2+} расположено достаточно глубоко в области трансмембранной поры рецептора, на которой происходит полное падение мембранного потенциала. В результате этого сродство наружного Mg^{2+} к его месту связывания в канале зависит от трансмембранной разности потенциалов: чем мембранный потенциал отрицательнее, тем выше сродство Mg^{2+} и эффективность блока NMDA каналов (рис. 3 А).

Для ингибирования интегральных токов блокаторами каналов существенным является взаимодействие блокирующей молекулы или иона с воротным механизмом канала. Например, «последовательные» блокаторы NMDA каналов, к которым можно отнести 9-аминокридин, IEM-1857 и тетрапентиламмоний, связываясь с каналом с относительно низкой равновесной константой диссоциации (K_D), измеренной в экспериментах на токах одиночных каналов, являются исключительно слабыми ингибиторами интегральных токов из-за того, что, находясь в канале, они препятствуют его закрыванию. Другое дело блокада по механизму «ловушки». В этом случае, закрываясь, канал фиксирует блокирующую молекулу или ион внутри. В настоящее время имеются веские доказательства того, что, находясь в канале NMDA рецепторов, блокирующий ион Mg^{2+} не препятствует его закрыванию и активации, т.е. захватывается каналом. Как следствие ED_{50} ингибирования Mg^{2+} интегральных токов NMDA рецепторов равняется кажущейся K_D , определенной в экспериментах на одиночных каналах. Это обстоятельство является существенным для моделирования блокады Mg^{2+} интегральных токов в различных экспериментальных условиях (Sobolevsky, 2003).

Обнаружено несколько молекулярных структур канала NMDA рецепторов, оказывающих влияние на блок наружным Mg^{2+} . Ключевыми для координации иона Mg^{2+} в канале в процессе блокады являются N-сайт, локализованный на вершине M2 области, и расположенный по соседству остаток аспарагина NR2 субъединицы (рис. 2). Однако было обнаружено несколько других областей рецептора, также существенно влияющих на блок наружным Mg^{2+} . Эти области выстилают наружный и внутренний вестибулы поры и вряд ли могут участвовать в формировании места связывания Mg^{2+} . Диффузное распределение структурных элементов, ответственных за Mg^{2+} блок, кажется несовместимым с представлениями о существовании дискретного места связывания для Mg^{2+} в канале. Эти расхождения в дополнение к необычайно высокой потенциалозависимости Mg^{2+} блока значительно осложняют его интерпретацию.

Объяснение этим загадочным фактам были выдвинуты на основе экспериментов по регистрации токов одиночных каналов (Antonov et al., 1998). С помощью органических блокаторов было обнаружено существование двух мест связывания для проникающих ионов в наружном и одного места их связывания во внутреннем вестибулях ионной поры NMDA рецепторов (рис. 2). Также было показано, что проникающие ионы имеют очень сильное влияние на кинетику канального блока и деблокирования Mg^{2+} в NMDAR (Antonov, Johnson, 1999). Из этих исследований стало ясно, что потенциалозависимое проникновение внутриклеточных ионов и их взаимодействие с местами связывания в наружном вестибуле NMDA рецепторов приводит к завышенной оценке потенциалозависимости Mg^{2+} блока.

Важным следствием конкуренции ионов в поре канала является возможность регуляции эффективности Mg^{2+} блока концентрационными градиентами проходящих ионов в различных физиологических условиях.

В силу выше изложенного NMDAR способны пропускать ток только в результате деполяризации постсинаптической мембраны, которая в физиологических условиях квантовой секреции следует за активацией AMPAR и приводит к разблокированию каналов NMDAR. Эта уникальная особенность и высокая проницаемость для Ca^{2+} (Burnashev et al., 1995), позволяет NMDAR играть важную роль в ЦНС, участвуя в таких функциональных процессах, как синаптическая пластичность, обучение, формирование памяти, развитие мозга при эмбриогенезе. Аналогично Mg^{2+} такие неконкурентные антагонисты NMDAR, как кетамин, декстрометорфан, мемантин, фенциклидин и (+)-5-метил-10,11-дигидро-5Н-дibenзоциклопентен-5,10-имин мелеат [(+)МК-801] блокируют каналы NMDAR в открытом состоянии, хотя кинетика блокады и зависимость от мембранного потенциала их эффектов значительно варьируют.

Помимо ионов Mg^{2+} в регуляции функционирования NMDAR участвуют также ионы цинка (Christine, Choi, 1990). В системе центральных нейронов добавление ионов Zn^{2+} уменьшает вызванные агонистами NMDAR деполяризацию мембраны нервных клеток и нейротоксические изменения. Согласно проведенным исследованиям, механизмы действия Mg^{2+} и Zn^{2+} различаются, так как место действия Zn^{2+} находится вблизи от участка связывания медиатора. Известно также, что в глутаматергических нервных окончаниях существует связанный пул Zn^{2+} в синаптических везикулах, который освобождается в синаптическую щель во время синаптической активности вместе с медиатором. По-видимому, ионы Mg^{2+} , Ca^{2+} и Zn^{2+} являются значимыми эндогенными регуляторами NMDAR.

AMPA и KAR обладают гораздо более быстрой кинетикой активации и вовлечены в передачу быстрых возбуждающих постсинаптических потенциалов. Как и NMDAR они являются гетеромерными структурами и состоят из 4 субъединиц, каждая из которых в отличие от NMDAR способна связывать и активироваться Glu. Глицин не является коагонистом этих рецепторов. Канал AMPAR может состоять из четырех различных типов субъединиц (GluR1–GluR4), в то время как KAR — из пяти различных типов субъединиц (GluR5–GluR7 или KA1 и KA2). AMPAR, имеющие в своем составе GluR2, непроницаемы для Ca^{2+} и слабо блокируются органическими каналоблокаторами и внутриклеточным спермином. Напротив, отсутствие в AMPAR GluR2-субъединицы приводит к тому, что канал обладает проводимостью для Ca^{2+} и имеет входящее выпрямление из-за блокады выходящих токов внутриклеточным спермином. На основе замены AMPAR одного состава на другой может происходить регуляция синаптических ответов в условиях тетанической стимуляции (см. также обзор И. Ю. Павлова в данном пособии). Из наиболее известных конкурентных антагонистов можно выделить 6-циано-7-нитрохиноксалин-2,3-дион (CNQX) и 6,7-динитрохиноксалин-2,3-дион (DNQX). Однако эти антагонисты могут селективно блокировать AMPAR и KAR только в присутствии в среде глицина. Это происходит из-за их большего родства к глицин-связывающему сайту в NMDAR.

Десенситизация GluR является основным молекулярным механизмом, ограничивающим длительность постсинаптического сигнала. GluR различаются по кинетическим параметрам десенситизации. NMDAR переходят в десенситизированное состояние медленно. Описано несколько механизмов их десенситизации. AMPAR и KAR переходят в десенситизированное состояние быстро, причем, как правило, длительность десенситизации этих рецепторов больше. В зависимости от скоростей открывания и закрывания каналов, десенситизация

может удлинять или укорачивать длительность синаптических токов. В нормальных условиях синаптического сигнала, когда AMPAR, KAR и NMDAR колокализированы в постсинаптической мембране, высвобождаемый из пресинапса Glu активирует в первую очередь AMPAR и KAR, вызывая местную деполяризацию постсинаптической мембраны, что приводит к снятию Mg^{2+} блока каналов NMDAR. Суммарный возбуждающий постсинаптический ток (ВПСТ) приобретает более медленную кинетику или становится двухфазным и сопровождается входом кальция в клетку. Увеличение частоты разрядов пресинаптического нейрона может привести к тому, что концентрация остаточного Glu в синаптической щели возрастёт, так как системы захвата не будут успевать его откачивать. При этом может происходить значительное увеличение концентрации свободного Ca^{2+} в цитозоле. Если стимуляция будет чрезмерно длительной, то в клетке могут включаться механизмы апоптоза, в результате активации Ca^{2+} NO-синтазы и процессов образования активных форм кислорода. Вкратце, таким путем нормальная функция передачи возбуждения Glu может трансформироваться в нейротоксическое действие за счет «эксайтотоксичности» (excitotoxicity).

Нейротоксическое действие глутамата

Итак, глутамат, являясь ключевым возбуждающим медиатором физиологической коммуникации между нервными клетками, при определенных условиях активации GluR приводит к гибели нейронов — термин, получивший название «эксайтотоксичность» (от англ. «excitotoxicity» — токсичность, развивающаяся при возбуждении; Choi, 1992). Предполагается, что эксайтотоксичность проявляется при многих типах острых и хронических нейродегенеративных расстройств ЦНС и связана с аккумулярованием свободного Ca^{2+} в цитозоле нейронов. Нарушения глутаматного обмена, вероятно, играют решающую роль в нейропатологии, индуцированной другими факторами, например, образованием свободных радикалов, что способствует усилению нейротоксического потенциала эндогенного глутамата (Parsons et al., 1998).

Нейродегенерация, т. е. гибель нейронов, происходит, как при нормальном функционировании ЦНС, в частности, в эмбриональном развитии, так и в условиях патологии, вызванной различными факторами. В условиях нормального функционирования гибель нейронов в основном осуществляется по механизму апоптоза. Другой механизм гибели — некроз характеризуется набуханием клетки и нарушением целостности плазматической мембраны. Как один механизм, так и другой могут опосредоваться некими деструктивными факторами, которые вызывают нарушения в функционировании клеток. Говоря о ЦНС, к таким факторам можно отнести энергетическую депривацию, недостаток кислорода (ишемия), перевозбуждение и др. (Choi, 1992; Lipton, 1999).

В значительной мере нарушения функционирования пресинаптических элементов определяется существенным изменением концентрационных ионных градиентов во внеклеточном растворе и цитозоле нейронов и глиальных клеток: происходит накопление натрия и существенное снижение концентрации калия внутри клеток. Поскольку направленность транспорта трансмембранными помпами и нейромедиаторными транспортерами зависит от содержания Na^+ и K^+ снаружи и внутри, вместо захвата нейромедиаторов из наружного раствора происходит их освобождение за счет реверсии транспорта посредством некантовой секреции (Antonov, Magazanik, 1988; Szatkowski et al., 1990). Показано, что освобождение Glu посредством этого механизма значительно усиливается в условиях энергетической депривации (Rossi et al., 2000). Такие нарушения вызывают существенное повышение

свободной концентрации глутамата в межклеточном пространстве. К постсинаптическим факторам нейродегенерации относятся: активация различных типов GluR и деполяризация нейронов, нарушение мембранных ионных градиентов, и вход значительного количества Ca^{2+} в клетки, который запускает внутриклеточные каскады, приводящие к их гибели. В дальнейшем эти процессы могут привести к нейродегенерации, а гибель нейронов может происходить как по механизму апоптоза, так и по механизму некроза.

Чрезмерная активация GluR может иметь катастрофические последствия. Огромное количество заболеваний является следствием цитотоксичности, опосредуемой через глутаматные рецепторы. Сюда относятся болезни Паркинсона, Альцгеймера, шизофрения, судорожный синдром, включая эпилепсию, гипоксии различного происхождения. Массивный выброс глутамата за счет реверсии транспорта при гипоксии играет ключевую роль в повышении его внеклеточной концентрации, и как следствие, в генерации аноксической деполяризации с последующей дисфункцией нейронов. Большое внимание в настоящее время уделяется роли NMDAR в развитии шизофрении. Предполагается, что протекание этого заболевания частично связано со снижением эффективности глутаматергической передачи. Так, блокада NMDAR неконкурентным антагонистом фенциклидином приводила к возникновению симптомов этого заболевания. Нарушения функции NMDAR коррелируют с ментальными расстройствами и изменениями социального поведения, наблюдаемыми у больных шизофренией (Meldrum, 1992; Parsons et al., 1998).

В настоящее время данные многих авторов указывают на то, что при развитии токсического действия Glu, механизмы, определяющие ионный гомеостаз, с одной стороны, и энергетику клетки, с другой, тесно сопряжены. Было показано, что через активированные каналы GluR в нейрон поступают ионы Na^+ и Ca^{2+} и выходят в межклеточное пространство ионы K^+ . Деполяризация мембраны, обусловленная в основном входом в нейроны Na^+ , приводит к тому, что Ca^{2+} начинает поступать в клетки и через потенциалзависимые Ca^{2+} -каналы (Choi, 1995). Имеется еще два потенциальных источника поступления Ca^{2+} в цитоплазму при активации GluR. Это эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Выход Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума, в частности, вызывается инозитолтрифосфатом, который образуется в результате активации фосфоинозитидного обмена под влиянием взаимодействия глутамата с метаботропным рецептором пятого типа (mGlu5).

Ранее была обнаружена корреляция между токсическим действием возбуждающих аминокислот и накоплением внутриклеточного Ca^{2+} при гиперактивации NMDAR. Если в норме концентрация свободного кальция в цитоплазме ниже 0,1 мкМ, то после активации GluR нейронов концентрация этого иона может составлять 8-16 мкМ, а также выявляется накапливание Ca^{2+} в митохондриях. Эти органеллы в присутствии избытка фосфата могут аккумулировать 200 нМ Ca^{2+} /мг собственного белка (Brustovetsky, Dubinsky, 2000). Накопление Ca^{2+} митохондриями зависит от мембранного потенциала этих органелл, что указывает на электрогенный характер транспорта Ca^{2+} в митохондриях. Мембранный потенциал митохондрий может рассматриваться как фактор, в конечном счете вносящий вклад в регуляцию концентрации Ca^{2+} в цитоплазме нейрона, что должно наблюдаться и в условиях активации GluR (Khodorov, 2004). Имеются также предположение, что развитие глутаматной токсичности непосредственно связано со способностью митохондрий депонировать Ca^{2+} , особенно учитывая тот факт, что на цитоплазматической стороне NMDAR существуют участки для связывания Ca^{2+} . При попадании Ca^{2+} на эти участки происходит инактивация NMDA-каналов. Митохондрии, находясь вблизи этих Ca^{2+} -связывающих центров, могут активно перехватывать этот ион, понижая его локальную концентрацию вблизи мест связы-

вания и предотвращая инактивацию и десенситизацию NMDAR. При этом захват Ca^{2+} митохондриями не предотвращает накопление Ca^{2+} в других участках тела нейрона в условиях активации NMDAR, что ведет к кальциевой «перегрузке» сначала цитоплазмы, а впоследствии и митохондрий. Однако в нормальных физиологических условиях захват Ca^{2+} митохондриями может быть необходимым для предупреждения преждевременной инактивации NMDAR и ослабления синаптической передачи (Budd, Nicholls, 1996).

Высокая концентрация внутриклеточного Ca^{2+} является обязательным условием нейронной гибели, вызванной гиперстимуляцией NMDAR, при наличии электрогенного транспорта Ca^{2+} в митохондриях (Stout et al, 1998). Это указывает на определяющую роль митохондрий в инициации нейронной гибели при глутаматной токсичности. Видимо, именно вызванная кальциевой «перегрузкой» деструкция митохондрий, требующая функционирования дыхательной цепи и окислительного фосфорилирования, является ключевым моментом инициации гибели нейронов. Это предположение подтверждается тем, что одновременное ингибирование дыхательной цепи митохондрий ротеноном и АТФ-синтазы олигомицином не только в значительной мере защищает нейроны от гибели, вызванной гиперстимуляцией GluR, но и предотвращает снижение уровня АТФ и ведет к нормализации уровня свободного цитоплазматического Ca^{2+} (Khodorov, 2004).

Апоптоз и некроз — два варианта клеточной гибели

В настоящее время является общепризнанным то, что ключевым фактором патогенеза многих заболеваний нервной системы является гибель нейрона, которая может быть двух видов: запрограммированная клеточная смерть (апоптоз) и патологическая клеточная смерть (некроз). При этом прекращение жизнедеятельности клетки в процессе апоптоза и некроза имеет четкие морфологические и биохимические различия (Cafforio et al., 1996; Philpott et al., 1996).

Апоптоз, как явление, впервые был описан морфологами. Он характеризуется переходом фосфатидилсерина из внутреннего монослоя плазматической мембраны в наружный монослой. Его отличительной чертой является коллапс ядра (рис. 4). Хроматин, который в норме представлен открытыми и конденсированными областями (гетеро- и эухроматин), становится суперконденсированным в форме полумесяца по периферии ядра. В этот момент начинается фрагментация ДНК. На ранних стадиях апоптоза, в отличие от некроза, клетка сморщивается, теряя до 1/3 своего объема за несколько минут. Механизм этого явления до сих пор не изучен, но, несомненно, в этот процесс должны вовлекаться транспорт ионов и воды. Важной особенностью этого процесса является то, что не происходит повреждения мембран клетки. Уменьшение размеров хорошо выражено как в культуре клеток нейронов, так и в тканевых срезах, где апоптотическая клетка отделяется от соседних. Далее апоптотическая клетка превращается в совокупность окруженных мембраной апоптотических телец различных по своему составу, которые фагоцитируются макрофагами или соседними клетками. Клетка на данном этапе еще живая (включение мембранонепроницающего красителя трипанового синего не происходит).

В отличие от апоптоза, при некрозе клетки набухают, их митохондрии и другие органеллы расширяются, что приводит к деструкции и разрыву внутриклеточных и плазматической мембран (рис. 4). В результате этого активируются лизосомальные ферменты, а внутриклеточное содержимое, попадая во внеклеточную среду, вызывает воспалительные процессы. Классические причины, приводящие к некрозу клетки — гипертермия, ингиби-

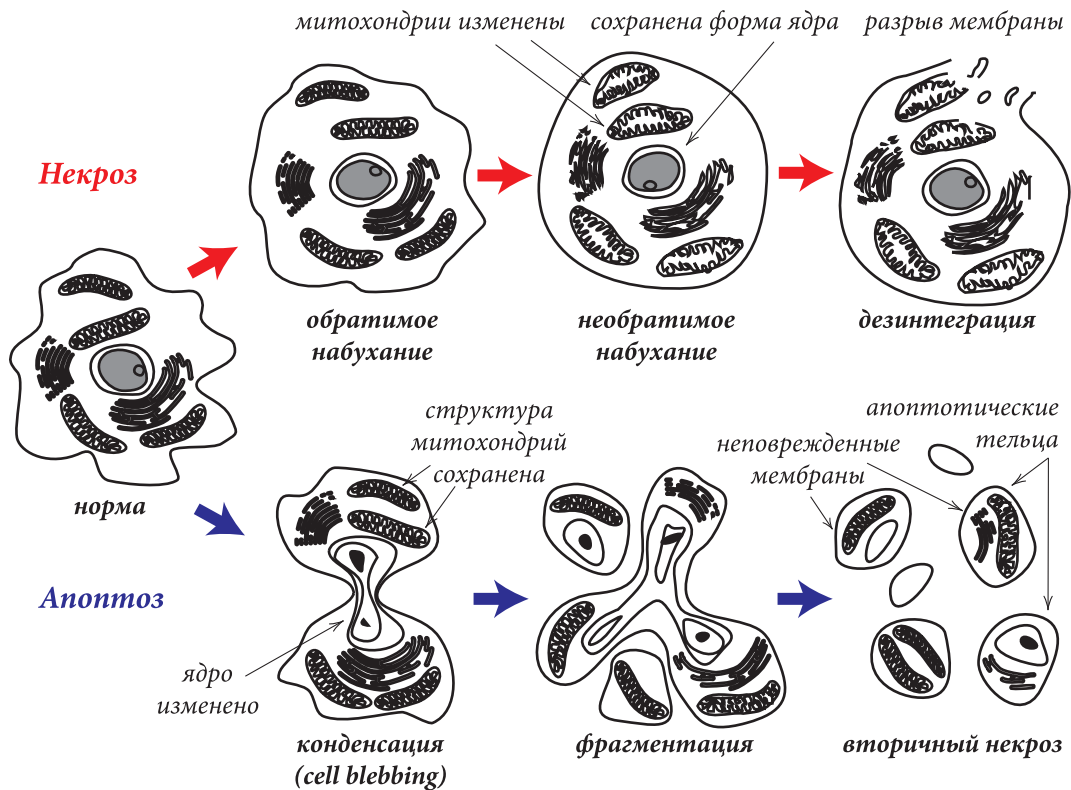


Рис. 4. Основные отличительные черты некроза и апоптоза.

рование окислительного фосфорилирования, гликолиза или цикла Кребса, гипоксия, действие различных токсинов.

Морфологические изменения, характерные для процессов гибели большинства клеток, по механизму апоптоза или некроза, имеют сходство. Однако, важной морфологической особенностью связанной с гибелью нервной клетки, является появление варикозных деформаций отростков (Лаврентьев, 1939; рис. 5). Данный процесс, заключающийся в реактивной морфологической перестройке нейрона при дегенерации, был впервые описан Вейсманом (Weismann, 1860).

История изучений реактивных изменений свидетельствует о том, что накопление описательной морфологией данных о статике нейрона закономерно предшествовало формированию представлений о возможной перестройке его структур и об их динамике изменений. Литература по нейроморфологии богата примерами, когда фазы динамической перестройки элементов нейрона вначале принимались исследователями за статические структуры (варианты, типы строения). Результаты работ многих исследователей позволяют сделать выводы о том, что варикозности не являются специфической принадлежностью каких-либо определенных волокон. Они наблюдаются на всех уровнях и аксонов, и дендритов во всех отделах нервной системы всех видов животных. Чаще всего они обнаруживаются в концевых разветвлениях аксонов и дендритов, то есть в участках с выраженной структурной подвиж-

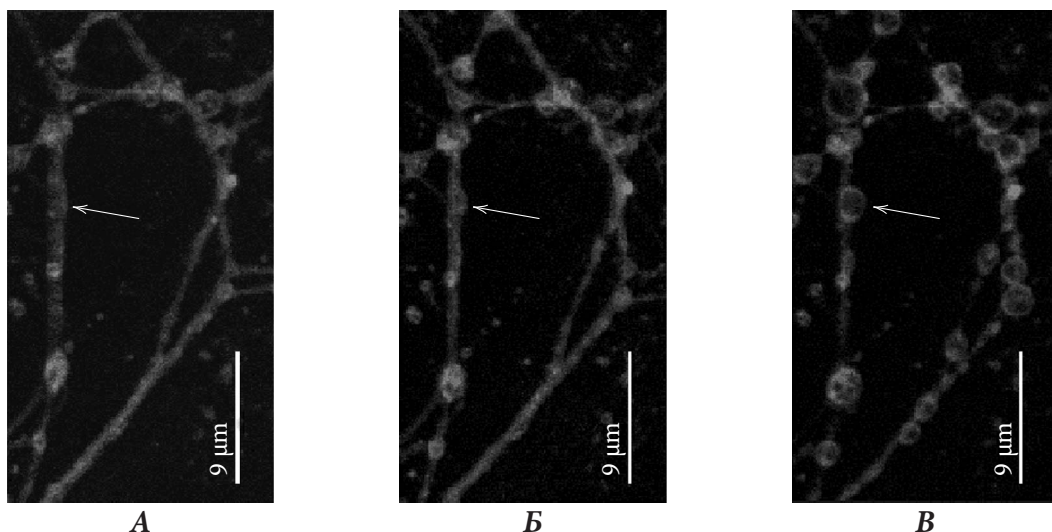


Рис. 5. Динамика варикозных деформаций в первичной культуре ткани нейронов коры головного мозга крыс при нейротоксическом действии $30 \mu\text{M}$ NMDA. А–В) Кадры серийной микросъемки при конфокальной микроскопии. Прижизненная окраска ANEPPS. Стрелками показано место образования варикозных деформаций нервного волокна. А) после 30 мин. воздействия NMDA ($30 \mu\text{M}$); Б) 60 мин.; В) 90 мин.

ностью (Куприянов, 1962; Майоров, 1969; Сотников, 1976). Следует отметить неспецифичность данного процесса, поскольку ряд исследователей наблюдал его при воздействиях различного рода. При патологических изменениях в результате токсического действия агентов и при ишемическом поражении наблюдается набухание варикозностей нерва. В дальнейшем происходит истончение и разрыв аксиального тяжа и наступает полная фрагментация нервного волокна. Эти процессы также наблюдаются при нейродегенерации нейронов коры в первичной культуре ткани (рис. 5). Морфологической границей между обратимыми и необратимыми изменениями является момент разрыва аксиального тяжа.

Апоптоз играет жизненно важную роль в процессе эмбрионального и онтогенетического развития. Он наблюдается при различных морфогенетических процессах. Хорошо исследована апоптотическая гибель клеток при эмбриональном развитии беспозвоночных животных, например нематоды (*Caenorhabditis elegans*). Изучена также запрограммированная клеточная гибель в процессе эмбриогенеза высших позвоночных при развитии глаза млекопитающих, сердца, нервной системы. Во взрослом организме апоптоз распространен в различных типах тканей и встречается как в медленно пролиферирующей популяции клеток (гепатоциты, клетки эпителия коры надпочечников), так и в быстро пролиферирующих клеточных популяциях. В первом случае он выполняет функцию гомеостатической регуляции оптимального объема ткани. Во втором случае роль апоптоза, в основном, связана с дифференцировкой клеток.

Все более очевидной становится роль апоптоза как при острых заболеваниях и повреждениях нервной системы (ишемия, травма), так и при нейродегенеративных болезнях (бо-

лезнь Альцгеймера, боковой амиотрофический склероз, болезнь Паркинсона). Вдобавок, многие исследователи высказывают мнение о вовлеченности нейротоксического действия Glu в патогенез вирусных и прионовых энцефалитов (Arends, Wyllie, 1991).

Апоптоз является широко распространенным общебиологическим механизмом, ответственным за поддержание постоянства численности клеток, формообразование новых клеток и выбраковку дефектных клеток. Его индукторами могут быть неспецифические факторы, такие как температура, токсические агенты, оксиданты, свободные радикалы, гамма и УФ-излучение, бактериальные токсины и др. Во всех этих случаях происходит индукция апоптоза, но при увеличении дозы соответствующего агента может развиваться некроз клетки.

Регуляция апоптоза в нервной системе осуществляется многочисленными сигнальными каскадами. Причем пути реализации этого процесса могут быть различными: модуляция активности ферментов, модуляция факторов транскрипции (p53, AP-1, NF- κ B), прямая активация генов раннего немедленного ответа (c-jun, c-fos) (Завалишин, Захарова, 1996). На сегодняшний день выявлен ряд веществ, способных как активировать, так и замедлять развитие апоптоза. К ингибиторам апоптоза относится семейство белков IAP (апоптоз ингибирующих белков). Все IAP — протеины на N-конце содержат от 1 до 3 специфических повторов (примерно по 70 аминокислотных остатков в каждом), которые ответственны за ингибирующую функцию (Deveraux, Reed, 1999). В настоящее время у человека идентифицировано 6 видов белков IAP — семейства: NAIP, cIAP-1, cIAP-2, XIAP, Survivin и BRUCE. Белки cIAP-1, cIAP-2 и XIAP ингибируют ключевые каспазы 3, 7 и 9 путем связывания с участками, с которыми взаимодействуют активаторы фермента. Белок NAIP ингибирует каспазы 1, 3, 6, 7 и 8.

Индукция апоптоза может осуществляться при воздействии как внешних, так и внутренних факторов, приводящих к возрастанию входа Ca^{2+} внутрь клетки, а также к повышению экспрессии или развитию мутации генов-активаторов апоптоза. Наиболее часто внешняя активация апоптоза в нейронах осуществляется в результате токсического действия глутамата. Основой этого феномена является активация GluR, вызывающая нарушение градиентов K^+ , Na^+ , Cl^- и Ca^{2+} между вне- и внутриклеточным пространствами. Результатом активации ионотропных рецепторов (наиболее часто — NMDAR) является повышенный вход Ca^{2+} в клетку с последующей стимуляцией протеаз и разрушением клеточных структур. Этот процесс сопровождается также возрастанием перекисного окисления липидов и последующим развитием окислительного стресса (Carpenter, 2002).

Молекулярные механизмы апоптоза

Применительно к клеткам животных и человека апоптоз в большинстве случаев связан с протеолитической активацией каскада каспаз — семейства эволюционно консервативных цистеиновых протеаз, которые специфически расщепляют белки после остатков аспарагиновой кислоты (Cohen, 1997). Все представители семейства каспаз (для млекопитающих известно 14 видов) характеризуются сходством в аминокислотных последовательностях, структуре и функциональной значимости. Каспазы присутствуют в цитоплазме в виде проэнзимов и активируются до полностью функциональных протеаз путем расщепления проэнзима на большую и малую субъединицы и дальнейшего отщепления от них N-концевых доменов. Затем субъединицы собираются в активные олигомеры. Расщепление прокаспаз могут осуществлять различные протеазы, в том числе и другие каспазы. Однако, апоптоз

возможен и без участия каспаз, поскольку сверхсинтез белков-промоторов апоптоза *Bax* и *Bak* индуцирует программированную клеточную смерть в присутствии ингибиторов каспаз (Xiang et al, 1996).

В каскаде реакций активации каспаз выделяют две функциональные группы протеазных молекул: инициаторы и эффекторы. Первым (каспаза 2, 8, 9, 10) принадлежит роль активирования новых видов протеиназ. Эффекторы же (каспаза 3, 6, 7) вызывают деструкцию специфичных субстратов, нарушая интеграцию клеточных подсистем. Обе группы характеризуются существенными различиями в структуре терминального домена.

Каспазы постоянно присутствуют в клетках, даже в нейронах, которые не обновляются на протяжении всей жизни. Существуют три основных пути развития каскада активации каспаз. Один из путей связан с взаимодействием индуктора апоптоза со специфическими рецепторами (например, активация каспазы 8 при взаимодействии *Fas* лиганда с *Fas* рецептором). Другой путь — активация каспазы 9—заключается в образовании гетеродимеров из семейства *Bcl-2*. И, наконец, третий путь активации каспаз — при помощи сериновой протеиназы — гранзима *B*. Этот путь запускается при индукции апоптоза клетки цитотоксическими Т-лимфоцитами и НК-клетками, секретирующими эти ферменты. Необходимо также присутствие поробразующих белков перфоринов, продуцируемых цитотоксическими клетками. В качестве мишеней гранзимов *B* выступают каспазы 3, 7 и 10.

Наиболее встречающиеся пути реализации апоптоза при активации каспаз заключаются в следующем.

1. Лиганд рецепторный путь инициируется посредством связывания специфических киллерных лигандов (*Fas*-лиганд, *TNF* — фактор некроза опухоли и др.) со своими рецепторами, что вызывает рекрутирование к ним адаптерных белков и прокаспаз, в частности прокаспазы 8 (Nagata, 1997). Агрегация молекул прокаспазы 8 достаточна, чтобы инициировать их расщепление и образование активных форм каспазы 8, которая, в свою очередь, индуцирует до активных форм эффекторные каспазы 3, 6, 7. До момента активации каспазой 8 каспазы 3 апоптоз является обратимым процессом. Существуют регуляторы, которые блокируют или, напротив, усиливают разрушительное действие каспаз на этой стадии. К ним относятся белки *Bcl-2* (ингибиторы апоптоза: *A1*, *Bcl-2*, *Bcl-W*, *Bcl-XL*, *Brag-1*, *Mcl-1* и *NR13*) и *Bax* (промоторы апоптоза: *Bad*, *Bak*, *Bax*, *Bcl-XS*, *Bid*, *Bik*, *Vim*, *Hrk*, *Mtd*). Эти белки эволюционно консервативны: гомолог *Bcl-2* обнаружен даже у губок *Geodia cydonium* и *Suberites domuncula*, у которых апоптоз необходим для морфогенеза (Adams, Cory, 1998).

2. При другом пути индукции апоптоза ключевую роль играют митохондрии, поэтому его называют митохондриальным путем. Во время эффекторной фазы митохондриального пути апоптоза, как правило, происходит увеличение концентрации Ca^{2+} в цитоплазме. Основными источниками увеличения ионов Ca^{2+} в клетке служат межклеточные пространства, матрикс митохондрий и эндоплазматический ретикулум. Увеличение содержания Ca^{2+} в цитозоле ведет к активации эндонуклеаз, тканевой трансглутаминазы и клеточных протеаз, участвующих в деградиционной фазе. Увеличение внутриклеточной концентрации кальция ведет к нарушению проницаемости митохондриальной мембраны, в результате чего происходит свободная диффузия различных ионов. Падение мембранного потенциала обусловлено увеличением проницаемости внутренней мембраны митохондрий (*permeability transition*) вследствие образования гигантских пор (Kroemer et al, 1997).

Разнообразны факторы, вызывающие раскрытие пор. К ним относятся истощение клеток восстановленным глутатионом, *NAD(P)H*, *АТФ* и *АДФ*, образование активных форм

кислорода, разобщение окислительного фосфорелирования протонофорными соединениями, увеличение содержания Ca^{2+} в цитоплазме. Образование пор в митохондриях можно вызвать церамидом, NO, каспазами, амфипатическими пептидами, жирными кислотами. Поры имеют диаметр 2,9 нм, позволяющий пересекать мембрану веществам с молекулярной массой 1,5 кДа и ниже. Следствием раскрытия поры является набухание митохондриального матрикса, разрыв наружной мембраны митохондрий и высвобождение растворимых белков межмембранного объема. Среди этих белков — ряд апоптогенных факторов: цитохром С, прокаспазы 2, 3 и 9, белок AIF (apoptosis inducing factor), представляющий собой флавопротеин с молекулярной массой 57 кДа. Прокаспазы 3 обнаруживаются как в межмембранном объеме митохондрий, так и в цитоплазме. После высвобождения цитохрома С в цитоплазму он связывается с белком APAF-1 и стимулирует образование его олигомеров. Это, в свою очередь вызывает рекрутирование на образовавшийся комплекс молекул прокаспазы 9, их агрегацию, аутопроцессирование и формирование активного комплекса каспазы 9. На следующем этапе происходит рекрутирование на этот комплекс молекул прокаспазы 3 и их процессирование до активных форм, которые расщепляют ключевые мишени и вызывают апоптоз. Следует заметить, что повреждение и стрессы приводят к выходу из митохондрий не только цитохрома С, но и ряда других молекул, в частности протеазы AIF. При этом существует взаиморегуляция сигнальных путей, активируемых рецепторами смерти и повреждающими воздействиями (рис. 6). Так, активация каспазы 8, вызванная активацией рецепторов смерти, не только напрямую активирует эффекторные каспазы, но и индуцирует увеличение проницаемости митохондриальной мембраны и активацию регуляторной каспазы 9. С другой стороны, при повреждениях и стрессах может наблюдаться повышение экспрессии рецепторов смерти — Fas и Killer/DR5.

Таким образом, проапоптотические сигналы амплифицируются, что позволяет надежнее достигать необходимого эффекта. Образование гигантских пор не является единственным механизмом выхода межмембранных белков митохондрий в цитоплазму. Предполагается, что разрыв наружной мембраны митохондрий может быть вызван гиперполяризацией внутренней мембраны (ср. с гипополяризацией при раскрытии гигантских пор). Возможен и альтернативный механизм, без разрыва мембраны, — раскрытие гигантского белкового канала в самой наружной мембране, способного пропускать цитохром С и другие белки из межмембранного пространства (Green, Reed, 1998).

3. Существует механизм активации апоптоза независимо от каспаз (Leist, Jaattela, 2001). Например, рецепторы с доменами смерти вызывают смерть клеток путем апоптоза, когда каскад каспаз ингибирован, а P53 вызывает гибель клеток у мышей накаутов по гену APAF1 (apoptotic protease-activating factor1). В poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) опосредованной клеточной гибели гиперактивация PARP-1 токсическим повреждением индуцирует ядерные сигналы гибели клетки (уменьшает NAD^+ , АТФ) и вызывает транслокацию AIF из митохондрий в ядро (Cregan et al., 2002). Зависимость транслокации AIF от активации PARP-1 показывает, что сигнальная система PARP может быть вовлечена в высвобождение AIF из митохондрий (рис. 6). Активные формы кислорода (АФК) и другие ДНК повреждающие агенты могут активировать проницаемость митохондрий, которая приводит к высвобождению AIF. Проницаемость митохондрий вызывает еще большее высвобождение АФК из митохондрий по механизму обратной связи.

Неизвестно перемещается ли endonuclease G (EndoG) в PARP опосредованной клеточной гибели, но, возможно, что AIF и EndoG действуют вместе, вызывая каспазо-независимую клеточную гибель (Wang et al., 2002). Poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) расщепляет

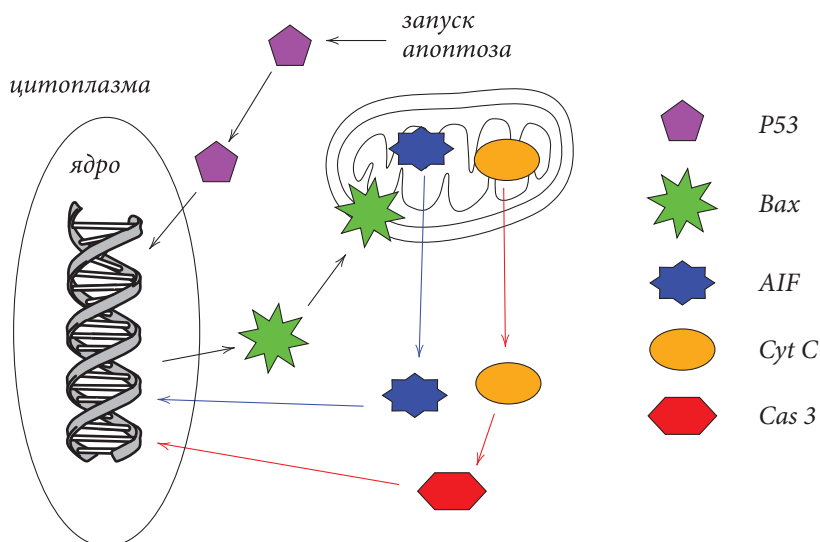


Рис. 6. Каспаз-зависимый и каспаз-независимый механизмы гибели нейронов. При запуске апоптоза (черные стрелки) в цитоплазме повышается уровень белка *P53*. Этот белок перемещается в ядро нейрона, где увеличивает синтез белка *Bax*. Вновь синтезированный белок *Bax* встраивается в мембрану митохондрий. В митохондриальной мембране этот белок взаимодействует с каналами и способствует их открытию. После открытия каналов из митохондрии начинает выходить её содержимое. В случае каспаз-независимого (синие стрелки) пути в цитоплазму выходит белок *AIF*, который направляется в ядро и вызывает разрушение ДНК нейрона. В случае каспаз-зависимого пути (красные стрелки) из митохондрии выходит цитохром *C*, который активирует каскад каспаз. В итоге молекулы прокаспазы 3 расщепляются, до активной формы. Активная форма каспазы 3 проникает в ядро нейронов и запускает разрушение ДНК.

poly (ADP-ribose) (PAR) полимеры с образованием PAR полимера и ADP-рибозы. Слабое повреждение ДНК запускает ее репарацию. Однако тяжелый инсульт, повреждение, которое вызывает сильное повреждение ДНК, приводит к гиперактивации PARP-1 и клеточной гибели.

Флавопротеин *AIF*, будучи добавленным к изолированным ядрам из клеток HeLa, вызывает конденсацию хроматина и фрагментацию ДНК, а при добавлении к изолированным митохондриям печени крыс — высвобождение цитохрома *C* и каспазы-9. Микроинъекция *AIF* в интактные фибробласты крыс приводит к конденсации хроматина по периферии ядра, разрыву ДНК на крупные фрагменты длиной 50 т. н. п. и больше, диссипации *Du* в митохондриях и переходу фосфатидилсерина из внутреннего слоя цитоплазматической мембраны в наружный. Ни один из этих эффектов *AIF* не предотвращается пептидным ингибитором каспаз — *N*-бензоилоксикарбонил-Val-Ala-Asp трифторметилкетон (Z-VAD.fmk), который предотвращает апоптоз, индуцированный микроинъекцированным цитохромом *C*. Эти данные показывают, что *AIF* является митохондриальным эффектором апоптоза у животных, действующим независимо от каспаз.

Все эти пути апоптоза могут реализовываться в условиях эксайтотоксичности. Имеются данные, что нейротоксическое действие, вызванное избирательной активацией NMDAR и AMPAR/KAR, сопровождается запуском различных апоптотических путей. Например, при гиперактивации NMDAR развитие апоптоза происходит по каспаз-независимому механизму с участием прямого освобождения AIF из митохондрий (Wang et al., 2004; Евстратова и др., 2008). Напротив, апоптоз вызванный активацией AMPAR/KAR развивается с участием каспаз (Евстратова и др., 2008). Это указывает на существование рецептор-селективных этапов развития и механизмов нейротоксического действия Glu.

В этой главе рассмотрен широкий круг вопросов, начиная от структуры глутаматергических синапсов, структурно-функционального строения ионотропных GluR, их функционирования в норме и патологии, и, заканчивая, механизмами эксайтотоксичности, т. е. нейротоксического действия глутамата.

Работа поддержана грантом РФФИ проект № 08-04-00423-а.

Список литературы

- Антонов С. М. (1989) Механизмы удаления глутамата как факторы, ограничивающие его пост-синаптическое действие. Физиология и биохимия глутаматергических синапсов. под ред. Мандельштам Ю. Е., Л., Наука, 110-121.
- Антонов С. М. (2001) Переносчики нейромедиаторов: рецепторная, транспортная и канальная функция. Журн. эвол. биохим. физиол., 37, 248-252.
- Евстратова А. А., Миронова Е. В., Дворецкова Е. А. И Антонов С. М. (2008) Апоптоз и рецепторная специфичность его механизмов при нейротоксическом действии глутамата. Росс. физиол. журн. им. И. М. Сеченова, 94, 380-393.
- Завалишин И. А. И Захарова М. Н. (1996) Оксидантный стресс — общий механизм повреждения при заболеваниях центральной нервной системы. Ж. неврологии и психиатрии им. С. С. Корсакова. 2, 111-114.
- Куприянов В. В. (1962) Проблемы морфологической адаптации нервных структур. В кн.: Исследования обратимости острых и хронических изменений внутренних органов. Сб. тр. Ин-та им. А. В. Вишневского. М., 158-187.
- Куффлер С. И Николс Дж. (1979) От нейрона к мозгу. М., Мир.
- Лаврентьев Б. И. (1939) Морфология антагонистической иннервации в автономной нервной системе и методы ее исследования. В кн.: Морфология автономной нервной системы. М. — Л., 13-83.
- Магазаник Л. Г., Антонов С. М. И Гмиро В. Е. (1984) Механизмы активации и блокирования постсинаптической мембраны, чувствительной к глутамату. Биол. мембраны, 1, 130-140.
- Майоров В. Н. (1969) Морфология реактивных состояний вегетативного межнейронного синапса. Л.
- Ноздрачев А. Д., Баженов Ю. И., Баранникова И. А. И др. (2001) Начала физиологии. Спб.
- Петров В. И., Пиотровский Л. Б., Григорьев И. А. (1997) Возбуждающие аминокислоты. Волгоград.
- Сотников О. С. (1976) Функциональная морфология живого мягкотного нервного волокна. Л., Наука.
- Adams J. M. & Cory S. (1998) The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. Science, 281, 1322-1326.
- Antonov S. M. & Johnson J. W. (1999) Permeant ion regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channel block by Mg^{2+} . Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 96, 14571-14576.
- Antonov S. M., Gmiro V. E. & Johnson J. W. (1998) Binding sites for permeant ions in the channel of NMDA receptors and their effects on channel block. Nature Neurosci., 1, 451-461.

- Antonov S. M. & Magazanik L. G. (1988) Intense non-quantal release of glutamate in an insect neuromuscular junction. *Neurosci. Lett.*, 93, 204-208.
- Arends M. J. & Wyllie A. H. (1991) Apoptosis. Mechanism and role in pathology. *Intern. Rev. Exp. Pathol.*, 32, 223-254.
- Brustovetsky N. & Dubinsky J. M. (2000) Limitations of cyclosporin A inhibition of the permeability transition in CNS mitochondria. *J. Neurosci.*, 20, 8229-8237.
- Budd S. L. & Nicholls D. G. (1996) Mitochondria, calcium regulation, and acute glutamate excitotoxicity in cultured cerebellar granule cells. *J. Neurochem.*, 67, 2282-2291.
- Burnashev N., Zhou Z., Neher E. & Sakmann B. (1995) Fractional calcium currents through recombinant Glu R channels of the NMDA, AMPA and kainite receptor subtypes. *J. Physiol.*, 485, 403-418.
- Cafforio P., Romito A., Grizzutti M. A. & Silvestris F. (1996) Methods for assessing programmed cell death. *Recent Prog. Med.*, 87, 366-373.
- Carpenter D. (2002) NMDA receptors and the molecular mechanisms of excitotoxicity, in *Oxidative Stress at Molecular, Cellular and Organ Levels*. Eds P. Johnson, A. Boldyrev. Research Signpost, Trivandrum., 77-88.
- Choi D. W. (1992) Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.*, 23, 1261-1276.
- Choi D. W. (1995) Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci.*, 18, 58-60.
- Christine C. W. & Choi D. W. (1990) Effects of zinc on NMDA receptor mediated channel currents in cortical neurons. *J. Neurosci.*, 10, 108-116.
- Cohen G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.*, 326, 1-16.
- Cregan S. P., Fortin A., MacLaurin J. G., Callaghan S. M., Cecconi F., Yu S. W., Dawson T. M., Dawson V. L., Park D. S., Kroemer G. & Slack R. S. (2002) Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J. Cell Biol.*, 158, 507-517.
- Curtis D. R. & Johnston G. R. (1974) Amino acid transmitters in the mammalian central nervous system. *Ergebn. Physiol.*, 69, 97-188.
- Deveraux Q. L. & Reed J. C. (1999) IAP family proteins—suppressors of apoptosis. *Genes. Dev.*, 13, 239-252.
- Dingledine R., Borges K., Bowie D. & Traynelis S. (1999) The glutamate receptor ion channels. *Pharmacol. Rev.*, 51, 7-61.
- Fatt P. & Katz B. (1950) Some observations on biological noise. *Nature*, 166, 567-598.
- Green D. R. & Reed J. (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
- Johnson J. W. & Ascher P. (1987) Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature*, 325, 529-531.
- Khodorov B. (2004) Glutamate-induced deregulation of calcium homeostasis and mitochondrial dysfunction in mammalian central neurons. *Progr. Biophys. Molec. Boil.*, 86, 279-351.
- Kroemer G., Zamzami N. & Susin S. A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immunol. Today*, 18, 44-51.
- Leist M. & Jaattela M. (2001) For deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2, 589-598.
- Lipton S. A. (1999) Ischemic cell death in brain neurons. *Physiol. Rev.*, 79, 1431-1537.
- Mayer M. L., Westbrook G. L. & Guthrie P. B. (1984) Voltage-dependent block by Mg^{2+} of NMDA response in spinal chord neurons. *Nature*, 309, 261-263.
- McBain C. J. & Mayer M. L. (1994) N-methyl-D-aspartic acid receptor structure and function. *Physiol. Rev.*, 74, 723-760.
- Meldrum B. (1993) Amino acids as dietary excitotoxins: a contribution to understanding neurodegenerative disorders. *Brain Res.*, 18, 293-314.
- Nagata S. (1997) Apoptosis by death factor. *Cell*, 88, 355-365.

- Nowak L., Bregestovski P., Ascher P., Herbert A. & Prochiantz A. (1984) Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurons. *Nature*, 307, 462-465.
- Parsons C. G., Dunysz W. & Quack G. (1998) Glutamate in CNS disorders as a target for drug development: an uptake. *Drug news perspect.*, 11, 523-569.
- Philpott K. L., Me Carthy M. J., Backer D., Gatchalian C. & Rubin L. L. (1996) Morphological and biochemical changes in neurons: apoptosis versus mitosis. *Eur. J. Neurosci.*, 8, 1906-1915.
- Ramon y Cajal S. (1952) Structure and connections of neurons. *Bull. Los Angel. Neuro Soc.*, 17, 5-46.
- Rossi D. J., Oshima T. & Attwell D. (2000) Glutamate release in sever brain ischemia is mainly by reversed uptake. *Nature*, 403, 316-325.
- Sobolevsky A. K. (2003) Channel block of glutamate receptors. *Recent. Research. developments of physiology.* Ed. by Pandalai S. G. -. — Kerala, India.- Research signpost., 1-38.
- Stout A. K., Raphael H. M., Kanterewicz B. I., Klann E. & Reynolds I. J. (1998) Glutamate-induced neuron death requires mitochondrial calcium uptake. *Nature Neurosci.*, 1, 366-373.
- Szatkowski M., Barbour B. & Attwell D. (1990) Non-vesicular release of glutamate from glial cells by reversed electrogenic glutamate uptake. *Nature*, 348, 443-446.
- Wang X., Yang C., Chai J., Shi Y. & Xue D. (2002) Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 298, 1587-1592.
- Wang H., Yu S. W., Koh D. W., Lew J., Coombs C., Bowers W., Federoff H. J., Poirier G. G., Dawson T. M. & Dawson V. L. (2004) Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J. Neurosci.*, 24, 10963-10973.
- Watkins J. C. & Evans R. H. (1981) Excitatory amino acid transmitters. *Ann. Rev. Pharmacol.*, 21, 165-204.
- Weismann A. (1860) Nervenuebildung in einem Neuron. *Schmidts Jahrbuch.*, 105, 14-16.
- Xiang J., Chao D. T. & Korsmeyer S. J. (1996) BAX-induced cell death may not require interleukin 1 beta-converting enzyme-like proteases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 14559-14563.

Механизмы синаптической пластичности в гиппокампе

Ключевым событием в распространении сигнала от нейрона к нейрону является синаптическая передача (или трансмиссия). Возникновение потенциала действия в пресинаптическом нейроне приводит к выбросу нейромедиатора из его аксонных окончаний в синаптическую щель. В результате в синаптической щели происходит резкое кратковременное возрастание концентрации нейромедиатора, рецепторы, расположенные в постсинаптической части контакта активируются, возникает ток ионов через мембрану постсинапса, что в конечном итоге приводит к изменению потенциала на мембране постсинаптического нейрона. Однако сила синаптического ответа (или эффективность синаптической передачи), измеряемая величиной возникающего в ответ на выброс нейромедиатора постсинаптического тока (ПСТ) или постсинаптического потенциала (ПСП), может варьировать в зависимости от уровня предыдущей активности синапса. Это явление, известное как синаптическая пластичность, играет важную роль в обеспечении способности нервной системы реагировать на изменения условий среды. В случае, когда происходит усиление эффективности синаптической трансмиссии (увеличение величины постсинаптического ответа), говорят о потенциации, а в случае ослабления — о депрессии. В зависимости от длительности периода, в течение которого сохраняются изменения эффективности синаптической передачи, различают кратковременную и долговременную пластичность. Долговременная потенциация (ДВП; long-term potentiation, LTP) была впервые описана Тимом Блиссом и Терье Ломо в 1973 году в синапсах гранулярных клеток зубчатой фасции (dentate gyrus granule cells) в ответ на высокочастотную стимуляцию перфорантного пути (perforant pathway) (Bliss & Lomo, 1973). Впоследствии феномен ДВП был описан во всех возбуждающих путях гиппокампа, возбуждающих синапсах целого ряда других структур головного мозга, а также в тормозных синапсах (Racine et al., 1995; Roman et al., 1999). Таким образом, способность проявлять ДВП является фундаментальным свойством большинства синаптических контактов.

Механизмы индукции и экспрессии долговременной потенциации

Молекулярные механизмы индукции и экспрессии ДВП значительно различаются в зависимости от типа синапсов и типа нейронов, участвующих в создании контакта. Так, для ряда возбуждающих синапсов индукция ДВП требует активации НМДА (NMDA) рецепторов, в то время как для других синапсов это не является необходимым условием. Наиболее изученной формой ДВП является НМДА-зависимая форма потенциации синапсов на пирамидных клетках в поле СА1 гиппокампа (именно о ней главным образом и будет идти речь в этом обзоре). Процесс ДВП принято разделять на несколько фаз: посттетаническую потенциацию (post-tetanic potentiation; первые несколько минут после тетанической стимуляции), ранняя ДВП (до ~60 минут после индукции) и поздняя ДВП (потенциация, длящаяся дольше часа).

Наиболее часто для индукции ДВП используется высокочастотная электрическая стимуляция, например, так называемая тетаническая стимуляция (tetanic stimulation). Как

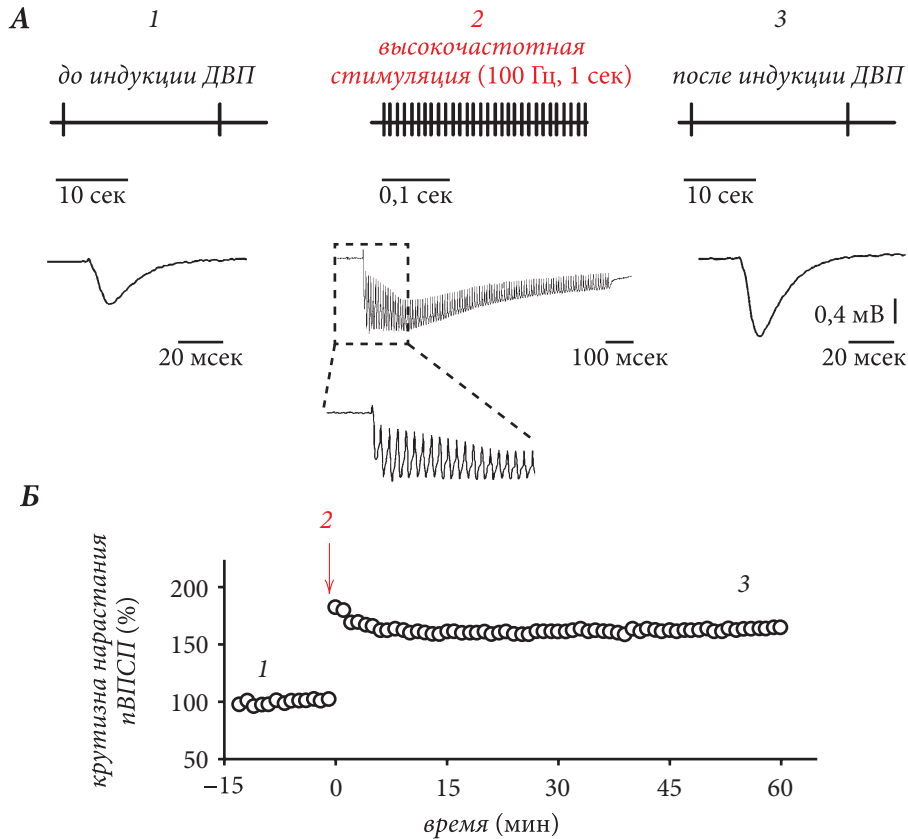


Рис. 1. Схема эксперимента регистрации долговременной потенциации (ДВП) в пирамидных клетках гиппокампа. **А**) Полевой возбуждающий постсинаптический потенциал (пВПСП), регистрируемый при помощи внеклеточного отведения в *stratum radiatum* поля CA1 гиппокампа (внизу) в ответ на стимуляцию коллатералей Шаффера одиночными импульсами (вверху). Величина ответа на стимул одной и той же интенсивности увеличивается после высокочастотной стимуляции. **Б**) Это увеличение, (выражающееся в изменении амплитуды ответа и крутизны нарастания ВПСП), сохраняется на протяжении длительного промежутка времени после прекращения высокочастотной стимуляции.

правило, это стимульный разряд продолжительностью в 1 секунду, состоящий из 100 импульсов, подаваемых с частотой 100 Гц (рис. 1). Молекулярные триггеры индукции ДВП возбуждающих синапсов в поле CA1 хорошо изучены и основаны на потенциал-зависимости активации НМДА рецепторов (см. обзор С. М. Антонова в данном сборнике). Большинство функционально зрелых возбуждающих синапсов в гиппокампе содержат два разных типа рецепторов глутамата — НМДА и АМПА (AMPA) рецепторы. Во время низкочастотной, или «базовой» (basal), тестовой стимуляции глутамат, высвобождаемый из синаптических везикул, приводит к активации каналов АМПА рецепторов и генерации возбуждающего ПСП (ВПСП; excitatory post-synaptic potential, EPSP). Ионные каналы, формируемые НМДА рецепторами, при потенциалах мембраны, близких к потенциалу покоя, блокируются вне-

клеточными ионами магния. Из-за наличия такого магниевого блока вклад НМДА рецепторов в 'базовую' нейротрансмиссию минимален. Однако во время высокочастотной стимуляции пресинаптических волокон, повторная активация АМПА рецепторов приводит к суммации ВПСР и постепенной деполяризации постсинаптической мембраны. В результате происходит снятие магниевого блока с НМДА рецепторов, и они становятся проницаемыми для ионов. Характерной особенностью этих каналов является то, что помимо ионов калия и натрия они также пропускают ионы кальция. Последние, попадая в клетку, активируют ряд сигнальных путей, необходимых для увеличения силы синаптической передачи (рис. 2).

Молекулярные механизмы, обеспечивающие ДВП, основаны на активности ряда протеинкиназ. Важным фактором стабилизации ДВП на ранних стадиях является активность СаМКП (Ca^{2+} /кальмодулин-зависимой протеинкиназы II; Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II). Кратковременное локальное повышение концентрации Ca^{2+} (в результате открытия каналов НМДА рецепторов) является достаточным, чтобы активировать СаМКП. В дальнейшем активность этой протеинкиназы поддерживается независимо от содержания Ca^{2+} вследствие процесса автофосфорелирования (Soderling & Derkach, 2000). Блокирование активности СаМКП приводит к невозможности индуцировать ДВП. Помимо СаМКП для различных форм ДВП важна активность ряда других постсинаптических протеинкиназ (например, PKC, PKA, MAPK, fyn, src). Причем вклад той или иной протеинкиназы может варьировать в зависимости от экспериментальных условий, типа стимуляции, возраста животного (Yasuda et al., 2003).

Молекулярно-клеточные механизмы, способные обеспечить поддержание ДВП, могут реализовываться как на базе пре-, так и постсинаптической части контакта. На уровне постсинапса продолжительная потенцияция может достигаться за счет изменений биофизических свойств рецепторов глутамата (Benke et al., 1998), а также посредством регуляции их числа. Например, активированная форма СаМКП вызывает фосфорелирование АМПА рецепторов и увеличение проводимости индивидуальных каналов (Derkach et al., 1999). Кроме того, целый ряд работ убедительно продемонстрировал увеличение числа рецепторов в синапсах *in vitro* в ответ на стимуляцию, используемую для индукции ДВП, а также *in vivo* вследствие обусловленных опытом пластических изменений (experience-dependent plasticity). Как и индукция ДВП, включение новых АМПА рецепторов в плазматическую мембрану гиппокампальных нейронов требует активации НМДА рецепторов.

Соответственно их блокирование препятствует увеличению числа АМПА рецепторов в синапсах (Pickard et al., 2001). Примечательно, что долговременная депрессия (ДВД; long-term depression, LTD), напротив, приводит к уменьшению числа АМПА рецепторов в постсинапсе (Hayashi et al., 2000). Таким образом, увеличение эффективности синаптической передачи может достигаться за счет транспорта в область постсинаптического уплотнения дополнительных молекул АМПА рецепторов. Увеличение числа рецепторов в постсинапсе происходит благодаря встраиванию в мембрану рецепторов, содержащих GluR1 субъединицу. То есть этот процесс специфичен в отношении субъединичного состава рецепторов и осуществляется независимо от постоянно идущего процесса взаимнообмена АМПА рецепторов в постсинапсе (constitutive receptor turnover) (Malinow & Malenka, 2002).

Обеспечение поддержания синаптической передачи в потенцированном состоянии может также осуществляться и пресинаптическими механизмами. В качестве одного из возможных вариантов было предложено изменение динамики высвобождения нейромедиатора из аксонного окончания в результате индукции ДВП. Этот механизм основан на

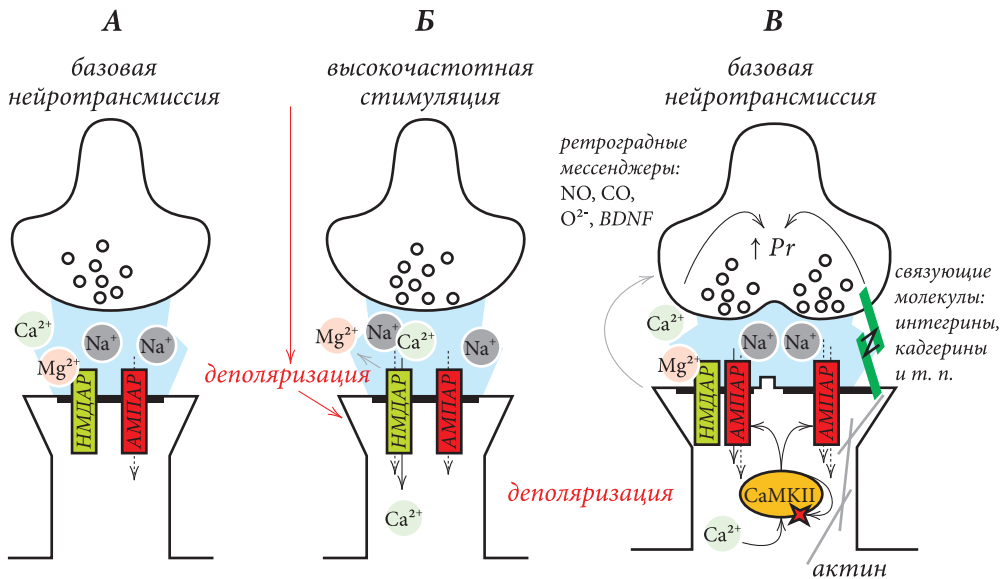


Рис. 2. Схема, демонстрирующая работу механизмов индукции и экспрессии ДВП в поле СА1 гиппокампа. **А–Б**) Индукция ДВП может быть осуществлена при помощи использования высокочастотной стимуляции, которая приводит к деполяризациям постсинаптической мембраны и снятию магниевого блока с каналов НМДА рецепторов. Удаление магниевого блока позволяет глутамату активировать НМДА рецепторы, и их открытие приводит к притоку катионов кальция внутрь клетки. Повышение внутриклеточного кальция является ключевым моментом, осуществляющим запуск ДВП. **В**) Экспрессия, или поддержание, ДВП может осуществляться при помощи участия нескольких как пре-, так и постсинаптических механизмов, не исключаяющих друг друга. Увеличение эффективности синаптической передачи может достигаться: увеличением проводимости АМПА каналов, связанной с фосфорилированием молекул рецептора; встраиванием дополнительных молекул рецептора в постсинаптическое уплотнение; увеличением высвобождения нейромедиатора из пресинаптического окончания. Структурные изменения, сопровождающие ДВП, также предполагают участие в этом процессе молекул цитоскелета. Координация изменений в пре- и постсинаптической части контакта может достигаться в результате действия ретроградных мессенжеров и молекул, осуществляющих физическую связь между пре- и постсинаптической мембраной (например, молекул клеточной адгезии).

особенностях кинетики связывания глутамата с рецепторами АМПА-типа. Быстрое увеличение концентрации нейротрансмиттера в синаптической щели во время трансмиссии более эффективно активирует рецепторы, чем медленные изменения концентрации нейротрансмиттера. Поэтому модуляция скорости экзоцитоза синаптических везикул способна оказывать влияние на величину синаптического ответа (Renger et al., 2001). Индукция ДВП может также приводить к изменению вероятности высвобождения нейромедиатора из аксонных терминалей (release probability). Некоторые формы ДВП, например, в синапсах мшистых волокон (mossy fiber synapses) на пирамидных клетках в поле СА3 гиппокампа, практически полностью реализуются за счет изменения вероятности релиза. Эта форма ДВП, однако, имеет отличный от вышеописанного механизм индукции и не зависит от активации НМДА

рецепторов. Кроме того, было высказано предположение, что индукция ДВП может приводить к изменениям размера поры слияния пресинаптических везикул (fusion pore) с мембраной во время выброса нейромедиатора и таким образом менять количество высвобождаемого глутамата и соответственно вызывать изменения величины постсинаптического ответа (Krupa & Liu, 2004).

Однако, если индукция ДВП происходит в постсинапсе, возникает вопрос, каким образом пресинаптическое окончание получает информацию о необходимости функциональных перестроек? В этой связи важно иметь в виду, что синаптический контакт не является «дорогой с односторонним движением», по которой информация передается лишь однонаправленно от аксонного окончания к постсинапсу. Большое число исследований продемонстрировало наличие механизмов обратного распространения сигналов (retrograde signaling) от постсинаптического нейрона к пресинаптическому, приводящих к изменению параметров выделения нейромедиатора (например, вероятности релиза и квантового размера [quantal size]).

Такая сигнализация осуществляется посредством ретроградных мессенджеров (retrograde messengers), способных диффундировать через внеклеточное пространство. В качестве сигнальных факторов могут выступать оксид азота (NO), супероксид анион (O_2^-), монооксид углерода (CO), арахидоновая кислота (arachidonic acid, AA), а также нейротрофические факторы, такие, как BDNF (brain-derived neurotrophic factor) (Medina & Izquierdo, 1995). Помимо этого, ретроградная сигнализация может осуществляться посредством конформационных изменений комплексов крупных белковых молекул, которые физически связывают пре- и постсинаптическую мембраны. Существование подобных комплексов было показано для молекул клеточной адгезии (например, интегринов и кадгерин), принимающих участие в модуляции ДВП (Tang et al., 1998; Chan et al., 2003).

Функциональные изменения синаптической передачи неразрывно связаны с ультраструктурными перестройками. Многочисленные работы убедительно продемонстрировали, что индукция ДВП приводит к изменениям морфологии синапса (Yuste & Bonhoeffer, 2001). При этом внимание исследователей с самого начала привлек тот факт, что изменения пре- и постсинаптической частей контакта происходят с высокой степенью координации. Предположительно, существенную роль в этом играют молекулы клеточной адгезии, которые с внутриклеточной стороны связаны с элементами цитоскелета клетки и, следовательно, могут запускать локальные морфологические перестройки в ответ на изменения морфологии окружающих клеток. Это и позволяет контактирующим нейронам синхронизировать реструктуризацию постсинапса и аксонного окончания во время ДВП (Wheal et al., 1998).

Однако, несмотря даже на значительные успехи в развитии методов визуализации синапсов, вопрос о том, к каким именно структурным изменениям синаптических контактов приводит ДВП, во многом остается открытым. Это связано в первую очередь с тем, что однозначно определить, произошла ли ДВП в данном конкретном синапсе, очень сложно, ведь запись электрофизиологических ответов производится со всего нейрона, а не с отдельного синапса. Работы, в которых были предприняты попытки «пометить» потенцированные синапсы, в частности с использованием цитохимических способов обнаружения Ca^{2+} в шипиках после высокочастотной стимуляции, при всех достоинствах основаны на ряде допущений, не имеющих экспериментальных доказательств (Buchs & Muller, 1996).

Еще в ранних исследованиях ДВП было высказано предположение, что она приводит не только к изменению морфологии синапсов, но и в итоге к увеличению их числа. Таким образом, поддержание потенциации осуществляется за счет того, что в суммарном ответе

нейрона на стимуляцию принимает участие большее число синапсов. Было постулировано, что увеличение в нейроне числа синапсов с двумя и более постсинаптическими уплотнениями после индукции ДВП является отражением процесса расщепления существующих дендритических шипиков и формирования новых синаптических контактов. Однако такой сценарий развития событий был поставлен под сомнение рядом исследователей (Hering & Sheng, 2001; Fiala et al., 2002; Ostroff et al., 2002). Кроме того, сам факт увеличения числа синапсов в ответ на ДВП до сих пор является предметом дискуссий.

Морфологические изменения формы и величины синаптического контакта не возможны без вовлечения процесса синтеза белка и экспрессии генов. Однако эти механизмы включаются только спустя некоторое время (десять минут и часы) и вносят вклад главным образом в поддержание поздних фаз ДВП (Kandel, 2001).

Как уже было отмечено, динамика изменения концентрации нейромедиатора в синаптической щели может являться одним из способов регуляции эффективности синаптической передачи. Помимо кинетики высвобождения нейромедиатора, она также определяется работой механизма обратного захвата, роль которого в поддержании ДВП недавно получила экспериментальное подтверждение (Levenson et al., 2002). Усиление процесса обратного захвата может быть необходимо для предотвращения десенситизации рецепторов в потенцированных синапсах. Кроме того, работа глутаматных транспортеров ограничивает «выплескивание» (spillover) нейромедиатора за пределы синаптической щели, предотвращая активацию соседних синапсов, и, возможно, вносит вклад в поддержание синаптической специфичности ДВП (Tsvetkov et al., 2004).

Роль торможения в синаптической пластичности

ГАМК (γ -аминомасляная кислота; GABA) является основным тормозным нейромедиатором центральной нервной системы. Соответственно, ГАМКергическая нейротрансмиттерная передача играет важную роль в осуществлении контроля возбуждения и в гиппокампе. Сети ГАМКергических интернейронов контролируют клеточную возбудимость и координируют свойства пространственно-временной интеграции пирамидных нейронов. Несмотря на то, что интернейроны составляют относительно небольшую популяцию нейронов гиппокампа, значительная арборизация их аксонов позволяет каждому тормозному нейрону устанавливать синаптические связи со многими пирамидными клетками, формируя многочисленные контакты с каждым из постсинаптических нейронов (Buhl et al., 1994a; Buhl et al., 1994b). При этом некоторые интернейроны посылают свои аксонные окончания преимущественно к перисоматической области клеток, в то время как другие формируют синапсы в основном на дендритном дереве нейронов (Miles et al., 1996). Кроме того, интернейроны имеют разветвленные связи внутри собственного пула, формируя таким образом тормозную сеть с высокой степенью взаимных соединений (Acsady et al., 1996; Gulyas et al., 1996).

В отличие от пирамидных нейронов, интернейроны представляют собой очень гетерогенную популяцию клеток. Только в поле CA1 гиппокампа насчитывается по меньшей мере 16 типов интернейронов, различающихся по морфологическим, биохимическим и электрофизиологическим свойствам (Somogyi & Klausberger, 2005). Однако отсутствие четких корреляций между этими параметрами в значительной степени затрудняет классификацию тормозных нейронов. Поэтому определение роли того или иного типа интернейронов в модуляции синаптической пластичности еще только предстоит. Тем не менее некоторые общие принципы участия торможения в синаптопластических изменениях хорошо охарактеризованы.

Стимуляция коллатералей Шаффера (Schaffer collaterals), используемая для индукции ДВП, приводит к активации не только возбуждающих, но и тормозных, ГАМКергических, нейронов гиппокампа. Последние осуществляют два функционально разных типа торможения пирамидных клеток поля СА1: прямое (feed-forward) торможение и обратное (feed-back or recurrent) торможение. В случае прямого торможения ГАМКергический нейрон, имеющий окончания на пирамидных клетках поля СА1, непосредственно активируется аксонами возбуждающих нейронов поля СА3. Прямое торможение опосредуется в основном перисоматическими окончаниями на пирамидных клетках (Parra et al., 1998). В случае обратного торможения возбуждение пирамидных нейронов поля СА1 в ответ на стимуляцию по коллатералям передается к интернейронам, которые в свою очередь осуществляют торможение возбуждающих их пирамидных клеток (рис. 3).

ГАМКергическая нейротрансmissão осуществляется посредством активации ионотропных лиганд-активируемых ГАМК_A рецепторов, которые формируют каналы, проницаемые для анионов хлора, а также метаботропных ГАМК_B рецепторов, проницаемых для катионов калия. ГАМК_A и ГАМК_B рецепторы осуществляют торможение с различной кинетикой. К тому же ГАМК_B рецепторы помимо постсинапса могут располагаться в пресинаптической части контакта, где они выполняют роль ауторецепторов (autoreceptors), подавляя выброс нейромедиатора (Davies & Collingridge, 1996).

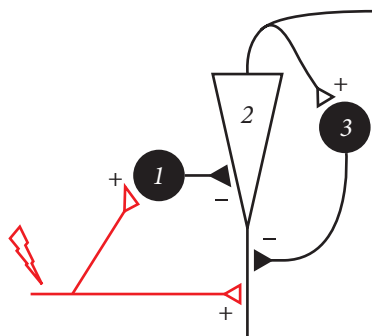


Рис. 3. Интернейроны, осуществляющие прямое (1) и обратное (3) торможение пирамидной клетки (2) при стимуляции коллатералей Шаффера (выделены красным). «+» — возбуждающие синапсы, «-» — тормозные синапсы.

ГАМКергическая система принимает участие в механизмах индукции и экспрессии ДВП в гиппокампе (Steele & Mauk, 1999; Feldman, 2000). Как правило, блокирование ГАМК_A рецепторов в срезах гиппокампа приводит к увеличению ДВП (Wigstrom & Gustafsson, 1985; Chapman et al., 1998). Усиление же ГАМКергической нейротрансmissions при помощи агонистов ГАМК рецепторов, напротив, снижает степень потенциации (Levkovitz et al., 1999).

Механизмы синаптического торможения, активируемые во время высокочастотной тетанической стимуляции, постепенно ослабевают, приводя

к увеличению деполяризующего эффекта, вызванного активацией возбуждающих синапсов (McCarren & Alger, 1985). Работа этого механизма отчасти может быть основана на участии ГАМК_B ауторецепторов в подавлении высвобождения ГАМК (Davies et al., 1991; Mott & Lewis, 1991). Однако существенная роль пресинаптических ГАМК_B рецепторов в индукции ДВП была продемонстрирована при потенциации, вызываемой использованием протокола тета-разрядов (theta-burst stimulation), во время которой обычно 10 пачечных разрядов, состоящих из 4 импульсов, подаваемых с частотой 100 Гц, разделены интервалами в 200 мс (что соответствует тета частоте — 5 Гц) (Staubli et al., 1999). Блокирование же ГАМК_B рецепторов при использовании «классической» высокочастотной стимуляции (100 Гц в течение 1 секунды) не оказывает столь значительного влияния на величину ДВП. Таким образом, модуляция пластичности зависит от паттерна и интенсивности стимуляции, используемой для индукции ДВП (Chapman et al., 1998; Staubli et al., 1999).

Кроме того, ряд исследований показал, что при высокочастотной стимуляции волокон Шаффера ГАМКергические ответы вместо гиперполяризации приводят к деполяризации постсинаптического нейрона, оказывая таким образом парадоксальное возбуждающее действие (Kaila et al., 1997; Taira et al., 1997), соответственно облегчая индукцию ДВП (cf Autere et al., 1999). Некоторые авторы также связывают этот деполяризующий эффект ГАМК с активностью ГАМК_B рецепторов (Cobb et al., 1999; Brown et al., 2003). Следует отметить, что окончательное прояснение роли возбуждающей ГАМКергической нейротрансмиссии в индукции ДВП во взрослом состоянии нуждается в дополнительных исследованиях.

Пластические изменения во время раннего развития

Примечателен тот факт, что механизмы, вовлеченные в осуществление некоторых форм синаптической пластичности в зрелом мозге, используются также на ранних этапах развития во время синаптогенеза. Роль электрической активности в формировании функциональных связей между нейронами известна давно. Хотя блокирование синаптической активности само по себе не предотвращает формирование синапсов, более тонкая настройка взаимных соединений клеточных элементов нервной ткани, избирательная стабилизация одних и ликвидация других контактов в значительной степени зависят от степени корреляции активности пре- и постсинаптических нейронов. Это характерно как для центральной, так и для периферической нервной системы (Verhage et al., 2000; Zhang & Poo, 2001; Lauri et al., 2003; Bouwman et al., 2004).

Одной из таких общих черт ДВП и активность-зависимых механизмов тонкой настройки входов нейрона (activity-dependent input refinement) на ранних этапах онтогенеза является участие в обоих процессах активации НМДА рецепторов. Как в первом, так и во втором случае НМДА рецепторы выступают в качестве молекулярного детектора временной корреляции активации пре- и постсинапса (Hahn et al., 1991; Cline, 2001; Shi et al., 2001). Оба процесса также зависят от активности протеинкиназы CaMKII (Wu et al., 1996). Кроме того, транспорт рецепторов (receptor trafficking) и встраивание их в активную зону после индукции ДВП имеют феноменологическое сходство с процессом созревания синаптических контактов, во время которого происходит преобразование так называемых «молчащих синапсов» («silent synapses») в функционально активные контакты. На основании этого была высказана гипотеза о том, что ДВП (или процесс подобный ей) является важным механизмом созревания возбуждающих синапсов (Liao et al., 1995; Durand et al., 1996). Косвенным свидетельством, подтверждающим эту возможность, является тот факт, что наличие спонтанной нейронной активности на ранних этапах развития нервной системы достаточно для осуществления селективной доставки в синапсы АМПА рецепторов, содержащих GluR4 субъединицы (Zhu et al., 2000). Активность-зависимые процессы как во время развития, так и во взрослом состоянии имеют в основе общие молекулярные механизмы, а многие сигнальные молекулы, участвующие в развитии синаптических контактов, также являются важными модуляторами синаптической пластичности у взрослых (Constantine & Cline, 1998).

Следует отметить, что во время неонатального периода развития даже низкочастотная стимуляция ГАМКергических волокон оказывает деполяризующее действие на мембрану постсинаптических нейронов. Это связано с тем, что на ранних этапах развития потенциал реверсии ГАМК рецепторов имеет более положительные значения из-за более высокой (по сравнению со взрослым состоянием) концентрации внутриклеточного хлора. Высокое со-

держание ионов хлора в развивающихся нейронах определяется отсутствием активного транспорта, направленного на выкачивание их во внеклеточное пространство. У крыс постепенный переход от деполяризующего к гиперполяризующему действию ГАМК происходит в течение второй недели после рождения, когда нейроны начинают экспрессировать нейронный K^+-Cl^- котранспортер KCC2 (Rivera et al., 1999; Lamsa et al., 2000). Работа помпы KCC2 приводит к выкачиванию хлора из клетки. Поэтому потенциал реверсии тока, опосредуемого ГАМК рецепторами, изначально более позитивный, чем потенциал покоя нейрона, становится более негативным. В результате активация ГАМК рецепторов приводит к тому, что хлор из внеклеточного пространства устремляется через канал рецептора внутрь клетки и мембрана приобретает более отрицательный заряд (гиперполяризуется). Деполяризация, которую обеспечивает активация ГАМК рецепторов на раннем этапе развития, оказывается достаточной для снятия магниевого блока с НМДА рецепторов. Таким образом, ГАМКергическая система является привлекательным кандидатом на роль модулятора синаптической пластичности во время развития головного мозга (Leinekugel et al., 1995; Ben-Ari, 2002). Действительно, было показано, что роль ГАМКергической нейротрансмиссии в индукции долговременной депрессии (ДВД) в гиппокампе различна у новорожденных крыс и более зрелых животных. На ранних этапах развития деполяризация за счет активации ГАМК_A рецепторов облегчает активацию НМДА рецепторов, понижая порог индукции ДВД. Напротив, у более зрелых животных синергизм в действии ГАМК_A и НМДА рецепторов отсутствует, и протоколы индукции ДВД, эффективные у новорожденных крыс, уже не действуют (Pavlov et al., 2004). Также было показано, что эффективность индукции ДВП изменяется в процессе развития организма, и ГАМКергическое торможение вносит вклад в механизм этих изменений (Meredith et al., 2003).

Взаимодействия между клетками и внеклеточным матриксом в модуляции синаптической пластичности

Внеклеточный матрикс составляет значительную часть объема нервной ткани. По некоторым оценкам он занимает около 20% головного мозга во взрослом состоянии и почти в два раза больше у новорожденных животных (Nicholson & Sykova, 1998). Более века тому назад Камилло Гольджи описал ретикулярную структуру, окружающую тела нейронов, — перинеурональную сеть. Она представляет собой комплекс молекул внеклеточного матрикса, которые наряду с глиальными отростками формируют оболочку вокруг нервных клеток. Молекулярный состав перинеурональных сетей, окружающих различные популяции нейронов, уникален и изменяется в процессе онтогенеза, что позволяет предположить наличие системы динамической регуляции состава элементов этих сетей.

Основными составляющими внеклеточного матрикса в ЦНС являются гликопротеины: ламинины, витронектин, тромбоспондины, тенасцины, а также различные протеогликаны, в которых центральный белок ковалентно связан с гликозаминогликанами (ГАГ-ами; см. таблицу 1). Хондроитин сульфат протеогликаны (CSPGs; например, агрекан, бревикан, нефрокан и фосфакан), а также гепаран сульфат протеогликаны (HSPGs; например, агрин, глипикан, цереброгликан, перлекан и синдеканы) являются двумя основными группами протеогликанов внеклеточного матрикса (Bandtlow & Zimmermann, 2000; Hartmann & Maurer, 2001). Основная часть функций протеогликанов осуществляется их боковыми цепочками гликозаминогликанов, которые способны связываться с различными сигнальными факторами внеклеточного матрикса и молекулами, располагающимися на поверхности кле-

Таблица 1. Основные компоненты внеклеточного матрикса в ЦНС

Компоненты внеклеточного матрикса	Примеры
Гликопротеины	Ламинины, фибронектин, тенасцин, тромбоспондины
Протеогликаны	Синдекан, глипикан, агрин, агрекан, версикан, фосфакан
Гликозаминогликаны	— хондроитин/дерматан сульфат — гепаран сульфат/гепарин — кератан сульфат — гиалуронан
Секретируемые сигнальные молекулы	bFGF, HB-GAM

ток. Кроме того, помимо интегральных компонентов во внеклеточном пространстве содержится ряд сигнальных молекул, таких, как факторы роста и дифференцировки, например, FGFs (fibroblastic growth factors), HB-GAM (heparin-binding growth-associated molecule). Модуляция биологической активности этих факторов осуществляется путем их взаимодействия с другими компонентами матрикса. Одним из примеров может служить регуляция активности FGF гепаран сульфатом (Raman et al., 2003).

Функции молекул внеклеточного матрикса многообразны. Они не только выполняют «пассивную» роль, обеспечивая механическую поддержку клеток в ткани, но также играют «активную» роль, осуществляя сигнальные функции между матриксом и клеточными элементами нервной ткани. Молекулы внеклеточного матрикса связываются с молекулами клеточной адгезии (например, интегринами), расположенными на поверхности клеток. Кроме того, внеклеточный матрикс участвует в регуляции формы клеток и их подвижности, формируя адгезивный субстрат, необходимый для осуществления миграции нейронов и их морфогенеза во время развития, внося вклад в процессы роста нейритов, направленного движения конуса роста, формирования и стабилизации синаптических контактов (Ruegg, 2001). Во взрослом состоянии внеклеточный матрикс принимает участие во многих патофизиологических процессах. Так, аксотомия периферических нервов стимулирует выработку Ф-спондина [F (floor plate)-spondin] (Burstyn et al., 1998). Ряд компонентов внеклеточного матрикса, например, HB-GAM, агрин, глипикан и синдеканы, аккумулируются в амилоидных бляшках при болезни Альцгеймера (Wisniewski et al., 1996; Verbeek et al., 1999; vanHorssen et al., 2002). При формировании глиальных рубцов в местах повреждения нервной ткани увеличивается содержание кератан-сульфат протеогликанов, ограничивая тем самым регенерацию аксонов (Zuo et al., 1998; Morgenstern et al., 2002; Properzi et al., 2003).

Структура и молекулярный состав внеклеточного матрикса важны также для электрической передачи сигналов в мозге, модуляции синаптической трансмиссии и регуляции синаптической пластичности. Необходимо отметить, что экспрессия ряда компонентов внеклеточного матрикса и молекул, связанных с поверхностью клеток, зависит от характера электрической активности нейронов. Примером может служить активность-зависимая экспрессия агрина в гиппокампе, причем влияние нейронной активности зави-

сит от степени зрелости синаптических контактов (Cohen et al., 1997; Lesuisse et al., 2000). Агрин в свою очередь способен активировать ген немедленного ответа *c-fos*, а значит сам может осуществлять модуляцию нейронной активности (Hilgenberg et al., 2002). Также активность-зависимые механизмы экспрессии имеют НВ-GAM (Lauri et al., 1996), тенасцины (tenascins) (Nakic et al., 1998), нейрональный кадгерин (N-cadherin), NCAM (neural cell adhesion molecule) и L1 (Itoh et al., 1997). Все эти молекулы принимают участие в регуляции синаптической пластичности (Dityatev & Schachner, 2003). Однако конкретные молекулярно-клеточные механизмы этого участия могут существенно различаться.

Тенасцин-С и тенасцин-R способны связываться с потенциал-зависимыми натриевыми каналами и, вероятно, играют роль в модуляции их активности и локализации в нейронах (Srinivasan et al., 1998; Xiao et al., 1999). Кроме того, было показано, что тенасцин-С вовлечен в передачу сигнала потенциал-зависимыми кальциевыми каналами L-типа (Evers et al., 2002), а тенасцин-R способен оказывать модулирующее действие на тормозные перисинаптические синапсы на пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа (Saghatelyan et al., 2001; Saghatelyan et al., 2003). Ряд сигнальных белков внеклеточного матрикса осуществляет свои функции посредством связывания с рецепторными молекулами на поверхности нейронов. Так, ингибирующее действие на экспрессию ДВП, опосредованное внеклеточным белком НВ-GAM, по всей видимости, осуществляется посредством связывания с трансмембранным протеогликаном синдекан-3, который в свою очередь передает сигнал из внеклеточной среды внутрь клетки (Lauri et al., 1998; Kaksonen et al., 2002; Pavlov et al., 2002).

Активность-зависимые изменения молекулярного состава внеклеточного матрикса могут осуществляться и путем регуляции активности внеклеточных протеаз (Jourquin et al., 2003). Матрикс-металлопротеиназы (matrix metalloproteinases, MMPs) представляют собой группу ферментов, способных расщеплять молекулы внеклеточного матрикса. Дисбаланс между матрикс-металлопротеиназами и их ингибиторами (tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, TIMPs) был продемонстрирован при целом ряде патологий (см. обзор Skiles et al., 2001). Изменения же активности металлопротеиназ в физиологических пределах может оказывать влияние на синаптическую пластичность и процессы обучения и памяти (Wright et al., 2002).

Изменения молекулярного состава внеклеточного матрикса имеют важные функциональные последствия, так как внеклеточное пространство представляет собой проводящую среду, в которой распространяются трансмембранные токи, возникающие в результате электрической активности нейронов. Композиция внеклеточного матрикса определяет и диффузию ионов, нейромедиаторов и других нейроактивных субстанций во внеклеточном пространстве (Nicholson & Sykova, 1998). Это, в первую очередь, является важным фактором, определяющим активацию внесинаптических рецепторов, а также пресинаптических ауто- и гетерорецепторов, которые регулируют вероятность высвобождения нейромедиатора и, таким образом, определяют динамику синаптической нейротрансмиссии. Активация перисинаптических и внесинаптических рецепторов, а также рецепторов на соседних синапсах может осуществляться благодаря «выплескиванию» нейромедиатора за пределы синаптической щели. Этот процесс регулируется не только механизмами обратного захвата нейромедиатора (как уже упоминалось выше), но и извилистостью внеклеточного пространства и его вязкостью. Соответственно изменения в составе внеклеточного матрикса могут существенно влиять на эффективность синаптической передачи, возбудимость нейронов, синаптическую специфичность и объемную передачу (Min et al., 1998; Kullmann et al., 1999).

Участие молекул внеклеточного матрикса и клеточной адгезии в процессах синаптической пластичности может также служить связующим звеном между функциональными изменениями в эффективности синаптической передачи и морфологическими перестройками ультраструктуры синапсов при ДВП и ДВД (Yuste & Bonhoeffer, 2001; Harris et al., 2003).

Автор выражает благодарность Е. В. Кушнеренко за критическое чтение данного обзора.

Список литературы

- Acsady L, Gorcs TJ & Freund TF. (1996). Different populations of vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive interneurons are specialized to control pyramidal cells or interneurons in the hippocampus. *Neuroscience* 73, 317-334.
- Autere AM, Lamsa K, Kaila K & Taira T. (1999). Synaptic activation of GABAA receptors induces neuronal uptake of Ca^{2+} in adult rat hippocampal slices. *JNeurophysiol* 81, 811-816.
- Bandtlow CE & Zimmermann DR. (2000). Proteoglycans in the developing brain: new conceptual insights for old proteins. *Physiol Rev* 80, 1267-1290.
- Ben-Ari Y. (2002). Excitatory actions of GABA during development: The nature of the nurture. *Nature Reviews Neuroscience* 3, 728-739.
- Benke TA, Luthi A, Isaac JT & Collingridge GL. (1998). Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature* 393, 793-797.
- Bliss TV & Lomo T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *JPhysiol* 232, 331-356.
- Bouwman J, Maia AS, Camoletto PG, Posthuma G, Roubos EW, Oorschot VM, Klumperman J & Verhage M. (2004). Quantification of synapse formation and maintenance in vivo in the absence of synaptic release. *Neuroscience* 126, 115-126.
- Brown JT, Gill CH, Farmer CE, Lanneau C, Randall AD, Pangalos MN, Collingridge GL & Davies CH. (2003). Mechanisms contributing to the exacerbated epileptiform activity in hippocampal slices of GABAB1 receptor subunit knockout mice. *Epilepsy Research* 57, 121-136.
- Buchs PA & Muller D. (1996). Induction of long-term potentiation is associated with major ultrastructural changes of activated synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8040-8045.
- Buhl EH, Halasy K & Somogyi P. (1994a). Diverse sources of hippocampal unitary inhibitory postsynaptic potentials and the number of synaptic release sites. *Nature* 368, 823-828.
- Buhl EH, Han ZS, Lorinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV & Somogyi P. (1994b). Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *JNeurophysiol* 71, 1289-1307.
- Burstyn C, Frumkin A, Xu YT, Scherer SS & Klar A. (1998). Accumulation of F-spondin in injured peripheral nerve promotes the outgrowth of sensory axons. *J Neurosci* 18, 8875-8885.
- Chan CS, Weeber EJ, Kurup S, Sweatt JD & Davis RL. (2003). Integrin requirement for hippocampal synaptic plasticity and spatial memory. *JNeurosci* 23, 7107-7116.
- Chapman CA, Perez Y & Lacaille JC. (1998). Effects of GABA(A) inhibition on the expression of long-term potentiation in CA1 pyramidal cells are dependent on tetanization parameters. *Hippocampus* 8, 289-298.
- Cline HT. (2001). Dendritic arbor development and synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 11, 118-126.
- Cobb SR, Manuel NA, Morton RA, Gill CH, Collingridge GL & Davies CH. (1999). Regulation of depolarizing GABA(A) receptor-mediated synaptic potentials by synaptic activation of GABA(B) autoreceptors in the rat hippocampus. *Neuropharmacology* 38, 1723-1732.
- Cohen NA, Kaufmann WE, Worley PF & Rupp F. (1997). Expression of agrin in the developing and adult rat brain. *Neuroscience* 76, 581-596.

- Constantine P & Cline HT. (1998). LTP and activity-dependent synaptogenesis: the more alike they are, the more different they become. *Curr Opin Neurobiol* 8, 139-148.
- Davies CH & Collingridge GL. (1996). Regulation of EPSPs by the synaptic activation of GABAB autoreceptors in rat hippocampus. *J Physiol* 496 (Pt 2), 451-470.
- Davies CH, Starkey SJ, Pozza MF & Collingridge GL. (1991). GABA autoreceptors regulate the induction of LTP. *Nature* 349, 609-611.
- Derkach V, Barria A & Soderling TR. (1999). Ca^{2+} /calmodulin-kinase II enhances channel conductance of alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate type glutamate receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 3269-3274.
- Dityatev A & Schachner M. (2003). Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 4, 456-468.
- Durand GM, Kovalchuk Y & Konnerth A. (1996). Long-term potentiation and functional synapse induction in developing hippocampus. *Nature* 381, 71-75.
- Evers MR, Salmen B, Bukalo O, Rollenhagen A, Bosl MR, Morellini F, Bartsch U, Dityatev A & Schachner M. (2002). Impairment of L-type Ca^{2+} channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C. *J Neurosci* 22, 7177-7194.
- Feldman DE. (2000). Inhibition and plasticity. *Nat Neurosci* 3, 303-304.
- Fiala JC, Allwardt B & Harris KM. (2002). Dendritic spines do not split during hippocampal LTP or maturation. *Nat Neurosci* 5, 297-298.
- Gulyas AI, Hajos N & Freund TF. (1996). Interneurons containing calretinin are specialized to control other interneurons in the rat hippocampus. *J Neurosci* 16, 3397-3411.
- Hahm JO, Langdon RB & Sur M. (1991). Disruption of retinogeniculate afferent segregation by antagonists to NMDA receptors. *Nature* 351, 568-570.
- Harris KM, Fiala JC & Ostroff L. (2003). Structural changes at dendritic spine synapses during long-term potentiation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358, 745-748.
- Hartmann U & Maurer P. (2001). Proteoglycans in the nervous system--the quest for functional roles in vivo. *Matrix Biol* 20, 23-35.
- Hayashi Y, Shi SH, Esteban JA, Piccini A, Poncer JC & Malinow R. (2000). Driving AMPA receptors into synapses by LTP and CaMKII: requirement for GluR1 and PDZ domain interaction. *Science* 287, 2262-2267.
- Hering H & Sheng M. (2001). Dendritic spines: structure, dynamics and regulation. *Nat Rev Neurosci* 2, 880-888.
- Hilgenberg LG, Ho KD, Lee D, Dowd DK & Smith MA. (2002). Agrin regulates neuronal responses to excitatory neurotransmitters in vitro and in vivo. *Mol Cell Neurosci* 19, 97-110.
- Itoh K, Ozaki M, Stevens B & Fields RD. (1997). Activity-dependent regulation of N-cadherin in DRG neurons: differential regulation of N-cadherin, NCAM, and L1 by distinct patterns of action potentials. *J Neurobiol* 33, 735-748.
- Jourquin J, Tremblay E, Decanis N, Charton G, Hanessian S, Chollet AM, Le D, Khrestchatsky M & Rivera S. (2003). Neuronal activity-dependent increase of net matrix metalloproteinase activity is associated with MMP-9 neurotoxicity after kainate. *Eur J Neurosci* 18, 1507-1517.
- Kaila K, Lamsa K, Smirnov S, Taira T & Voipio J. (1997). Long-lasting GABA-mediated depolarization evoked by high-frequency stimulation in pyramidal neurons of rat hippocampal slice is attributable to a network-driven, bicarbonate-dependent K^{+} transient. *J Neurosci* 17, 7662-7672.
- Kaksonen M, Pavlov I, Voikar V, Lauri SE, Hienola A, Riekkki R, Lakso M, Taira T & Rauvala H. (2002). Syndecan-3-deficient mice exhibit enhanced LTP and impaired hippocampus-dependent memory. *Mol Cell Neurosci* 21, 158-172.

- Kandel ER. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialog between genes and synapses. *BiosciRep* 21, 565-611.
- Krupa B & Liu G. (2004). Does the fusion pore contribute to synaptic plasticity? *Trends Neurosci* 27, 62-66.
- Kullmann DM, Min MY, Asztely F & Rusakov DA. (1999). Extracellular glutamate diffusion determines the occupancy of glutamate receptors at CA1 synapses in the hippocampus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354, 395-402.
- Lamsa K, Palva JM, Ruusuvuori E, Kaila K & Taira T. (2000). Synaptic GABA(A) activation inhibits AMPA-kainate receptor-mediated bursting in the newborn (P0-P2) rat hippocampus. *J Neurophysiol* 83, 359-366.
- Lauri SE, Lamsa K, Pavlov I, Riekkki R, Johnson BE, Molnar E, Rauvala H & Taira T. (2003). Activity blockade increases the number of functional synapses in the hippocampus of newborn rats. *MolCell Neurosci* 22, 107-117.
- Lauri SE, Rauvala H, Kaila K & Taira T. (1998). Effect of heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) on synaptic transmission and early LTP in rat hippocampal slices. *Eur J Neurosci* 10, 188-194.
- Lauri SE, Taira T, Kaila K & Rauvala H. (1996). Activity-induced enhancement of HB-GAM expression in rat hippocampal slices. *Neuroreport* 7, 1670-1674.
- Leinekugel X, Tseeb V, Ben-Ari Y & Bregestovski P. (1995). Synaptic Gaba(A) Activation Induces Ca²⁺ Rise in Pyramidal Cells and Interneurons from Rat Neonatal Hippocampal Slices. *Journal of Physiology-London* 487, 319-329.
- Lesuisse C, Qiu D, Bose CM, Nakaso K & Rupp F. (2000). Regulation of agrin expression in hippocampal neurons by cell contact and electrical activity. *Brain Res Mol Brain Res* 81, 92-100.
- Levenson J, Weeber E, Selcher JC, Kategaya LS, Sweatt JD & Eskin A. (2002). Long-term potentiation and contextual fear conditioning increase neuronal glutamate uptake. *Nat Neurosci* 5, 155-161.
- Levkovitz Y, Avignone E, Groner Y & Segal M. (1999). Upregulation of GABA neurotransmission suppresses hippocampal excitability and prevents long-term potentiation in transgenic superoxide dismutase-overexpressing mice. *J Neurosci* 19, 10977-10984.
- Liao D, Hessler NA & Malinow R. (1995). Activation of postsynaptically silent synapses during pairing-induced LTP in CA1 region of hippocampal slice. *Nature* 375, 400-404.
- Malinow R & Malenka RC. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25, 103-126.
- McCarren M & Alger BE. (1985). Use-dependent depression of IPSPs in rat hippocampal pyramidal cells in vitro. *J Neurophysiol* 53, 557-571.
- Medina JH & Izquierdo I. (1995). Retrograde messengers, long-term potentiation and memory. *Brain Res Brain Res Rev* 21, 185-194.
- Meredith RM, Floyer L & Paulsen O. (2003). Maturation of long-term potentiation induction rules in rodent hippocampus: role of GABAergic inhibition. *J Neurosci* 23, 11142-11146.
- Miles R, Toth K, Gulyas AI, Hajos N & Freund TF. (1996). Differences between somatic and dendritic inhibition in the hippocampus. *Neuron* 16, 815-823.
- Min MY, Rusakov DA & Kullmann DM. (1998). Activation of AMPA, kainate, and metabotropic receptors at hippocampal mossy fiber synapses: role of glutamate diffusion. *Neuron* 21, 561-570.
- Morgenstern DA, Asher RA & Fawcett JW. (2002). Chondroitin sulphate proteoglycans in the CNS injury response. *Prog Brain Res* 137, 313-332.
- Mott DD & Lewis DV. (1991). Facilitation of the induction of long-term potentiation by GABAB receptors. *Science* 252, 1718-1720.
- Nakic M, Manahan-Vaughan D, Reymann KG & Schachner M. (1998). Long-term potentiation in vivo increases rat hippocampal tenascin-C expression. *J Neurobiol* 37, 393-404.

- Nicholson C & Sykova E. (1998). Extracellular space structure revealed by diffusion analysis. *Trends Neurosci* 21, 207-215.
- Ostroff LE, Fiala JC, Allwardt B & Harris KM. (2002). Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron* 35, 535-545.
- Parra P, Gulyas AI & Miles R. (1998). How many subtypes of inhibitory cells in the hippocampus? *Neuron* 20, 983-993.
- Pavlov I, Riekkari R & Taira T. (2004). Synergistic action of GABA-A and NMDA receptors in the induction of long-term depression in glutamatergic synapses in the newborn rat hippocampus. *EurJNeurosci* 20, 3019-3026.
- Pavlov I, Voikar V, Kaksonen M, Lauri SE, Hienola A, Taira T & Rauvala H. (2002). Role of heparin-binding growth-associated molecule (HB-GAM) in hippocampal LTP and spatial learning revealed by studies on overexpressing and knockout mice. *MolCell Neurosci* 20, 330-342.
- Pickard L, Noel J, Duckworth JK, Fitzjohn SM, Henley JM, Collingridge GL & Molnar E. (2001). Transient synaptic activation of NMDA receptors leads to the insertion of native AMPA receptors at hippocampal neuronal plasma membranes. *Neuropharmacology* 41, 700-713.
- Properzi F, Asher RA & Fawcett JW. (2003). Chondroitin sulphate proteoglycans in the central nervous system: changes and synthesis after injury. *Biochem Soc Trans* 31, 335-336.
- Racine RJ, Chapman CA, Trepel C, Teskey GC & Milgram NW. (1995). Post-activation potentiation in the neocortex. IV. Multiple sessions required for induction of long-term potentiation in the chronic preparation. *Brain Res* 702, 87-93.
- Raman R, Venkataraman G, Ernst S, Sasisekharan V & Sasisekharan R. (2003). Structural specificity of heparin binding in the fibroblast growth factor family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 2357-2362.
- Renger JJ, Egles C & Liu G. (2001). A developmental switch in neurotransmitter flux enhances synaptic efficacy by affecting AMPA receptor activation. *Neuron* 29, 469-484.
- Rivera C, Voipio J, Payne JA, Ruusuvuori E, Lahtinen H, Lamsa K, Pirvola U, Saarma M & Kaila K. (1999). The K^+/Cl^- co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255.
- Roman FS, Truchet B, Marchetti E, Chaillan FA & Soumireu M. (1999). Correlations between electrophysiological observations of synaptic plasticity modifications and behavioral performance in mammals. *Prog Neurobiol* 58, 61-87.
- Ruegg MA. (2001). Molecules involved in the formation of synaptic connections in muscle and brain. *Matrix Biol* 20, 3-12.
- Saghatelyan AK, Dityatev A, Schmidt S, Schuster T, Bartsch U & Schachner M. (2001). Reduced perisomatic inhibition, increased excitatory transmission, and impaired long-term potentiation in mice deficient for the extracellular matrix glycoprotein tenascin-R. *Mol Cell Neurosci* 17, 226-240.
- Saghatelyan AK, Snapyan M, Gorissen S, Meigel I, Mosbacher J, Kaupmann K, Bettler B, Kornilov AV, Nifantiev NE, Sakanyan V, Schachner M & Dityatev A. (2003). Recognition molecule associated carbohydrate inhibits postsynaptic GABA(B) receptors: a mechanism for homeostatic regulation of GABA release in perisomatic synapses. *Mol Cell Neurosci* 24, 271-282.
- Shi J, Aamodt SM, Townsend M & Constantine-Paton M. (2001). Developmental depression of glutamate neurotransmission by chronic low-level activation of NMDA receptors. *JNeurosci* 21, 6233-6244.
- Skiles JW, Gonnella NC & Jeng AY. (2001). The design, structure, and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr Med Chem* 8, 425-474.
- Soderling TR & Derkach VA. (2000). Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends Neurosci* 23, 75-80.

- Somogyi P & Klausberger T. (2005). Defined types of cortical interneurone structure space and spike timing in the hippocampus. *J Physiol* 562, 9-26.
- Srinivasan J, Schachner M & Catterall WA. (1998). Interaction of voltage-gated sodium channels with the extracellular matrix molecules tenascin-C and tenascin-R. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 15753-15757.
- Staubli U, Scafidi J & Chun D. (1999). GABAB receptor antagonism: facilitatory effects on memory parallel those on LTP induced by TBS but not HFS. *J Neurosci* 19, 4609-4615.
- Steele PM & Mauk MD. (1999). Inhibitory control of LTP and LTD: stability of synapse strength. *J Neurophysiol* 81, 1559-1566.
- Taira T, Lamsa K & Kaila K. (1997). Posttetanic excitation mediated by GABA(A) receptors in rat CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol* 77, 2213-2218.
- Tang L, Hung CP & Schuman EM. (1998). A role for the cadherin family of cell adhesion molecules in hippocampal long-term potentiation. *Neuron* 20, 1165-1175.
- Tsvetkov E, Shin RM & Bolshakov VY. (2004). Glutamate uptake determines pathway specificity of long-term potentiation in the neural circuitry of fear conditioning. *Neuron* 41, 139-151.
- vanHorssen, Kleinnijenhuis J, Maass CN, Rensink AA, Otte H, David G, van d, Wesseling P, de W & Verbeek MM. (2002). Accumulation of heparan sulfate proteoglycans in cerebellar senile plaques. *Neurobiol Aging* 23, 537-545.
- Verbeek MM, Otte H, van d, David G, Wesseling P & de W. (1999). Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan accumulating in Alzheimer's disease brain. *Am J Pathol* 155, 2115-2125.
- Verhage M, Maia AS, Plomp JJ, Brussaard AB, Heeroma JH, Vermeer H, Toonen RF, Hammer RE, van den Berg TK, Missler M, Geuze HJ & Sudhof TC. (2000). Synaptic assembly of the brain in the absence of neurotransmitter secretion. *Science* 287, 864-869.
- Wheal HV, Chen Y, Mitchell J, Schachner M, Maerz W, Wieland H, Van Rossum D & Kirsch J. (1998). Molecular mechanisms that underlie structural and functional changes at the postsynaptic membrane during synaptic plasticity. *Prog Neurobiol* 55, 611-640.
- Wigstrom H & Gustafsson B. (1985). Facilitation of hippocampal long-lasting potentiation by GABA antagonists. *Acta Physiol Scand* 125, 159-172.
- Wisniewski T, Lalowski M, Baumann M, Rauvala H, Raulo E, Nolo R & Frangione B. (1996). HB-GAM is a cytokine present in Alzheimer's and Down's syndrome lesions. *Neuroreport* 7, 667-671.
- Wright JW, Kramar EA, Meighan SE & Harding JW. (2002). Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides* 23, 221-246.
- Wu G, Malinow R & Cline HT. (1996). Maturation of a central glutamatergic synapse. *Science* 274, 972-976.
- Xiao ZC, Ragsdale DS, Malhotra JD, Mattei LN, Braun PE, Schachner M & Isom LL. (1999). Tenascin-R is a functional modulator of sodium channel beta subunits. *J Biol Chem* 274, 26511-26517.
- Yasuda H, Barth AL, Stellwagen D & Malenka RC. (2003). A developmental switch in the signaling cascades for LTP induction. *Nat Neurosci* 6, 15-16.
- Yuste R & Bonhoeffer T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24, 1071-1089.
- Zhang LI & Poo MM. (2001). Electrical activity and development of neural circuits. *Nat Neurosci* 4 Suppl, 1207-1214.
- Zhu JJ, Esteban JA, Hayashi Y & Malinow R. (2000). Postnatal synaptic potentiation: delivery of GluR4-containing AMPA receptors by spontaneous activity. *Nat Neurosci* 3, 1098-1106.
- Zuo J, Hernandez YJ & Muir D. (1998). Chondroitin sulfate proteoglycan with neurite-inhibiting activity is up-regulated following peripheral nerve injury. *J Neurobiol* 34, 41-54.

Математические модели ионных каналов, нейронов и нейронных популяций

В настоящей главе мы рассмотрим основы математических моделей, описывающих данные электрофизиологических экспериментов. При описании моделей отдельных нейронов в качестве примера экспериментальной записи возьмём ответ нейрона зрительной коры крысы на инъекцию тока через регистрирующий электрод (рис. 1). Сравнение с этим рисунком выявит те детали активности нейрона, которые описываются или не описываются той или иной моделью. Для подробной модели нейрона нам потребуются аппроксимации отдельных ионных каналов. После того, как детальная модель нейрона будет описана, мы обсудим параметры, которыми этот нейрон управляется, рассмотрим простые аппроксимации синаптических связей нейронов, а затем перейдем к рассмотрению активности нейронных популяций.

1. Нейрон — пороговый интегратор

Наиболее простой моделью нейрона можно считать модель порогового интегратора. Она приближённо описывает изменение мембранного потенциала посредством суммирования входных сигналов, прежде всего синаптических токов, согласно закону Ома, и определяет

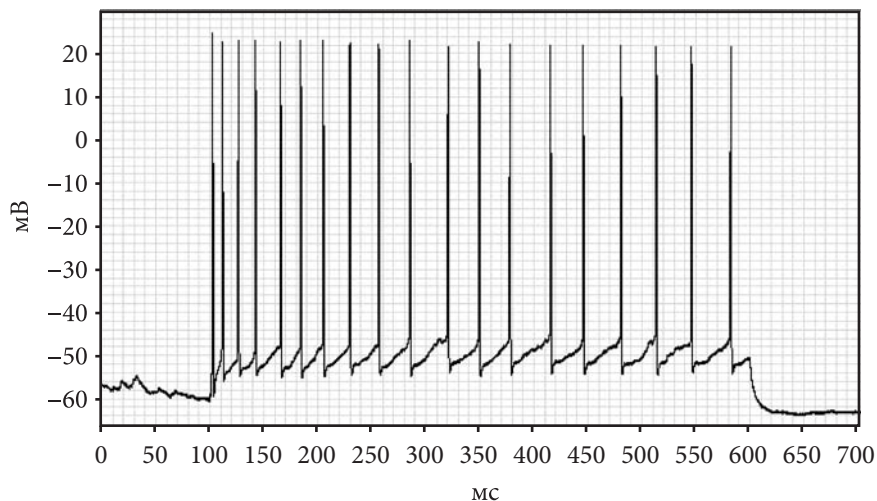


Рис. 1. Мембранный потенциал нейрона первичной зрительной коры крысы в ответ на инъекцию тока через регистрирующий электрод (Graham, L. J., unpublished data).

момент генерации спайка (потенциала действия) как момент времени, когда мембранный потенциал превышает пороговое значение.

$$C \frac{dV}{dt} = -g_L(V - V_L) + I_a, \tag{1.1}$$

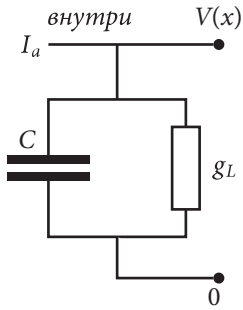


Рис. 2. Электрическая схема модели нейрона-порогового интегратора.

если $V > V_T$, то $V > V_{reset}$

Здесь V — мембранный потенциал; I_a — входной (синаптический) ток, C — ёмкость мембраны; g_L — проводимость мембраны; V_{rest} — потенциал покоя; V_T — пороговый потенциал; V_{reset} — потенциал обновления.

В зарубежной литературе такая модель называется one-compartmental linear leaky integrate-and-fire neuron. Такая модель не рассматривает ни пространственную структуру нейрона, ни свойства активных ионных каналов. Для демонстрации возможностей этой модели приведём экспериментальную (рис. 1) и расчётную (рис. 3) записи последовательности спайков нейрона (spike train) в ответ на стимуляцию ступенькой тока, подаваемого через электрод.

Из сравнения рисунков 1 и 3 видно, что при удачном подборе параметров модель может отражать спайковую активность в смысле согласования стационарной частоты спайков с экспериментальной, но модель не способна воспроизвести следующие существенные детали: форму спайков, профиль изменения потенциала между спайками, адаптацию спайков в виде относительно медленного увеличения межспайковых интервалов; проявление спонтанной активности в виде нерегулярности спайков и флуктуаций потенциала и т. д.

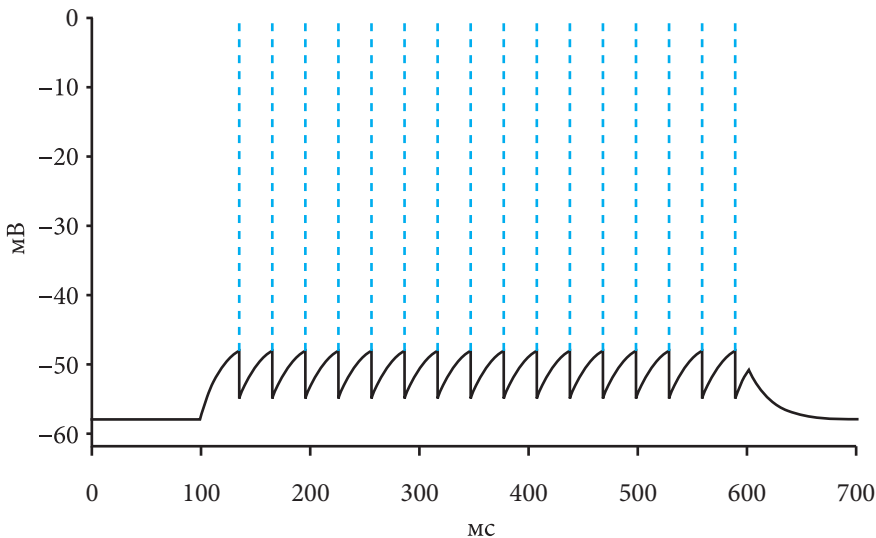


Рис. 3. Ответ нейрона-порогового интегратора на стимуляцию ступенькой тока.

Частота спайков ($1/T$, где T — межспайковый интервал) согласно модели (1) вычисляется аналитически:

$$v(I_a) = \frac{g_L}{C \ln \left(\frac{V_L + I_a/g_L - V_{reset}}{V_L + I_a/g_L - V_T} \right)} \quad (1.2)$$

Зависимость $v(I_a)$ может рассматриваться как самое простое описание основной характеристики нейрона — спайковой активности. Заметим, что оно справедливо только для случая стационарной спайковой активности, т. е. при постоянной стимуляции, когда устанавливается режим генерации спайков с постоянными межспайковыми интервалами. Зависимость $v(I_a)$ может вычисляться не только по модели нейрона-порогового интегратора, но и по любой другой модели единичного нейрона, либо может быть измерена экспериментально при подаче в нейрон постоянного стимулирующего тока.

2. Синаптические токи

Основными составляющими тока I_a в правой части ур. (1.1) обычно являются токи i_S от всех присутствующих на нейроне синаптических популяций, а также, возможно, ток I_{el} , пропускаемый через регистрирующий электрод:

$$I_a(t) = \sum_S i_S(t) + I_{el}(t) \quad (2.1)$$

Будем рассматривать только химически управляемые синапсы, проводимость которых не зависит от потенциала. Согласно закону Ома

$$i_S(t) = g_S(t)(V(t) - V_S) \quad (2.2)$$

Тогда

$$I_a(t) = \sum_S g_S(t)(V(t) - V_S) + I_{el}(t) \quad (2.3)$$

где g_S — синаптическая проводимость; V_S — потенциал реверсии синаптического тока s -типа. Зависимость от времени синаптической проводимости $g_S(t)$ определяется пресинаптической спайковой активностью и кинетикой синаптических каналов данного типа. Аппроксимация кинетики синаптической проводимости будет приведена ниже, после обсуждения основных свойств нейрона.

3. Нейрон с активными натриевыми и калиевыми каналами

Натриевые и калиевые каналы обеспечивают электрическую возбудимость мембраны нейрона. Уравнение для мембранного потенциала записывается в виде:

$$C \frac{dV}{dt} = -I_{Na}(V, t) - I_K(V, t) - g_L(V(t) - V_L) - \sum_S g_S(t)(V(t) - V_S) - I_{el}(t) \quad (3.1)$$

При этом первый член определяет ёмкостной ток; сумма токов ионных каналов (четыре первых члена в правой части) определяет суммарный трансмембранный ток.

Предполагая такую модель нейрона, можно изучать его свойства. Типичными режимами whole-cell patch-clamp регистрации являются режимы фиксации потенциала или фиксации тока.

Режим фиксации тока. Если ток через электрод I_{el} фиксирован, то регистрируется потенциал $V(t)$. Рассмотрим частные случаи таких измерений. В предположении отсутствия синаптических токов и задания постоянного тока I_{el} можно ожидать либо установления постоянного уровня потенциала V , либо установления режима генерации спайков с постоянной частотой:

— В случае установления постоянного уровня потенциала V уравнение (3.1) упрощается:

$$-I_{Na}(V, t) - I_K(V, t) - g_L(V - V_L) + I_{el} = 0 \quad (3.2)$$

Задавая различные значения фиксируемого тока I_{el} можно построить вольт-амперную характеристику нейрона. Наклон этой характеристики определяет входное сопротивление нейрона: . Обычно при малых токах I_{el} натриевые и калиевые токи не активированы и измеряемое входное сопротивление определяет проводимость утечки: $g_L = 1/R_{in}$.

— В случае установления режима генерации спайков с постоянной частотой ν можно построить частотно-токовую характеристику $\nu = \nu(I_{el})$. Однако, следует иметь в виду, что естественные синаптические токи всегда сопровождаются изменением проводимости нейрона, и в этом смысле режим фиксации тока, а значит и характеристика $\nu = \nu(I_{el})$, являются для нейрона искусственными.

Наоборот, в предположении существенного синаптического ответа при отсутствии активных токов I_{Na} и I_K , измеряется постсинаптический потенциал. При этом ток I_{el} задаёт уровень деполяризации мембраны до прихода синаптического сигнала:

$V_{rest} = V_L + I_{el}/g_L$, а измеряемый постсинаптический потенциал $V_{PSP}(t) = V(t) - V_{rest}$ определяется уравнением, следующим из (3.1):

$$C \frac{dV_{PSP}}{dt} = -g_L V_{PSP}(t) - \sum_S g_S(t)(V_{PSP}(t) + V_{rest} - V_S) \quad (3.3)$$

Режим фиксации потенциала. В этом случае ток $I_{el}(t)$, пропускаемый через электрод, управляет мембранным потенциалом, фиксируя его согласно заданной функции времени $V(t) = V_h(t)$ (V_h — потенциал фиксации, hold potential). Ток $I_{el}(t)$ динамически компенсирует изменения потенциала. Этот ток определяется согласно ур. (3.1) при подстановке $V(t) = V_h(t)$, т. е.

$$I_{el}(t) = C \frac{dV_h(t)}{dt} + I_{Na}(V_h(t), t) + I_K(V_h(t), t) + g_L(V_h(t) - V_L) + \sum_S g_S(t)(V_h(t) - V_S) \quad (3.4)$$

Если потенциал фиксирован на постоянном уровне $V = V_h$, то изменение тока $I_{el}(t)$ определяется изменением синаптических проводимостей, поскольку проводимости потенциал-зависимых каналов в этом случае постоянны:

$$I_{el}(t) = \sum_S g_S(t)(V_h - V_S) + I_0 \quad (3.5)$$

где $I_0 = I_{Na}(V_h) + I_K(V_h) + g_L(V_h - V_L)$.

Нужно, однако, иметь в виду, что реальный нейрон представляет собой сложную пространственно-распределенную структуру и потенциал вдали от электрода может сильно отличаться от фиксируемого значения.

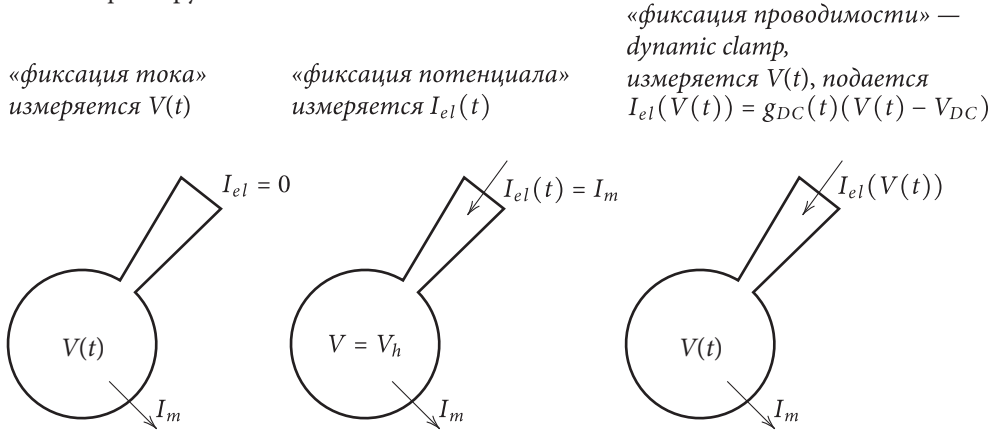


Рис. 4. Режимы фиксации тока, фиксации потенциала и *dynamic clamp* при измерениях patch-электродом в режиме *whole-cell*.

Режим *dynamic clamp*. В режиме «*dynamic clamp*» ток через электрод может динамически контролироваться компьютером и таким образом зависеть от измеряемого потенциала. Это позволяет, например, искусственно вводить дополнительную проводимость $g_{DC}(t)$. В этом случае ток через электрод задаётся по формуле

$$I_{el} = g_{DC}(t)(V(t) - V_{DC}) \quad (3.6)$$

в которой V_{DC} — потенциал реверсии искусственного канала. Функция изменения во времени проводимости $g_{DC}(t)$ задаёт кинетику искусственного канала. В случае введения искусственного пассивного канала утечки $g_{DC}(t) = \text{const}$, в случае синаптического канала $g_{DC}(t)$ зависит только от времени, в случае искусственного потенциал-зависимого канала эта функция зависит от потенциала $g_{DC}(t) = g_{DC}(V(t), t)$.

Как мы увидим в п. 6, нейрон управляется двумя сигналами, током и проводимостью. Как следствие, создать искусственный синаптический стимул можно только, если имеется возможность задавать входной ток и дополнительную проводимость, а для этого режим *dynamic clamp* является необходимым инструментом.

4. Аппроксимации натриевых и калиевых токов типа Ходжкина-Хаксли

Свойства коллективной активности натриевых и калиевых каналов исследуют в режиме фиксации мембранного потенциала. Мембранный потенциал изменяют во времени согласно ступенчатой, кусочно-постоянной функции, поэтому на участках постоянного потенциала V_h емкостной ток равен нулю. Синаптическими токами пренебрегают. Отсюда, согласно ур. (3.4), ток через электрод равен:

$$I_{el}(t) = I_{Na}(V_h, t) + I_K(V_h, t) + g_L(V_h - V_L) \quad (4.1)$$

Параметры g_L и V_L могут быть оценены в условиях, когда натриевый и калиевый токи не активированы, например, при значениях V_h близких потенциалу покоя V_{rest} . В случаях деполяризующих значений V_h натриевый и калиевый токи активируются и дают свои вклады в регистрируемый ток. Отдельный натриевый ток выделяют с помощью фармакологической блокады калиевых каналов тетраэтиламмонием (ТЭА); отдельный калиевый ток — с помощью блокады натриевых каналов тетродотоксином (ТТХ); ток утечки вычитается. Соответствующие проводимости вычисляются согласно закону Ома:

$$g_K(t) = I_K(t)/(V_h - V_K) \quad (4.2)$$

Потенциалы реверсии натриевых и калиевых токов V_{Na} и V_K вычисляются согласно формуле Нернста, рассматривающей равновесие электрических и диффузионных сил для ионов в каналах:

$$V_X = \frac{RT}{zF} \ln \frac{[X]_o}{[X]_i} \quad (4.3)$$

где R — универсальная газовая постоянная, T — температура, z — валентность, F — константа Фарадея, $[X]_o$, $[X]_i$ — концентрации ионов снаружи и внутри клетки. Для ионов натрия

$$V_{Na} = 58 \text{ mV} \log \frac{[440]}{[50]} = +55 \text{ mV};$$

для ионов калия

$$V_K = 58 \text{ mV} \log \frac{[20]}{[400]} = -75 \text{ mV}.$$

Пример экспериментальных данных, которые несут всю необходимую и достаточную информацию о кинетике натриевых и калиевых каналов, представлены на рис. 5.

Ходжкин и Хаксли в работе (Hodgkin & Huxley, 1952) предложили аппроксимации натриевых и калиевых каналов. Аппроксимация натриевого тока включает в себя два обыкновенных дифференциальных уравнения первого порядка для безразмерных переменных $m(t, V)$ — активации и $h(t, V)$ — инактивации:

$$I_{Na}(t, V) = g_{Na}(t, V)(V(t) - V_{Na}), \quad (4.4)$$

$$g_{Na}(t, V) = \bar{g}_{Na} m^3(t, V) h(t, V)$$

$$\frac{dm}{dt} = \alpha_m(V) - (\alpha_m(V) + \beta_m(V))m \quad (4.5),$$

$$\frac{dh}{dt} = \alpha_h(V) - (\alpha_h(V) + \beta_h(V))h \quad (4.6)$$

Аппроксимирующие функции имеют вид:

$$\alpha_m(V) = \frac{a_1(a_2 - V)}{\exp((a_2 - V)/a_3) - 1}, \quad \beta_m(V) = \frac{-b_1 V}{\exp(-V/b_3)} \quad (4.7)$$

$$\alpha_h(V) = \frac{-c_1 V}{\exp(-V/c_3)}, \quad \beta_h(V) = \frac{d_1}{\exp((d_2 - V)/d_3) + 1} \quad (4.8)$$

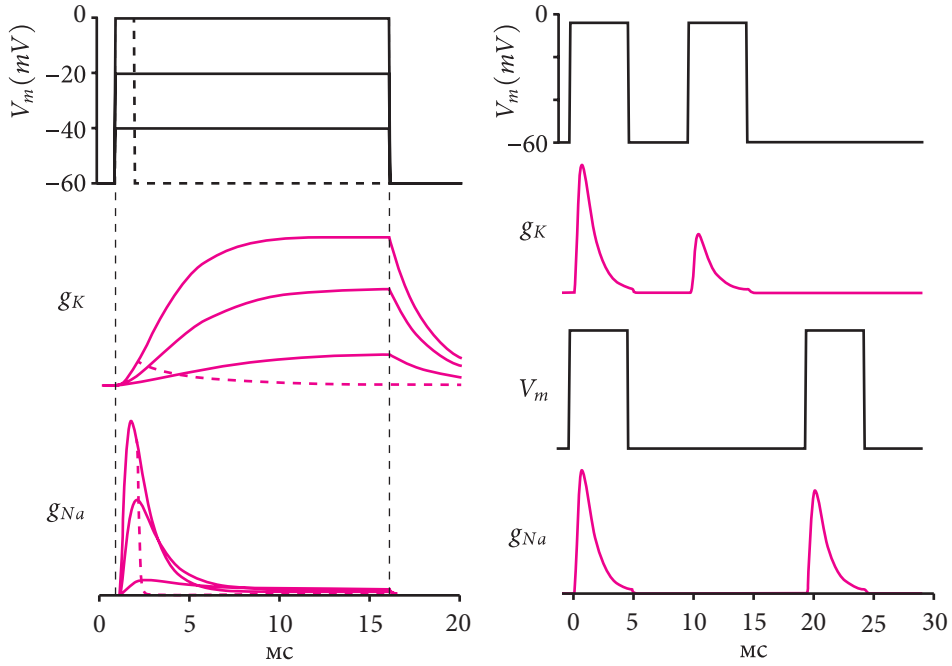


Рис. 5. Проводимости натриевых и калиевых каналов в ответ на изменение фиксируемого мембранного потенциала. Графики получены с помощью уравнений Ходжкина-Хаксли и подобны экспериментальным (см., например, Kandel et al., 2000). Такой набор данных отражает все основные свойства активации и инактивации каналов.

Аппроксимация калиевого тока включает в себя одно обыкновенное дифференциальное уравнение первого порядка для безразмерной переменной $n(t, V)$:

$$I_K(t, V) = g_K(t, V)(V(t) - V_K), \quad g_K(t, V) = \bar{g}_K n^4(t, V) \quad (4.9)$$

$$\frac{dn}{dt} = \alpha_n(V) - (\alpha_n(V) + \beta_n(V))n \quad (4.10)$$

$$\alpha_m(V) = \frac{a_1(a_2 - V)}{\exp((a_2 - V)/a_3) - 1}, \quad \beta_m(V) = \frac{-b_1 V}{\exp(-V/b_3)} \quad (4.11)$$

Коэффициенты $a_1, a_2, a_3, b_1, b_3, c_1, c_3, d_1, d_2, d_3, e_1, e_2, e_3, f_1, f_2, f_3$ могут быть найдены с помощью численного метода. Для этого нужно минимизировать ошибки воспроизведения экспериментальных данных, подобных данным рис. 5, с помощью моделей (4.4-4.8) и (4.9-4.11):

$$\sum_i \int_0^{t_{end}} [g_{Na}^{exp.,i}(t) - g_{Na}^{mod.,i}(t)] dt = \min \quad (4.12)$$

(over all curves)

$$\sum_i \int_0^{t_{end}} [g_K^{exp.,i}(t) - g_K^{mod.,i}(t)] dt = \min \quad (4.13)$$

(over all curves)

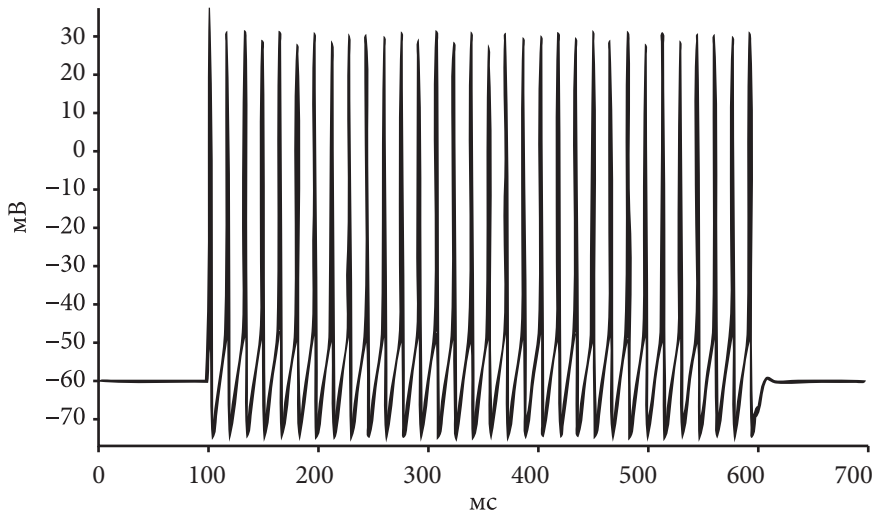


Рис. 6. Численное решение уравнений Ходжкина-Хаксли при задании стимулирующего тока $I_{el} = 11 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ в период с 100 по 600 ms.

По данным Ходжкина и Хаксли (Hodgkin & Huxley, 1952) эти коэффициенты имеют следующие значения: $a_1 = 0,1$, $a_2 = 25$, $a_3 = 10$, $b_1 = 4$, $b_3 = 18$, $c_1 = 0,07$, $c_3 = 20$, $d_1 = 1$, $d_2 = 30$, $d_3 = 10$, $e_1 = 0,01$, $e_2 = 10$, $e_3 = 10$, $f_1 = 0,125$, $f_2 = 0$, $f_3 = 80$. Другие специфические параметры для нейрона Ходжкина и Хаксли: $V_{Na} = 50 \text{ mV}$, $V_K = -77 \text{ mV}$, $\bar{g}_{Na} = 120 \text{ mS}/\text{cm}^2$, $\bar{g}_K = 36 \text{ mS}/\text{cm}^2$, $g_L = 0,3 \text{ mS}/\text{cm}^2$, $V_L = -50 \text{ mV}$. Пример численного решения уравнения

$$C \frac{dV}{dt} = -I_{Na}(V, t) - I_K(V, t) - g_L(V(t) - V_L) + I_{el}(t) \quad (4.14)$$

с аппроксимациями (4.4-4.11) и стимулирующим током $I_{el} = 11 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ в период с 100 по 600 ms показан на рис. 6. При такой стимуляции нейрон входит в режим установившейся генерации спайков с частотой $\nu = 60 \text{ Hz}$. Всю область возбуждения нейрона мы проанализируем в п. 6.

5. Модель коркового адаптивного нейрона с шумом

В сравнении с экспериментальным нейроном (рис. 1), поведение модельного нейрона, показанное на рис. 6, излишне регулярно, не обладает адаптацией и спонтанной активностью. Кроме того, качественно отличается ход потенциала на межспайковых промежутках. В большой мере эти недостатки устраняются для модели коркового пирамидного нейрона, рассматривающей более полный набор типов ионных каналов:

$$C \frac{dV}{dt} = -I_{Na} - I_{DR} - I_A - I_M - I_L - I_{AHP} - I_S(t) + I_{el}(t) \quad (5.1)$$

где I_{DR} , I_A — быстрые калиевые токи, I_M — медленный калиевый ток спайковой адаптации, I_{AHP} — медленный калиевый кальций-зависимый ток спайковой адаптации. Аппроксимации для I_{Na} , I_{DR} , I_A , I_M заимствованы из (Borg-Graham, 1999); I_{AHP} — из (Kopell et al., 2000).

Для имитации спонтанной активности введём в рассмотрение модель цветного шума (Ornstein-Uhlenbeck process) для синаптического тока I_S :

$$\tau \frac{dI_S}{dt} = -I_S + \sqrt{2\tau\sigma}\xi(t) \quad (5.2)$$

где $\xi(t)$ — гауссов белый шум, характеризуемый средним значением $\langle \xi(t) \rangle = 0$ и автокорреляцией $\langle \xi(t)\xi(t') \rangle = \tau\delta(t-t')$; τ — временная постоянная корреляции шума; σ — амплитуда шума. Такая модель пирамидного нейрона демонстрирует поведение, весьма похожее на поведение экспериментального нейрона, как видно из сравнения рисунков 7 и 1.

6. Два управляющих параметра нейрона

Вернемся к ур. (3.1). Все члены этого уравнения за исключением последних двух слагаемых в правой части уравнения определяют собственные свойства нейрона, в то время как последние два слагаемых — внешние токи, зависящие от синаптической активности и от тока, пропускаемого через электрод в эксперименте. Перегруппируем эти два слагаемых в виде:

$$C \frac{dV}{dt} = -I_{Na}(V, t) - I_K(V, t) - g_L(V(t) - V_L) - s(t)(V(t) - V_0) + u(t) \quad (6.1)$$

где

$$s(t) = \sum_S G_S(t), u(t) = \sum_S (t)(V_S - V_0) + I_{el}(t) \quad (6.2)$$

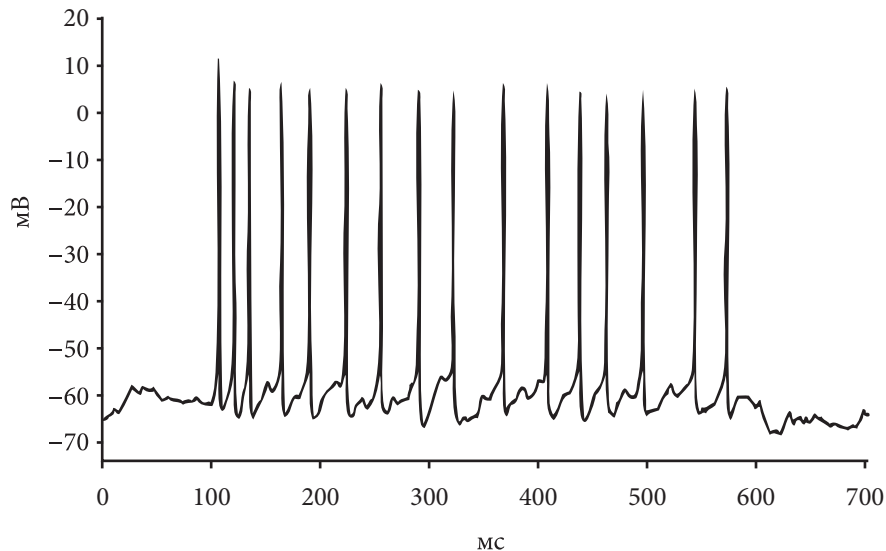


Рис. 7. Численное решение уравнений пирамидного нейрона (Graham, 1999) при задании стимулирующего тока $I_{el} = 300$ пА в период с 100 по 600 мс.

— управляющие параметры нейрона; V_0 -произвольная постоянная. Действительно, в предположении о независимости синаптических проводимостей от потенциала параметры s и u не зависят от активности самого нейрона, т. е. от $V(t)$, и образуют в ур. (6.1) член, линейно зависящий от потенциала, и свободный член. Таким образом, сколько бы ни было синаптических каналов, управление состоянием нейрона осуществляется через два этих комплекса (Покровский, 1987). Как следствие, любая характеристика активности нейрона и, в частности, частота стационарной импульсации, должны рассматриваться как функции этих двух параметров $v = v(u, s)$ (рис. 8). Значения s и u могут быть интерпретированы как суммарная синаптическая проводимость (проводимость открытых синаптических каналов) и внешний (синаптический) ток, измеренный на уровне потенциала V_0 . Часто измеряемая в эксперименте зависимость частоты спайков от подаваемого через электрод тока $v(I_{el})$ на рис. 8 представлена сечением двумерного графика горизонтальной осью, т. е. $v(I_{el}) = v(u, s = 0)$. Видно, что начиная с некоторого порогового значения тока около $10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ частота спайков увеличивается, а при токах больших приблизительно $140 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ генерация спайков срывается из-за недостаточной де-инaktivации натриевых каналов за межспайковый интервал. Форма зависимости при ненулевых значениях s показывает, что шунтирующее влияние синаптической проводимости приводит к сдвигу пороговых токов возбуждения, и, более того, при значениях синаптической проводимости $s > 1.3$ возбуждение невозможно. Важно иметь в виду, что зависимость $v(I_{el})$ представляет собой лишь сечение двумерного графика, т. е. недостаточно полно характеризует стационарную спайковую активность.

Исключительным случаем настоящего рассмотрения является активность потенциал-зависимых синапсов типа NMDA; в этом случае, если зависимость синаптической проводимости представима как линейная функция, то в уравнении (6.1) появляется третий управляющий параметр, стоящий при квадратичном члене V_2 .

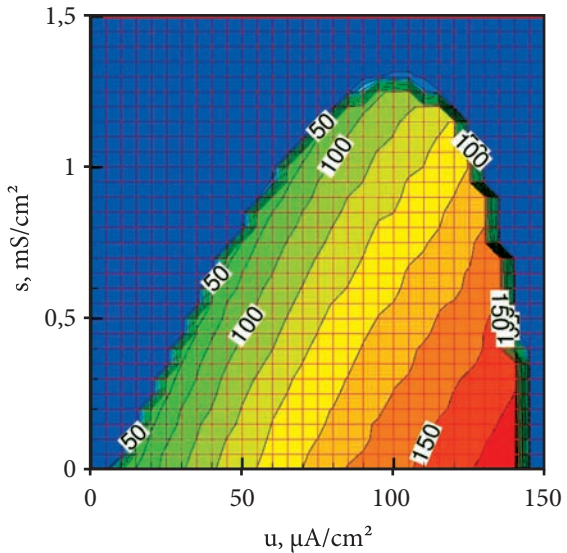


Рис. 8. Зависимость частоты стационарной импульсации нейрона Ходжкина-Хаксли [ур. (4.14) с аппроксимациями (4.4–4.11)] от управляющих параметров s — «синаптической проводимости» и — «синаптического тока», измеренного при фиксации потенциала на уровне $V_0 = V_K$. Пример спайковой активности нейрона, показанный на рис. 6, соответствует точки плоскости с координатами $u = 11 \mu\text{A}/\text{cm}^2$, $s = 0$.

7. Кинетика синаптических каналов

Синаптические токи связаны с синаптическими проводимостями и мембранным потенциалом согласно закону Ома, ур. (2.2):

$$i_S(t) = g_S(t)(V(t) - V_S) \quad (7.1)$$

где g_S — синаптическая проводимость; V_S — потенциал реверсии синаптического тока s-типа.

Зависимость от времени синаптической проводимости $g_S(t)$ определяется пресинаптической спайковой активностью и кинетикой синаптических каналов данного типа. Простейшей аппроксимацией кинетики синаптической проводимости является обыкновенное дифференциальное уравнение первого порядка:

$$\tau_S \frac{dg_S}{dt} = \tau_S \bar{g}_S \delta(t - t^{spike}) \quad (7.2)$$

где τ_S — постоянная времени убывания синаптической проводимости после открытия синаптических каналов; \bar{g}_S — максимальная проводимость; t^{spike} — момент времени, когда на пресинаптическую терминаль приходит спайк; $\delta(t)$ — дельта-функция.

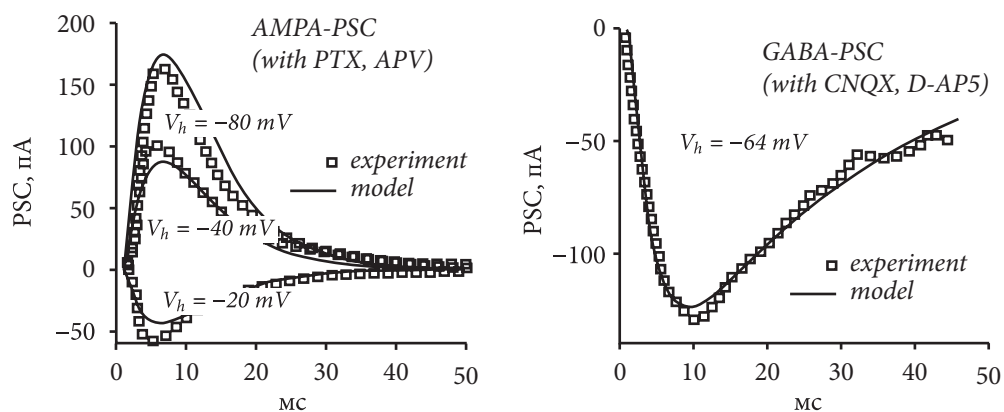


Рис. 9. Кинетика синаптических токов, вызванных короткой внеклеточной стимуляцией пресинаптических аксонов в эксперименте (квадратики) и в модели (сплошные линии), основанной на ур. (7.1, 7.2). Временные константы для AMPA-проводимости: $\tau_1^{AMPA} = \tau_2^{AMPA} = 5,4$ ms, для GABA-проводимости: $\tau_1^{GABA} = 0,2$ ms, $\tau_2^{GABA} = 8,3$ ms; потенциалы реверсии $V_{AMPA} = 0$, $V_{GABA} = -70$ mV. Экспериментально токи регистрировались на сомах пирамидных клеток области CA1 гиппокампа (Karnup & Stelzer, 1999).

Аппроксимация токов на основе ур. (7.1, 7.2) приемлема для токов, измеряемых на отдельных синапсах. Однако токи, измеряемые на соме нейрона, кроме эффектов открытия синаптических каналов на отдельных синапсах отражают также эффекты электротонического проведения синаптического возбуждения по дендритам до сомы. Кроме того, часто пресинаптическое возбуждение затрагивает множество синапсов, и постсинаптические токи, измеряемые на соме, отражают суммарный по этому множеству синапсов сигнал.

В этом случае синаптические токи и соответствующие эффективные синаптические проводимости оказываются сглаженными во времени. Удачной аппроксимацией для такой синаптической проводимости является аппроксимация обыкновенным дифференциальным уравнением второго порядка:

$$\tau_1 \tau_2 \frac{d^2 g_S}{dt^2} + (\tau_1 + \tau_2) \frac{dg_S}{dt} + g_S = \tau \bar{g}_S \delta(t - t^{spike}) \quad (7.3)$$

где τ_1, τ_2 — постоянные времени нарастания и убывания синаптической проводимости; τ — масштабирующая константа времени, $\tau = 1 \text{ ms}$.

8. Понятие популяции нейронов

Во многих областях мозга нейроны организованы в популяции. Свойства и входные сигналы нейронов такой популяции схожи. Поскольку активность нейронов внутри популяции более или менее синхронизирована, то их пресинаптическое воздействие на другие нейроны или нейроны своей популяции оказывается более сильным, чем активность одиночных нейронов, то есть один нейрон часто не может оказать решающего пресинаптического воздействия на другой нейрон, достаточного для генерации им потенциала действия. По этой причине в большинстве случаев функциональной активности мозга значимой оказывается именно активность популяций, в то время как одиночные нейроны и ограниченные нейронные сети работают на фоне популяционной активности. Следует отметить, что множество нейронов, которое можно рассматривать как популяцию, различно для разных случаев активности мозга. Так, в каких-то случаях под отдельной популяцией можно понимать, например, пирамидные нейроны отдельной колонки коры головного мозга, а в другом случае, например при однородной стимуляции обширной области коры, это может быть множество пирамидных нейронов колонок всей этой области. Когда число нейронов популяции велико, то разумно математически описывать осреднённую по множеству нейронов активность популяции, а не спайковую активность индивидуальных нейронов. Как при переходе от описания отдельных частиц к макроописанию ансамблей в статистической физики, уравнения популяций выводятся из уравнений единичных нейронов, но существенно отличаются. Итак, для математического описания популяции введем определение.

Популяция — это набор подобных нейронов, получающих подобный входной сигнал.

С целью упрощения модельного рассмотрения вводят дополнительные допущения. Различия характеристик нейронов (например, порогов) и входных сигналов (например, шума), которые приводят к разбросу активности нейронов, могут быть отражены в дисперсии входных сигналов в предположении одинаковости собственных свойств нейронов. Различие во входных сигналах может быть представлено в модели как шум на фоне одинаковых для всех нейронов осредненных сигналов. Количество нейронов популяции считается бесконечным.

Выходным сигналом популяции является популяционная спайковая активность, или популяционная частота (population firing rate). Она определяется формулой:

$$v(t) = \lim_{\Delta t \rightarrow 0} \lim_{N \rightarrow \infty} \frac{1}{\Delta t} \frac{n_{act}(t; t + \Delta t)}{N} \quad (8.1)$$

где $n_{act}(t; t + \Delta t)$ — количество спайков N нейронов популяции, произошедших в промежутке времени $(t; t + \Delta t)$.

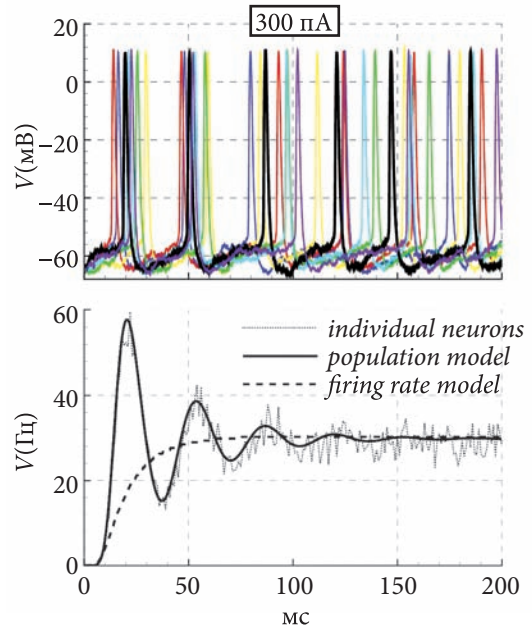
На рис. 10 представлен пример вычисления популяционной частоты по ответам нейронов популяции при внутриклеточной стимуляции постоянным током. Спайки нескольких представленных нейронов распределены во времени неравномерно. Вычисление числа спайков в каждую единицу времени для большого числа нейронов приводит к популяционной частоте, показанной на нижнем рисунке. Первые с момента стимуляции спайки нейронов образуют первый горб популяционной частоты, вторые — второй, далее спайки разных нейронов всё более перемешиваются.

9. Частотная модель популяции (firing rate model)

Простейшим классом моделей популяции нейронов является класс частотных (firing rate) моделей. Как было замечено в п. 1, простейшим описанием спайковой активности одного нейрона является зависимость

$$v = v(I_a) \quad (9.1)$$

Рис. 10. На верхнем рисунке представлены мембранные потенциалы семи нейронов популяции в ответ на внутриклеточную стимуляцию постоянным током (верхний рисунок). Снизу — популяционная активность, вычисленная по ф. (8.1) для 4000 нейронов (тонкая флуктуирующая кривая) и для бесконечного количества нейронов (толстая сплошная линия), посчитанная с помощью подробной популяционной модели (conductance-based Refractory Density Approach). Для сравнения, пунктирной линией приведён результат применения простейшей частотной (firing rate) модели популяции (9.2, 9.3).



Такая же зависимость может отражать активность популяции таких нейронов. Несколько более сложной моделью является зависимость частоты спайков от беспайкового мембранного потенциала U , получаемого согласно закону Ома (1.1), интегрирующему входной ток I_a :

$$C \frac{dU}{dt} = -g_L(U - V_L) + I_a \quad (9.2)$$

$$v = v(U) \quad (9.3)$$

Поведение такой модели представлено на рис. 10. Такая модель хорошо отражает стационарный режим, т. е. режим установившейся спайковой активности нейронов популяции при постоянном стимуле. В случае, когда наблюдается синхронизация, например при внезапно начавшемся стимуле как на начальном этапе рис. 10, модель не может адекватно воспроизвести популяционную частоту. Зависимость (9.3) для популяции нейронов-пороговых интеграторов с разбросом потенциала, характеризуемым дисперсией σ_V , может быть вычислена согласно работе (Johannesma, 1968):

$$v^{st.} = A(U) = \left(\tau_m \sqrt{\pi} \int_{(V_{reset}-U)/\sigma_V\sqrt{2}}^{(V_T-U)/\sigma_V\sqrt{2}} e^{u^2} (1 + erf(u)) du \right)^{-1}; \quad \tau_m = C/g_L \quad (9.4)$$

Более точная модель воспроизводит как режим стационарной генерации спайков, так и режим возникновения генерации при увеличении потенциала U (Chizhov et al., 2007):

$$v(t) = A(U) + B(U, dU/dt) \quad (9.5)$$

где частота стационарной генерации задана формулой (9.4), а частота нестационарной генерации определяется формулой, выведенной в предположении о гауссовом распределении мембранного потенциала в нейронах популяции с дисперсией σ_V около среднего значения U :

$$B(U) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_V} \left[\frac{dU}{dT} \right]_+ \exp\left(-\frac{(V_T - U)^2}{2\sigma_V^2}\right) \quad (9.6)$$

Таким образом, в качестве достаточно простой модели популяции, приближенно описывающей режимы стационарной и нестационарной активности, можно порекомендовать модель, состоящую из уравнения (9.2) и формул (9.4-9.6). Как следует из рис. 11, такая модель позволяет воспроизвести первый популяционный пик, возникающий из-за синхронной генерации первых спайков нейронов в ответ на начавшийся стимул, а также установившийся уровень частоты.

10. Популяционные синаптические токи

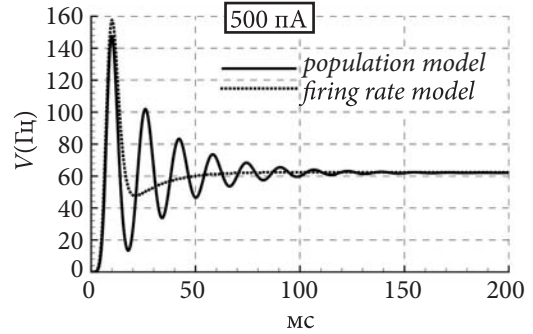
Синаптические токи в нейронах популяции управляются популяционной частотой спайков, приходящих по аксонам нейронов пресинаптической популяции. Аппроксимационное уравнение для проводимости получается усреднением ур. (7.3) по нейронам пресинаптической популяции:

$$\tau_1 \tau_2 \frac{d^2 g_S}{dt^2} + (\tau_1 + \tau_2) \frac{dg_S}{dt} + g_S = \tau \bar{g}_S v^{pre}(t) \quad (10.1)$$

где τ_1, τ_2 — постоянные времена нарастания и убывания синаптической проводимости; τ — масштабирующая константа времени, $\tau = 1$ ms; $v_{pre}(t)$ — частота пресинаптической спайковой активности. Постоянные τ_1, τ_2 были найдены в п. 7.

Если пренебречь аксонной задержкой и эффектами пространственного распространения по аксонам, то можно считать, что частота спайковой импульсации на окончаниях аксонов пресинаптической популяции $v_{pre}(t)$ равна частоте спайковой импульсации на сомах ней-

Рис. 11. Популяционная активность, вычисленная с помощью подробной популяционной модели (сплошная линия) и с помощью частотной модели (пунктир), основанной на ур. (9.2, 9.4–9.6). Нейроны популяции с момента $t = 0$ стимулировались постоянным током.



ронов этой популяции. Например, в ур. (10.1) для синапсов АМРА-типа можно подставить $v_{pre}(t) = v_E(t)$, где $v_E(t)$ — популяционная частота спайков от возбуждающих нейронов. Таким образом, набор уравнений для каждого типа синапсов типа ур. (10.1) вместе с формулами для мембранного потенциала и популяционной частоты (9.2, 9.4–9.6) позволяют строить модели связанных популяций.

11. Пример моделирования с помощью частотной модели популяции нейронов

Рассмотрим популяцию FS (fast spiking) нейронов, возбуждаемых аксонами клеток таламуса, которые испытывают воздействие стимула (Cruikshank et al., 2007). Ответ единичной FS клетки определяется моносинаптическим возбуждением и торможением посредством рекуррентных связей внутри популяции FS нейронов (рис. 12). Как следствие, вызванные внешним стимулом постсинаптические ответы единичного FS нейрона зависят от амплитуды стимула. Опишем модель такого простого взаимодействия внутри одной популяции.

Краткий импульс активности аксонов таламических нейронов вызывает возбуждающие постсинаптические токи в FS нейронах (рис. 13), которые можно вычислить согласно ур. (7.1, 10.1):

$$i_E(t) = g_E(t)(V(t) - V_E) \quad (11.1)$$

$$\tau_1^E \tau_2^E \frac{d^2 g_E}{dt^2} + (\tau_1^E + \tau_2^E) \frac{dg_E}{dt} + g_E = \tau \bar{g}_E v^{ext}(t) \quad (11.2)$$

где $\tau_1^E = 0,1$ ms, $\tau_2^E = 3,3$ ms, $\tau = 1$ ms, $\bar{g}_E = 70$ nS, $V_E = 5$ mV, $v^{ext}(t)$ — импульс длительностью 1 ms.

Возбуждающий постсинаптический ток $i_E(t)$ вызывают деполяризацию мембраны FS нейронов, согласно закону Ома:

$$C \frac{dU}{dt} = -g_L(U - V_L) + i_E(t) + i_I(t) \quad (11.3)$$

где $R_m = 1/g_L = 81$ MΩ, $\tau_m = C/g_L = 9$ ms, $V_L = -78$ mV. При достаточно сильном стимуле FS нейроны генерируют спайки, и в результате связей FS нейронов внутри популяции появляется тормозящий постсинаптический ток $i_I(t)$. Возбуждение FS нейронов характеризуется популяционной частотой спайков $v(t)$, которая вычисляется по формулам (9.4–9.6):

$$v(t) = A(U) + B(U)$$

$$A(U) = \left(\tau_m \sqrt{\pi} \int_{(V_{reset}-U)/\sigma_V \sqrt{2}}^{(V_T-U)/\sigma_V \sqrt{2}} e^{u^2} (1 + erf(u)) du \right)^{-1}$$

$$B(U) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_V} \left[\frac{dU}{dt} \right]_+ \exp\left(-\frac{(V_T - U)^2}{2\sigma_V^2}\right) \quad (11.4)$$

где $V_{reset} = V_L$, $V_T - V_L = 14$ mV, $\sigma_V = 2$ mV.

Аналогично возбуждающему току, тормозящий синаптический ток аппроксимируется уравнениями

$$i_I(t) = g_I(t)(V(t) - V_I) \quad (11.5)$$

$$\tau_1^I \tau_2^I \frac{d^2 g_I}{dt^2} + (\tau_1^I + \tau_2^I) \frac{d g_I}{dt} + g_I = \tau \bar{g}_I v(t) \quad (11.6)$$

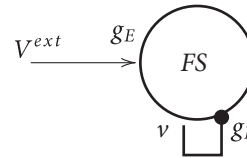
где $\tau_1^I = 0,5$ ms, $\tau_2^I = 5$ ms, $\bar{g}_I = 60$ nS, $V_I = -88$ mV.

На рис. 13 и 14 приведено сравнение экспериментальных регистраций и модели. Очевидно как качественное, так и неплохое количественное согласование графиков, что показывает адекватность построенной одно-популяционной модели.

12. Популяционные модели на основе Probability Density Approach

Как отмечалось в п. 9, частотные модели популяции лишь приближенно описывают динамику активности популяций. В общем случае оказывается важным то, как распределены нейроны по фазам своей спайковой активности. Временная синхронизация и десинхронизация нейронов может существенно изменить эволюцию популяционной частоты даже при относительно постоянной частоте разрядов. Например, в абстрактном случае постоянного входа на все нейроны популяции, показанном на рис. 11, частоты спайков от отдельных нейронов приблизительно одинаковы и постоянны, в то время как на графике популяционной частоты видны резкие пики активности, вызванные синхронизацией моментов генерации спайков и периодов молчания нейронов. Воспроизвести такую активность помогает Probability Density Approach, рассматривающий эволюцию плотности распределения нейронов по одному или нескольким параметрам состояния нейрона.

Рис. 12. Схема активности популяции FS (fast spiking) нейронов, возбуждаемых внешним стимулом $v^{ext}(t)$, приходящим из таламуса. Обозначения: $v(t)$ — популяционная частота спайков FS нейронов, $g_E(t)$, $g_I(t)$ — проводимости возбуждающих и тормозящих синапсов.



Этот подход в применении к упрощённым моделям отдельных нейронов описан в работах (Knight, 1972; Omurtag et al., 2000; Eggert & van Hemmen, 2001; Nykamp & Tranchina, 2000) и подробно освещен в книге (Gerstner & Kistler, 2002). Основная проблема теории популяционного моделирования состоит в том, чтобы уменьшить размерность основных уравнений. Поскольку в общем случае состояние нейрона описывается не одной, а несколькими переменными, то рассмотрение распределения большого или бесконечного числа нейро-

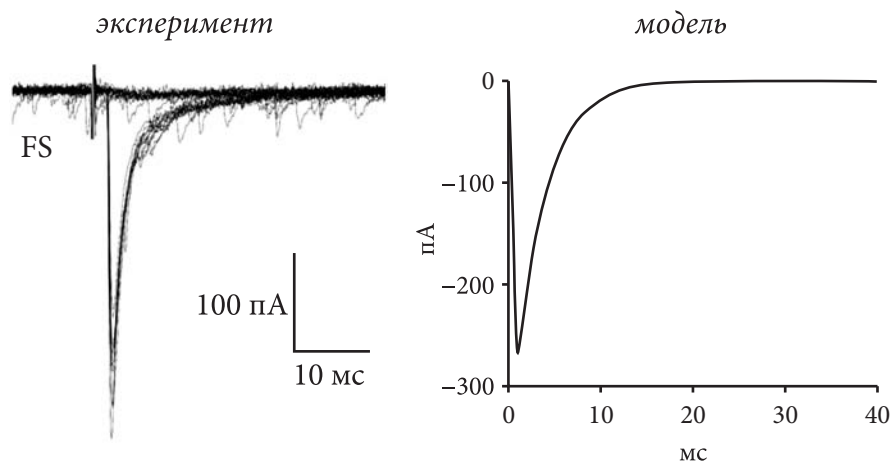


Рис. 13. Постсинаптический (моносинаптический) ток в FS-нейроне при слабой таламической стимуляции током $30 \mu\text{A}$ и потенциале фиксации 88 mV в эксперименте (слева) (adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: (Cruikshank et al., 2007), copyright 2007) и в модели (справа).

нов по этим параметрам приводит к многомерным дифференциальным или интегральным уравнениям в частных производных. Решение таких уравнений столь же сложно получить, как и решение большого или бесконечного числа систем уравнений отдельных нейронов, составляющих популяцию. Поэтому различные популяционные модели класса Probability Density Approach предлагают разные варианты упрощений, приводящих к одномерным уравнениям (Чижов & Турбин, 2006). Стоит выделить два варианта выбора единственного параметра состояния нейрона. Первый — это мембранный потенциал. В этом случае уравнение для плотности распределения нейронов по мембранному потенциалу строится на основе уравнения Колмогорова-Фоккера-Планка. Однако если для моделей типа порогового интегратора мембранный потенциал и так является единственным параметром состояния, то для более сложных нейронов этот параметр неоднозначно определяет состояние между спайками. Второй вариант — время, отсчитываемое от момента спайка нейрона. Модели с такой параметризацией для нейронов типа пороговых интеграторов или некоторых других упрощенных моделей нейронов разработаны в упомянутых выше работах. Для подробных нейронов, рассматривающих богатый набор ионных каналов в аппроксимации типа Ходжкина-Хаксли, в том числе медленных каналов спайковой адаптации, популяционная модель со временем от спайка предложена в работах (Chizhov & Graham, 2007; Chizhov & Graham, 2008). Рассмотрение упомянутых моделей а также примеров подробного моделирования активности взаимосвязанных популяций выходит за рамки настоящего вводного материала.

Заключение

Таким образом, в настоящей главе мы описали иерархию моделей единичного нейрона разной сложности, аппроксимацию синаптических токов и простейшие модели нейронных популяций. Приведенные математические модели позволяют в той или иной мере воспроиз-

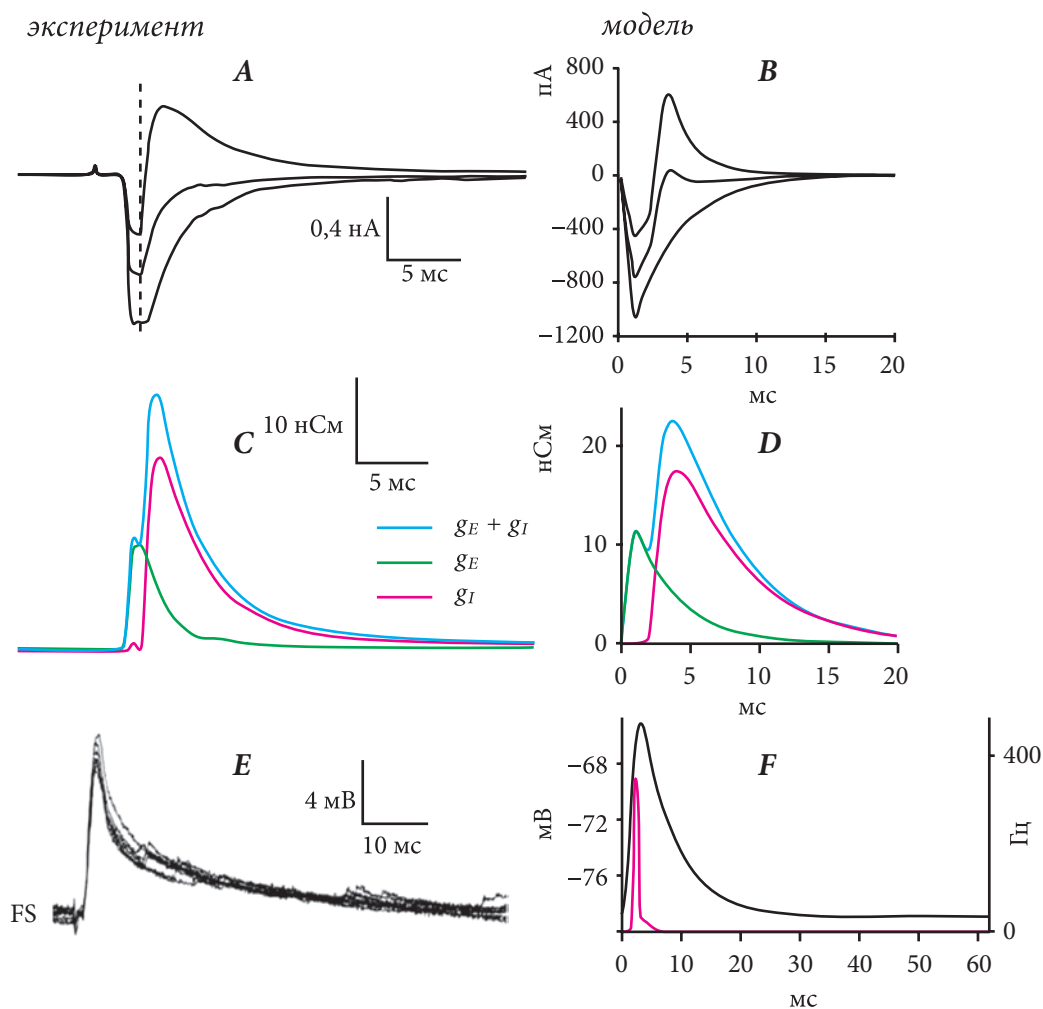


Рис. 14. Ответы FS-нейронов на таламическую стимуляцию током $120 \mu\text{A}$ в эксперименте (слева) (adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: (Cruikshank et al., 2007), © 2007) и в модели (справа). А, В) постсинаптические токи при потенциале фиксации -88 , -62 , и -35 mV ; С, D) синаптические проводимости; Е, F) постсинаптические потенциалы U и модельная популяционная частота ν .

водить ответы нейронов, регистрируемые электрофизиологическими методами, и являются основой для построения более подробных моделей.

В качестве дополнительной учебной литературы по моделям нейронов и моделям нейронных популяций на русском языке можно порекомендовать главу 3 из (Покровский, 1987); на английском языке в интернете доступна книга (Gerstner & Kistler, 2002).

Работа поддержана грантами РФФИ-НЦНИ 07-04-92167а, РФФИ 09-01-00473а.

Список литературы

- Покровский, А. Н. (1987) Процессы управления в нервных клетках. Учеб. пособие. Л., ЛГУ, 86 с.
- Чижов, А. В. & Турбин, А. А. (2006) От моделей единичных нейронов к моделям популяций нейронов. *Нейроинформатика*, 1(1), 76-87; <http://www.niisi.ru/Journal/N1/ChTur.pdf>
- Borg-Graham, L. (1999) Interpretations of data and mechanisms for hippocampal pyramidal cell models. In: *Cerebral Cortex* (P. S. Ulinski, E. G. Jones and A. Peters, eds), v.13, pp.19-138, Plenum Press.
- Chizhov, A.V. & Graham, L.J. (2007) Population model of hippocampal pyramidal neurons, linking a refractory density approach to conductance-based neurons. *Phys. Rev. E*, 75, 011924.
- Chizhov, A.V. & Graham, L.J. (2008) Efficient evaluation of neuron populations receiving colored-noise current based on a refractory density method. *Phys. Rev. E*, 77, 011910.
- Chizhov, A.V., Rodrigues, S. & Terry, J.R. (2007) A comparative analysis of a firing-rate model and a conductance-based neural population model. *Physics Letters A*, 369(1-2), 31-36.
- Cruikshank, S. J., Lewis, T. J. & Connors, B.W. (2007) Synaptic basis for intense thalamocortical activation of feedforward inhibitory cells in neocortex. *Nature Neuroscience*, 10(4), 462-468.
- Eggert, J. & van Hemmen, J.L. (2001) Modeling Neuronal Assemblies: Theory and Implementation. *Neural Computation*, 13, 1923-1974.
- Gerstner, W. & Kistler, W.M. (2002) *Spiking Neuron Models, Single Neurons, Populations, Plasticity*. Cambridge University Press, Cambridge, U. K.
- Hodgkin, A. L. & Huxley, A. F. (1952) A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J. Physiology*, 117(4), 500-544.
- Johannesma, P. I. M. (1968) Diffusion models of the stochastic activity of neurons. In: *Neural Networks*, pp.116-144, Berlin. Springer.
- Kandel, E. R., Schwartz, J. H. & Jessell, T. M. (2000) *Principles of Neural Science*. Forth edition. 1414 pages. McGraw-Hill.
- Karnup, S. & Stelzer, A. (1999) Temporal overlap of excitatory and inhibitory afferent input in guinea-pig CA1 pyramidal cells. *J. Physiology*, 516(2), 485-504.
- Knight, B.W. (1972) Dynamics of encoding. *J. Gen. Physiol.*, 59, 734-766.
- Kopell, N., Ermentrout, G.B., Whittington, M.A. & Traub, R.D. (2000) Gamma rhythms and beta rhythms have different synchronization properties. *Neurobiology*, 97(4), 1867-72.
- Nykamp, D. & Tranchina, D. (2000) A Population Density Approach That Facilitates Large-Scale Modeling of Neural Networks: Analysis and an Application to Orientation Tuning. *J. Comput. Neuroscience*, 8, 19-50.
- Omurtag, A., Knight, B.W., & Sirovich, L. (2000). On the simulation of large populations of neurons. *J. Comput. Neuroscience*, 8, 51-63.

КОГНИТИВНЫЕ НЕЙРОНАУКИ

Когнитивное развитие ребенка в первый год жизни: Поведенческие и электро- физиологические методы исследования

Традиционно поведение новорожденных младенцев в первые недели и даже месяцы жизни рассматривалось как исключительно обусловленное рефlekсами. В норме когнитивное развитие оценивается психологами и врачами ближе к концу второго года жизни. В последние годы, однако, все большее количество исследований демонстрирует, что дети уже при рождении обладают уникальными способностями воспринимать и осваивать информацию. Исследование развития ребенка в первый год жизни может помочь оценить риск развития некоторых генетически обусловленных заболеваний, таких как аутизм или дислексия. В данной главе будут рассмотрены методы исследования некоторых аспектов раннего когнитивного развития детей в первый год жизни.

Парадигма габитуации/дисгабитуации (habituation/dishabituation paradigm)

Ориентировочная реакция (или ориентировочный рефлекс, ОР) на новизну и ее угасание (привыкание или габитуация) в ответ на повторяющийся стимул могут быть зарегистрированы у новорожденных в первые дни жизни. Обнаружение нового в окружающей среде не только необходимо для выживания организма, но и является одним из основных механизмов научения. Габитуация представляет собой адаптивный процесс — организм прекращает реагировать на незначимый, не несущий новой информации стимул. ОР включает ряд реакций организма: поворот головы, движение глаз, изменение сердечного ритма и кожно-гальванической реакции, а также десинхронизацию электроэнцефаллограммы (ЭЭГ) и увеличение амплитуды некоторых вызванных потенциалов мозга (ВП). Изменения сердечного ритма как показатель ОР могут быть зарегистрированы онтогенетически очень рано (см. обзор в Gomes et al. 2000): на последнем триместре беременности плод реагирует замедлением сердечного ритма в ответ на новый стимул (Lecanuet et al. 2000).

Способность новорожденных отвечать на стимул (*responsiveness*) сильно варьирует в зависимости от параметров стимуляции и от уровня бодрствования. Вскоре после рождения новорожденные реагируют предпочтительно на физические характеристики стимула, такие как интенсивность и спектральный состав, изменение которых ведет к изменению общей энергии сигнала. Левковиц и Туркевич (Lewkowicz and Turkewitz 1980) в своем исследовании продемонстрировали любопытный факт: новорожденные могли «сопоставлять» зрительные и звуковые стимулы по их интенсивности, реагируя на изменения общей энергии стимула, а не его модальности — задача непосильная для взрослых.

В течение первых месяцев жизни ребенок реагирует на стимулы все более избирательно, и все больше опираясь на собственный опыт. В то время как новизна становится более зна-

чимой, интенсивности и спектральной насыщенности стимула уделяется меньше внимания. Это важный этап в развитии селективного внимания — способности удерживать внимание на важном, не отвлекаясь на посторонние, не относящиеся к текущей активности стимулы.

Феномен габитуации в ответ на повторяющийся раздражитель и последующей дисгабитуации в ответ на изменение стимула (или на новый стимул) широко используется в исследовании когнитивных функций детей в возрасте до полутора лет.

Поведенческие тесты, использующие парадигму габитуации/дисгабитуации применяются, например, для изучения способности младенцев различать стимулы из разных категорий. Стимулы из первой категории предъявляются до тех пор, пока ребенок активно сосет соску-датчик для измерения частоты сосания (тест известный в англоязычной литературе как высокоамплитудное сосание, *high-amplitude sucking*, HAS) или внимательно смотрит на зрительный стимул (регистрация времени фиксации взгляда, *looking time*). Подобное поведение свидетельствует о повышенном внимании, интересе к стимулу, и в данном случае стимул сам по себе служит подкреплением (*conjugate reinforcer*). Когда ребенок теряет интерес к повторяющемуся стимулу и соответственно частота сосания или время зрительной фиксации уменьшается (наступает привыкание), предъявляется стимул из другой категории. Считается, что ребенок различает два стимула, если в ответ на стимул из второй категории частота сосания или время фиксации снова возрастает (*response recovery*).

Парадигма предпочтения (*preference paradigm*)

Как вариант парадигмы габитуации используется парадигма предпочтения (*preference paradigm*), в которой ребенку предъявляются одновременно два стимула, например, справа и слева на мониторе, и регистрируется время фиксации на каждом стимуле. Чаще всего эта парадигма демонстрирует предпочтение новизны (*novelty preference*), то есть ребенок проводит больше время, изучая новый стимул, чем тот, который уже видел и достаточно изучил. В некоторых случаях, однако, возможно предпочтение знакомого (*familiarity preference*), когда ребенок предпочитает известный ему стимул, особенно это касается биологически значимых стимулов на ранних этапах развития. Так, новорожденные предпочитали проводить время, повернувшись к источнику запаха, который они «выучили» в первый час после рождения (Varendi, Porter and Winberg 2002), а 2-месячные дети предпочитают смотреть на речевую мимику, которая совпадает со звучащим текстом, чем на артикуляцию, не соответствующую ему (Weikum et al. 2007).

Инструментальный условный рефлекс

Изменение частоты сосания в ответ на стимул у новорожденных использовалось также при выработке инструментального условного рефлекса (*instrumental conditioning* (обзор в Moon and Fifer 2000). ДеКаспер и Файфер (DeCasper and Fifer 1980) разработали метод, который позволил показать, что в первые дни жизни новорожденные младенцы предпочитают голос матери голосу незнакомой женщины. Изменяя частоту сосания соски-датчика, младенцы могли инициировать воспроизведение пленки с записью голоса матери или другой женщины, причем одна группа малышей должна была сосать соску с более высокой частотой, чтобы слышать голос матери, а другая группа — с более низкой. Обе группы детей продемонстрировали не только предпочтение голоса матери в первые дни жизни, но и способность контролировать частоту сосания для достижения желаемого результата. К возрасту

8–10 недель дети быстро научаются двигать ножкой, чтобы запускать движение подвижной игрушки («мобиль»), прикрепленной к детской кроватке (Rovee and Rovee 1969). В этом исследовании эластичная резинка крепилась одним концом к игрушке, другим концом к коленке ребенка. Каждое движение ноги вызывало движение подвижной игрушки. В течение нескольких минут дети научались оперировать игрушкой, увеличивая ритм движений ноги. Частота движений не увеличивалась у контрольной группы детей, у которых игрушка двигалась независимо от их движений. Из этого следует, что увеличение двигательной активности нельзя объяснить общим возбуждением детей при виде «мобиля». Этот метод используется в настоящее время для изучения долгострочной памяти у детей первого года жизни (Rovee-Collier 1997): детей тестируют повторно с отсрочкой в несколько месяцев.

Описанные выше методы исследования детского развития можно объединить под названием «поведенческие методы». Поведенческие методы не всегда удобны и адекватны в исследованиях когнитивных функций новорожденных детей, поскольку способности младенцев к координированному моторному акту и к удержанию определенного уровня внимания ограничены в первые недели жизни. Нашумевшее исследование о способности новорожденных имитировать лицевую мимику (Meltzoff and Moore 1977) не получило достаточное количество достоверных подтверждений в последующих исследованиях. Авторы предположили, что способность к имитации, обнаруженная сразу после рождения, угасает на некоторое время и возобновляется через несколько месяцев (Meltzoff and Moore 1989). Позже было показано, что имитация такой лицевой мимики, как открытый рот и высунутый язык, могла иметь альтернативное объяснение — новорожденные высовывают язык в ответ на заинтересовавший их стимул, так как рот и язык малышей являются для них в первые недели жизни одним из наиболее важных инструментов исследования (Jones 1996, Jones 2006).

Другая сложность в исследовании когнитивного развития очень маленьких детей — это сильная зависимость поведенческой реакции ребенка от уровня бодрствования (активности). Вольф выделил 6 уровней активности новорожденных (активное бодрствование, плач, спокойное бодрствование, полусон, глубокий сон (quiet sleep), поверхностный сон (active sleep)) и продемонстрировал, что в состоянии спокойного бодрствования младенцы реагировали на стимуляцию повышением общей активности, в то время как те, которые находились в активном бодрствовании или кричали, наоборот, успокаивались (Wolff 1966).

В последние годы все большую популярность приобретают электрофизиологические методы исследования, позволяющие получить информацию о функционировании мозга независимо от уровня бодрствования и способности ребенка продемонстрировать ожидаемый поведенческий ответ. Вызванные потенциалы (ВП), связанные с обработкой слуховой информации, возможно зарегистрировать, например, у новорожденных даже в состоянии глубокого сна.

Метод ВП позволяет исследовать обработку сигнала с точным временным разрешением, хотя не является очень точным в отношении пространственного разрешения, где на помощь приходят имиджинговые методы, такие как магнитно-резонансная и оптическая томография, которые также начинают активно применяться к изучению когнитивных функций детей до года.

Магнитно-резонансная томография (МРТ) не самый удобный метод в исследовании детей, так как бодрствующие дети не могут находиться без движения даже в течение очень короткого времени. На настоящий момент известно только одно исследование, проведенное с бодрствующими 3-месячными малышами с использованием функциональной МРТ (Dehaene-Lambertz et al. 2006). Оптическая томография, использующая излучение около-

инфракрасного диапазона (near-infrared spectroscopy, NIRS), позволяет локализовать источник активации в мозге с пространственным разрешением, сопоставимым с МРТ, и является гораздо более удобной методикой для применения в детских исследованиях: отсутствует шум сканнера, магнитное поле и ограничения пространства и подвижности. На настоящий момент, некоторые работы показали активацию соответствующих областей мозга детей до полугода в ответ на речевые (Watanabe et al. 2008, Homae et al. 2007, Homae et al. 2006, Minagawa-Kawai et al. 2007b, Minagawa-Kawai et al. 2007a, Pena et al. 2003) и зрительные стимулы (Watanabe et al. 2008) (см. также обзор А. Н. Шестаковой и соавт. в данном сборнике).

Электрофизиологические методы исследования раннего детского развития

ВП, или связанные с событием потенциалы (ССП), представляют собой усредненную электрическую активность мозга в ответ на то или иное событие. Так как амплитуда спонтанной ЭЭГ много больше, чем амплитуда ВП, необходимо большое количество усреднений (для волн меньшей амплитуды необходимо большее количество усреднений). Так, например, чтобы выявить низкоамплитудные стволовые слуховые ВП (brain stem auditory potentials, ВАЕР), необходимо около 1000 усреднений, в то время как высокоамплитудные ВП детей в ответ на зрительные стимулы могут быть выявлены уже при 15–20 усреднениях.

Вызванные потенциалы, по всей вероятности, генерируются в результате нескольких процессов. Одной из наиболее широко используемых гипотез генерации ВП является механизм дополнительного компонента (Dawson, 1950, additive activity). Его основная идея состоит в том, что спонтанная ЭЭГ активность рассматривается как шум, к которому добавляется дополнительный компонент при предъявлении того или иного стимула. После усреднения нескольких реализаций спонтанная активность взаимоисключается, а ВП остается.

Предполагается, что основным источником такого рода ВП являются большие пирамидные клетки. Возбуждающие постсинаптические потенциалы (ВПСП) в этих клетках возникают главным образом в районе апикальных дендритов, что приводит к появлению там отрицательного межклеточного заряда (в районе синаптического контакта) и одновременно положительного заряда в районе сомы. Таким образом, возникает диполь. На поверхности коры (скальпа) такая активация будет соответствовать появлению негативности. В зависимости от расположения синапсов (на апикальных, дистальных дендритах или соме) и от того, является ли данный синапс возбуждающим или тормозным, возможны различные конфигурации негативных и позитивных комплексов при регистрации ВП.

Другим возможным механизмом генерации ВП является механизм фазовой перестройки (phase reset, Sayers et al., 1974). Согласно этой гипотезе для генерации ВП необходимо только наличие спонтанных осцилляций. Когда подается стимул, то такие осцилляции меняют свою фазу на определенное фиксированное значение вне зависимости от того, какая фаза сигнала была до предъявления стимула. После усреднения все несинхронизированные осцилляции уменьшаются, но остается ВП, который отражает кратковременную синхронизацию спонтанных осцилляций.

Недавно был предложен также третий механизм генерации (Nikulin et al., 2007). Он состоит в том, что если среднее значение спонтанных ритмов не равно нулю, то любая амплитудная модуляция таких ритмов должна приводить к генерации ВП. Данная модель предполагает, что, кроме непосредственно осциллирующей части, нейрональные ритмы также

содержат постоянный компонент, который изменяется пропорционально изменению амплитуды ритма.

Данный эффект был показан, например, для альфа-ритма. Поскольку амплитудная модуляция этого ритма часто соответствует в пространственно-временном континууме генерации ВП, представляется вполне возможным, что именно динамика альфа-ритма может быть причиной возникновения компонентов ВП, связанных с когнитивной деятельностью (например, P300, CNV, readiness potential, N400).

В настоящее время существует несколько систем для регистрации ЭЭГ. Наиболее популярными в детских исследованиях являются NeuroScan и EGI (Geodesic Sensor Net). Система NeuroScan позволяет использовать как одиночные электроды, так и электродную шапочку (cap). Одиночные одноразовые электроды очень удобны для работы с новорожденными младенцами — они абсолютно плоские, легко накладываются и снимаются, не требуют электродной пасты и имеют очень низкое переходное сопротивление (5 кОм). Однако использование более 15–20 одноразовых электродов представляется затруднительным,



Рис. 1. Система Geodesic Sensor Net (EGI) из 128 электродов.

так как процесс позиционирования электродов требует времени. Электродная сетка (Geodesic Sensor Net, EGI) позволяет наложить 128 (256) электродов за несколько минут, что делает возможным проведение исследований на подвижных и бодрствующих детях, и делать запись с большого количества электродов. Отметим, что переходное сопротивление электродов в целом выше, чем при использовании одноразовых электродов. Электродная сетка обычно хорошо переносится детьми и не причиняет им никакого беспокойства (рис. 1).

При сравнении данных из разных лабораторий следует очень внимательно относиться к условиям регистрации, а именно: относительно какого референтного электрода (электродов) оцениваются амплитуды и латентности. Необходимо учитывать, что ВП, зарегистрированный на активном электроде, является разностью потенциалов между активным и референтным электродами. В идеале референтный электрод должен быть расположен на электрически нейтральной позиции, но проблема в состоит том, что на голове нет электрически нейтральных мест. Значит, потенциал, зарегистрированный между активным электродом и референтным электродом, будет отражать электрическую активность на обоих электродах. Поэтому часто измеряют разность потенциалов между данным электродом и усредненным значением потенциала на всех электродах (average reference). Однако при недостаточном количестве электродов (электроды не покрывают всю голову) это тоже может привести к искажению сигнала. Оптимальным референтным электродом для небольшого количества активных электродов принято считать алгебраическую сумму левого и правого мастоидных электродов. При этом нужно учитывать, что потенциал, зарегистрированный на мастоидных электродах, будет суммироваться с потенциалом на активных электродах и может приводить к искусственному увеличению или уменьшению амплитуды ВП.

При сравнении данных из разных лабораторий следует очень внимательно относиться к условиям регистрации, а именно: относительно какого референтного электрода (электродов) оцениваются амплитуды и латентности. Необходимо учитывать, что ВП, зарегистрированный на активном электроде, является разностью потенциалов между активным и референтным электродами. В идеале референтный электрод должен быть расположен на электрически нейтральной позиции, но проблема в состоит том, что на голове нет электрически нейтральных мест. Значит, потенциал, зарегистрированный между активным электродом и референтным электродом, будет отражать электрическую активность на обоих электродах. Поэтому часто измеряют разность потенциалов между данным электродом и усредненным значением потенциала на всех электродах (average reference). Однако при недостаточном количестве электродов (электроды не покрывают всю голову) это тоже может привести к искажению сигнала. Оптимальным референтным электродом для небольшого количества активных электродов принято считать алгебраическую сумму левого и правого мастоидных электродов. При этом нужно учитывать, что потенциал, зарегистрированный на мастоидных электродах, будет суммироваться с потенциалом на активных электродах и может приводить к искусственному увеличению или уменьшению амплитуды ВП.

Другой важный момент регистрации — это полоса пропускания частот. Использование некоторых фильтров не только способно исказить амплитуду и латентность компонентов, но и может добавить искусственные компоненты, которых не было в изначальной записи (рис. 2). По возможности рекомендуется использовать фильтры как можно меньше и учитывать, какой результат может иметь наложение определенной полосы пропускания (Luck 2005).

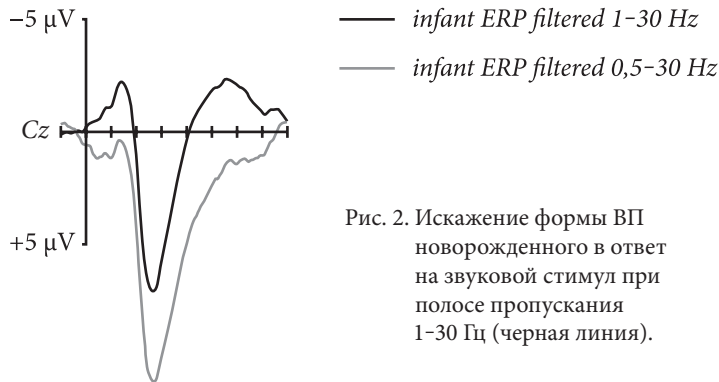


Рис. 2. Искажение формы ВП новорожденного в ответ на звуковой стимул при полосе пропускания 1-30 Гц (черная линия).

Наряду с вызванными потенциалами, в детских исследованиях все чаще анализируют также вызванные (evoked, phase-locked) или индуцированные (induced, not phase-locked) осцилляции (см., например, обзор Csibra, Kushnerenko and Grossman 2008). Наибольший интерес представляют гамма-осцилляции (20-80 Гц, чаще всего 40 Гц, рис. 3). Это еще одна причина внимательно относиться к полосе пропускания частот, особенно при регистрации.

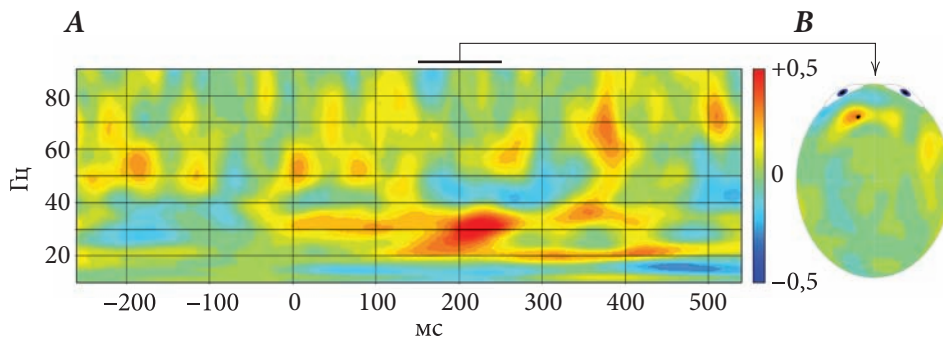


Рис. 3. Гамма-осцилляции в ответ на неконгруэнтный аудио-визуальный речевой стимул: артикулируемое «ба» и произносимое «га» (слева). Распределение усредненной (20-40 Гц, 150-250 мс после начала аудио стимула) осцилляторной активности (справа). Из Kushnerenko et al, PNAS, 2008 © (2008) National Academy of Sciences, U. S. A.

Слуховые ВП в исследовании когнитивного развития

В исследованиях раннего детского развития метод ВП пользуется особой популярностью, так как позволяет проследить связь между нейроанатомическими изменениями в первые два года жизни и становлением важнейших психологических функций — развитием речи, абстрактного мышления, причинно-следственной связи.

Наиболее широко используемый ВП метод, так называемая oddball парадигма и ее вариации, представляет собой последовательность одинаковых повторяющихся стимулов (стандартов), из которых 10–20% случайным образом заменены на отличающийся стимул (девиант). Электрофизиологический ответ на это отличие, известный как Mismatch negativity, MMN (в русскоязычной литературе обозначенный как Негативность Рассогласования, НР), можно увидеть на разностной кривой двух ответов — ВП в ответ на девиант за вычетом ВП в ответ на стандарт. Возникновение НР связано с формированием в слуховой коре репрезентации стимула в нейронной сети (neural representation, memory trace) в результате его повторного предъявления и последующего рассогласования этой репрезентации с новым стимулом. Теория НР во многом перекликается с концепцией нервной модели стимула, разработанной Е.Н. Соколовым (Соколов, 1958). По теории Соколова, нервная модель стимула (энграмма) хранит информацию о его характеристиках. Действие нового стимула вызывает рассогласование с существующей нервной моделью стимула, приводя к ориентировочной реакции. НР сама по себе не является электрофизиологическим коррелятом ориентировочной реакции (предполагается, что таковым коррелятом является компонент Р3а (Friedman, Cusowicz and Gaeta 2001), так как небольшие и незначимые изменения в окружающей среде не требуют ориентировочной реакции и привлечения внимания. Тем не менее каждое, даже небольшое, акустическое изменение автоматически регистрируется мозгом, и НР может быть записана даже у спящих младенцев, что делает этот метод очень удобным для исследования точности слухового различения у новорожденных. Однако у новорожденных компонент ВП в ответ на рассогласование отличается от НР, описанной в исследованиях на взрослых. Полярность и латентность ответа на рассогласование у детей до года зависит от параметров стимуляции, возраста, а также от методологических особенностей регистрации и анализа полученных данных (референтный электрод, полоса пропускания частот, сопротивление электродов).

Впервые НР у новорожденных была зарегистрирована Киммо Алхо и коллегами (Alho et al. 1990a). Последующие работы продемонстрировали наличие подобного ответа у детей, рожденных преждевременно (30–35 недель (Cheour-Luhtanen et al. 1996). Однако, в ответ на те же стимулы в возрасте 4 месяцев был зарегистрирован не негативный, а позитивный компонент (Alho et al. 1990b). Такие же изменения полярности ВП в раннем неонатальном периоде были описаны в предыдущих исследованиях в ответ на речевые стимулы (Kurtzberg et al. 1984) и позже были отнесены на счет разной скорости созревания различных слоев слуховой коры (Trainor et al. 2003). Таким образом, в настоящий момент принято считать, что более зрелым ответом на рассогласование у младенцев до 4-х месяцев будет компонент позитивной полярности (Leppanen et al. 2004). Следует отметить, что в ряде исследований, использующих очень большой акустический контраст [больше 50% — тоны 1000 и 2000 Гц (Morr et al. 2002) или тон и широкополосный шум (Kushnerenko et al. 2007)], были зарегистрированы как минимум два компонента рассогласования — ранний негативный компонент и центральный позитивный компонент, за которым в некоторых экспериментальных ситуациях следовал также поздний негативный компонент (возможно

Нс). Трудно с уверенностью сказать, что является аналогами этих компонентов у взрослых, но предположительно, ранний негативный компонент не является аналогом НР, так как не демонстрирует одинаковой зависимости от условий эксперимента у детей и у взрослых (Kushnerenko et al. 2007), и регистрируется только при большом спектральном контрасте. Предположительно, ранний негативный компонент у новорожденных отражает вовлечение в ответ дополнительных афферентов в ответ на более широкополосные стимулы. Вероятно также, что в дифференциацию легких и трудных акустических контрастов вовлечены разные процессы (He, Hotson and Trainor 2007). Действительно, позитивный компонент рассогласования в основном наблюдался при сложном различении [фонетические контрасты (Dehaene-Lambertz and Gliga 2004), вычленение закономерности звуковой последовательности (Ruusuvirta et al. 2004, Ruusuvirta et al. 2003)], в то время как ранний негативный компонент — только при больших спектральных контрастах.

С четвертого месяца жизни ранний негативный компонент может быть зарегистрирован в ответ на небольшие акустические контрасты (He, Hotson and Trainor 2008), но его свойства все еще отличаются от НР взрослых. Наиболее часто у детей до года описывают позитивный компонент рассогласования, по характеристикам больше напоминающий НР взрослых (Dehaene-Lambertz and Gliga 2004). Позитивный компонент рассогласования часто перекрывается во времени с негативным, причем один из них может маскировать другой в зависимости от их амплитуды и латентности (Morr et al. 2002, Kushnerenko et al. 2002b). Мара Морр и коллеги исследовали несколько групп детей от двух месяцев до четырех лет и показали, как полярность ответа меняется с возрастом в зависимости от того, какой компонент преобладает. Между 18 и 30 месяцами жизни позитивный компонент был примерно равен негативному по латентности и амплитуде и, таким образом, разностная кривая была равна нулю.

Важно подчеркнуть, что только при использовании таких спектрально насыщенных стимулов, как широкополосные шумы, мы получили стабильную форму ВП ответа среди новорожденных (Kushnerenko et al, 2007). Наше предыдущее исследование с использованием гармонических тонов в качестве стимулов показало, что ВП детей до года очень вариабельны, что является препятствием для их использования в качестве диагностического метода (Kushnerenko et al. 2002b). Однако, ВП в ответ на широкополосные стимулы потенциально могут быть использованы для диагностических целей. В этом исследовании мы показали также, что особая чувствительность к спектральной насыщенности стимула характерна только для новорожденных — разница амплитуды ВП в ответ на белый шум и гармонический тон была значительно больше для детей, чем для взрослых в одной и той же экспериментальной ситуации (рис. 4). В то же время НР на фоне повторяющегося белого шума (стандартный стимул) была обнаружена только у взрослых, новорожденные не могли зарегистрировать «новизну» отличающихся от стандарта широкополосных шумов. Интересно отметить, что наши электрофизиологические данные хорошо согласуются с теорией о специализации перцептивных систем ребенка в течение первого года жизни (perceptual narrowing) (Scott, Pascalis and Nelson 2007). Как обсуждалось выше, ориентировочная реакция новорожденного в первую очередь вызвана изменением общей энергии стимула, в то время как в процессе развития больше внимания уделяется новизне стимула.

Одна из важных особенностей НР состоит в том, что она регистрируется не только в ответ на изменение физических характеристик стимула, но и в ответ на изменение определенной закономерности, правила, которому подчиняется звуковая последовательность. Ванесса Каррал и коллеги (Carral et al. 2005) продемонстрировали, что новорожденные также

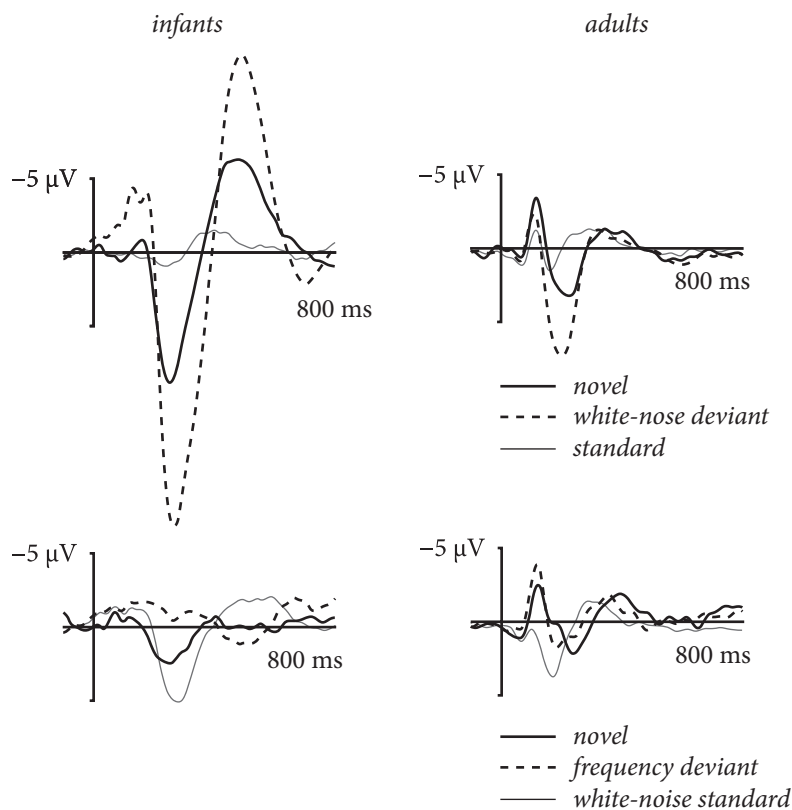


Рис. 4. Вызванные потенциалы новорожденных (слева) и взрослых (справа) в ответ на тоновый стимул (сплошная серая линия), белый шум (прерывистая линия) и новый стимул (сплошная черная линия). Обратите внимание на значительную разницу в амплитуде ответов на белый шум у детей и взрослых (амплитуда ответа на тоновый стимул сопоставима по величине). Из Kushnerenko et al., *Eur J Neurosci* © (2007), Wiley-Blackwell Publishing Ltd.

способны определять закономерность в звуковой последовательности. В данном исследовании тональные стимулы предъявлялись парами, с вероятностью 80% пара была составлена таким образом, что частота первого тона была ниже, чем частота второго (стандартный стимул), в остальных случаях частота второго была ниже (девиантный стимул). В ответ на девиантный стимул у новорожденных был зарегистрирован позитивный компонент рассогласования.

Как будет показано ниже, эта способность к так называемому «статистическому обучению» (statistic learning) лежит в основе овладения речью. Гипотеза статистического обучения подразумевает, что мозг автоматически анализирует вероятности акустических событий, происходящих в окружающей среде, выделяя события с наибольшей вероятностью как значимые для удержания в памяти. В этой связи представляет интерес также исследование Тимо Руусувирты и коллег (Ruusuvirta et al. 2004, Ruusuvirta et al. 2003), продемонстрировавшее, что мозг новорожденного за несколько минут повторного предъявления формирует модель звукового стимула из трех параметров — частота, длительность и интенсивность.

Если в качестве девианта предъявлялся стимул, отличный хотя бы по одному из этих параметров, на ВП отмечался позитивный компонент рассогласования.

В последнее время появляется все больше исследований на новорожденных с использованием магнитоэнцефалографии (МЭГ), где регистрируется магнитная составляющая ВП [(Sambeth et al. 2006, Huotilainen et al. 2003). Более подробно о МЭГ исследованиях см. в обзоре А. Н. Шестаковой и соавт.].

Зрительные ВП в исследовании восприятия лиц

Острота зрения новорожденных позволяет им различать объекты и лица на расстоянии примерно одного метра (Atkinson 2000), но картина, которую они видят, отличается от того, что видим мы (рис. 5). В последние годы особенно активно исследовалось восприятие новорожденными человеческих лиц. Исследование, опубликованное в 1991 г., подтвердило ранние наблюдения, согласно которым новорожденные с большим предпочтением реагируют на схематические лице-подобные паттерны (Johnson et al. 1991). Паттерн, содержащий высококонтрастные пятна, соответствующие примерному расположению глаз и рта, достаточен для того, чтобы привлечь внимание новорожденного (рис. 6; см. также обзоры Kushnerenko and Johnson in press; Johnson 2005).

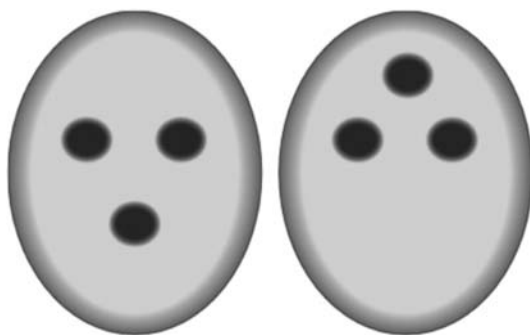


Рис. 5. Лицевые стимулы с прямым зрительным контактом и отведенным взглядом (слева) и эти же стимулы, имитирующие частотное разрешение зрительной системы новорожденного ребенка. Из Farroni et al, PNAS, 2002 © (2002) National Academy of Sciences, U. S. A.

Это свидетельствует в пользу того, что новорожденные предрасположены уделять особое внимание стимулам, напоминающим лица. Однако существуют и альтернативные гипотезы. Одна из них («sensory hypothesis») заключается в том, что все зрительные предпочтения новорожденных основаны на относительной видимости стимула. Зрительная система новорожденных ограничена диапазоном низких пространственных частот, и было предположено, что новорожденные предпочитают смотреть на лица исключительно потому, что амплитуда различных частот этих стимулов совпадает с диапазоном восприимчивости зрительной системы новорожденного.

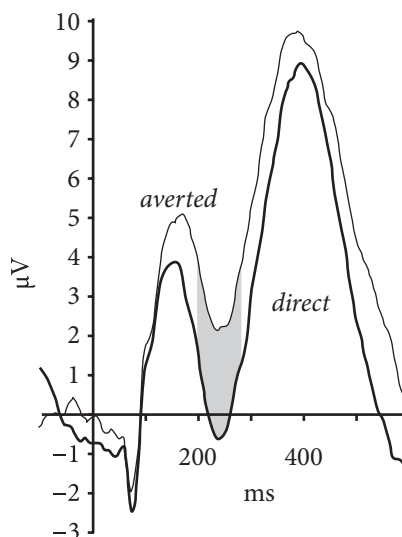
Другая гипотеза предполагает, что в основе предпочтения лицевых стимулов лежит несколько процессов: предпочтение асимметричных паттернов с большим количеством деталей в верхней части (Turati et al. 2002) и чувствительность к фазовому контрасту — лица в «негативе» не привлекали внимания малышей (Farroni et al. 2005). Наиболее важным, од-

Рис. 6. Гипотетические оптимальные стимулы для исследования предпочтения лицевых стимулов новорожденными. Эти гипотетические стимулы основаны на результатах нескольких экспериментов, демонстрирующих важность базовой лицевой конфигурации, количества элементов в верхней части стимула, и лицеподобный фазовый контраст. Из Johnson, 2005, Macmillan Publishers Ltd: [Nature Reviews Neuroscience], © (2005).



нако, в восприятии лиц малышами является наличие открытых глаз и прямого зрительного контакта. Исследование Терезы Фаррони и коллег (Farroni et al. 2002) показало, что новорожденные в возрасте 2-5 дней предпочитают смотреть на лицо с прямым зрительным контактом (рис. 5), а не на лицо с отведенным взглядом. Электрофизиологическое исследование показало, что прямой взгляд усиливает компонент N170 (рис. 7), известный как лице-специфический компонент ВП у взрослых. Амплитуда N170 у взрослых и детей (N290 аналог N170) значительно выше в ответ на зрительное предъявление лиц, чем любых других стимулов (Halit et al. 2004).

Рис. 7. Вызванные потенциалы в ответ на лицевые стимулы с прямым зрительным контактом (толстая линия) и отведенным взглядом (тонкая линия). Обратите внимание на увеличение амплитуды зрительного компонента N290 (аналога N170 у взрослых) в ответ на прямой зрительный контакт. Из Farroni et al, PNAS, 2002. © (2002) National Academy of Sciences, U. S. A.



В течение первого года жизни латентность N170 уменьшается примерно с 350 мс (3 месяца) до 290 мс (12 месяцев) (Halit, de Haan and Johnson 2003). Интересно отметить, что к 12 месяцам амплитуда детского N290, также, как и N170 взрослых, увеличивается, если лицо перевернуто. Причем, этот эффект специфичен только для человеческих лиц, амплитуда этого компонента не изменяется при манипуляциях с лицами обезьян (Halit et al. 2003, de

Naan, Pascalis and Johnson 2002). У 3-х и 6-месячных детей инвертирование лицевого стимула тоже не влияло на амплитуду ВП.

Кроссmodalная интеграция в раннем онтогенезе

Как уже упоминалось, новорожденные младенцы способны интегрировать аудио и визуальную информацию весьма необычным образом — сопоставляя стимулы по интенсивности (Lewkowicz and Turkewitz 1980). Таким образом, восприятие уже с рождения имеет зачатки кросс-модальной интеграции. На данный момент детских исследований с использованием мультимодальных стимулов довольно мало. Левкович и коллеги, используя поведенческие методики, показали, что дети способны к аудио-визуальной интеграции на основе временной синхронизации (*temporal synchrony*), т. е. если события в слуховой и зрительной модальности происходят одновременно (*synchronous onset and offset*; Lewkowicz 1996; Lewkowicz and Ghazanfar 2006).

К 7-месячному возрасту дети имеют полное представление о том, что эмоциональное выражение лица часто сопровождается соответствующей эмоциональной интонацией. Используя метод ВП, Тобиас Гроссманн и коллеги показали, что в ответ на радостную интонацию в сочетании с сердитым лицом (или наоборот) на ВП возникает компонент, наиболее часто ассоциируемый с реакцией на новизну и вовлечением внимания у детей — негативный центральный компонент (Nc) (Grossmann, Striano and Friederici 2006).

Наше электрофизиологическое исследование показало также, что дети в возрасте 5 месяцев воспринимают речь как аудио-визуальное целое (Kushnerenko et al. 2008). Основываясь на открытии МакГерка и МакДональда [феномен известный в англоязычной литературе как *McGurk illusion* (McGurk and MacDonald 1976)], мы использовали такие же аудио и визуальные стимулы, сочетание которых привело к иллюзорному восприятию фонемы, которая не была представлена ни в зрительной, ни в слуховой модальности. Так, испытуемым проигрывали звук «ба», в то время как на экране они видели артикуляцию, соответствующую звуку «га». При этом большинству испытуемых (98% взрослых и 87% детей) слышался звук «да». При обратном сочетании (визуальное «ба» и аудио «га») только половина взрослых «интегрировала» это сочетание в комбинацию «бга». Большинство остальных слышало «га». Проанализировав визуальные и аудио стимулы, мы предположили, что визуальное «ба» не

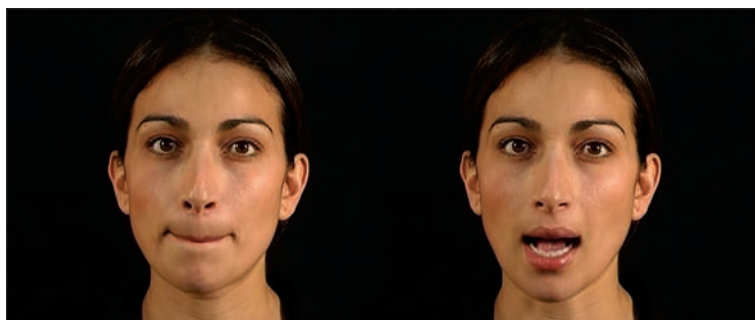


Рис. 8. Визуальные стимулы, соответствующие начальной артикуляции слогов «ба» (слева) и «га» (справа). Из Kushnerenko et al, PNAS, 2008. © (2008) National Academy of Sciences, U. S. A.

может быть интегрировано с неконгруэнтным аудио по причине своей «специфичности», а именно: артикуляция, предшествующая звуку «ба» (сжатие губ, рис. 8, слева) может соответствовать только трем звукам («б», «п», и «м»), в то время как артикуляция, предшествующая «га» (открытие рта, рис. 8, справа) соответствует многим гласным и согласным. Из этого следует, что иллюзорная интеграция происходит в том случае, если визуальный стимул довольно слабо предсказывает последующий речевой звук. Поэтому мы предположили, что, если дети способны интегрировать речевые стимулы кросс-модально, мы получим два возможных электрофизиологических ответа: ВП в ответ на визуальное «га» и аудио «ба» (иллюзорное «да») не должен отличаться от ВП в ответ на аудио-визуально конгруэнтные стимулы «ба» и «га», в то время как неконгруэнтный визуальный «ба» — аудио «га» может вызвать рассогласование с ожиданием (*expectation violation*). По сути, этот же механизм лежит в основе НР — повторяющаяся последовательность стимулов формирует «модель будущего стимула», в то время как девиантный стимул вызывает рассогласование его с ожидаемым. В нашем исследовании мы не использовали традиционную парадигму рассогласования, где один стимул предъявляется с высокой вероятностью, а другой — с низкой. В данном случае мы тестировали не кратковременные следовые процессы памяти, сформированные непосредственно предшествующей акустической информацией, а долговременные следы памяти — результат всего предыдущего опыта ребенка (см. о НР в ответ на речевые стимулы и о долговременных следах памяти в обзоре Штырова Ю.Ю. и Пулфермюллера Ф. в данном сборнике, а также в Pulvermuller and Shtyrov 2006). В данном исследовании мы предъявляли 4 типа стимулов (2 конгруэнтных «ба» и «га» и 2 неконгруэнтных) с равной вероятностью, основываясь на предположении, что только один из них должен восприниматься как «неправильный» стимул и вызвать рассогласование между ведущим зрительным «ба» и последующим «га». Экспериментальные результаты подтвердили эту гипотезу — позитивный компонент рассогласования, по латентности и распределению напоминающий компонент аналогичный НР у взрослых, был зарегистрирован только в ответ на «га», следующее за визуальным «ба» (рис. 9). В дополнение, только в ответ на этот стимул происходило усиление активации в полосе гамма-частот в префронтальной области коры (рис. 3). Таким образом, можно предположить, что не только акустические стимулы могут формировать модель будущего стимула, но и визуальные. В данном случае, визуальное «ба», по всей видимости, запускает процесс обработки речевого стимула «ба», в то время как предъявление «га» нарушает течение этого процесса и результатом является компонент рассогласования.

Другой важный результат этого исследования: ВП в ответ на другой неконгруэнтный аудио-визуальный стимул, воспринимаемый взрослыми как иллюзорное «да», не отличались от ВП на «нормальные» конгруэнтные стимулы. Предположительно, этот стимул воспринимался детьми как «нормальный» речевой звук с соответствующей артикуляцией. Результаты этого исследования подчеркивают важность зрительной информации в освоении речи ребенком.

Развитие речи

С момента рождения младенцы демонстрируют предпочтение ряда стимулов, биологически значимых для них: запах и голос матери, человеческие лица и звуки речи. Новорожденные не только предпочитают звуки речи другим звукам (Vouloumanos and Werker 2007a), но и демонстрируют явное предпочтение родного языка (Moon, Cooper and Fifer 1993). Наи-

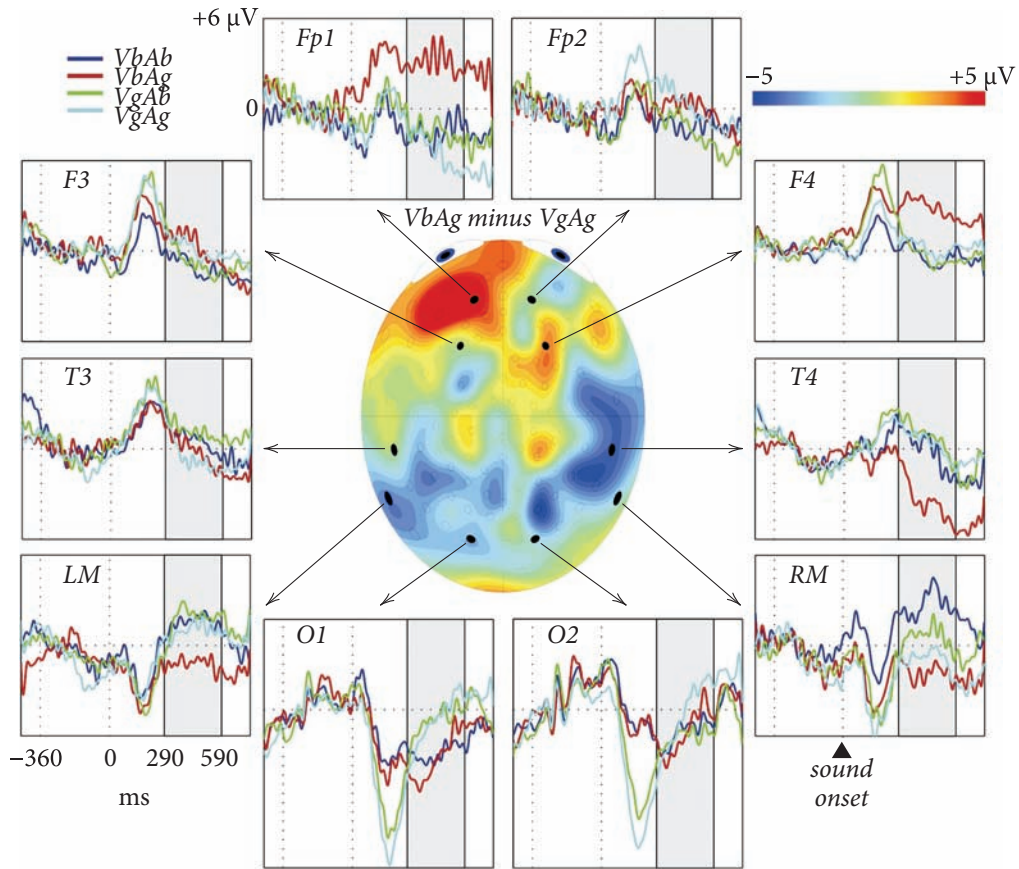


Рис. 9. Вызванные потенциалы в ответ на конгруэнтные («ба» — синяя линия, «га» — голубая) и неконгруэнтные аудио-визуальные стимулы (визуальное «га» — аудио «ба» — зеленая линия, визуальное «ба» — аудио «га» — красная). Выделенная серым цветом область соответствует временному интервалу, где ответ на визуальное «ба» — аудио «га» значимо отличался от всех остальных ответов (290–590 мс от начала предъявления аудио стимула). Обратит внимание на электроды F4 и T4, где сдвиг ВП меняет полярность с положительной на отрицательную. Из Kushnerenko et al, PNAS, 2008 © (2008) National Academy of Sciences, U. S. A.

более вероятно, что узнавание родной речи базируется на определенных ритмических паттернах. Было показано, например, что французские младенцы могут отличать английский язык от японского, но не от немецкого, который ритмически более похож на английский (Nazzi, Bertoncini and Mehler 1998). Ритмические паттерны речи не сохраняются, когда речь проигрывается назад (backward speech). Используя парадигму габитуации/дисгабитуации Рамус и коллеги показали, что младенцы отличают голландский язык от японского, но только если предложения проигрывались вперед, но не назад (Ramus et al. 2000). Основываясь на этих данных, можно предположить, что младенцы научаются различать ритмические

паттерны уже внутриутробно, и предпочтение родного языка также формируется в результате внутриутробного опыта. Действительно, в течение последнего триместра беременности ребенок уже может слышать голос матери, хотя и приглушенно, преимущественно низко-частотную составляющую. Исходя из исследований на животных, возможно предположить, что мелодический контур родного языка может достаточно четко распознаваться внутриутробно (Armitage, Baldwin and Vince 1980, Griffiths et al. 1994). Однако, интригующим является тот факт, что младенцы нескольких дней от роду способны замечать также тонкие фонетические различия между гласными и согласными (Moon, Bever and Fifer 1992, Dehaene-Lambertz and Pena 2001a, Bertoncini et al. 1987), хотя подобная спектральная информация не доступна внутриутробно. Более того, недавно было показано, что новорожденные могут отличать речь от неречевых стимулов только при наличии высокочастотной составляющей (Vouloumanos and Werker 2007b). Частоты выше 500 Гц практически не доступны внутриутробно, тем не менее, когда был наложен соответствующий фильтр на речевые стимулы, чтобы сделать их похожими на то, что ребенок предположительно слышит внутриутробно, младенцы перестали отличать речевые звуки от их тоновых аналогов.

Таким образом, предпочтение звуков речи другим акустическим сигналам вряд ли формируется исключительно внутриутробно. По всей вероятности, малыши обладают уникальной способностью очень быстро научиться распознавать речевые сигналы. Предполагается, что в основе этого лежит механизм «статистического» или вероятностного обучения (statistical learning): мозг автоматически анализирует вероятности акустических событий и настраивается на восприятие наиболее вероятных.

Предположительно, так дети учатся выделять отдельные слова из сплошного потока речи. Дженни Саффран и коллеги «обучали» 8-месячных детей в течение 2-х минут вычленять «слова» из сплошного потока слогов, например, «бидакупадотиголабубидаку». Единственной подсказкой для малышек было то, что вероятность перехода от одного слога к другому в одних случаях была равна 1 (например, после «би» всегда следовало «да»), а в других случаях 0,33. Последующее тестирование показало, что дети воспринимают «бида» как знакомое сочетание («слово») уже через 2 минуты после начала «обучения» (Saffran 2001, Saffran, Aslin and Newport 1996).

Этот же механизм, по всей видимости, лежит в основе фонетической настройки на родной язык. Полугодовалые малыши могут различать практически все иностранные контрасты, но теряют эту способность к концу первого года жизни. Патрисия Кул предположила, что в основе этого явления лежит «neural commitment», назовем это по-русски «настройкой мозга» на наиболее часто встречающиеся в языковом окружении фонемы (Kuhl 2004). Частота встречаемости речевых элементов наиболее низкая на границе между категориями. Когда одной группе детей дали прослушать последовательность слогов «да», постепенно переходящий в «та», с максимальной частотой встречаемости в центре континуума (элемента среднего между «да» и «та»), малыши не смогли во время последующего теста отличить эти «да» и «та» друг от друга. Другой группе детей предъявляли те же слоги, но с двумя максимумами распределения на двух концах континуума (бимодальное распределение), один соответствовал слогу «да», другой — «та». Малыши были способны отличить эти два слога друг от друга уже через 2 минуты «статистического обучения» (Maye, Werker and Gerken 2002).

Ранее уже упоминалось о том, что элетрофизиологические исследования продемонстрировали, что мозг даже новорожденного ребенка автоматически просчитывает закономерности, которым подчиняются звуки в звуковой последовательности (феномен, получивший

название «примитивный интеллект слуховой системы», Näätänen et al. 2001). Позитивный компонент рассогласования был зарегистрирован у новорожденных в ответ на нарушение закономерности «первый тон в паре имеет более низкую частоту, чем второй» (Carral et al. 2005). Важно также упомянуть исследование Джислэн Дехан-Ламбер, продемонстрировавшее, что позитивный компонент рассогласования может быть зарегистрирован у новорожденных, даже когда слоги («па» и «та») произносились несколькими разными голосами (Dehaene-Lambertz and Pena 2001b). Это исследование свидетельствует о том, что младенцы способны категоризовать речевые стимулы онтогенетически очень рано и что позитивный компонент рассогласования в данном случае отражает не только различие в физических свойствах акустических сигналов.

Электрофизиологические корреляты постнатального развития мозга

Первые два года жизни ребенка — период наиболее интенсивного развития мозга. К концу первого года жизни объем мозга увеличивается в три раза, а к концу второго года составляет 80% от объема мозга взрослого человека. Параллельно происходит развитие нейронов, процесс синаптогенеза, ветвление дендритов, миелинизация аксонов. Синаптическая плотность в коре головного мозга у новорожденного примерно равна таковой у взрослого, но в течение первых месяцев жизни значительно возрастает, достигая максимума, после чего в течение нескольких лет постепенно снижается в результате элиминации синаптических контактов (*synaptic pruning*) (Huttenlocher 1979, Huttenlocher 1984, Huttenlocher and Dabholkar 1997). В этой связи интересно отметить некоторые корреляции между ВП и периодами синаптогенеза в различных областях коры. Согласно исследованиям Huttenlocher и коллег, максимальная синаптическая плотность в слуховой коре достигается у новорожденных к трем месяцам, в зрительной коре — к шести, а во фронтальных областях — в период от двух до шести лет (Huttenlocher 1979, Huttenlocher 1984, Huttenlocher and Dabholkar 1997). Исследования развития зрительных ВП в первый год жизни показали, что максимальная амплитуда детского аналога P2 достигается к 6 месяцам жизни, затем начинает уменьшаться. Наши электрофизиологические исследования показали наибольшую амплитуду слухового P2 у трехмесячных детей (Kushnerenko et al. 2002a), в соответствии с периодом максимальной синаптической плотности в слуховой коре. Куше и коллеги отметили также корреляцию между синаптической плотностью во фронтальной области и амплитудой негативного центрального компонента (Nc) (Courchesne 1990), который, как считается, отражает вовлечение непроизвольного (автоматического) внимания и оценку новизны стимула.

Здесь интересно провести параллели между элиминацией избыточных синапсов в коре головного мозга, «настройкой мозга» (*neural commitment*, Kuhl, 2004) и перцептивной специализацией (*perceptual narrowing*, Scott et al. 2007). По всей вероятности, процесс специализации настраивает нейронные сети на восприятие определенных стимулов, и невовлеченные в этот процесс синапсы впоследствии исчезают. Как было отмечено выше, электрофизиологические ответы на широкополосные стимулы у новорожденных также значительно превосходят по амплитуде ВП взрослых (Kushnerenko et al. 2007), по всей вероятности, вовлекая в ответ гораздо большее количество нейронов, чем необходимо.

Заключение. Ключевые моменты развития ребенка в первый год жизни и альтернативные теории

Подводя итоги, нужно отметить, что младенцы первого года жизни обладают уникальными способностями к обучению. Как обсуждалось выше, в течение нескольких часов после рождения новорожденные способны отличать голос матери от голоса посторонней женщины (DeCasper and Fifer 1980) и отличать родной язык от неродного (Moon et al. 1993). Вулуманос и Веркер (Vouloumanos and Werker 2007b) предположили, что раннее избирательное предпочтение к речевым стимулам может быть врожденным. Возможно и альтернативное объяснение. Так, существуют данные, свидетельствующие о повышенной способности к обучению младенца в первые часы после рождения.

Варенди и коллеги показали, что в течение первого часа после родов младенцы запомнили запах, который был предъявлен им исследователями (Varendi et al, 2002). Ряд исследований также демонстрирует необычно быструю способность новорожденного отличать запах материнской груди от запаха чужой женщины (Varendi, Porter and Winberg 1994, Varendi and Porter 2001). Это быстрое ольфакторное обучение предположительно обусловлено высоким уровнем катехоламинов, в частности норадреналина, который характерен для адаптивного «родового стресса новорожденных» и удерживается в течение примерно двух часов после рождения.

Некоторые авторы полагают, что такое быстрое обучение нацелено на узнавание матери и на формирование привязанности, или связи, (attachment, bonding) между матерью и ребенком. Роль контакта с матерью в течение этих первых двух часов после рождения была наглядно продемонстрирована в исследованиях Быстровой и коллег (Bystrova 2008, Bystrova et al. 2003). Результаты исследований показали, что новорожденные, имевшие полторачасовой телесный контакт с матерью сразу после родов (skin-to-skin contact), быстрее преодолевали негативные последствия «родового стресса новорожденных» (Bystrova et al. 2003). Эти же дети в годовалом возрасте продемонстрировали более высокий уровень саморегуляции в условиях структурированной игры (модель «легкого стресса») по сравнению с детьми, разлученными с их матерями после рождения. Интересно, что, если новорожденных разлучали с их матерями всего на 2 часа, а потом воссоединяли для дальнейшего совместного пребывания в одной палате, уровень их саморегуляции в один год был таким же, как у детей, содержащихся отдельно с их матерями в течение всех дней пребывания в родильном доме. Эти данные позволяют говорить о наличии у новорожденных так называемого «сенситивного периода», за время которого, в случае телесного контакта с матерью, дающего максимальную сенсорную стимуляцию, происходит становление оптимальной постнатальной саморегуляции ребенка, а возможно, и других его функций. В то же время следует отметить, что сенситивный период у ребенка не является критическим. Это означает, что при отсутствии телесного контакта матери с ребенком в первые часы после рождения существует возможность наверстывания упущенного в последующем с помощью повторяющейся сенсорной стимуляции. Однако этот процесс требует гораздо большего времени и усилий (Bystrova 2008).

В течение первого года жизни широкие потенциальные возможности ребенка к восприятию информации ограничиваются «перцептивной специализацией» («perceptual narrowing») (Pascalis, de Haan and Nelson 2002, Lewkowicz and Ghazanfar 2006, Scott et al. 2007)). Как указывалось выше, сначала ребенок реагирует практически на любое изменение во внешней среде, с приобретением опыта его реакции становятся все более и более избирательными.

Младенцы до полугода способны различать практически все фонетические контрасты, часто неразличимые для взрослых (так, например, англоговорящие взрослые не способны уловить различие между фонемами /Ta/ и /ta/ в языке хинди (Werker and Tees 1984b, Werker and Tees 1984a), а носители японского языка не делают разницы между звуками /p/ и /л/ (Kuhl et al. 2006), в то время как полугодовалые малыши различают эти контрасты с легкостью. Однако к концу первого года жизни младенцы теряют эту замечательную способность: восприятие родного языка продолжает совершенствоваться, в то время как фонетическая информация, не присутствующая в окружающей среде, теряет свое значение (Kuhl 2004). Примечательно, что быстрое угасание способности различать иностранные фонетические контрасты можно повернуть вспять, проведя всего 12 сеансов с 9-месячными детьми. Патрисия Кул и коллеги предоставили англоговорящим детям возможность интерактивного общения с носителями китайского языка 3 раза в неделю по 25 минут в день в течение 4 недель, что позволило малышам сохранить сенситивность к фонетическим контрастам китайского языка (Kuhl, Tsao and Liu 2003). Возможно, это отвечает на вопрос почему дети гораздо легче осваивают иностранные языки, чем взрослые.

Такая перцептивная специализация характерна также для восприятия лиц. К девяти месяцам жизни дети теряют способность видеть различия в лицах обезьян, в то время как в шесть месяцев эта способность еще не утрачивается (Pascalis et al. 2002). Таким образом, развитие ребенка идет по пути все большей специализации, «настройки мозга» (neural commitment).

Описанные исследования указывают на уникальные потенциальные возможности ребенка первого года жизни, которые, возможно, не полностью используются в процессе его воспитания и обучения. Вопреки ранее бытовавшему мнению, новорожденный приходит в этот мир достаточно подготовленным к тому, чтобы воспринимать значимую информацию и стремительно быстро обучаться. Применение и развитие новых методов для изучения процессов восприятия и обработки информации в период раннего детства и внедрение их в родильные дома, поликлиники и детские центры, могут оказать неоценимую помощь в реализации детских потенциальных возможностей.

Автор благодарит за комментарии и уточнения К. С. Быстрову, В. В. Никулина и И. Ю. Павлова.

Список литературы

- Соколов Е. Н. Восприятие и условный рефлекс. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1958. 333 с.
- Alho, K., K. Sainio, N. Sajaniemi, K. Reinikainen & R. Naatanen (1990a) Event-related brain potential of human newborns to pitch change of an acoustic stimulus. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, 77, 151-155.
- Alho, K., N. Sajaniemi, T. Niittyvuopio, K. Sainio & R. Naatanen. 1990b. ERPs to an auditory stimulus change in preterm and full-term infants. In *Psychophysiological Brain Research*, eds. C. H. M. Brunia, A. W. K. Gaillard & A. Kok, 139-142. Tilburg: Tilburg University Press.
- Armitage, S. E., B. A. Baldwin & M. A. Vince (1980) The fetal sound environment of sheep. *Science*, 208, 1173-1174.
- Atkinson, J. 2000. *The Developing Visual Brain*. Oxford: Oxford University Press.
- Bertoncini, J., R. Bijeljac-Babic, S. E. Blumstein & J. Mehler (1987) Discrimination in neonates of very short CVs. *J Acoust Soc Am*, 82, 31-7.
- Bystrova, K. 2008. Doctoral thesis. Available at <http://diss.kib.ki.se/2008/978-91-7357-167-8/thesis.pdf>.

- Bystrova, K., A. M. Widstrom, A. S. Matthiesen, A. B. Ransjo-Arvidson, B. Welles-Nystrom, C. Wassberg, I. Vorontsov & K. Uvnas-Moberg (2003) Skin-to-skin contact may reduce negative consequences of «the stress of being born»: a study on temperature in newborn infants, subjected to different ward routines in St. Petersburg. *Acta Paediatr*, 92, 320-6.
- Carral, V., M. Huotilainen, T. Ruusuvirta, V. Fellman, R. Naatanen & C. Escera (2005) A kind of auditory 'primitive intelligence' already present at birth. *Eur J Neurosci*, 21, 3201-4.
- Cheour-Luhtanen, M., K. Alho, K. Sainio, T. Rinne, K. Reinikainen, M. Pohjavuori, M. Renlund, O. Aaltonen, O. Eerola & R. Näätänen (1996) The ontogenetically earliest discriminative response of the human brain. *Psychophysiology, Special Report*, 33, 478-481.
- Courchesne, E. 1990. Chronology of postnatal human brain development: event-related potential, positron emission tomography, myelinogenesis, and synaptogenesis studies, *Event-Related Brain Potentials. In Basic Issue and Applications*, eds. R. Rohrbaugh, R. Parasuraman & R. Johnson, 210-241. New York: Oxford University Press.
- Csibra, G., E. Kushnerenko & T. Grossman. 2008. Electrophysiological methods in studying infant cognitive development. In *Handbook of Developmental Cognitive Neuroscience*, eds. C. A. Nelson & M. Luciana. MIT Press.
- Dawson, G.D. (1950) Cerebral responses to nerve stimulation in man. *Br. Med. Bull.*, 6, 326-329.
- de Haan, M., O. Pascalis & M. Johnson (2002) Specialization of neural mechanisms underlying face recognition in human infants. *J Cogn Neurosci*, 14, 199-209.
- DeCasper, A. & W. Fifer (1980) Of human bonding: Newborns prefer their mother's voice. *Science*, 208, 1174-1176.
- Dehaene-Lambertz, G. & T. Gliga (2004) Common neural basis for phoneme processing in infants and adults. *J Cogn Neurosci*, 8, 1375-1387.
- Dehaene-Lambertz, G., L. Hertz-Pannier, J. Dubois, S. Meriaux, A. Roche, M. Sigman & S. Dehaene (2006) Functional organization of perisylvian activation during presentation of sentences in preverbal infants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 14240-5.
- Dehaene-Lambertz, G. & M. Pena (2001a) Electrophysiological evidence for automatic phonetic processing in neonates. *Neuroreport*, 12, 3155-8.
- Farroni, T., G. Csibra, F. Simion & M. H. Johnson (2002) Eye contact detection in humans from birth. *PNAS*, 99, 9602-9605.
- Farroni, T., M. H. Johnson, E. Menon, L. Zulian, D. Faraguna & G. Csibra (2005) Newborns' preference for face-relevant stimuli: effects of contrast polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 17245-50.
- Friedman, D., Y. M. Cycowicz & H. Gaeta (2001) The novelty P3: an event-related brain potential (ERP) sign of the brain's evaluation of novelty. *Neurosci Biobehav Rev*, 25, 355-73.
- Gomes, H., S. Molholm, C. Christodoulou, W. Ritter & N. Cowan (2000) The development of auditory attention in children. *Frontiers in Bioscience*, 5, 108-120.
- Griffiths, S. K., W. S. Brown, Jr., K. J. Gerhardt, R. M. Abrams & R. J. Morris (1994) The perception of speech sounds recorded within the uterus of a pregnant sheep. *J Acoust Soc Am*, 96, 2055-63.
- Grossmann, T., T. Striano & A. Friederici (2006) Crossmodal integration of emotional information from face and voice in the infant brain. *Dev Sci*, 9, 309-15.
- Halit, H., G. Csibra, A. Volein & M. Johnson (2004) Face-sensitive cortical processing in early infancy. *J Child Psychol Psychiatry*, 45, 1228-34.
- Halit, H., M. de Haan & M. Johnson (2003) Cortical specialisation for face processing: face-sensitive event-related potential components in 3- and 12-month-old infants. *Neuroimage*, 19, 1180-93.
- He, C., L. Hotson & L. Trainor (2007) Mismatch responses to pitch changes in early infancy. *J Cogn Neurosci*, 19, 878-92.

- He, C., L. Hotson & L. Trainor (2008) Maturation of cortical mismatch responses to occasional pitch change in early infancy: Effects of presentation rate and magnitude of change. *Neuropsychologia*.
- Homae, F., H. Watanabe, T. Nakano, K. Asakawa & G. Taga (2006) The right hemisphere of sleeping infant perceives sentential prosody. *Neurosci Res*, 54, 276–80.
- Homae, F., H. Watanabe, T. Nakano & G. Taga (2007) Prosodic processing in the developing brain. *Neurosci Res*, 59, 29–39.
- Huotilainen, M., A. Kujala, M. Hotakainen, A. Shestakova, E. Kushnerenko, L. Parkkonen, V. Fellman & R. Naatanen (2003) Auditory magnetic responses of healthy newborns. *Neuroreport*, 14, 1871–5.
- Huttenlocher, P. R. (1979) Synaptic density in human frontal cortex — developmental changes and effects of aging. *Brain Res*, 163, 195–205.
- Huttenlocher, P. R. (1984) Synapse elimination and plasticity in developing human cerebral cortex. *American Journal of mental deficiency*, 88, 488–496.
- Huttenlocher, P. R. & A. S. Dabholkar (1997) Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J Comp Neurol*, 387, 167–178.
- Johnson, M. H. 2005. *Developmental Cognitive Neuroscience*. Blackwell Publishing.
- Johnson, M. H., S. Dziurawiec, H. Ellis & J. Morton (1991) Newborns' preferential tracking of face-like stimuli and its subsequent decline. *Cognition*, 40, 1–19.
- Jones, S. (1996) Imitation or exploration? Young infants' matching of adults' oral gestures. *Child Dev*, 67, 1952–69.
- Jones, S. (2006) Exploration or imitation? The effect of music on 4-week-old infants' tongue protrusions. *Infant Behav Dev*, 29, 126–30.
- Kuhl, P. K. (2004) Early language acquisition: cracking the speech code. *Nat Rev Neurosci*, 5, 831–843.
- Kuhl, P. K., E. Stevens, A. Hayashi, T. Deguchi, S. Kiritani & P. Iverson (2006) Infants show a facilitation effect for native language phonetic perception between 6 and 12 months. *Dev Sci*, 9, F13–F21.
- Kuhl, P. K., F. M. Tsao & H. M. Liu (2003) Foreign-language experience in infancy: effects of short-term exposure and social interaction on phonetic learning. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 9096–101.
- Kurtzberg, D., P. L. Hilpert, J. A. Kreuzer & H. G. Vaughan, Jr. (1984) Differential maturation of cortical auditory evoked potentials to speech sounds in normal fullterm and very low-birthweight infants. *Dev Med Child Neurol*, 26, 466–475.
- Kushnerenko, E., R. Ceponiene, P. Balan, V. Fellman, M. Huotilainen & R. Naatanen (2002a) Maturation of the auditory event-related potentials during the 1st year of life. *NeuroReport*, 13, 47–51.
- Kushnerenko, E., R. Ceponiene, P. Balan, V. Fellman & R. Naatanen (2002b) Maturation of the auditory change-detection response in infants: A longitudinal ERP study. *NeuroReport*, 13, 1843–1848.
- Kushnerenko, E. & M. H. Johnson. in press. *Newborn Behaviour*. In *The Newborn Brain: Neuroscience & Clinical Applications*, ed. H. Lagercrantz.
- Kushnerenko, E., T. Teinonen, A. Volein & G. Csibra (2008) Electrophysiological evidence of illusory audiovisual speech percept in human infants. *PNAS*, 105, 11442–5.
- Kushnerenko, E., I. Winkler, J. Horváth, R. Näätänen, I. Pavlov, V. Fellman & M. Huotilainen (2007) Processing acoustic change and novelty in newborn infants. *Eur J Neurosci*, 26, 265–274.
- Lecanuet, J., C. Granier-Deferre, A. Jacquet & A. DeCasper (2000) Fetal discrimination of low-pitched musical notes. *Dev. Psychobiol*, 36, 29–31.
- Leppanen, P. H., T. K. Guttorm, E. Pihko, S. Takkinen, K. M. Eklund & H. Lyytinen (2004) Maturation effects on newborn ERPs measured in the mismatch negativity paradigm. *Exp Neurol*, 190, 91–101.
- Lewkowicz, D. (1996) Perception of auditory-visual temporal synchrony in human infants. *J Exp Psychol Hum Percept Perform*, 22, 1094–106.

- Lewkowicz, D. & S. Marcovitch (2006) Perception of audiovisual rhythm and its invariance in 4- to 10-month-old infants. *Dev Psychobiol*, 48, 288-300.
- Lewkowicz, D. J. & A. A. Ghazanfar (2006) The decline of cross-species intersensory perception in human infants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 6771-4.
- Lewkowicz, D. J. & G. Turkewitz (1980) Cross-modal equivalence in early infancy: Auditory-visual intensity matching. *Developmental Psychology*, 16, 597-607.
- Luck, S. J. 2005. *An Introduction to the Event-Related Potential Technique*. Cambridge, Massachusetts: The MIT Press.
- Maye, J., J. F. Werker & L. Gerken (2002) Infant sensitivity to distributional information can affect phonetic discrimination. *Cognition*, 82, B101-11.
- McGurk, H. & J. MacDonald (1976) Hearing lips and seeing voices. *Nature*, 264, 746-748.
- Meltzoff, A. N. & M. K. Moore (1977) Imitation of facial and manual gestures by human neonates. *Science*, 198, 74-8.
- Meltzoff, A. N. & M. K. Moore (1989) Imitation in newborn infants: Exploring the range of gestures imitated and the underlying mechanisms. *Developmental Psychology*, 25, 954-962.
- Minagawa-Kawai, Y., K. Mori, N. Naoi & S. Kojima (2007a) Neural attunement processes in infants during the acquisition of a language-specific phonemic contrast. *J Neurosci*, 27, 315-21.
- Minagawa-Kawai, Y., A. Shestakova, H. van der Lely, E. Kushnerenko, J. Meek, J. Hebden, N. Everdell & E. Dupoux. 2007b. Newborn's brain responses to temporally and spectrally different sound changes measured with NIRS. In *International symposium: Topical problems of Biophotonics*. Moscow, Russia.
- Moon, C., T. G. Bever & W. P. Fifer (1992) Canonical and non-canonical syllable discrimination by two-day-old infants. *J Child Lang*, 19, 1-17.
- Moon, C., R. P. Cooper & W. P. Fifer (1993) Two-day-old infants prefer their native language. *Infant Behavior and Development*, 16, 495-500.
- Moon, C. M. & W. P. Fifer (2000) Evidence of transnatal auditory learning. *J Perinatol*, 20, S37-44.
- Morr, M. L., V. L. Shafer, J. A. Kreuzer & D. Kurtzberg (2002) Maturation of mismatch negativity in typically developing infants and preschool children. *Ear and Hearing*, 23, 118-136.
- Nazzi, T., J. Bertoncini & J. Mehler (1998) Language discrimination by newborns: toward an understanding of the role of rhythm. *J Exp Psychol Hum Percept Perform*, 24, 756-66.
- Naatanen, R., M. Tervaniemi, E. Sussman, P. Paavilainen & I. Winkler (2001) «Primitive intelligence» in the auditory cortex. *Trends Neurosci*, 24, 283-8.
- Pascalis, O., M. de Haan & C. A. Nelson (2002) Is face processing species-specific during the first year of life? *Science*, 296, 1321-3.
- Nikulin, V.V., Linkenkaer-Hansen, K., Nolte, G., Lemm, S., Müller, K.R., Ilmoniemi, R.J. & Curio G. (2007) A novel mechanism for evoked responses in the human brain. *Eur J Neurosci*, 25, 3146-3154.
- Pena, M., A. Maki, D. Kovacic, G. Dehaene-Lambertz, H. Koizumi, F. Bouquet & J. Mehler (2003) Sounds and silence: an optical topography study of language recognition at birth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11702-5.
- Pulvermuller, F. & Y. Shtyrov (2006) Language outside the focus of attention: the mismatch negativity as a tool for studying higher cognitive processes. *Prog Neurobiol*, 79, 49-71.
- Ramus, F., M. D. Hauser, C. Miller, D. Morris & J. Mehler (2000) Language discrimination by human newborns and by cotton-top tamarin monkeys. *Science*, 288, 349-51.
- Rovee, C. K. & D. T. Rovee (1969) Conjugate reinforcement of infant exploratory behavior. *J Exp Child Psychol*, 8, 33-9.
- Rovee-Collier, C. (1997) Dissociations in infant memory: rethinking the development of implicit and explicit memory. *Psychol Rev*, 104, 467-98.

- Ruusuvirta, T., M. Huotilainen, V. Fellman & R. Naatanen (2003) The newborn human brain binds sound features together. *Neuroreport*, 14, 2117-9.
- Ruusuvirta, T., M. Huotilainen, V. Fellman & R. Naatanen (2004) Newborn human brain identifies repeated auditory feature conjunctions of low sequential probability. *Eur J Neurosci*, 20, 2819-21.
- Saffran, J. R. (2001) Words in a sea of sounds: the output of infant statistical learning. *Cognition*, 81, 149-69.
- Saffran, J. R., R. N. Aslin & E. L. Newport (1996) Statistical learning by 8-month-old infants. *Science*, 274, 1926-8.
- Sambeth, A., M. Huotilainen, E. Kushnerenko, V. Fellman & E. Pihko (2006) Newborns discriminate novel from harmonic sounds: a study using magnetoencephalography. *Clin Neurophysiol*, 117, 496-503.
- Sayers, B.M., Beagley, H.A. & Henshall, W.R. (1974) The mechanism of auditory evoked EEG responses. *Nature*, 247, 481-483.
- Scott, L. S., O. Pascalis & C. A. Nelson (2007) A Domain-General Theory of Perceptual Development. *Current Directions in Psychological Science*, 16, 197-201.
- Trainor, L., M. McFadden, L. Hodgson, L. Darragh, J. Barlow, L. Matsos & R. Sonnadara (2003) Changes in auditory cortex and the development of mismatch negativity between 2 and 6 months of age. *Int J Psychophysiol*, 51, 5-15.
- Turati, C., F. Simion, I. Milani & C. Umiltà (2002) Newborns' preference for faces: what is crucial? *Dev Psychol*, 38, 875-82.
- Turkewitz, G., D. J. Lewkowicz & J. Gardner. 1983. Determinants of infant perception. In *Advances in the Study of Behavior*, eds. C. Rosenblatt, C. Beer, R. Hinde & M. Busnel, 39-62. New York: Academic Press.
- Varendi, H. & R. H. Porter (2001) Breast odour as the only maternal stimulus elicits crawling towards the odour source. *Acta Paediatr*, 90, 372-5.
- Varendi, H., R. H. Porter & J. Winberg (1994) Does the newborn baby find the nipple by smell? *Lancet*, 344, 989-90.
- Varendi, H., R. H. Porter & J. Winberg (2002) The effect of labor on olfactory exposure learning within the first postnatal hour. *Behav Neurosci*, 116, 206-11.
- Vouloumanos, A. & J. F. Werker (2007a) Listening to language at birth: evidence for a bias for speech in neonates. *Dev Sci*, 10, 159-64.
- Vouloumanos, A. & J. F. Werker (2007b) Why voice melody alone cannot explain neonates' preference for speech. *Developmental Science*, 10, 169-171.
- Watanabe, H., F. Homae, T. Nakano & G. Taga (2008) Functional activation in diverse regions of the developing brain of human infants. *Neuroimage*, 43, 346-57.
- Weikum, W. M., A. Vouloumanos, J. Navarra, S. Soto-Faraco, N. Sebastian-Galles & J. F. Werker (2007) Visual language discrimination in infancy. *Science*, 316, 1159.
- Werker, J. F. & R. C. Tees (1984a) Cross-language speech perception : Evidence for perceptual reorganization during the first year of life. *Infant Behavior and Development*, 7, 49-63.
- Werker, J. F. & R. C. Tees (1984b) Phonemic and phonetic factors in adult cross-language speech perception. *J Acoust Soc Am*, 75, 1866-78.
- Wolff, P. H. (1966) The causes, controls, and organization of behavior in the neonate. *Psychol Issues*, 5, 1-105.

Магнито-энцефалография и оптическая топография — новейшие методы исследования когнитивного развития младенцев и детей младшего возраста

Список сокращений

МЭГ — магнитоэнцефалография (magnitoecephalography, MEG)

ВП — вызванный потенциал (evoked potential, EP)

ВПол — вызванное поле (evoked field, EF)

мНР — магнитный эквивалент НР (mMMN)

ИЛК — изменение локального кровотока (regional changes in blood flow, RCBF)

МРТ — магнитно-резонансная томография (magnetic resonance imaging, MRI)

фМРТ — функциональная МРТ (functional magnetic resonance imaging, fMRI)

НР — негативность рассогласования (mismatch negativity, MMN)

ОК — оптическое картирование (optical imaging, OI)

ОТ — оптическая топография, оптическая томография (optical topo/pography)

БИК спектроскопия — спектроскопия ближнего инфракрасного диапазона (near-infrared spectroscopy, NIRS)

ПЭТ — позитронно-эмиссионная томография (positron emission tomography, PET)

ЭЭГ — электроэнцефалография (electroencephalography, EEG)

Магнитоэнцефалография как метод оценки слуховой функции у детей и младенцев

Наряду с электроэнцефалографией (ЭЭГ), все большую популярность в последнее время приобретает метод магнитной энцефалографии (МЭГ), обладающий помимо высокого временного разрешения, сравнимого с ЭЭГ, еще и высоким пространственным разрешением, позволяющим локализовать источники активности нейронов коры головного мозга, связанные с выполнением той или иной экспериментальной задачи. Магнитное поле, порождаемое нейрональными источниками и регистрируемое за пределами головы, менее чувствительно к анизотропии свойств костей черепа и мягких мозговых оболочек, чем электрическое, измеряемое ЭЭГ на поверхности скальпа. Как следствие, задача построения достаточно точной прямой модели в случае МЭГ существенно проще таковой в ЭЭГ. Последний факт объясняет потенциально более высокое пространственное разрешение, присущее МЭГ по сравнению с ЭЭГ. Слабое магнитное поле, порождённое нейрональными источниками тока, может быть бесконтактно зарегистрировано при помощи сверхчувствительных SQUID (Superconducting Quantum Interference Device) датчиков: ничтожно слабое магнитное поле в условиях сверхпроводимости индуцирует электрическое в датчиках (сен-

сорах), представляющих собой электромагнитные катушки (Hämäläinen et al., 1993). В последствии, многократно усиленное, это поле может быть визуализировано.

В МЭГ ориентация нейронов по отношению к сенсорам имеет большое значение. Так, токи, генерируемые пирамидными нейронами первичной слуховой коры, направлены по касательной к сфере поверхности головы, а линии магнитного поля выходят за пределы поверхности головы, что позволяет регистрировать большую часть нейрональной активности. Источники же возбуждения (активности), расположенные перпендикулярно поверхности головы, будут практически невидимы для SQUID.

В исследованиях слуховой функции самым распространенным компонентом вызванных потенциалов (ВП) является отклик N1 (Näätänen, 1987). К примеру, N1 компонент ВП может быть зарегистрирован через примерно 100 мс после начала предъявления любого отдельного стимула. Вместе с N1, широкое распространение получил компонент Негативность Рассогласования (НР), который в английской литературе известен как mismatch negativity (MMN) или magnetic mismatch negativity (mMMN) (когда речь идет о ее магнитном эквиваленте, вызванном поле (ВПол). НР или мНР является коррелятом сенсорной памяти (Näätänen, 1999), так как активация, которую он отражает, возникает в ответ на предъявление редкого, так называемого девиантного стимула, отличающегося от часто-предъявляемого стандартного, формирующего моментальный след памяти. В более поздних исследованиях с использованием языко-специфичных речевых стимулов выяснилось, что мНР является также коррелятом долговременной памяти, следы которой у взрослых локализируются в левом полушарии (Näätänen et al., 1997). Если у взрослых мНР активность обусловлена кортико-кортикальными взаимодействиями, то у детей мНР ответы могут скорее всего быть активированными таламокортикальными проекциями (Huotilainen et al., 2008).

В то время как у взрослых самым распространенным компонентом ВПол также является компонент N1 (N100), у детей эта своеобразная ориентировочная реакция на предъявление стимулов быстро затухает (Karhu, 1997) и при суммации ответов наиболее видимым откликом экзогенных ВП — т. е. связанных с акустическими характеристиками стимула — становится N200 (M200). Таким образом N200 является основным компонентом слуховых ВП (ВПол) у детей (Ceponiene et al., 2002; Kushnerenko et al., 2002; Shestakova et al., 2003). Его пик, в отличие от взрослого N1, приходится на время 200 мс после начала предъявления стимула. Функциональная природа этого компонента, тем не менее до конца не определена (Ceponiene et al., 2002; Kushnerenko et al., 2002; Shestakova et al., 2003). Структура мНР сходна с ответом у взрослых (Kushnerenko et al., 2002; Huotilainen et al., 2003; Sambeth et al., 2006). Так, в мНР исследовании (Huotilainen, 2003) авторы показали, что еще до своего рождения ребёнок способен различать разницу между звуками по частоте в степени, сравнимой со взрослыми испытуемыми. В более поздних исследованиях (Sambeth et al., 2006) удалось зарегистрировать мНР у новорожденных детей в ответ на предъявление сложных гармонических тонов. Аналогичные данные были получены в экспериментах с фонемами (Pihko et al., 2004; Kujala et al., 2004).

На рис. 1 приводится типичный пример M200, зарегистрированного в ответ на предъявление фонем родного языка детям младшего школьного возраста. M200 отклик локализуется в области слуховой коры, как это видно из представленных временных последовательностей изменения магнитных полей. Амплитуда мНР определяется разницей между ответами на стандартный и девиантный стимулы (подробности экспериментальной задачи описаны также в Shestakova et al., 2002 и Huotilainen et al., 2008). Локализация источника активности M200 в эксперименте, описанном в Shestakova et al. (2002), была осуществлена

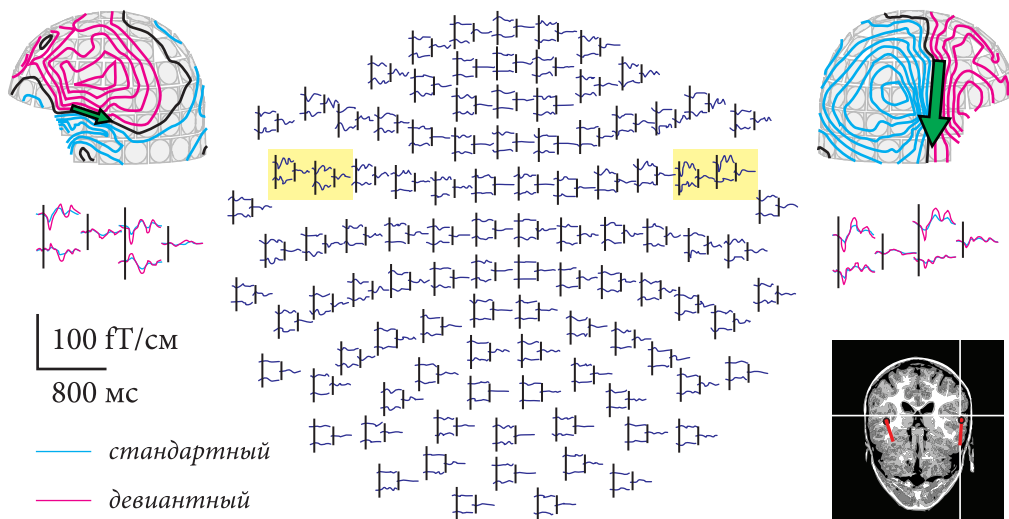


Рис. 1. Пример магнитного компонента Негативности Рассогласования (мНР или magnetic mismatch negativity) 7-летнего испытуемого в ответ на предъявление гласных фонем родного языка. мНР активность выражена в виде разницы между стандартным и девиантным ответами на кривых ВПол, а также в виде зеленых стрелочек, символизирующих токовые диполи. Пик основного компонента ВПол M200 у детей младшего школьного возраста приходится на 200 ms после начала предъявления стимула. Компонент совершенно отчетливо визуализируется в области слуховой коры в виде кривых вызванных магнитных полей. При локализации источников использован структурный МРТ мозга испытуемого. Видно, что источники активности, связанной с обработкой речевого сигнала локализуются в извилине Хешля.

методом подбора эквивалентных диполей — по одному на каждое полушарие. Ориентация диполя выбрана согласно модельным представлениям о том, что на МЭГ мы наблюдаем активацию пирамидных нейронов, расположенных перпендикулярно поверхности слуховой коры. Для визуализации результатов эксперимента по локализации источников активности использован МРТ карта испытуемого (полученная методом магнитно-резонансной томографии). Видно, что источники активности, связанной с обработкой речевого сигнала, локализуются в извилине Хешля.

На рис. 2 показана карта локализации M200, полученная в результате идентификации параметров распределенной модели. Здесь в качестве модели нейрональных источников электромагнитного поля мы использовали модель распределенной активности — без ограничения количества диполей в отдельном полушарии. Идентификация параметров модели была осуществлена в соответствии с методом наименьшей нормы первого порядка (L1-нормы) (также известного как метод Minimum Current Estimate, или MCE). Этот алгоритм минимизирует сумму абсолютных значений амплитуд токов (Utela et al., 2001). Стрелками на нижней линейке моделей мозга обозначены источники активности с максимальной амплитудой в области интереса — височных областях мозга, где находится слуховая кора. Метод

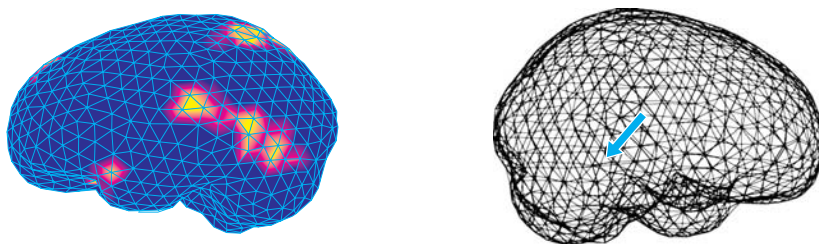


Рис. 2. Визуализация той же активности M200, что и на предыдущем рисунке, но уже в виде облака в пространстве, а не точки: здесь используется модель распределенной активности, без ограничения количества диполей в отдельном полушарии (в частности Метод L1-нормы, известный также как метод Minimum Current Estimate, или MCE). Стрелкой на правой модели мозга обозначен источник с максимальной амплитудой в области интереса — височной области мозга, где находится слуховая кора.

квадратичной нормы (L2-нормы) также широко используется и реализован, например, в программном обеспечении MNE-Suite, разработанном в Martinos Center, Harvard, USA, а также — в программном обеспечении Statistical Parametric Mapping, SPM (Friston K. J. (Ed), 2006), разработанном в Functional Imaging Laboratory, UCL, GB. В этом случае среди множества всех распределений амплитуд диполей, удовлетворяющих измеренным данным, ищется такое распределение, чтобы сумма квадратов амплитуд токовых диполей была наименьшей. Иными словами метод минимизации L2 нормы позволяет получить решение с минимальной энергией.

На первый взгляд может показаться, что магнитные эксперименты лишь повторяют электрические, но это не так. Временное и пространственное разрешение в современных МЭГ установках необычайно высоки. Так, в МЭГ установке Electa Neuromag Ltd (рис. 3) частота дискретизации, к примеру, достигает 5-8 кГц на канал, количество МЭГ сенсоров — 306, существует возможность интеграции МЭГ данных с ЭЭГ (64 канала), а также возможна одновременная обработка МЭГ/ЭЭГ с использованием структурного МРТ (например, с использованием SPM и других программных продуктов). В дополнение, описанная установка позволяет непрерывно отслеживать положения головы испытуемого по отношению к SQUID при помощи специальных HPI (Head Positioning Indicator) катушек, позволяющих локализовать координаты головы в трехмерном пространстве (Imada et al., 2006). Эта процедура позволяет избежать систематической ошибки, особенно в случае экспериментов с детьми. Новейшие методы пространственно временной обработки позволяют выделить пространственно временной сигнал, обусловленный лишь нейрональными источниками. Перечисленные технологические достижения и простота модели магнитных полей за пределами объёмного проводника (головы) позволяют достичь высокой эффективности при решении обратной задачи МЭГ и локализовать источники нейрональной активности с точностью до нескольких миллиметров (Hämäläinen et al., 1993).

Таким образом, несмотря на существующие методологические сложности при регистрации МЭГ младенцев и маленьких детей, связанные, в основном, с большей удаленностью головы от сенсоров (Pang et al., 2003), их МЭГ отклики могут быть достаточно точно лока-

Рис. 3. 6-летняя испытуемая, принимающая участие в МЭГ исследовании речи с использованием системы Elekta Neuromag Oy, Университетский Госпиталь г. Хельсинки, Финляндия.



лизованы в слуховой коре, особенно если используется вышеупомянутая система постоянного отслеживания позиции головы и интеграция со структурным МРТ, что позволяет учитывать индивидуальную анатомию мозга и, тем самым, способствует повышению точности локализации источников активности

Магнитоэнцефалография может служить адекватным, а иногда и наиболее оптимальным методом исследования вызванной и спонтанной активности не только слуховой коры, но и, например, соматосенсорной. Так Pihko и коллеги (2004) (см. также Обзор Pihko&Lauronen, 2004) успешно применяли метод МЭГ для выявления дифференцированного влияния стадии сна, в которой находится новорожденные, на их чувствительность к тактильной стимуляции. Они обнаружили, что в стадии активного или поверхностного сна амплитуды соматосенсорных вызванных полей (СВПол, по-английски somatosensory evoked field, SEF) были меньше, чем в состоянии глубокого сна. Сам факт регистрации соматосенсорных ответов при помощи МЭГ у новорожденных впервые в мире также заслуживает внимания (рис. 4).

Невозможно не упомянуть о клинических приложениях МЭГ и их значимости для предоперационной диагностики (и возрастной, в частности). МЭГ позволяет локализовать источники судорожной активности в неокортексе и дифференцировать фокальную и генерализованную эпилепсию (Mäkelä et al., 2006, 2007). Еще одним ярким примером приложений МЭГ, как в связи с предоперационной диагностикой, так и в связи с диагностикой различных заболеваний, связанных с нарушениями речи и когнитивных функций, является оценка межполушарной асимметрии (Mäkelä et al, 2006, 2007). Так, у детей с диагнозом краниостеноз была обнаружена аномальная латерализация (вплоть до полного отсутствия активации в правом полушарии) отклика M200 в ответ на разнообразные типы слуховых стимулов — от гармонических тонов и щелчков, до пения птиц (Hukki et al., 2003).

Выше уже упоминалось об использовании структурных томограмм при локализации источников методом МЭГ, как успешном примере интеграции методов. Еще одним методом картирования мозга, основанным на физическом явлении ядерного магнитного резонанса является функциональная магнитно –резонансная томография (фМРТ). фМРТ является одним из наиболее эффективных и распространенных методов, позволяющих с высокой точностью локализовать когнитивные и другие функции в мозге человека, как в коре, так и в подкорковых структурах. Метод фМРТ, если описывать его в самых общих чертах, дает возможность оценить изменение активности нейронов по изменению кровотока путем

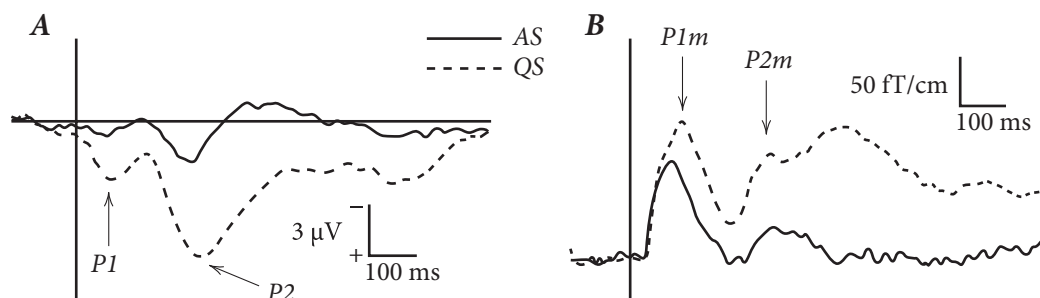


Рис. 4. Пример соматосенсорных потенциалов, зарегистрированных у новорожденных в Университетской клинике Хельсинки, Финляндия методом магнитоэнцефлографии. Из Pihko et al. *Clinical Electrophysiology*, 2004. С разрешения Elsevier.

определения разницы в концентрации окси- и дезоксигемоглобина с использованием Blood Oxygen Level Dependent (BOLD) сигнала. В основе метода лежит явление ядерного магнитного резонанса. Гемоглобин является диамагнетиком, тогда как дезоксигемоглобин — парамагнетиком. МР (магнитный резонанс) сигнал, измеряемый прибором, таким образом зависит от соотношения концентраций окси- и дезоксигемоглобина в крови. Вслед за активацией нейронов с временной задержкой в несколько секунд усиливается локальный кровоток. Концентрации же окси- и дезокси гемоглобина, тем не менее, остается примерно той же, что и в покое. Дело в том, что способность тканей усваивать кислород, доставленный оксигемоглобином, превращая его в дезокси-, меняется относительно мало. То есть, в условиях усилившегося кровотока в активном участке коры концентрация венозного оксигемоглобина будет возрастать, а разница между окси- и дезоксигемоглобином, увеличиваться. Так называемая проблема *neurovascular coupling* в действительности намного сложнее. Все больше и больше обнаруживается факторов регуляции мозгового кровотока, его скорости и объема, и однозначного ответа на вопрос как связана активация нейронов и изменение кровотока до сих пор не получено¹. Так как об изменении активности мозга в фМРТ можно судить опосредовано по изменению локального кровотока, имеющего задержку от 1 до 5 сек по сравнению с нейронным ответом, временное разрешение фМРТ — гораздо ниже, чем ЭЭГ или МЭГ.

При изучении когнитивных функций детей, фМРТ широко не используется из-за методологических сложностей, а также из этических соображений. С одной стороны, МРТ чрезвычайно чувствителен к двигательным артефактам, а с другой, МРТ является инвазивным методом, поскольку испытуемый подвергается действию сильных электромагнитных полей, как статических так и импульсных. Кроме того, испытуемые могут испытывать определенный дискомфорт, оказавшись в замкнутом пространстве в условиях сильного шума в течение длительного времени. Некоторым исследовательским лабораториям все же удается преодолевать сложности, связанные с использованием МРТ и проводить фМРТ исследования по изучению когнитивных функций младенцев (Dehaene et al., 2002) и детей (Raizada et al., 2008).

¹ За подробностями о методе фМРТ авторы советуют обращаться к учебным пособиям 'Functional Magnetic Resonance Imaging' (под ред. Huettel A.S., 2005) и 'Brain Imaging Handbook' (под ред. Bremner J.D., 2004). Эти и другие пособия на английском языке имеются в библиотеке магистерской программы (www.neuroscience.spb.ru).

При исследовании детей до года, вероятно, более адекватной оказывается оптическая топо- и томография (ОТ), в основе которых лежит использование излучения видимого и ближнего инфракрасного (ИК) диапазона. Методы оптической визуализации являются одними из наиболее перспективных методов изучения головного мозга человека в следствие своей низкой инвазивности по сравнению с фМРТ и относительной дешевизны по сравнению с МЭГ.

Оптическая топография

К семейству методов оптической визуализации относятся активно развивающиеся сейчас методы оптической спектроскопии, топографии и томографии. Эта группа методов использует излучение видимого и ближнего ИК диапазона из так называемого диагностического окна (длины волн 0,6–1,3 мкм), где биоткани имеют минимальный уровень поглощения. Поскольку рассеяние биотканей высоко, тело человека не прозрачно. Однако, теоретически показано и экспериментально подтверждено, что существует возможность просвечивать органы толщиной порядка 10–15 см, получая регистрируемый уровень сигнала (распространяясь через подобные объекты от источника к приемнику сигнал претерпевает среднее ослабление порядка ~ 10). Процесс распространения излучения в биологических объектах характеризуется коэффициентом поглощения, коэффициентом рассеяния, а также индикатрисой рассеяния. Поглощение водой, основным компонентом мягких тканей, которое значительно возрастает с увеличением длины волны свыше 1300 нм, и очень сильное поглощение гемоглобином крови на длинах волн, меньших, чем 600 нм, ограничивают спектр излучения, которое можно использовать для исследований кровенаполненных биологических объектов толщиной в несколько сантиметров, красным и ближним ИК диапазонами (Elwell С., Hebden J., 1999). Возможность красного и инфракрасного излучения проникать глубоко в ткань, несмотря на очень короткую длину среднего свободного пробега фотонов, определяется двумя факторами: во-первых, в биологических тканях подавляющее большинство взаимодействий — акты рассеяния, а не поглощения (Arridge et al., 1992); во-вторых, размер биологической клетки много больше длины волны, поэтому излучение на длине свободного пробега фотона рассеивается на небольшие углы по отношению к первоначальному направлению. Зарегистрированное прошедшее или рассеявшееся излучение используется в качестве данных для последующей компьютерной обработки и получения изображений внутренней структуры объекта.

Выбор длины волны обуславливается необходимостью определять относительные оптические характеристики различных исследуемых тканей, используя полосы поглощения отдельных хромофоров (например, гемоглобина крови), а также возможностями подходящих источников и чувствительностью приемника. Существенное уменьшение рассеяния благоприятствует использованию больших длин волн, тогда как вследствие значительного поглощения воды следовало бы использовать длины волн до 1.1 мкм.

Из рис. 5А видно, что в диапазоне от 600 нм до 1 мкм, где вода имеет максимум поглощения, можно выбрать для исследования несколько длин волн, где гемоглобин в окси- и дезокси- состояниях имеет существенно разное поглощение. Таким образом, методы оптической визуализации позволяют выявить пространственное распределение коэффициентов поглощения и рассеяния и оценить локальную степень оксигенации гемоглобина.

Уже в конце 70-х годов появились первые сообщения о возможности неинвазивного послойного определения внутреннего состава биологических объектов спектроскопическими

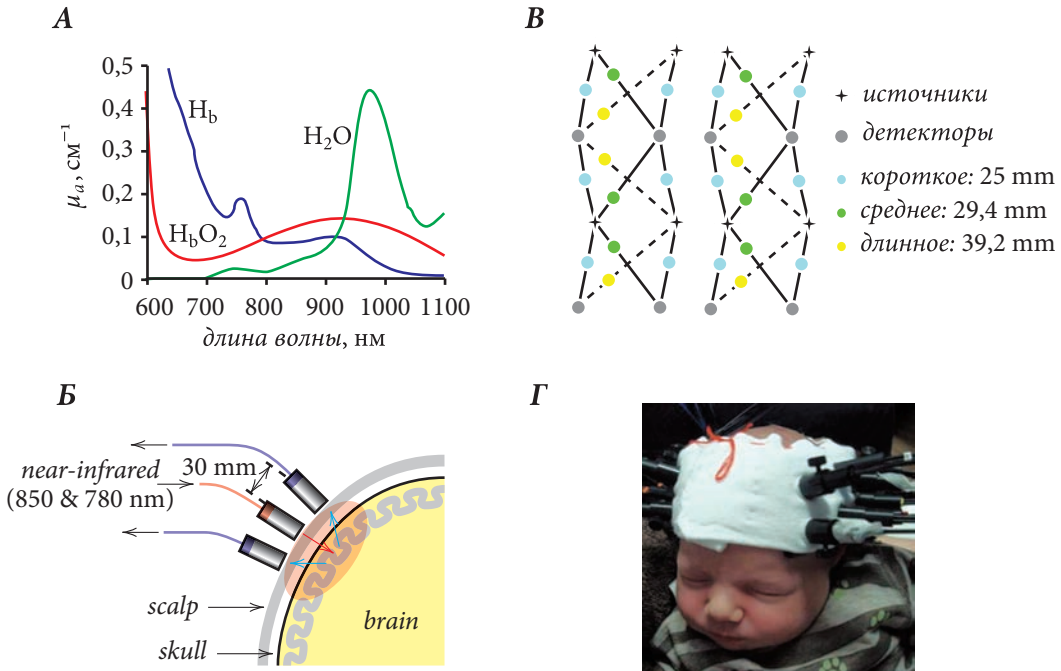


Рис. 5. А) Зависимость коэффициента поглощения дезокси-гемоглобина (H_b), оксигемоглобина (H_bO₂) и воды (H₂O) в зависимости от длины. Б) Падение интенсивности монохромного света, излучаемого лазерным диодом и проходящего через поверхностные слои скальпа, мозговых оболочек и коры мозга, но не проникающего глубже нескольких сантиметров, регистрируется с наибольшей вероятностью на поверхности головы на расстоянии нескольких см от источника — траектория распространения света от источника до детектора таким образом имеет банановидную форму. В) Расположение NIRS сенсоров-каналов, образованных парами источников и детекторов монохромного света. Г) В нашем исследовании на новорожденных, мы использовали систему для измерения гемодинамического ответа методом оптической спектроскопии около-инфракрасного излучения NIRS (Medical Physics Department, UCL, Великобритания), длины волн 780 and 850 нм.

методами (Jöbsis, 1977). Но, несмотря на попытки усовершенствовать методику просвечивания ткани путем использования источников и приемников, работающих в ближнем ИК диапазоне, клинические опыты показали, что полезность метода довольно ограничена (Profio et al., 1989). Причиной этого является многократное рассеяние при прохождении излучения через биоткань, приводящее к тому, что наблюдаемая на поверхности структура оказывается очень расплывчатой.

После ряда работ (Change et al., 1988, Maris et al., 1994), в которых были предложены способы усовершенствования методов спектроскопии ближнего ИК диапазона посредством введения методов измерений, использующих селекцию прошедшего насквозь или рассеявшегося назад излучения по времени нахождения в объекте, появилось несколько методик получения информации о внутренней структуре сильнорассеивающей среды (e.g., Gratton

et al., 1993). По аналогии с уже использовавшимися методами диагностики при помощи восстановления пространственной структуры исследуемого объекта, такими, как рентгеновская томография и магнитно-резонансная томография, новый метод получил название оптической томографии (Arridge, Hebden, 1997). Томографическая реконструкция внутренней структуры объекта есть решение обратной задачи при использовании подходящего способа описания распространения излучения в объекте (Arridge et al., 1991).

Проблема томографической реконструкции включает в себя две задачи: 1 — прямая задача — расчет распространения излучения от источника к приемнику в неоднородной среде, 2 — обратная задача, которая и является томографической реконструкцией распределения неоднородностей внутри просвечиваемого объекта. В случае рентгеновской томографии прямая задача имеет элементарное решение в приближении геометрической оптики, а решение обратной задачи для прямолинейного распространения излучения получено Радоном. В оптической томографии, когда приближение геометрической оптики неприменимо, необходимо начать с исследования прямой задачи с целью приспособления ее решения к виду, пригодному для решения обратной задачи.

Формирование изображения, представляющего пространственное распределение одной или более из внутренних оптических характеристик, на основании серии измерений на границе объекта соответствует так называемой обратной задаче. Она включает в себя восстановление параметров подходящей модели.

Оптическая топография² — это разновидность оптической томографии, позволяющая получать изображения двумерных объектов (поверхностей) в трехмерном пространстве, когда результат решения обратной задачи ищется не для всего трехмерного объекта, а для поверхности, залегающей на заданной глубине под поверхностью объекта.

Как было замечено выше, для функциональной нейрофизиологии особая ценность методов оптической визуализации заключается в возможности определять изменение концентрации окси- и дезоксигемоглобина в живых тканях. Просвечивая излучением с различными длинами волн, можно определять оксигенацию тканей, что делает возможной функциональную диагностику, аналогично фМРТ. Падение интенсивности излучения лазерного диода, проходящего через поверхностные слои скальпа, мозговых оболочек и коры мозга, но не проникающего глубже нескольких сантиметров, регистрируется на поверхности головы на расстоянии нескольких см от источника — наиболее вероятная область распространения света от источника до детектора, таким образом, имеет банановидную форму (рис. 5В). Один и тот же детектор может улавливать свет от разных источников (рис. 5В). Манипулируя расстоянием между источником и детектором, можно варьировать глубину области, сквозь которую прошел зарегистрированный сигнал, чем больше расстояние источник-детектор, тем глубина больше. Увеличение количества пар источник-приемник повышает разрешающую способность метода вплоть до теоретического предела (согласно следствию из теоремы Котельникова-Шеннона; рис. 5В).

В отличие от фМРТ, изменения, регистрируемые при помощи ОТ, не коррелируют с систематическими циркуляторными изменениями в крупных артериях, так как ОТ оценивает концентрацию гемоглобина в мелких сосудах: артериолах, венолах, а также капиллярах. Таким об-

² Оптическая топография — один из методов оптической визуализации структуры и функций головного мозга. В англоязычной литературе этот метод также часто называется «Near Infrared Spectroscopy, NIRS», что дословно переводится как «спектроскопия ближнего инфракрасного диапазона». Однако использование данного термина искажает природу метода, так как в основе NIRS применительно к картированию мозга лежит метод реконструкции изображения, а не спектроскопии как таковой, поэтому более уместным видится использование термина «оптическая томография (или топография)».

разом, изменение концентрации окси- и дезокси- гемоглобина, которое возможно определить при помощи ОТ, больше коррелирует с изменением локального кровотока, измеряемого методом позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ). Более того, аддитивная природа метода измерения концентрации гемоглобина относительно двух отдельных длин волн света, а вследствие этого лучшее соотношение сигнал-шум в отличие от индивидуальных коррелятов окси- и дезосигемоглобина, делает этот метод наиболее привлекательным для сравнения результатов, полученных разными методами, измеряющими изменение кровотока (фМРТ, ПЭТ, ОК), так и при сравнении различных возрастных групп (Minagawa-Kawai et al. 2006, 2007, 2008).

NIRS подразделяется на описанную нами выше так называемую «медленную» (обладающую временным разрешением 0,3–0,5 Hz) BOLD-зависимую и «быструю» (так называемый *fast optical imaging*, или *fast NIRS*). С помощью быстрой NIRS можно зарегистрировать так называемую вызванную оптическую активность или *Event-Related Optical Signal* (Gratton et al., 1997; Rinne et al., 1999). В основе миллисекундного NIRS лежит измерение изменения рассеивания света на клеточной мембране. Природа этих изменений еще не изучена до конца, хотя и выдвинута идея о вкладе в этот процесс конформационных изменений мембранных белков, выброса нейромедиаторов, реорганизации компонентов цитоскелета, изменение объема клеток, вызванных трансмембранными ионными токами, а также захвата калия клетками глии (Gratton&Fabiani, 2003).

Rinne и коллегам (1999) удалось зарегистрировать вызванную оптическую активность, сходную по своей динамике с ВП. В *oddball* эксперименте с чистыми тонами им удалось зарегистрировать оптический (NIRS) аналог НР (MMN) с пиком около 150 миллисекунд.

NIRS данные, полученные в исследовании Peña и коллег (2003) — пример медленного NIRS. Авторы зарегистрировали активность слуховой коры новорожденных в ответ на предъявление а) обыкновенных речевых стимулов (*Forward Speech*), б) речи, воспроизведенной в обратном порядке (*backward speech*) и в) тишины. Их исследование является одним из блестящих примеров изучения латерализации речевой функции у новорожденных. В их исследовании было обнаружено, что именно в левом полушарии амплитудные пики кривых изменения общей концентрации гемоглобина имеют большую величину при предъявлении ребенку обыкновенной речи (*forward speech*) по сравнению с ответами на стимулы, представляющие собой речь, воспроизведенную в обратном порядке (*backward speech*), тогда как справа — эта разница пренебрежительно мала. Другим ярким примером применения БИК спектроскопии к поиску нейробиологических основ межполушарной асимметрии может являться работа Minagawa-Kawai с соавт. (2002), когда исследователи предъявляли фонемы японского языка младенцам и детям разного возраста. На рис. 6 видно, что в ответ на предъявление фонемы другой категории в левом полушарии возникала активация более высокой амплитуды и с возрастом эта асимметрия приобретала более выраженный и фокальный характер.

Целью ОТ исследования Minagawa-Kawai и коллег (Minagawa-Kawai et al., 2007; Minagawa-Kawai et al., in prep.), было изучение латерализации восприятия неречевых стимулов, обладающих разными временными и спектральными характеристиками, в мозге новорожденных (рис. 7), а также сравнение NIRS ответов новорожденных с данными изменения локального кровотока (ИЛК), полученными в ПЭТ исследовании взрослых в ответ на предъявление одних и тех же стимулов из (Zatorre and Belin, 2001). В данном исследовании использовалась БИК система, сделанная в департаменте Медицинской Физики, UCL, Великобритания (длины волн 780 and 850 нм) (рис. 5Г). По теории Zatorre и Belin, у взрослых информация об изменении спектральных и временных характеристик речевых стимулов обрабатывается в различных полушариях.

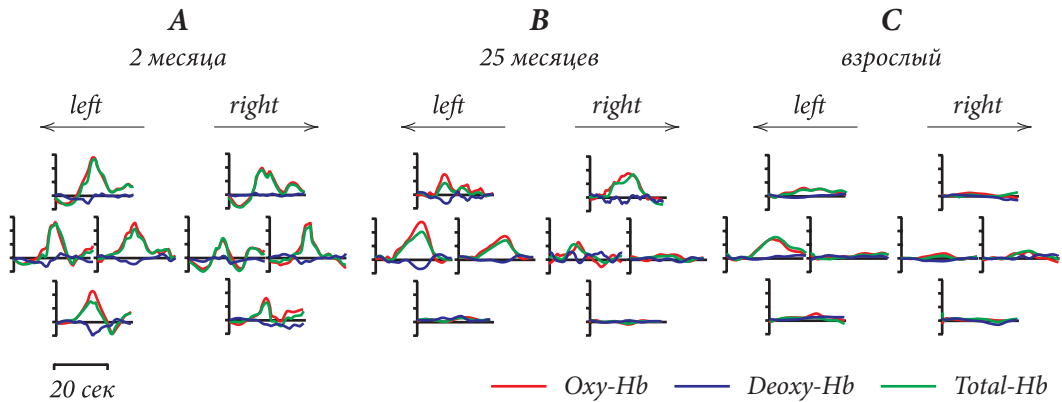


Рис. 6. Пример типичного NIRS ответа — функция изменения концентрации сумарного гемоглобина взрослого (С), и детей в возрасте трех месяцев (А) и двух лет (В). Каналы Из Minagawa-Kawai et al.(2002) Печатается с разрешения Elsevier.

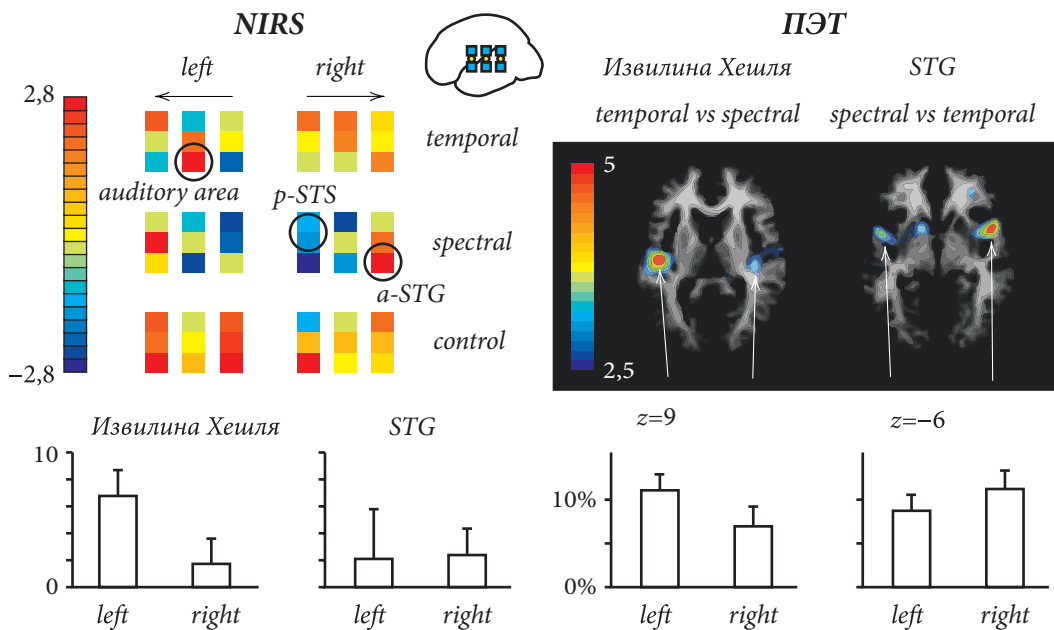


Рис. 7. Сравнение ПЭТ результатов взрослых (Zatorre и Belin , Cerebral Cortex, 2001, с разрешения Oxford University Press) (ПЭТ данные изображены на черном фоне справа) и NIRS данных младенцев (слева) (Minagawa-Kawai et al., 2007) в исследовании дифференциальной обработки спектральных и временных характеристик между полушариями головного мозга. Слева приведены статистические карты активаций по каждому из 9 NIRS каналов , образованных источник-детектор парами (шесть на воображаемой линии, соединяющей источник и детектор на расстоянии 2,5 см (голубые кружочки) и 3-4 см (желтые). Особое внимание следует обратить на идентичность результатов детей и взрослых в извилине Хешля — первичной слуховой области и различие — в области Superior Temporal Gyrus.

Вместе с тем, согласно современным представлениям о структурно-функциональной организации слуховой коры (Kaas et al., 1999), подразделяющим ее на core, belt и parabelt (вместо хорошо известных первичной, вторичной, и ассоциативной), извилина Хешля (Heshl Gyrgus) и Superior Temporal Gyrgus (STG) оказываются в разных подразделениях — core и belt — соответственно. Этот факт подразумевает дифференцированную вовлеченность обеих структур в процесс обработки разных характеристик слуховой информации (Rauschecker et al., 1995). Действительно, в ПЭТ исследовании было продемонстрировано, что на уровне извилины Хешля временные характеристики более эффективно обрабатывались в левом полушарии, тогда как на уровне STG активация, связанная с обработкой спектральных характеристик была сильнее, чем активация, связанная с обработкой временных параметров. Полученная разница была больше справа, что совпадает с теоретическими представлениями авторов (Zatorre&Belin, 2001). Сравнение ИЛК результатов взрослых и ОТ результатов детей показало, что на уровне первичных слуховых центров мозговые активации свидетельствуют об идентичности процессов дифференцированной обработки спектральной и временной информации в разных возрастных группах, тогда как на уровне belt (опоясывающих первичные слуховые зоны) областей у младенцев межполушарной асимметрии не наблюдалось (рис. 7).

Наш и другие эксперименты показывают, что ОТ метод может быть успешно использован в исследованиях асимметрии мозга и латерализации когнитивных функций. Несмотря на то, что ОТ уступает фМРТ в пространственном разрешении, тем не менее, в возрастной и сравнительной психофизиологии у первого метода имеется огромный потенциал.

Итак, краткий обзор работ по исследованию активности мозга младенцев и детей младшего возраста, выполненных в разное время авторами данной статьи, а также результаты исследований других групп позволяют сделать следующие выводы:

- благодаря развитию низкоинвазивных методов картирования мозга, особенно МЭГ и ОТ, расширяется круг возможностей для исследования онтогенеза когнитивных функций человека в раннем возрасте;
- благодаря достижениям физики, инженерии, прикладной математики, программирования, статистики и интеграции вышеупомянутых областей с биологией и психологией, мы можем наблюдать с необычайно высоким пространственно-временным разрешением за, практически, мгновенными процессами, сопоставимыми по времени с динамикой пост-синаптической активности или даже разрядами популяции нейронов или одиночного нейрона, происходящими в растущем мозге;
- благодаря созданию новых программных продуктов в области обработки сигнала, появляется возможность интегрировать информацию, полученную при помощи различных методов — к примеру, М/ЭЭГ и f/МРТ, повышая таким образом информативность методов картирования мозга.

Список литературы

- Arridge S. R., Cope M., and Delpy D. T. (1992) The theoretical basis for the determination of optical pathlengths in tissue: temporal and frequency analysis *Phys Med Biol*, 37, 1531–1560
- Arridge S. R., Hebden J. C. (1997) Optical imaging in medicine II: Modelling and reconstruction. *Phys. Med. Biol.* 42(5), 841–853.
- Arridge S. R., van der Zee P., Cope M., Delpy D. T. (1991) Reconstruction methods for infra-red absorption imaging. *Proc. SPIE*, 1431, 204–215.

- Bremner, J.D. (2005) *Brain Imaging Handbook* / London, NY: W.W. Norton & Company, 195 p.
- Ceponiene, R., Kushnerenko, E., Fellman, V., Renlund, M., Suominen, K., Näätänen, R. (2002) Event-related potential features indexing central auditory discrimination by newborns. *Brain Res Cogn Brain Res* 13, 101–113.
- Chance B., Leigh J. S., Miyake H., Smith D. S., Nioka S., Greenfeld R., Finander M., Kaufmann K., Levy W., Young M., Cohen P., Yoshioka H., Boretsky R. (1988) Comparison of time-resolved and -unresolved measurements of deoxyhemoglobin in brain. *PNAS* 85 (14), 4971–4975.
- Elwell, C., Hebden, J. «Near-Infrared Spectroscopy» // http://www.medphys.ucl.ac.uk/research/borg/research/NIR_topics/nirs.htm 1999
- Friston, K. J. (Editor) (2006) *Statistical Parametric Mapping: The Analysis of Functional Brain Images*. Academic Press.
- Gratton E., Mantulin W. W., van de Ven M. J., Fishkin J. B., Maris M. B., Chance B. (1993) A novel approach to laser tomography. *Bioimaging*, 1, 40–46.
- Gratton, G., Fabiani, M. (2003) The event-related optical signal (EROS) in visual cortex: replicability, consistency, localization, and resolution. *Psychophysiology* 40, 56–571.
- Huettel, A.S., Song A. W., McCarthy G.. (2004) *Functional Magnetic Resonance Imaging*. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 492 p.
- Hämäläinen, M., Hari, R., Ilmoniemi, R.J., Knuutila, J., Lounasmaa, O. V. (1993) Magnetoencephalography — Theory, instrumentation, and applications to noninvasive studies of the working human brain. *Reviews of Modern Physics*, 65, 413–497.
- Jöbsis F.F. (1977) Noninvasive, infrared monitoring of cerebral and myocardial oxygen sufficiency and circulatory parameters. *Science* 198, 1264–1267.
- Hari, R. (1990) Magnetic evoked fields of the human brain: basic principles and applications. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol Suppl* 41, 3–12.
- Hukki, J., Huotilainen, M., Öhman, J., Kushnerenko, E., Shestakova, A., Näätänen, R. (2003) Measurements of electrical and magnetic brain activity help detecting brain dysfunctions in children with craniosynostoses. *Proceedings of the Tenth International Congress of the International Society of Cranio Facial Surgery*. Monterey USA, September 21–24, Editor(s): Salyer K. E.
- Huotilainen, M., Kujala, A., Hotakainen, M., Shestakova, A., Kushnerenko, E., Parkkonen, L., Fellman, V., Näätänen, R. (2003) Auditory magnetic responses of healthy newborns. *Neuroreport* 14:1871–1875.
- Huotilainen, M., Shestakova, A., Hukki, J. (2008) Using magnetoencephalography in assessing auditory skills in infants and children. *Int J Psychophysiol* 68, 123–129.
- Huotilainen, M., Tiitinen H., Lavikainen J., Ilmoniemi R. J., Pekkonen E., Sinkkonen J., Laine P., Näätänen R (1995) Sustained fields of tones and glides reflect tonotopy of the auditory cortex. *Neuroreport* 6, 841–844.
- Huotilainen, M., Winkler, I., Alho, K., Escera, C., Virtanen, J., Ilmoniemi, R.J., Jaaskelainen, I.P., Pekkonen, E., Näätänen, R. (1998) Combined mapping of human auditory EEG and MEG responses. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol* 108, 370–379.
- Huotilainen, M., Kujala, A., Hotakainen, M., Parkkonen, L., Taulu, S., Simola, J., et al. (2005) Short-term memory functions of the human fetus recorded with magnetoencephalography. *NeuroReport* 16 (1), 81–84.
- Imada T., Zhang Y., Cheour M., Taulu S., Ahonen A., Kuhl P.K. (2006) Infant speech perception activates Broca's area: a developmental magnetoencephalography study *Neuroreport* 17, 957–962.
- Kaas, J.H., Hackett T. A., Tramo M. J. (1999) Auditory processing in primate cerebral cortex. *Curr Opin Neurobiol* 9, 164–170.
- Karhu, J., Herrgård, E., Pääkkönen, A., Luoma, L., Airaksinen, E., Partanen, J. (1997) Dual cerebral processing of elementary auditory input in children. *Neuroreport* 8, 1327–1330.

- Kohl, M. Watson, R., Cope, M. (1997) Determination of absorption-coefficients in highly scattering media from changes in attenuation and phase. *Opt. Lett* 21, 1519–1521
- Kujala, A., Huutilainen, M., Hotakainen, M., Lennes, M., Parkkonen, L., Fellman, V., et al., (2004). Speech-sound discrimination in neonates as measured with MEG. *NeuroReport* 15, 2089–2092.
- Kushnerenko, E., Ceponiene R., Balan P., Fellman V., Näätänen R. (2002) Maturation of the auditory change detection response in infants: a longitudinal ERP study. *Neuroreport* 13, 1843–1848
- Lutter, W. J., Maier, M., Wakai, R.T. (2006) Development of MEG sleep patterns and magnetic auditory evoked responses during early infancy. *Clinical Neurophysiology* 117, 522–530.
- Maris M., Gratton E., Majer J., Mantulin W., Chance B. (1994) Functional near-infrared imaging of deoxygenated haemoglobin during exercise of the finger extensor muscles using the frequency-domain technique. *Bioimaging*, 2, 174–183.
- Minagawa-Kawai Y, Mori K, Furuya I, Hayashi R, Sato Y. 2002. Assessing cerebral representations of short and long vowel categories by NIRS. *Neuroreport* 13:581–584
- Minagawa-Kawai, Y., Mori, K., Hebden, J.C., Dupoux, E. (2008) Optical imaging of infants' neurocognitive development: recent advances and perspectives. *Dev Neurobiol*, 68, 712–728.
- Minagawa-Kawai, Y., Mori, K., Naoi, N., Kojima, S. (2007) Neural attunement processes in infants during the acquisition of a language-specific phonemic contrast. *J Neurosci*, 27, 315–321.
- Minagawa-Kawai, Y., Shestakova, A., van der Lely, H., Kushnerenko, E., Meek, J., Hebden, J. Everdell N. and Dupoux E. (2007) Newborn's brain responses to temporally and spectrally different sounds changes measures with NIRS . *Proceedings of the International Symposium "Topical problems of biophotonics, Moscow , Russia.*
- Mäkelä, J.P., Forss, N., Jääskeläinen, J., Kirveskari, E., Korvenoja, A., Paetau, R. (2007) Magnetoencephalography in neurosurgery. *Neurosurgery*, 147–164
- Näätänen, R., Picton, T. (1987) The N1 wave of the human electric and magnetic response to sound: a review and an analysis of the component structure. *Psychophysiology* 24, 375–425.
- Näätänen, R., Tervaniemi, M., Sussman, E., Paavilainen, P., Winkler, I. (2001) «Primitive intelligence» in the auditory cortex. *Trends Neurosci*, 283–288.
- Näätänen, R., Winkler, I. (1999) The concept of auditory stimulus representation in cognitive neuroscience. *Psychol Bull*, 125, 826–859.
- Näätänen, R., Lehtokoski, A., Lennes, M., Cheour, M., Huottilainen, M., Iivonen, A., Vainio, M., Alku, P., Ilmoniemi, R.J., Luuk, A., Allik, J., Sinkkonen, J., Alho, K. (1997) Language specific phoneme representations revealed by electric and magnetic brain responses. *Nature* 385, 432–434.
- Pang, E.W., Gaetz, W., Otsubo, H., Chuang, S., Cheyne, D. (2003) Localization of auditory N1 in children using MEG: source modeling issues. *International Journal of Psychophysiology* 51, 27–35.
- Peña M., Maki A., Kovacic D., Dehaene-Lambertz G., Koizumi H., Bouquet F., Mehler J. (2003) Sounds and silence: an optical topography study of language recognition at birth. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(20), 11702–11705.
- Pihko, E., Lauronen, L., Wikström, H., Taulu, S., Nurminen, J., Kivitie-Kallio, S., Okada, Y. (2004) Somatosensory evoked potentials and magnetic fields elicited by tactile stimulation of the hand during active and quiet sleep in newborns. *Clin Neurophysiol*, 115(2), 448–55.
- Pihko, E., Lauronen, L. (2004) Somatosensory processing in healthy newborns. *Exp Neurol*, 190 Suppl 1:S2–7.
- Pihko, E., Sambeth, A., Leppänen, P.H., Okada Y., Lauronen L. (2004) Auditory evoked magnetic fields to speech stimuli in newborns--effect of sleep stages. *Neurol Clin Neurophysiol*, 30, 2004–2006
- Profio A. E., Navarro G. A., Sartorius O. W. (1989) Scientific basis of breast diaphanography. *Med. Phys.*, 16, 60–65.

- Raizada, R.D., Richards, T.L., Meltzoff, A., Kuhl, P.K. (2008) Socioeconomic status predicts hemispheric specialisation of the left inferior frontal gyrus in young children. *Neuroimage* 40, 1392-1401.
- Rauschecker, J.P., Tian, B., Hauser, M. (1995) Processing of complex sounds in the macaque nonprimary auditory cortex. *Science* 268, 111-114.
- Rinne, T., Gratton, G., Fabiani, M., Cowan, N., Maclin, E., Stinard, A., Sinkkonen, J., Alho, K., Näätänen, R. (1999) Scalp-recorded optical signals make sound processing in the auditory cortex visible? *Neuroimage* 10, 620-624.
- Sambeth, A., Huotilainen, M., Kushnerenko, E., Fellman, V., Pihko, E. (2006) Newborns discriminate novel from harmonic sounds: a study using magnetoencephalography. *Clinical Neurophysiology*, 117, 496-503.
- Shestakova, A., Huotilainen, M., Ceponiene, R., Cheour, M. (2003) Event-related potentials associated with second language learning in children. *Clin Neurophysiol*, 114, 1507-1512
- Shestakova, A., Brattico, E., Huotilainen, M., Galunov, V., Soloviev, A., Sams, M., et al. (2002) Abstract phoneme representations in the left temporal cortex: magnetic mismatch negativity study. *NeuroReport*, 13 (14), 1813-1816.
- Uutela, K., Hämäläinen, M., Somersalo, E. (1999) Visualization of magnetoencephalographic data using minimum current estimates. *NeuroImage*, 10, 173-180.
- Winkler, I., Kujala, T., Tiitinen, H., Sivonen, P., Alku, P., Lehtokoski, A., Czigler, I., Csépe, V., Ilmoniemi, R.J., Näätänen, R., 1999. Brain responses reveal the learning of foreign language phonemes. *Psychophysiology*, 36, 638-642.
- Zatorre, R.J., Belin P. (2001) Spectral and temporal processing in human auditory cortex. *Cereb Cortex*, 11, 946-953.

Когнитивные исследования внимания

Проблема внимания, также как и проблема сознания, относится к вечным проблемам психологии, о чем свидетельствуют приведенные ниже цитаты.

«Каждый знает, что такое внимание. Это, когда разум охватывает в ясной и отчетливой форме нечто, в чем видится одновременно несколько возможных объектов или ходов мысли. Сосредоточение, концентрация сознания — вот его суть. Оно означает отвлечение от одних вещей ради того, чтобы эффективно работать с другими» (James, 1890).

«Теория внимания — это жизненный нерв всей системы психологических понятий, и по тому, как люди судят о нем, их самих будут судить перед верховным судом психологии» (Титченер, 1914).

«Внимание долго позиционируется как главный вызов психологу» (Pashler, 1998)

За годы исследования внимания было предложено большое число различных описаний и теорий внимания. В различных контекстах оно описывалось как фильтр, бутылочное горлышко, процессы выбора, интеллектуальные усилия, ретуширование образа, ресурсы и т. д.

В монографии под редакцией М. И. Познера (Posner, 2004) приводятся данные о количестве публикаций, выпускаемых с 1960 года по 2003 год в рамках пяти ключевых слов: внимание, память, познание (cognition), восприятие, обучение. Как оказалось, число публикаций по вниманию с 1960 года выросло почти в три раза. При этом ближайšie цифры относятся к памяти, где число публикаций увеличилось почти в 1,5 раза (Cavanagh, 2004). Это обстоятельство делает задачу полного обзора работ по вниманию в рамках обычной публикации едва ли выполнимой. Поэтому мы решили остановиться на основных проблемах внимания.

Прогресс экспериментальных исследований и все более полный учет нейрофизиологических данных позволили продемонстрировать разнообразие форм внимания и сознания и многоуровневость лежащих в их основе процессов.

Обратимся к рассмотрению истории вопроса. Впервые проблема внимания в контексте экспериментальной психологии была изложена в книге британского психолога Дональда Бродбента «Восприятие и коммуникация» (1958) (Broadbent, 1958), где внимание сравнивалось с фильтром, осуществляющим отбор информации и предохраняющим канал передачи информации от перегрузки. На основании собственных исследований, а также данных К. Черри, Д. Бродбент выдвинул идею ранней селекции и положил начало множеству исследований, посвященных вопросу о том, где расположен фильтр (рис. 1).

Три имени связаны с начальным этапом исследований, посвященных вниманию как процессу фильтрации, это — Д. Бродбент, К. Черри и Н. Моррей.

Модель Д. Бродбента (1958) иллюстрирует центральные положения теории фильтра. Эта теория, называемая моделью с фильтрацией, связана с так называемой «одноканальной теорией» и предполагает наличие фильтра на/или непосредственно перед стадией перцептивного анализа, поэтому в один момент времени может быть воспринят только один стимул. Когда два стимула предъявляются одновременно, один воспринимается немедленно, в то

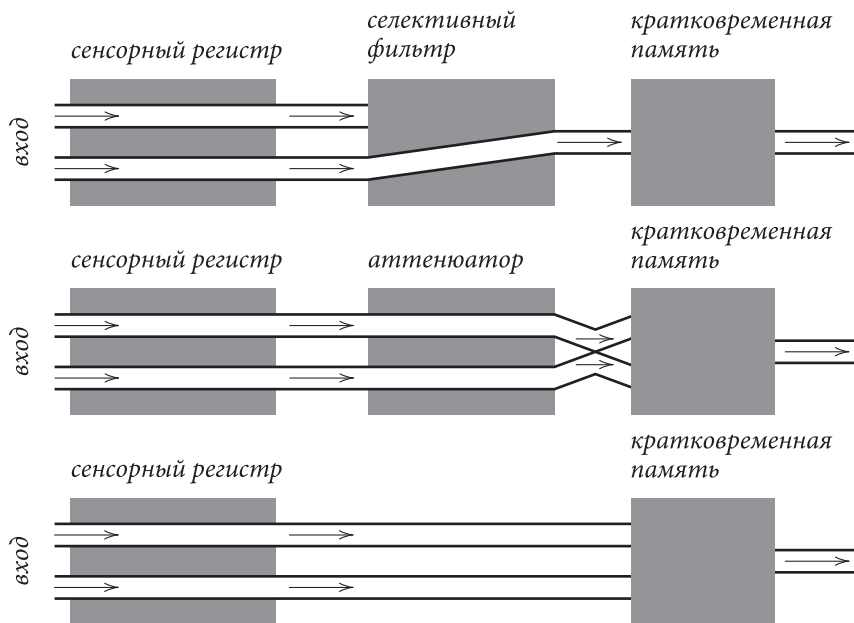


Рис. 1. Графическое сопоставление трех теорий внимания: Бродбента (наверху), Трейсмана (середина) и Дойчей (внизу).

время как сенсорная информация, соответствующая второму, короткое время удерживается в виде необработанного следа образа. Наблюдатель может направить внимание на подобные следы и образы и воспринять их содержание, но только после того, как будет закончена перцептивная обработка первого сообщения. Согласно этой модели, восприятие контролируется вниманием (рис. 1).

Уолдорф с соавт. (1993) (Waldorff et al., 1993) показали, что вызванные потенциалы (ВП) на слуховые сигналы, приходящие от уха, на которое направлено внимание, имеют большую амплитуду в диапазоне 20–50 мс после начала предъявления стимула. Аналогичные факты получены и при исследовании зрения, где модулирующее обработку сигнала влияние пространственного внимания начинает сказываться через 80–90 мс (Хильярд, Анло-Венто, 1998) (рис. 2). Столь ранние проявления внимания могли бы говорить о том, что кортикальная обработка сенсорной информации с самого начала модулируется вниманием. Это означает, что изменения в ВП наблюдаются много раньше, чем могут быть идентифицированы голос говорящего или значение сообщения.

Британский ученый Колин Черри, анализируя проблему так называемой «коктейль вечеринки», нашел, что способность поддерживать внимание на некотором выбранном звуковом канале основывается на способности использовать определенные физические характеристики, например, пол говорящего, громкость сообщения, локализацию источника и т. д. (Cherry, 1953). Когда К. Черри предъявлял два сообщения, передаваемые одним голосом

одновременно в оба уха, устранив, таким образом, физические различия, слушателям было очень трудно разделить эти два сообщения только на основании их значения (1953).

Исследования К.Черри (Cherry, 1953) привели к разработке экспериментальной процедуры, называемой затенение (shadow) (предполагается, что этот термин взят из техники живописи, где оттенить означает выделить что-либо из окружения). В этой методике испытуемому дихотически предъявлялись одновременно два слуховых сообщения, одно из них должно быть «оттенено» (то, которое он должен повторить устно), а другое — проигнорировано. К.Черри обнаружил, что, несмотря на способность испытуемых к затенению сообщений, они запоминали довольно мало информации. Возможно, основная часть обработки информации происходила в кратковременной памяти, поэтому отсутствовало постоянное хранение и понимание сообщения. Сообщение, которому не уделялось внимания, запоминалось намного хуже. Когда в качестве такого сообщения предъявлялась речь, испытуемые отмечали, что распознают ее как речь. Но когда в игнорируемом канале английский язык сменялся немецким, или предъявлялась перевернутая английская речь, они этого не замечали.

Н.Морей (Moray, 1959) показал, что информация, поступающая на игнорируемое ухо, не запоминалась испытуемым, хотя некоторые слова предъявлялись 35 раз. Тогда Н.Морей сделал важный шаг, состоящий в том, что сообщению в игнорируемом канале предшествовало собственное имя испытуемого. В этом случае примерно в трети случаев испытуемые замечали собственные имена. Найсер (Neisser, 1969) в аналогичном эксперименте со зрительными стимулами получил результаты, сходные с результатами Н.Морея. Испытуемые должны были читать вслух осмысленный текст и игнорировать слова, напечатанные красным шрифтом под каждой строчкой отбираемого текста. Испытуемые не узнавали слова, представленные на игнорируемых строках, даже тогда, когда одно и то же слово повторялось несколько раз. Однако две трети испытуемых заметили свои собственные имена в отвергаемых строках.

Попытаемся резюмировать модель Бродбента. Он допустил существование последовательности трех элементов: кратковременного хранилища (S-системы), селективного фильтра и канала с ограниченной пропускной способностью (P-системы) (рис. 1). Одновременные стимулы поступают в S-систему, и там они анализируются по физическим признакам, таким, например как тембр голоса. Какого либо установленного предела пропускной способности S-системы не существует. Селективный стимул пропускает в P-систему те стимулы, которые поступают по обозначенному «каналу». Канал задается любой физической характеристикой, на которую фильтр может быть настроен. Более тщательный перцептивный анализ выполняется в P-системе. Эта система последовательно работает с принятыми

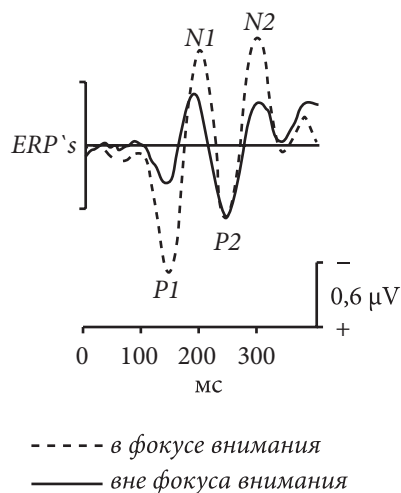


Рис. 2. Типичная картина изменений слуховых вызванных потенциалов мозга (ERP) при концентрации внимания на пространственном расположении стимула.

стимулами, и время, затраченное на каждый стимул, зависит от количества информации, которую этот стимул передает. Когда Р-система освобождается, фильтр позволяет поступить новому стимулу. Таким образом, когда два стимула предъявляются одновременно, они будут обработаны последовательно, но только если переработка первого закончится прежде, чем след второго угаснет в S-системе. Теория фильтра трактует сфокусированное внимание как настройку фильтра на селекцию определенного класса стимулов и отвержение остальных. (Broadbent, 1970).

Теория фильтрации Бродбента не могла объяснить эти данные, так как предполагалось, что селекция ведется на основе физических характеристик сигнала и переключение внимания не должно быть связано с содержанием сообщения. Серьезную критику эта теория получила благодаря опытам Грея и Веддерберна (Gray, Wedderburn, 1960). Они предъявляли через левое и правое ухо слоги, составляющие вместе одно слово, и случайные цифры, так что, когда в одном ухе слышался слог, в другом слышалась цифра. Например:

<i>Левое ухо</i>	<i>Правое ухо</i>
ОБЪ	6
2	ЕК
ТИВ	9

Если теория с фильтрацией Бродбента верна, то испытуемые, когда их просили повторить то, что они слышали через один канал, должны были произнести нечто невнятное — например, «об-два-тив». Но вместо этого они говорили слово «объектив», демонстрируя тем самым свою способность быстро переключаться с одного канала на другой. В другом эксперименте Грей и Веддерберн использовали ту же самую процедуру, но вместо слогов предъявляли фразы типа «Какого черта»:

<i>Левое ухо</i>	<i>Правое ухо</i>
Какого	3
5	черта

Ряд исследователей представил интересные данные, полученные благодаря использованию кожно-гальванической реакции (КГР). Так, например, в экспериментах Кортин и Вуд (Corteen, Wood, 1972) вслед за словами, обозначающими названия городов, следовал удар электрическим током. Впоследствии названия городов, которые были включены в отвергаемое сообщение, часто вызывали КГР, хотя никогда сознательно не опознавались.

Все вышеприведенные результаты явились серьезным ударом для теории фильтрации Бродбента.

А.Трейсман ученица Д.Бродбента разработала модификацию его модели, известную как теория ослабления (1964), которую Бродбент впоследствии принял (Broadbent 1964). Эта теория предполагала, что некоторые сообщения будут ослабляться, но не игнорироваться полностью на основе их физических свойств (рис. 1). Согласно Трейсман (Treisman, 1971), сенсорное сообщение активирует в памяти гипотетические «словарные единицы». Порог для слова, которое делает вероятным контекст, понижается временно. Из-за таких изменений порогов высокочастотное или высоковероятное слово будет воспринято вопреки ослаблению. Временные изменения порога объясняют данные Трейсман, заключающиеся в том, что испытуемые следуют за содержанием сообщения, которое неожиданно переключается с одного канала на другой. Вот как пишет по этому поводу сама Трейсман: «Возможно, что каналный фильтр только ослабляет нерелевантные сообщения, а не блокирует их полно-

стью. Если так, то слова, очень важные или существенные для человека могут извлекаться, несмотря на низкое отношение сигнал/шум, если порог их обнаружения временно или постоянно понижен внутри самой системы опознавания слов. Одной из возможных систем опознавания слов может быть иерархия последовательно выполняемых тестов, имеющих отдельный выход для каждого слова или другой лингвистической единицы. Для некоторых выходов критерии, определяющие результаты тестирования, могут снижаться, если этому способствует контекст, или эти выходы недавно уже использовались, или они имеют особую важность. Сообщения, ослабляемые таким фильтром, могут выдержать тесты только тогда, когда критерии снижены в их пользу, а иначе они не могут пройти дальше по иерархии» (1964, с.14) (Treisman, 1964).

Солсо ставит в своей монографии справедливый вопрос о том, способен ли простой делитель анализировать сложные элементы сообщения и тщательно проверять их, чтобы увидеть, стоит их пропускать или нет? и как он успевает делать все это в мгновение ока, не отставая при этом от текущей панорамы слуховых событий? Как раз из-за этих вопросов вспыхнул спор о том, какие именно свойства Трейсман приписывает делителю. Трейсман прояснила свою позицию в замечании, сделанном специально для Солсо: «Я думаю, что аттенюатор обрабатывает все неконтролируемые сообщения одинаково и независимо от их содержания. Влияние их вероятности, существенности, важности и т. п. определяется внутри системы распознавания речи, точно так же, как и для контролируемого вниманием сообщения, если оно приходит с низким отношением сигнал/шум... Единственное различие между контролируемыми и неконтролируемыми сообщениями состоит в том, что у неконтролируемого сообщения общее отношение сигнал / шум уменьшено селективным фильтром, и следовательно, ничто из такого сообщения не может возбудить лексические входы, за исключением нескольких слов и фраз с необычайно низким порогом обнаружения. Аттенюатор выбирает только на основе общих физических свойств, таких как локализация и качество голоса» (1986). (Цит. по Солсо, 2005).

Сильно отступая от теории фильтра, Трейсман делает вывод, что возможно распределенное внимание и параллельная переработка могут происходить параллельно для двух одновременных входных сигналов, но только если они не затрагивают одних и тех же анализаторов. Однако, если один и тот же анализатор должен работать с двумя стимулами, переработка обязательно будет последовательной (Treisman, 1969).

Альтернативное теории фильтра-аттенюатора объяснение предложили Дойч и Дойч (Deutch, Deutch, 1963), а позже Норманн (1968) (Norman 1968), в своей теории позднего отбора (см. рис. 1). Согласно этой радикальной модели, все сигналы проходят предварительный анализ в перцептивной системе, и далее предпочтение отдается одним или другим сообщениям в зависимости от их существенности или «уместности» по отношению к текущей цели, стоящей перед системой. Они предположили, существование центральных структур, эквивалентных словарным единицам у Трейсман, но предположили, что внимание не влияет на ту степень, в которой эти структуры активируются сенсорной стимуляцией. Однако каждая центральная структура имеет заранее установленную степень важности, которая отражает текущие намерения (например, сейчас релевантными являются названия животных) или устойчивые диспозиции (например, мое собственное имя всегда релевантно). Среди одновременно активных центральных структур для управления осознанием и ответом выбирается одна, обладающая наивысшей степенью важности. В терминах теории обнаружения сигнала, параметр важности есть сдвиг критерия в пользу релевантных объектов. Расхождения между этими двумя теориями наиболее четко видны в контексте рас-

пределенного внимания. В теории фильтра утверждается, что распределение внимания между одновременными стимулами совершенно невозможно, поскольку внимание в некий момент времени может быть направлено только на один канал. С другой стороны, Дойч и Дойч предполагают, что обнаружение релевантного сигнала должно осуществляться независимо от того, направлено или нет внимание наблюдателя в данный момент на тот канал, в котором предьявляется сигнал.

Трейсман и Геффен (Treisman, Geffen 1967, 1968) попытались преодолеть разногласие между двумя теориями. В задаче на дихотическое прослушивание испытуемые должны были отнестись к одному сообщению и кроме этого сказать, слышали ли они определенное «целевое» слово, которое могло предьявляться как на одно, так и на другое ухо. Согласно модели Дойчей-Нормана целевое слово должно быть обнаружено независимо от того, на какое ухо оно предьявлялось. Как оказалось, испытуемые обнаруживали 87% целевых слов, предьявленных на ухо, контролируемое вниманием, но только 8% из слов, предьявляемых на неконтролируемое ухо, что является серьезным возражением против модели Дойчей и Нормана.

Из множества экспериментов, проведенных для проверки модели Дойчей и Нормана, в некоторых из них не подтвердились отдельные положения, предусмотренные этой моделью.

Многие из приведенных выше данных не согласуются ни с теорией фильтра, ни с теорией Дойчей-Нормана. Теория фильтра не согласуется с данными, указывающими на параллельную переработку. Теория Дойчей-Нормана не верна, поскольку не согласуется с влиянием предпочтения канала на обнаружение высокозначимого стимула (Treisman A. M., Riley, 1969).

Стремясь точнее определить различия между моделями Трейсман и Дойчей, Джонстон с коллегами предложили более сложную модель, предполагающую, что отбор слуховой информации осуществляется на нескольких этапах. Важно, что отбор информации происходит настолько рано, насколько это возможно с точки зрения решаемой задачи. При экспериментальной проверке этой гипотезы Джонстон и Хейнц (Johnston, Heinz, 1978) предьявляли целевые и нецелевые слова одновременно и бинаурально. Испытуемых просили оттенять целевые слова. В одном случае оба набора слов читал один и тот же диктор мужчина, а в другом — целевые слова читал мужчина, а нецелевые читала женщина. Во втором случае благодаря различиям в высоте тона мужского и женского голосов можно было различать слова по их сенсорным характеристикам. В первом же случае, когда оба набора читались мужским голосом, сенсорное различие оказывалось более трудным, и испытуемому приходилось опираться на значения или смысловые характеристики слов. В том случае, когда целевые и нецелевые слова читались мужским голосом, от испытуемого требовалось больше усилий, чем когда слова читала женщина и мужчина.

Напомним, что в модели Дойчей все сигналы проходят некоторый предварительный анализ, тогда как в модели Трейсман незначительные сообщения ослабляются канальным делителем, а не исключаются полностью. В эксперименте Джонстона и Хейнца (1978) целевые слова должны были проходить более сложную обработку, когда оба набора читал мужчина. Согласно полученному выводу, степень обработки неоттеняемых сигналов меняется в зависимости от требований решаемой задачи, что лучше отвечает более гибкой модели Трейсман, чем модели Дойча и Нормана.

Канеман (Kahneman 1973) предлагает разделять два аспекта внимания: интенсивный и селективный. Для того, чтобы объяснить ограниченную возможность выполне-

ния разнообразных видов деятельности одновременно, Канеман в своей теории ресурсов вводит положение о том, что ресурсы, которые могут быть распределены на разные виды деятельности, ограничены, причем эти ограничения изменяются совместно с уровнем активации: при умеренно высокой активации доступно больше ресурсов, чем при низкой. Интенсивностный аспект внимания отождествлен с усилием. Количество внимания, или усилия, прилагаемого в любой момент времени, зависит, прежде всего, от требований текущих деятельностей. Причем, политика распределения усилий зависит от текущих диспозиций и временных намерений. Согласно Канеману, центральными элементами его модели являются «принципы распределения» и «оценка спроса на ресурсы». «Принципы распределения» определяются четырьмя факторами: 1) долговременной готовностью, отражающей законы непроизвольного внимания (выделение ресурсов на обработку любого нового сигнала, на всякий разговор, где упоминается имя собственное); 2) временными намерениями (например, слушать голос в правом наушнике; 3) оценкой требований, например, если два действия требуют для своей реализации больше ресурсов, чем имеется, одно из них прекращается; 4) влияниями возбуждения, например, возбуждение может повышаться вследствие беспокойства, страха, гнева (рис. 3).

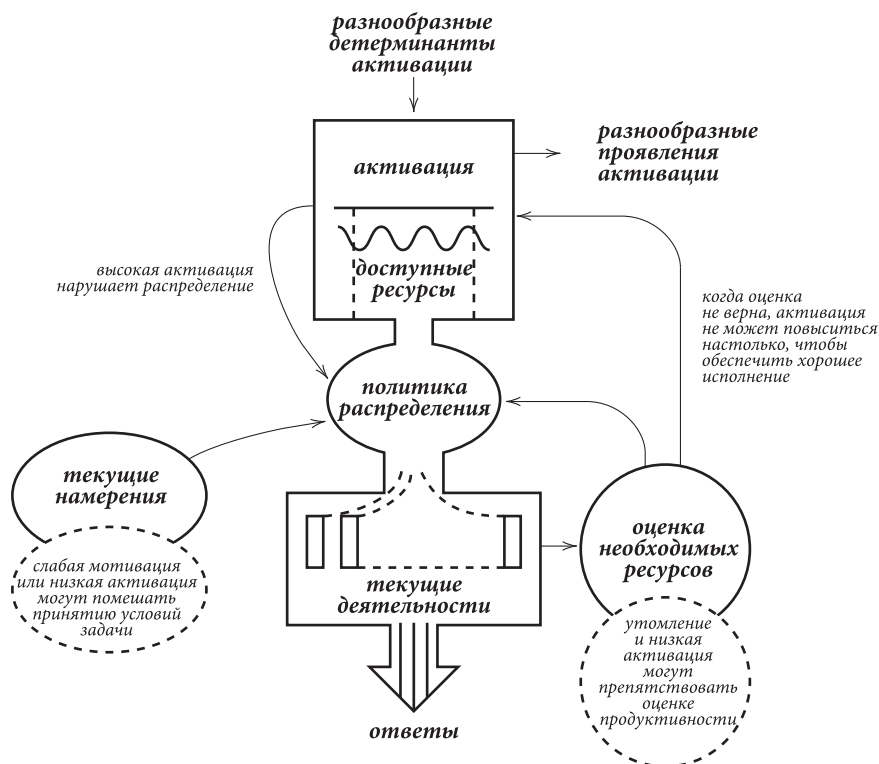


Рис. 3. Модель внимания как распределение ресурсов (по Д. Канеману).

Теория интеграции признаков

Теория интеграции признаков была впервые предложена А.Трейсман (Treisman 1988, 1992). Она предположила, что люди должны сосредоточивать внимание на стимуле, прежде чем смогут синтезировать его особенности в паттерн. Она проводила различия между признаками объекта (например, цвет, размер, линии разной ориентации) и самими объектами. Она сделала следующие предположения:

- в том случае, когда искомый объект отличается одним признаком, его поиск осуществляется быстро с помощью параллельных процессов, в которых зрительные характеристики объектов обрабатываются вместе без участия внимания;
- если искомый объект характеризуется сочетанием нескольких признаков, его поиск осуществляется с помощью последовательного внимательного просмотра объектов;
- последовательные процессы медленнее, чем параллельные процессы, особенно, когда размер множества большой;
- характеристики могут объединяться с помощью сфокусированного внимания с местоположением объекта, в этом случае сфокусированное внимание обеспечивает «клей» для формирования унитарного объекта из доступных характеристик;
- на комбинацию характеристик могут повлиять накопленные знания (например, известно, что бананы обычно желтые);
- при отсутствии сфокусированного внимания или релевантных накопленных знаний, характеристики от разных объектов могут комбинироваться случайно, давая «иллюзорные соединения».

Предварительной поддержкой этой теории послужили данные Трейсман и Геладе (Treisman, Gelade, 1980). Испытуемые искали мишень в зрительном ряду, который состоял из 1 до 30 элементов. Мишенью служил объект, основанный на объединении признаков (зеленая буква Т), либо состоял из одной характеристики (голубая буква или S). Когда мишенью была зеленая буква Т, все не мишени разделяли только одну характеристику с мишенью (они были либо коричневой буквой Т, либо зеленой буквой Х). Предсказание состояло в том, что сфокусированное внимание потребуется для того, чтобы обнаружить мишень, которая соединяет два признака (потому что мишенью являлась комбинация характеристик), но не потребуется, чтобы обнаружить единственную характеристику мишени. Данные подтвердили это предсказание. Размер ряда оказывал большое влияние на скорость обнаружения, когда мишень представляла комбинацию или сочетание характеристик (т.е., зеленая буква Т). Однако, размер ряда оказывал очень маленькое влияние, когда мишень была с единственной характеристикой (голубая буква или S).

В другом эксперименте Трейсман и Геладе (рис. 4) испытуемым предлагалось следующие два варианта. В одном случае надо было найти букву Т среди 30 букв У и 30 букв I. Такую задачу испытуемый выполнял за 400 мс. В другом случае необходимо было найти букву Т среди букв I и Z. Для выполнения этой задачи потребовалось на 400 мс больше. Таким образом, при условии распознавания сочетания двух признаков потребовалось больше времени, чем при условии, когда необходимо требовалось выделить отдельный признак.

Трейсман и Шмидт (Treisman, Schmidt, 1982) проверяя последний тезис, смотрели, что происходит с комбинациями особенностей, когда стимулы находятся вне фокуса внимания. Испытуемых просили сообщить об идентичности двух черных цифр, высвеченных в одной части поля зрения. Это было их первоначальной задачей, и именно там фокусировалось их внимание. В другой части поля зрения предъявлялись буквы разного цвета. Так, испытуе-

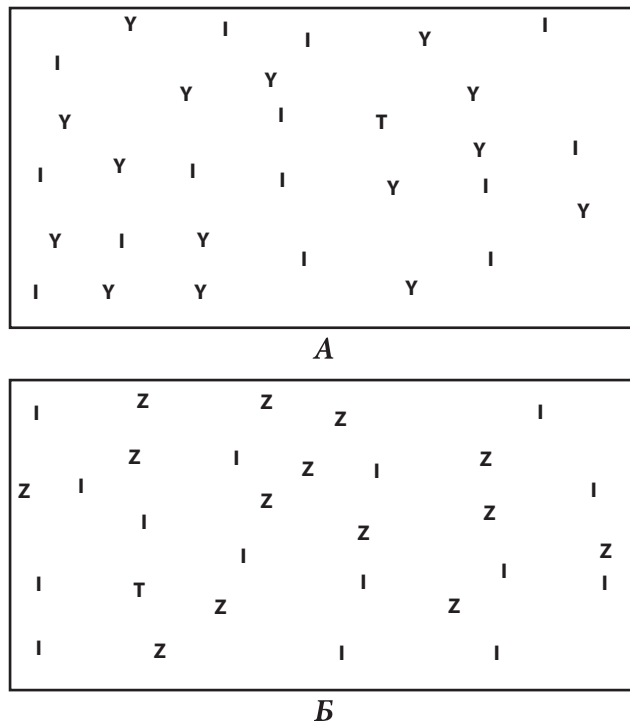


Рис. 4. Стимулы, используемые Трейсмман и Геладом (1980). Испытуемым легче обнаружить Т в множестве А, чем в множестве Б.

мым могли предъявляться розовая Т, желтая S и синяя N в игнорируемой части поля зрения. После того как испытуемые сообщали о числах, их просили сообщить о любых буквах, которые они видели, и о цвете этих букв. Испытуемые сообщали о том, что наблюдали такие стимулы как, например, розовая S, (иллюзорные сочетания признаков), почти так же часто, как и о том, что наблюдали правильные комбинации. Т.о., получается, что мы способны комбинировать признаки в точное восприятие лишь, когда наше внимание сосредоточено на объекте. В противном случае мы воспринимаем признаки, но вполне можем комбинировать их в восприятие объектов, которых там никогда не было.

Трейсман и Сато (Treisman., Sato 1990), развивая интеграционную теорию, доказали, что степень подобия между мишенью и дистракторами влияет на время зрительного поиска. Например, если вы ищете голубой круг в картинке, содержащей голубые треугольники, красные круги и красные треугольники, вы будете игнорировать красные треугольники. Это противоречит взглядам исследования Трейсман и Геладе (1980), которые показали, что ни один из стимулов не будет игнорирован.

Вышеизложенные противоречия послужили поводом для выдвижения Трейсман (Treisman 1993) более сложной версии интеграционной теории, в которой имелось 4 формы селекции внимания. Во-первых, имеется отбор посредством вовлечения относительно широкого или узкого окна внимания. Во-вторых, имеется отбор по характеристикам. Характеристики разделялись по поверхностно определяемым признакам (например, цвет, яркость, относительное движение) и по форме, определяющей характеристики (например, ориентация, размер). В третьих, имеется отбор на основе объектно-определяемых локаций. В четвертых, имеется отбор на поздней стадии обработки, которая детерминирует объектный

файл, контролирующий индивидуальный ответ. Т.о., селективность внимания может управлять обработкой информации при различных уровнях, зависящих от требований задачи.

Интеграционная теория повлияла на теоретические подходы к зрительному поиску в двух отношениях. Во-первых, многие теоретики приняли тот факт, что во внимание вовлечено два последовательных процесса. Во-вторых, те, кто принял первую точку зрения, в общем, согласны, что первый процесс быстрый и эффективный, в то время как второй процесс более медленный и менее эффективный. Как подчеркивает Квинлан в обзоре, посвященном теории интеграции признаков (Quinlan 2003), не будет преувеличением сказать, что эта теория является одной из наиболее влиятельных и серьезных теорий последней четверти двадцатого века.

Сознательные и автоматические процессы

Большинство процессов в мозге протекают автоматически и не требуют от субъекта специального внимания. Хорошо известно, что множество сложных, но привычных мыслительных процессов могут протекать автоматически. Познер и Снайдер (Posner, Snyder 1975) выделили три основных критерия отличия автоматических процессов от контролируемых:

- автоматические процессы характеризуются произвольностью и протекают без усилий субъекта, не требующих обращения к ресурсам организма, возможности которых достаточно ограничены;
- они не достигают уровня сознания;
- не взаимодействуют (не интерферируют) с какой-либо текущей психической (интеллектуальной) деятельностью, т. е. не нарушают ее.

Эти соображения позволили предложить методический прием разведения сознательных и автоматических процессов. Он получил название методики «проигрыша-выигрыша» (она же методика Познера-Снайдера, 1975). Поскольку автоматическая обработка осуществляется полностью сформированными подсистемами, которые могут функционировать параллельно, то предварительная настройка одной из этих подсистем приведет к ускорению обработки адекватной для нее информации, но не будет сопровождаться замедлением обработки, если предъявляется совсем другая, неожиданная информация. Следовательно, автоматизированные системы работают по правилу «выигрыш, но не проигрыш». Сознательная обработка сопровождается «выигрышем» при предъявлении ожидаемых стимулов, но в случае неожиданной информации, к обработке которой мы не подготовились, будут возникать затруднения. Иными словами, для сознательной обработки характерны «как выигрыш, так и проигрыш». Этот «проигрыш» в системе сознательного управления должен возникать в результате вызванного ожиданиями произвольного перераспределения ресурсов. При этом не исключаются полностью возможности работы других подсистем, такое перераспределение делает обработку информации в них более медленной и поверхностной.

Чтобы лучше понять логику этих рассуждений, обратимся к экспериментам Познера и Снайдера (Posner, Snyder 1975). Справа или слева от испытуемого предъявлялся сигнал, который мог быть либо зрительным, либо акустическим. В разных сериях измерялось время реакции определения модальности или положения сигнала. Перед каждой пробой испытуемый получал предварительную инструкцию, в которой сообщалось, какой сигнал будет предъявлен. В 80% случаев эта информация была верной, а в 20% — ложной. В контрольных условиях вместо предварительной инструкции предъявлялся случайный набор букв. Оказалось, что в задаче на пространственную локализацию верная инструкция

(80% случаев) приводила к «выигрышу» — ускорению ответов по сравнению с контролем, но ложная преднастройка (20% случаев) не сопровождалась «проигрышем»: время реакции оставалось таким же, как и в контрольном условии. В задаче на определение модальности (вижу или слышу независимо от локализации) был обнаружен как «выигрыш», так и «проигрыш». Это означает, что интермодальная пространственная локализация — автоматический процесс, который разворачивается независимо от намерений субъекта. Определение сенсорной модальности, которое часто считается чуть ли не первичным психическим актом, напротив, осуществляется при участии сознания и конкурирует с другими процессами.

В этой связи безусловный интерес представляет концепция Познера и Паттерсона (Posner, Petersen 1990), в которой рассматривается две системы внимания в мозгу:

1) передняя система, расположенная во фронтальных областях и связанная с когнитивным контролем и селекцией активности;

2) задняя система, расположенная в теменных и окципитальных областях, сочетающаяся с ориентировочным и сенсорным вниманием;

Передняя система внимания ответственна за формирование «внимания к действию» и участвует в семантических операциях, приводящих к выбору нужной реакции.

В качестве примера автоматического внимания можно привести эффект Струпа, который показывает, что обработка сенсорной и семантической информации может протекать параллельно и автоматически. Испытуемому предъявляются слова — названия цветов, написанные чернилами разного цвета. Его задача — называть цвет чернил. Устное выполнение задания замедляется, если название цвета и цвет чернил не совпадают, и ускоряется при их совпадении. Иными словами, семантическая информация обрабатывается независимо от установки, параллельно анализу сенсорных свойств стимула. Интерференция возникает не между процессами обработки сенсорной и семантической информации, а на этапе запуска исполнительской реакции: между речевой реакцией, которую требует задание, и импульсом, стимулирующим произвольное речевое воспроизведение прочитанного слова — названия цвета. При несовпадении одновременно инициируемых речевых реакций возникает задержка в исполнении.

Теория Шифрина и Шнейдера

Одну из первых попыток для теоретического разделения между контролируруемыми и автоматическими процессами предприняли Шифрин и Шнейдер (Shiffrin, Schneider 1977). Согласно этим авторам:

- контролируемые процессы являются ограниченными по мощности, требуют внимания, и могут использоваться гибко при изменении обстоятельств;
- автоматические процессы не страдают от ограничений мощности, не требуют внимания и с большим трудом модифицируются, когда осуществляется обучение.

Для обозначения автоматических и контролируемых процессов обработки эти авторы используют термины автоматическое обнаружение и контролируемый поиск.

Шифрин и Шнейдер использовали методику, объединяющую задачи зрительного поиска и поиска в памяти. Испытуемому последовательно с относительно высокой скоростью предъявлялись матрицы, содержащие от двух до четырех буквенно-цифровых стимулов. Он должен быстро решить, есть ли среди них хотя бы один символ из показанного ему ранее и удерживаемого в памяти положительного множества. Критическим различием было использование в качестве целевых и irrelevantных стимулов (дистракторов) символов

из разных или же из обеих категорий. Эти два условия назывались «постоянное соответствие» и «переменное соответствие». При «постоянном соответствии» на протяжении всей серии проб, целевыми стимулами всегда были буквы, а дистракторами — цифры. При «переменном соответствии» использовалась смесь чисел и консонантов, чтобы образовать запоминаемый ряд и обеспечить дистракторы на дисплее.

Обнаружились поразительные эффекты манипуляции. Число элементов в запоминаемом ряду и на дисплее сильно влияло на скорость принятия решения только в условии «переменного соответствия». Согласно Шифрин и Шнейдер (1977), контролируемый процесс поиска использовался только при «переменном соответствии». Он включал последовательное сравнение между каждым элементом в запоминаемом ряду и каждым элементом на дисплее до тех пор, пока не было сделано каждое сопоставление. В противоположность этому, выполнение эксперимента с «постоянным соответствием» вовлекает автоматические процессы, выполняемые независимо и параллельно. Согласно Шифрин и Шнейдер (1977), эти автоматические процессы развиваются как результат годов практики по различению букв и цифр.

Представление о том, что автоматические процессы развиваются с помощью практики, исследовалось Шифрином и Шнейдером. Они использовали «постоянное соответствие» от В до L, формирующими один ряд и буквами от Q до Z, формирующими другой ряд. Как и прежде, элементы из одного ряда всегда использовались в конструкции запоминаемого ряда, а дистракторы на дисплее все выбирались из другого ряда. Имелось большое улучшение выполнения на протяжении более чем 2100 проб, которое, по-видимому, отражало рост автоматических процессов.

Теоретический подход Шифрина и Шнейдера оказался очень важным. Однако, имело место загадочное расхождение между теорией и данными относительно идентификации автоматичности. Теоретическое предположение, что автоматические процессы происходят параллельно и не требуют ресурсов, означает, что имеется нулевой наклон (т.е. горизонтальная линия) в функции, связывающей скорость решения с количеством элементов в запоминаемом ряду и/или на дисплее, когда автоматические процессы используются.

Теория Норманна и Шаллиса

В 1980-х годах была предложена модель произвольного и автоматического контроля, которую разработали Дональд Норманн и Тим Шаллис (Norman, Shallice 1986). Модель дает несколько более дифференцированное описание процессов контроля, чем это предполагает двухуровневая модель Шифрина и Шнейдера. В этой модели проводилось различие между полностью автоматическими процессами и частично автоматическими процессами. Авторы идентифицировали три уровня функционирования:

- высший уровень образуют процессы произвольного (сознательного) контроля, осуществляемые системой «внимательного руководства» (supervisory attentional system — супервизорной системы внимания);
- полуавтоматические процессы, вовлекающие содержательные программы без преднамеренного направления или сознательного контроля. Содержательные программы используются, чтобы установить приоритеты и разрешить конфликты между процедурами третьего уровня;
- третий уровень представляет собой полностью автоматизированные процессы, контролируемые схемой (организованные планы).

Согласно Норманну и Шаллису (1986), полностью автоматизированный процесс происходит при очень слабом вовлечении сознательных активаций. Одним из источников данных для модели служат всевозможные ошибочные действия, часто возникающие при внезапных прерываниях текущей деятельности, таких как телефонные звонки. Такие автоматические процессы будут часто прерывать поведение, если остаются целиком в их собственных устройствах. Совершенно очевидно, что произвольное внимание представляет собой атрибут процессов контроля, необходимых для преодоления автоматических тенденций выполнения привычного, хорошо заученного действия.

Система внимательного руководства, которая образует центральный элемент данной модели, может быть охарактеризована с помощью следующего перечня условий деятельности:

- 1) выполняемое действие включает этапы принятия решения и планирования;
- 2) в процессе решения возникают непредвиденные трудности;
- 3) процессы решения являются новыми или плохо выученными;
- 4) задача представляется сложной или даже опасной;
- 5) решение предполагает преодоление очень сильного привычного ответа.

Теоретический подход Норманна и Шаллис (1986) включает весьма важное понятие о том, что существуют две отдельных контролирующих системы: содержательное программирование и суперзрительная система внимания. Это контрастирует с точкой зрения о том, что существует единственная контролирующая система. Подход Норманна и Шаллис кажется более предпочтительным, потому что он обеспечивает более естественное объяснение тому, что некоторые процессы, но не все, являются полностью автоматическими, в то время как другие частично автоматические. Другое преимущество этого теоретического подхода — это попытка идентифицировать основные функции системы суперзрительного внимания (например, конструирование новой схемы, модернизация новой схемы, мониторинг ошибок).

Корбетта и Шульман (Corbetta, Shulman 2002) наряду с Познером и Петерсенем, утверждают, что существует две главных системы внимания: произвольное или управляемое целью и непроизвольное, управляемое стимулом. Корбетта и Шульман рассматривают внимание, управляемое целью, как систему, функционирующую по принципу сверху-вниз (top-down) при селекции сенсорной информации. Внимание, управляемое стимулом, или система, функционирующая по принципу снизу-вверх (down-top), вовлекается в обнаружение существенных или заметных стимулов, находящихся вне зоны внимания. Согласно Корбетта и Шульман (2002), первая система состоит из задне-фронтально-теменных областей (рис. 5). В противоположность этому система, запускаемая стимулами, используется, когда предъявляются потенциально важные стимулы (например, огонь у порога вашей комнаты). Эта система состоит из правополушарных вентро-фронтально-теменных областей. Эти две системы взаимодействуют друг с другом, по крайней мере, для того, чтобы прервать действие первой системы, когда обнаруживаются значимые стимулы (рис. 5).

Во второй системе, несмотря на различие экспериментальных процедур, имеется существенное наложение активированных областей.

Рис. 5 показывает, что разные мозговые области активируются при переходе от одного к другому исследованию. Это, вероятно, отражает тот факт, что испытуемые используют разные процедуры. Они ожидают стимулы в данном месте в экспериментах Корбетта и Хорфингера, они ожидают разное направление движения у Шульмана, и они ожидают сложный комплексный зрительный указатель у Кастнера.

К концу двадцатого века все большее число исследователей пришло к выводу о том, что внимание необходимо рассматривать как многоуровневый процесс. Пришло понимание,

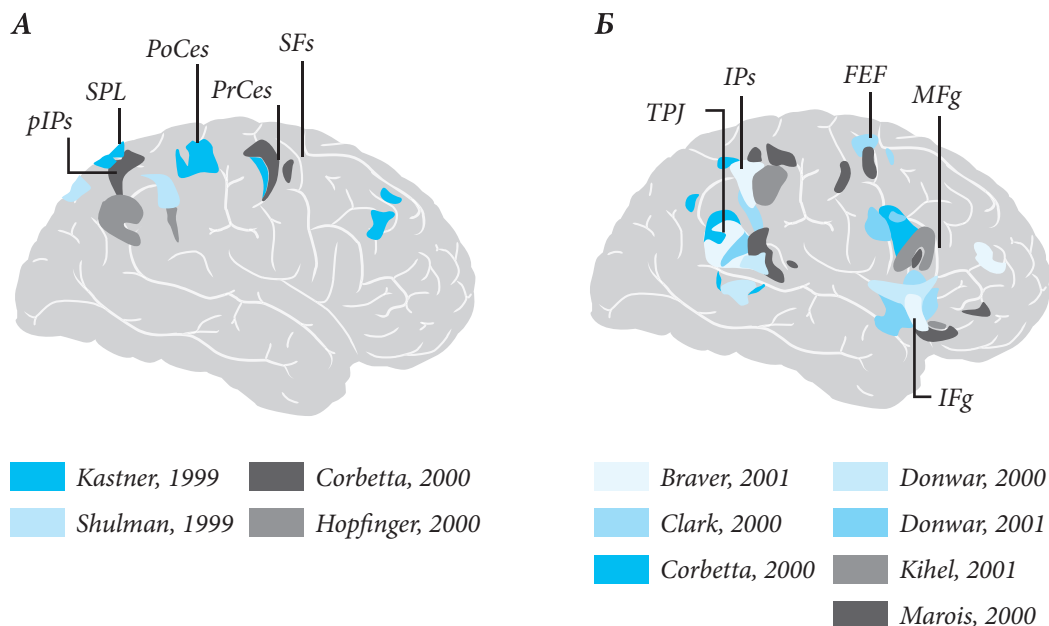


Рис. 5. А) Мозговые области, вовлеченные в систему внимания, управляемую целью. На рисунке представлены данные исследований, в которых испытуемые ожидали определенный зрительный стимул. Б) Мозговые области, вовлеченные в систему внимания, управляемую стимулом. При этом испытуемые детектируют редкие стимулы-мишени (Corbetta and Shulman, 2002).

что традиционная дихотомия сознательной и бессознательной обработки, используемая в двухуровневых моделях, явно недостаточна для описания внимания, как многоуровневого процесса. В этой связи безусловный интерес представляет развиваемая в последние годы Познером и его коллегами (Posner 2004) концепция, которая рассматривает три системы внимания в мозгу:

- 1) Возбуждения-бдительности (Alerting),
- 2) Ориентировки (Orienting),
- 3) Исполнительного контроля (Executive Control).

Первые две системы реализуют преимущественно автоматические операции. Система возбуждения-длительности отражает включение механизмов активации. При этом ориентировка понимается Познером как пространственный поиск и селекция стимульных областей для более глубокой обработки. Третья система работает по произвольному механизму, Познер связывает ее функции с оперативной памятью, преодолением конфликтов и исполнительным контролем.

Список литературы

- Солсо Р. Когнитивная психология. Санкт-Петербург, 2002, С.115
- Титченер Э.Б. Учебник психологии. Ч.1 и 2. СПб. 1914.
- Broadbent, D.E. Perception and communication. London: Pergamon Press. 1958.
- Broadbent, D.E., (1964) Gregory Stimulus set and response set: The alternation of attention. *Quartely Journal of Experimental Psychology*, 16, 309-317.
- Broadbent, D.E. Stimulus set and response set: Two kinds of selective attention In D. I. Mostofsky (Ed.) *Attention: Contemporary theories and analysis*. N.Y.: Appleton-Century-Crofts. 1970. P.51-60.
- Cavanagh, P. Attention routines and the Architecture of Selection. In: Posner M.I. (Ed.) *Cognitive Neuroscience of Attention*. N.Y., London, The Guilford Press. 2004. P. 13-28.
- Cherry, E.C. (1953) Some experiments on the recognition of speech with one and two ears. *Journal of the Acoustical Society of America*, 25, 975-979.
- Corbetta, M. & Shulman, G.I. (2002) Control of goal-directed and stimulus-driven attention in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, 3, 201-215.
- Corteen, R.S. & Wood, B. (1972) Autonomic responses to shock-associated words in an unattendent channel. *Journal of Experimental Psychology*, 94, 308-313.
- Deutsch, J. A. & Deutch, D. (1963) Attention: Some theoretical considerations. *Psychological Review*, 93, 283-321
- Gray, J. A. & Wedderburn, A.A. (1960) Grouping strategies with simultaneous stimuli. *Quartely Journal of Experimental Psychology*, 12, 180-184
- Hillyard, S.A. & Anllo-Vento, L. (1998) Event-related brain potentials in the study of visual selective attention. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95, 781-787
- James, W. Principles of psychology: Briefly course. N.Y.: Holt, 1890.
- Johnston, W. A. & Heinz, S.P. (1978) Flexibility and capacity demands of attention. *Journal of Experimental Psychology: General*, 107, 420-435.
- Kahneman, D. Attention and effort. Englewood Cliffs, N.Y.: Prentice Hall. 1973
- Moray, N. (1959) Attention in dichotic listening: Affective cues and the influence of instructions. *Quartely Journal of experimental Psychology*, II, 56-60.
- Neisser, U. Selective reading: A method for the study of visual attention: presented at the Nineteenth International Congress of Psychology. London. 1969
- Norman, D.A. (1968) Towards a theory of memory and attention. *Psychological Review*, 75, 522-536
- Norman, D.A. & Shallice, T. Attention to action: Willed and automatic control of behaviour. In R. I. Davidson, G.E. Schwartz, D. Shapiro (Eds.), 1986.
- Pashler, H. Attention. Hove, U. K.: Psychology Press, 1998.
- Posner, M. I. (Ed.) *Cognitive Neuroscience of Attention*. N.Y., London, The Guilford Press. 2004.
- Posner, M.I. & Petersen, S.E. (1990) The attention system of the human brain. *Annual Review of Neuroscience*, 13, 25-42.
- Posner, M. I. & Snyder, C.R.R. Attention and cognitive control. In: R.L. Solso (Ed.) *Information processing and cognition*. Potomac, MD: Erlbaum. 1975.
- Quinlan, P.T. (2003) Visual feature integration theory: Past, present, and future. *Psychological Bulletin*, 129, 643-673.
- Shiffrin, R.M. & Schneider, W. (1977) Controlled and automatic human information processing: II. Perceptual learning, automatic attending, and a general theory. *Psychological Review*, 84, 127-190.
- Treisman, A. M. (1964) Selective attention in man. *British Medical Bulletin*, 20, 12-16.
- Treisman, A. M. (1969) Strategies and models of selective attention. *Psychological Review*, 78, 282-299.

- Treisman, M. (1971) On the word frequency effect. Comments of the papers by J.Catlin and L. H.Nakatani. *Psychological Review*, 73, 420-425.
- Treisman, A. M. (1988) Features and objects: The fourteenth Barlett memorial lecture. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 40a, 589-593.
- Treisman, A. M. (1992) Spreading suppression or feature integration? A reply to Duncan and Humphreys. *Journal of experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 18, 589-593.
- Treisman, A. M. The perception of features and objects. In A.Baddeley and L.Weiskrantz (Eds.) *Attention: Selection, awareness, and control*. Oxford: Clarendon Press. 1993.
- Treisman, A. M. & Geffen, G. (1967, 1968) Selective attention and cerebral dominance In perceiving and responding to speech messages. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 19-20, 1-17, 139-151.
- Treisman, A. M. & Gelade, G. (1980) A feature integration theory of attention. *Cognitive Psychology*, 1297-1360.
- Treisman, A. M. & Riley, J.G.A. (1969) Is selective attention selective perception or selective response? A further test. *Journal of Experimental Psychology*, 79, 27-34.
- Treisman, A. M. & Sato, S. (1990) Conjunction search revisited. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 16, 459-478.
- Treisman, A. M. & Schmidt, H. (1982) Illusory conjunctions in the perception of objects. *Cognitive Psychology*, 14, 107-141.
- Waldorff, M.G., Gallen, C.C., Hampson, S.R., Hillyard, S.A. et. al. (1993) Modulations of early sensory processing in human auditory cortex during auditory selective attention. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 90, 8722-8726.

Неосознаваемое восприятие

В настоящее время уже не приходится сомневаться в значимости неосознаваемого восприятия в организации поведения человека. При этом в качестве критерия осознанности информации принимается (Симонов, 1987) возможность ее передачи другим членам сообщества посредством языка вообще или ее озвученной формы — речи, в частности.

В многочисленных исследованиях установлена возможность неосознаваемого восприятия поступающей информации. Еще в конце позапрошлого века были получены первые экспериментальные данные о наличии неосознаваемого восприятия (Sidis, 1898; цит. по Mericle et al., 2001). В опытах демонстрировали карточки с изображениями букв или цифр с расстояния, при котором испытуемые не могли дать отчет о характере зрительного стимула. Однако, при использовании метода принудительного выбора идентификация зрительного материала оказалась выше случайного уровня. В другом исследовании (Williams, 1938) на экран проецировался контур круга, треугольника или квадрата с подпороговым уровнем. Испытуемые знали о том, что проецируется одно из трех изображений, но даже в тех случаях, когда они вообще ничего не видели на экране, уровень правильного выбора был выше случайного. В аналогичных исследованиях установлено, что такие относительно простые стимулы как круги, треугольники, квадраты, буквы и цифры могут идентифицироваться на неосознаваемом уровне.

Среди физиологических исследований в первую очередь следует отметить результаты работ Г. В. Гершуни (1945–1950) показавшего (Гершуни, 1947) возможность возникновения условнорефлекторных вегетативных и ЭЭГ-реакций на звуковые стимулы подпороговой интенсивности. Наиболее значительными для разработки мозговых механизмов проблемы неосознаваемого восприятия явились работы Р. У. Сперри, получившего в 1981 году Нобелевскую премию «за открытия, касающиеся функциональной специализации полушарий головного мозга». Так, в ходе изучения особенностей восприятия у пациентов с перерезанными основными связями между полушариями, была показана неспособность человека дать словесный отчет об информации, поступающей из левой части поля зрения обоих глаз и, следовательно, адресованной правому полушарию. Однако, эти испытуемые могли использовать данную информацию в неречевых тестах, в частности, для организации правильных двигательных реакций. Например, предъявление карикатуры в левой части поля зрения обоих глаз (обуславливающее поступление зрительной информации у пациентов с перерезанным мозолистым телом в правое полушарие) может вызвать у человека смех. Следовательно, правое полушарие осуществило анализ зрительного изображения. Однако больной не может правильно объяснить причину смеха. И, напротив, предъявление карикатуры в правой части поля зрения (обуславливающее поступление зрительной информации у пациентов с перерезанным мозолистым телом в левое полушарие) не только приводило к возникновению смеха, но и к вербальному объяснению причин его возникновения. Таким образом была выявлена не только возможность неосознаваемого восприятия, но и особое значение левого и правого полушарий коры мозга в процессах обработки информации на осознанном и неосознаваемом уровнях соответственно.

Однако, при критическом анализе может возникнуть естественный вопрос о возможности перенесения данных, полученных на пациентах, подвергшихся операции по перерезке мозолистого тела, на здоровых людей. Поэтому представляется принципиальным, что с помощью разных методических подходов в разных научных центрах получены экспериментальные доказательства реальности феномена неосознаваемого восприятия у интактных здоровых испытуемых (см. Костандов, 1983, 2004; Смирнов и др. 1996). Более того, на здоровых людях установлена возможность отражения в суммарных электрических реакциях мозга анализа смысла слов, предъявленных на неосознаваемом уровне (Костандов, 1983).

О способах предъявления сенсорной информации для обеспечения ее восприятия на неосознаваемом уровне

К настоящему времени существуют разнообразные способы предъявления сенсорной информации для обеспечения ее восприятия на неосознаваемом уровне так же, как и методические приемы регистрации физиологических и поведенческих проявлений ее значимости. При исследовании неосознаваемого восприятия обычно неосознаваемость задается одним из двух способов. В первом случае она обуславливается созданием соответствующих условий стимуляции (подпороговый уровень стимулов, прямая и обратная маскировка стимулов, изменение временной структуры предъявляемых сигналов). Во втором неосознаваемость задается инструкцией испытуемым о соответствующем распределении внимания (например, при предъявлении зрительных сигналов, воздействующих на парафовеальные области сетчатки). Следует отметить, что, несмотря на дискуссию о преимуществах и недостатках методов самоотчета и принудительного выбора, в целом имеется соответствие полученных результатов. Использование метода принудительного выбора считается более консервативным (надежным в отношении доказательства), но по всей видимости менее чувствительным (Merikle, 2001).

Весьма значительное количество работ было проведено по опосредованному выявлению значимости неосознаваемого восприятия. В первой из них (Kunst-Wilson, Zajonc, 1980) испытуемым предъявляли 10 различных многоугольников в течение 1 мс по 5 раз. Затем уже с длительной экспозицией демонстрировали пару многоугольников, один из которых подавался до этого, а второй до этого не использовался. Испытуемые должны были ответить на два вопроса: какая из фигур уже встречалась до этого и какая из них больше нравится. Оказалось, что если ответы на первый вопрос носили случайный характер, то при ответе на второй вопрос выявлялось предпочтение того многоугольника, который предъявлялся ранее на неосознаваемом уровне. Начиная с 1980 года ряд публикаций различных авторов (Barchas, Perlaki, 1986; Bonano, Stillings, 1986; Bornstein et al., 1987; Mandler et al., 1987; Seamon et al., 1983a,b; Seamon et al., 1984) подтвердили эти данные.

В относительно недавних работах при использовании неосознаваемых (за счет малой длительности) зрительных стимулов показана возможность определения значения слов (Cheesman, Merikle, 1986; Merikle et al., 1995) и лицевой экспрессии эмоций (Esteves et al., 1994; Esteves, Ohman, 1993). С помощью метода функционального магнитного резонанса установлено, что предъявление на неосознаваемом уровне испуганного лица приводило к большей нейрональной активации в амигдале, чем при демонстрации счастливого лица (Whalen et al., 1998). При использовании метода позитронной эмиссионной томографии выявлено (Morris et al., 1998), что предъявляемые на неосознаваемом уровне изображения сердитых лиц, приводят к активации правой, но не левой амигдалы. К настоящему времени

влияние неосознаваемых зрительных стимулов выявлено и при осуществлении строгого объективного контроля их предъявления на подпороговом уровне (Marcel, 1974, 1983). Логика данных экспериментов основана на том, что испытуемые быстрее реагируют на осознаваемое слово (например, «доктор») после предъявления первого семантически связанного слова («санитарка»). При использовании зрительной «маски», которая обуславливает неосознаваемость первых слов, они, тем не менее, продолжают оказывать соответствующее влияние. Эти результаты были многократно воспроизведены (Balota, 1983; Dagenbach et al., 1989; Fowler et al., 1981; Greenwald et al., 1996; Kemp-Wheeler, Hill, 1988). Более того, аналогичные результаты были получены в случае принятия решения о значимости слова (McCauley et al., 1980) или картинки (Bar, Biederman, 1998) (при предъявлении на неосознаваемом уровне, за счет обратной зрительной маскировки, вместо первого слова соответствующей картинки). С помощью метода вызванных потенциалов и функционального магнитного резонанса обнаружено отражение неосознаваемого восприятия (Dehaene et al., 1998), не только в сенсорных структурах мозга, но также в тех, которые определяют моторное программирование.

Однако имеется ряд феноменов, связанных с неосознаваемым восприятием, которые на основе экспериментальных работ преимущественно отвергаются. Одним из таких феноменов является широко рекламируемая возможность использования аудиокассет для избавления от лишнего веса, избавления от алкоголизма, усиления сексуальных функций, обучения иностранным языкам и т. д. и т. п.

Исследования неосознаваемого восприятия на основе использования особенностей активного восприятия сенсорной информации (внимания)

Прежде чем перейти к анализу соответствующих данных о неосознаваемом восприятии, представляется необходимым отметить, что в настоящее время не подтверждается ранее широко распространенное мнение об участии специфических образований сенсорных систем в процессах активного выделения необходимой информации, основанное на представлениях о функции обратных (эфферентных, центрифугальных) путей в пределах соответствующей сенсорной системы. Так, сразу после установления факта уменьшения частоты фоновой импульсации нейронов по мере перехода от нижележащих уровней сенсорных систем к вышележащим, его стали рассматривать как свидетельство уменьшения объёма перерабатываемой информации, её селекции в сенсорных путях. Однако при несомненности самого феномена, по-видимому, обусловленного механизмом латерального торможения, подобная его трактовка неправомерна, поскольку кроме временного способа кодирования, характерного для первых уровней сенсорных систем, на верхних уровнях сохраняется топологический способ кодирования, реализующийся в многомерной упорядоченности расположения нейронов.

Весьма часто возможность прислушивания к мужскому или женскому голосу (так называемый эффект cocktail-party) объясняется нисходящими тормозными воздействиями оливо-кохлеарного пучка на вход слуховой системы. Однако отметим, что нисходящие пути в сенсорных системах, в том числе и оливо-кохлеарный пучок, отличает малочисленность аксонов и их широкое ветвление в тех образованиях, где они заканчиваются. Подобная особенность нисходящих связей по сравнению с восходящими свидетельствует о малой вероятности локального воздействия на определённые сенсорные каналы обработки и проведения информации. Нет и прямых физиологических доказательств причастности

центрифугальных путей к механизмам селекции сигналов в пределах слуховой системы. Более того, на животных и людях при условии контроля константности действующих сенсорных сигналов показано, что отвлечение или привлечение внимания к стимулу не влияет на амплитуду слуховых вызванных потенциалов, отражающих активность разных уровней ствола мозга. При несомненной убедительности данных о влиянии активации или выключения того или иного отдела сенсорной системы на деятельность нижележащих уровней, эти результаты указывают лишь на потенциальную важность нисходящих путей, но не могут рассматриваться в качестве доказательства их участия в процессах активного восприятия. Таким образом, по крайней мере, на нижних уровнях сенсорных систем не происходит выделения значимых сенсорных сигналов. В специфических образованиях сенсорных систем происходит описание всех сигналов, адекватных для активации рецепторов. Из этого следует принципиальный вывод, для рассматриваемых в данном обзоре вопросов, что мозг обрабатывает всю информацию, отраженную в активности соответствующих рецепторов, но не вся информация осознается.

При исследовании неосознаваемого восприятия широко используют способ привлечения внимания к определенному локальному участку поля зрения. Зрительные стимулы из других участков осознанно не воспринимаются. Следует отметить, что данная экспериментальная процедура является аналогом того, как неосознаваемые воздействия могут проявляться в естественных условиях. Имеются свидетельства, что данный способ эмоционального влияния на человека проявляется в произведениях живописи (Грюссер и др., 1995).

В работах с отвлечением внимания испытуемые должны фиксировать взор на определенном месте экрана (допустим, для определения отличий в длине горизонтальных и вертикальных отрезков в изображении креста). При предъявлении (Mack, Rock, 1998) креста сбоку, одновременно предъявляемое слово в центре дисплея осознанно не воспринималось, 60% испытуемых вообще отрицали наличие какого-либо другого стимула кроме креста. Тем не менее у 47 % этих испытуемых при принудительном выборе из 5 слов, выявлена достоверная идентификация соответствующего слова. В другом эксперименте при предъявлении какого-то слова (например, *flake*) на неосознаваемом уровне, испытуемые должны были достроить слово при последующей демонстрации на осознаваемом уровне первых трех букв (*fla*). У 36% испытуемых наблюдалось достраивание слова *flake*.

Для сравнительного анализа особенностей осознаваемого и неосознаваемого восприятия представляют интерес данные (Dabner, Jacoby, 1994). В их исследовании испытуемому предъявлялось на экране слово и, через 50 мс или 150 мс, «маска». После маскирующего воздействия предъявлялись первые три буквы из ранее экспонированного слова (*frigid*). От испытуемых требовалось дополнить эти три буквы (*fri*) до слова, отличающегося от слова *frigid*. При интервале в 150 мс испытуемые справлялись с данной задачей (например, буквы дополнялись до слов *fright*, *fringe*, *Friday*), при интервале 50 мс испытуемые, как правило, дополняли эти три буквы до слова *frigid*. Аналогичные результаты были получены и при условии привлечения или отвлечения внимания от предъявленного слова на одном из 180 дисплеев (Smith, Merikle, 1999). И в этом случае отвлечение или привлечение внимания к слову влияло противоположным образом. При отвлечении внимания у испытуемых возникали затруднения в следовании инструкции (не использовать предъявляемое ранее слово, до которого требовалось дописать три первых буквы). Исходя из аналогичных данных высказывается предположение о меньшей способности человека контролировать свои действия (большей выраженности их автоматизации) при неосознаваемом восприя-

тии. Предполагается, что в обычных условиях неосознаваемое восприятие стимула может обуславливать переключение внимания на него и таким образом переводить восприятие на осознаваемый уровень (Posner, Rothbart, 1992). И, наоборот, как отмечал еще Г.В.Гершуни (1947) «... изменение состояния внимания должно характеризоваться ... появлением суб-сенсорных реакций с тех афферентных систем, чувствительность которых понижается при перенесении внимания на раздражения, падающие на другой орган чувств».

Влияние неосознаваемого восприятия на произвольную деятельность человека

Выявление самой возможности неосознаваемого восприятия еще не предполагает эффективного влияния на поведение человека любой сенсорной информации описанной активностью нервных элементов сенсорных систем. Отсутствие учета этого обстоятельства приводило и до сих пор приводит к скептическим высказываниям относительно эффективности влияния на произвольную деятельность человека сенсорной информации воспринятой на неосознаваемом уровне.

Одним из многократно воспроизведенных исследований является работа Р.А. McCormick (1997). В ней в начале на осознаваемом или неосознаваемом уровне на экране слева или справа от точки фиксации взора предъявлялась некая метка, за которой через 500 мс предъявлялась одна из букв (Х или О). Перед испытуемым ставилась задача как можно быстрее определить какая из букв была на экране. При этом в 15 % метка и буква предъявлялись с одной и той же стороны от точки фиксации взора, а в 85 % случаях — с противоположных. В соответствии с данной вероятностью испытуемым предлагалось повысить эффективность выполнения задания за счет обращения внимания на противоположную сторону. При осознаваемом уровне предъявление метки испытуемые быстрее идентифицировали букву, когда она предъявлялась с противоположной стороны. Следовательно, наличие метки (при ее восприятии на осознаваемом уровне) способно переключать внимание на противоположную сторону. В том же случае, когда метка предъявлялась на неосознаваемом уровне, идентификация буквы осуществлялась быстрее когда метка и буква находились на одной стороне. Таким образом предъявление метки влияло на произвольное переключение внимания. В другой работе (Dunlap, 2000) показано влияние неосознаваемых элементов зрительного стимула на осознаваемое его восприятие в целом. В основе исследования лежала известная иллюзия Мюллер-Лайера (иллюзия стрелы) о восприятии отрезка с расходящимися концами с двух сторон как более длинного, по сравнению с таким же отрезком, но имеющим на концах сходящиеся линии. Показано, что предъявление на неосознаваемом уровне сходящихся или расходящихся концов, предопределяло суждение о большей или меньшей длине осознаваемого отрезка линии.

Основное, от чего зависит эффективность влияния сенсорных стимулов, не осознаваемых человеком — биологическая, социальная значимость этих стимулов. Поэтому еще до рассмотрения способов предъявления сенсорных сигналов, предопределяющих их принципиальную неосознаваемость, представляется целесообразным рассмотреть причины, обуславливающие наличие или возникновение у тех или иных сигналов соответствующей значимости.

В самом общем виде значимость сенсорных стимулов может формироваться: 1) на основе обуславливания с помощью того или иного подкрепления или 2) на основе таких форм обучения как импринтинг, имитация, предопределяющих возникновение набора зна-

чимых (позитивных и негативных по эмоциональному воздействию) видоспецифических сигналов.

При обусловливании основным фактором является наличие потребности, ибо сегодня под подкреплением понимается снятие, удовлетворение той или иной потребности. Экспериментальное определение наличия тех или иных потребностей может осуществляться исходя из критерия возможности формирования на их основе новых приспособительных поведенческих актов. В соответствии с этим очевидным представляется наличие витальных и зоосоциальных потребностей, направленных на выживание индивидуума и вида соответственно. К числу первых относятся например пищевая и питьевая потребности, на базе которых может осуществляться выработка пищевых и питьевых условных рефлексов. На основе зоосоциальных потребностей формируются такие формы поведения как половое, материнское, территориальное и ряд других. Особого внимания заслуживает выделение и так называемых потребностей саморазвития, на базе которых формируется игровое и исследовательское поведение (см. Симонов, 1987). Доказательством наличия потребностей саморазвития, в соответствии с вышеизложенным, являются данные о формировании новых условнорефлекторных реакций, в тех случаях когда подкреплением является не некое лакомство, а возможность проводить исследовательскую деятельность. При этом существенным представляется то обстоятельство, что ассоциация между нейтральным стимулом и значимым может возникать при однократном сочетании. Это проявляется при наличии у людей и животных так называемого доминантного состояния, когда значимый стимул соответствует какой-либо господствующей потребности. Естественно, что исходить из одновременного наличия у соответствующих групп людей тех или иных потребностей не приходится. Достаточно указать, что возникшие сомнения в эффективности феномена 25-го кадра были обусловлены отсутствием учета фактора значимости предъявляемого воздействия. Так в случае использования данного феномена в рекламе напитков эффективность определяется наличием жажды у людей и т. п.

Следует отметить возможность формирования значимости неосознаваемых воздействий на основе процедуры обусловливания при использовании условнорефлекторных ассоциаций второго порядка. В этом случае исходно относительно нейтральные сенсорные сигналы сочетаются со значимыми воздействиями, и приобретают значимость, что в дальнейшем может быть использовано в исследованиях неосознаваемого восприятия. Существенно, что подобное подкрепление на неосознаваемом уровне оказывается более эффективным по сравнению с аналогичным воздействием на осознаваемом уровне. Понятно, что и само по себе предъявление видоспецифических сигналов способно влиять на эмоциональное состояние человека.

В соответствии с вышеизложенным для разработки проблемы неосознаваемого восприятия представляется необходимым рассмотреть известные формы видоспецифических сигналов и способы их предъявления на неосознаваемом уровне. Существенным является и вопрос об объективных способах выявления влияния неосознаваемых сенсорных воздействий на поведение человека.

Анализируя значимость видоспецифических воздействий, приобретающих соответствующую значимость в ходе индивидуального пре- и постнатального развития на основе таких форм обучения как импринтинг и имитация следует отметить, что сегодня нет экспериментальных доказательств отсутствия у ряда видоспецифических биологически значимых воздействий врожденных, генетически обусловленных характеристик. В плане рассмотрения значимых видоспецифических воздействий уже сегодня, основываясь на эксперименталь-

ных данных, полученных в разных научных центрах, можно выделить следующие: 1) видоспецифические характеристики лица и голоса новорожденных и взрослых людей находящихся в разных функциональных состояниях; 2) временные характеристики сенсорных воздействий, исходя из экспериментально выявленных особенностей воздействия потешек и колыбельных; 3) воздействия на эмоциональное состояние испытуемых при восприятии гласных и согласных (см. следующий параграф); 4) мажорные и минорные особенности акустических воздействий; 5) значимость частотности предъявления нейтральных стимулов на неосознаваемом уровне для увеличения их привлекательности.

Последний пункт требует специального комментария. С одной стороны имеется ряд результатов, полученных разными авторами (см. Erley et al., 1999), свидетельствующих в пользу данного тезиса. Так, первоначально многократно предъявляемые на неосознаваемом уровне воздействия (фотографии лиц, слова, геометрические фигуры и т. п.) оказывали достоверное влияние на предпочтение тех или иных осознаваемых воздействий. Однако, не понятны причины, обуславливающие увеличение степени привлекательности стимулов лишь за счет увеличения частотности их воздействий.

Неосознаваемое влияние на эмоциональное состояние человека и проблема фоносимволизма

У людей при восприятии гласных и согласных речи выявлены устойчивые ощущения незвукового свойства — феномен звуко-, или фоносимволизма. Теория звуко-символизма имеет длительную историю. Идея о связи звука и смысла восходит к древности, и соображения о соответствии звучания и значения высказывались еще со времен античности, а на интуитивном уровне использовались в поэзии (см. Журавлев, 1974). Постановку проблемы фоносимволизма в науке связывают с работами лингвистов 20-х гг. прошлого столетия (О. Йеспersen, Э. Сепир, С. Ньюмен). Объективные лингвистические и, позднее, психолингвистические методы позволили провести экспериментальную проверку и доказать существование феномена на материале разных языков.

Последовавшие за этим работы подтвердили правомерность термина «символизм» применительно к гласным и согласным фонемам — звукобуквам, но не к соответствующим звукам. Наиболее многочисленными являются исследования гласных, у которых, по мнению Р. Якобсона, он выражен в наибольшей степени. Проблема фоносимволизма носит междисциплинарный характер. Значительный объем доказательств базируется на данных фоностатистического анализа. В рамках одного языка исследуется сходство состава между группами слов, обозначающих сходные ощущения или имеющих сходное значение, необъяснимое с позиций принципов ортодоксальной этимологии. Психолингвистический подход предполагает исследование способности аудиторов с высокой степенью вероятности определять смысл предложенных им «псевдослов» или слов незнакомого языка. Традиционным является метод семантически противоположных пар (СПП), или метод семантического дифференциала, предложенный Ч. Огстудом (1952). Сущность его заключается в том, что испытуемые оценивают сигнал по N-балльной шкале по ряду признаков. Каждый из признаков задается парой антонимов — слов противоположного содержания («плохой — хороший», «медленный — быстрый» и т. д.). Набор признаков, используемых в методе СПП, произволен, однако уже на основе первых проведенных исследований и результатах обработки данных с применением факторного анализа Ч. Огстудом (1957) было высказано предположение, что независимо от модальности оцениваемых признаков, семантически противоположные

пары могут быть разделены на три группы. По мнению автора, это связано с некими общими первичными признаками, содержащимися в антонимах. Он выделяет фактор общей оценки («плохой — хороший», «красивый — безобразный» и т. д.), фактор активности («медленный — быстрый», «молчаливый — шумный») и фактор силы («высокий — низкий», «большой — маленький»). До настоящего времени эти шкалы — общей оценки, активности и силы — остаются базовыми при исследованиях фоносемантизма методом СПП.

В рамках изучения проблемы семантики звуков проводится и исследование эмоционального значения фонетических стимулов. При этом, подобно проблеме становления речи, дискуссия разделила исследователей на два лагеря, в соответствии с их взглядами на проблему <nature versus nurture> — <врожденное — приобретенное>. Одни (Ф. Соссюр, Б. Скиннер, Н. Хомский) настаивали на условности и произвольности языковых символов, а, следовательно, на приобретенности соответствия звука и смысла (исключение составляют звукоподражательные названия — ономотопеи). Другие (О. Йеспersen, Э. Сепир, Р. Якобсон и их последователи) — усматривали истоки фоносемантизма в экспрессивных природных свойствах звуков.

Вопрос о том, может ли экспрессивное значение в речи выражаться не только при помощи средств речевой динамики (ударения, тона, длительности), но и при помощи собственно фонетических средств в обычном понимании, или могут ли те или иные различия гласных и согласных ощущаться как наделенные семантическим значением вне всякой связи с теми конкретными ассоциациями, которые имеют эти гласные и согласные в составе значимых слов — поставлен в одной из первых экспериментальных работ Э. Сепира (1929/1993). Там же автор дает ответ: «как представляется, полученные к настоящему времени результаты довольно убедительно свидетельствуют о реальности подобных ощущений, чем бы они ни были вызваны» (с. 324) и далее — «мы действительно имеем дело с достаточно независимым психологическим фактором, который — в силу отсутствия лучшего термина — может быть назван «фонетическим семантизмом» (Сепир, 1929/1993, с. 330).

Наиболее подробно исследован фоносемантизм по шкале размера. При этом универсальность оценок наиболее четко, как психолингвистическими, так и фоностатистическими методами, прослеживается для гласных. Этому соответствуют данные по звукобуквам гласных русского языка (Левицкий, 1973; Журавлев, 1974, 1981). В целом имеющиеся к настоящему времени данные свидетельствуют в пользу универсальности семантики звукобукв гласных по шкале размера.

Исследования по шкале общей оценки тесно смыкаются с исследованиями эмоционального звукосемантизма. В работах такого плана исследуется частотность фонем и строятся «фоноэмоциональные профили» литературных произведений разных жанров (поэзия, проза) и разной направленности (детская литература, «женские романы», «мужские романы»). (Журавлев, 1974, Whissell, 1989, 1999, 2000, 2003). Данные, полученные на значительном объеме фонетического материала как в пределах одного языка, так и в кросслингвистических исследованиях, позволяют сделать вывод о присутствии универсального компонента и этого вида звуковой семантики.

В целом имеющиеся к настоящему времени данные подтвердили наличие двух факторов, обуславливающих семантику звукобукв — языковой, или национальный («языковая привычка» согласно И. Тейлор, 1963), и межъязыковой, или универсальный. Именно «языковой привычкой», в широком смысле слова — фонологической системой конкретного языка, могут быть объяснены различия результатов в случае использования шкалы оценки в разных языках, а также при оценке звуков иностранного языка, поскольку звуки, наиболее ча-

стые для данного языка, как правило, имеют более высокую оценку, чем звуки редкие. Природа универсального фоновимболизма остается невыясненной, хотя в качестве факторов, обуславливающих его, предлагается несколько гипотез.

Основная группа предположений заключается в допущении, что в основе «природных» экспрессивных свойств звука лежат их физические (акустические и артикуляционные) свойства. В этом русле рассматриваются различия в характере артикуляции, в частотных характеристиках и врожденных истоках вокализаций, во взаимодействии лицевой экспрессии и звукопродукции (Whissell, 1999, 2003). Эти объяснения носят спекулятивный характер и нуждаются в экспериментальной проверке. Большинство их относится к данным по шкале размера (силы) и оценке «приятный — неприятный». Так, согласно «кинестетическим» объяснениям (Sapir, 1929/1993; Newman, 1933; Orr, 1944), в основе феномена звуко-символизма лежит способность человека соотносить с ощущением величины положение речевых органов, размеры ротовой полости, мышечное напряжение, положение языка и т. д. Например, предполагают, что способ артикуляции может быть субъективно более или менее приятен, и это отражается в эмоциональной оценке стимула: гласные верхнего подъема, как и переднего ряда, более приятны, чем нижнего подъема и заднего ряда (Tsur, 1992).

Объяснения в рамках гипотезы «частотного кода» (Ohala, 1983) усматривают взаимосвязь оценки звуков со значениями формант или их отношениями. Эти же характеристики проанализированы и в отношении результатов «эмоционального» шкалирования в английском языке, однако, эта гипотеза, тем не менее, не в состоянии объяснить имеющиеся данные. Возможной причиной такого несоответствия может являться не только разная значимость шкал, но и методическая ограниченность исследований. Дело в том, что хотя теоретически способ предъявления стимульного материала может быть как звуковым, так и графическим, практически все работы построены на предъявлении графических изображений («графонах» — в применении к отдельным фонемам). Работы, в которых стимулы предъявляются только акустически, единичны (Fitch, 1986). Сложность такого подхода очевидна — наличие нефонетических ключей (высота тона, интонация, длительность) определяет возможность их влияния на оценку. Прямой перенос данных, полученных при предъявлении графонов на естественные звуки, оказывается неправомерным, о чем свидетельствуют наши предварительные данные: сходные по фонетической принадлежности и значениям двух формант гласные могут иметь разные оценки по эмоциональным шкалам.

В целом, вопрос о том, зависит ли эмоциональная характеристика ассоциаций от свойств самого звука и/или от способа звукопродукции остается открытым. Аналогичным образом, остается не выясненной роль спектральных составляющих звука в оценке его фонетического значения, поскольку гипотеза «частотного кода» построена на сопоставлении оценок звукобукв с данными о неких усредненных акустических характеристиках звука.

Список литературы

- Гершуни Г. В. (1974) Изучение субсенсорных реакций при деятельности органов чувств. Физиолог. журн. СССР, 33, №4, 393–412
- Грюссер Ш.-Й., Зельке Т., Цинда Б., Функциональная асимметрия мозга и ее значение для искусства, эстетического восприятия и художественного творчества. В кн. Красота и мозг, М., Мир, 1995, 265–299.
- Журавлев А. П. (1974) Фонетическое значение, Л., ЛГУ, 160 с
- Журавлев А. П. (1981) Звук и смысл. М. «Просвещение». 160 с.

- Костандов Э. А., Функциональная асимметрия полушарий головного мозга и неосознаваемое восприятие. М. Наука, 1983, 171 с.
- Костандов Э. А., Психофизиология сознания и бессознательного. СПб., Питер, 2004, 167 с.
- Левицкий В. В. (1973) Семантика и фонетика. Черновцы. 102 с.
- Симонов П. В., Мотивированный мозг. М. Мир, 1987, 237 с.
- Смирнов И., Безносюк Е., Журавлев А., Психотехнологии, М., Прогресс, 1995, 416 с.
- Adams, J. K. (1957) Laboratory studies of behavior without awareness. *Psychological Bulletin*, 54, 383-405.
- Assad, J. (1999) Now you see it: frontal eye field responses to invisible stimuli. *Nature Neuroscience*, 2, 205-206.
- Baker, L.E. (1937) The influence of subliminal stimuli on verbal behavior. *Journal of Experimental Psychology*, 20, 84-100.
- Balota, D.A. (1983) Automatic semantic activation and episodic memory. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, 22, 88-104.
- Bar, M. & Biederman, I. (1998) Subliminal visual priming. *Psychological Science*, 9, 464-469.
- Chalmers, D.J. (1996) *The conscious mind*. New York: Oxford University Press.
- Cheesman, I. & Merikle, P.M. (1986) Distinguishing conscious from unconscious perceptual processes. *Canadian Journal of Psychology*, 40, 343-367.
- Chomsky, N. (1966) *Language and mind*. N-Y: Harcourt, Brace & World.
- Dagenbach, D., Carr, T.H. & Wilhelmson, A. (1989) Task-induced strategies and near-threshold priming: conscious influences on unconscious perception. *Journal of Memory and Language*, 28, 412-443.
- Danziger, S., Kingstone, A. & Rafal, R.D. (1998) Orienting to extinguished signals in hemispatial neglect. *Psychological Science*, 9, 119-123.
- Debner, J. A. & Jacoby, L. L. (1994) Unconscious perception: attention, awareness, and control. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory and Cognition*, 20, 304-317.
- Dehaene, S., Naccache, L., Le Clec' H.G., Koechlin, E., Mueller, M., Dehaene-Lambertz, G., van de Moortele, P.-F. & Le Bihan, D. (1998) Imaging unconscious semantic priming. *Nature*, 395, 597-600.
- Dunlap, K. (1900) The effect of imperceptible shadows on the judgment of distance. *Psychological Review*, 7, 435-453.
- Epley N., Savitsky K. & Kacheliski R., (1999) What every skeptic should know about subliminal persuasion. *Skeptical inquirer*, Sep.-Oct., 40-58
- Eriksen, C. W. (1960) Discrimination and learning without awareness: a methodological survey and evaluation. *Psychological Review*, 67, 279-300.
- Esteves, F. Ö, Dimberg, U., & Öhman, A. (1994) Automatically elicited fear: conditioned skin conductance responses to masked facial expressions. *Cognition and Emotion*, 8, 393-413.
- Esteves, F. & Öhman, A. (1993) Masking the face: recognition of emotional facial expressions as a function of the parameters of backward masking. *Scandinavian Journal of Psychology*, 34, 1-18.
- Fitch, W. T. S. III (1986) *Vocal tract length perception and the evolution of language*. Brown Univ. Press. 95 p.
- Forster, K. I. & Davis, C. (1984) Repetition priming and frequency attenuation in lexical access. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory, and Cognition*, 10, 680-698.
- Forster, K. I. & Veres, C. (1998) The prime lexicality effect: form-priming as a function of prime awareness, lexical status, and discrimination difficulty. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory and Cognition*, 24, 498-514.
- Fowler, C. A., Wolford, G., Slade, R. & Tassinari, L. (1981) Lexical access with and without awareness. *Journal of Experimental Psychology: General*, 110, 341-362.
- Greenwald, A. G., Draine, S. C. & Abrams, R. L. (1996) Three cognitive markers of unconscious semantic activation. *Science*, 273, 1699-1702.

- Holender, D. (1986) Semantic activation without conscious identification in dichotic listening, parafoveal vision, and visual masking: a survey and appraisal. *Behavioral and Brain Sciences*, 9, 1-23.
- Jakobson, R. *Six lectures on sound and meaning*. 1937/1978. Cambridge, Mass: MIT Press.
- Jacoby, L. L. & Whitehouse, K. (1989) An illusion of memory: false recognition influenced by unconscious perception. *Journal of Experimental Psychology: General*, 118, 126-135.
- Jespersen, O. (1933) Symbolic value of the vowel I/. In: Jespersen O. (Ed.) *Linguistica*, pp. 283-303. Copenhagen: Levin and Munksgaard..
- Johnson, W. A. & Dark, V.J. (1986) Selective attention. *Annual Review of Psychology*, 37, 43-75.
- Kemp-Wheeler, S.M. & Hill, A.B. (1988) Semantic priming without awareness: some methodological considerations and replications. *Quarterly Journal of Experimental Psychology*, 40A, 671-692.
- Mack, A. & Rock, I. (1998) *Inattention blindness*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Marcel, A.J. (1974) Perception with and without awareness. Paper presented at the meeting of the Experimental Psychology Society, Stirling, Scotland.
- Marcel, A. J. (1980) Conscious and preconscious recognition of polysemous words: locating the selective effects of prior verbal context. In R. S. Nickerson, *Attention and performance* (Vol. VIII, pp. 435-457). Hillsdale, NJ: Erlbaum.
- Merikle P.M., Smilek D. & Eastwood J.D., Perception without awareness: perspectives from cognitive psychology, *Cognition*, 2001, 79, 115-134
- Marcel, A. J. (1983) Conscious and unconscious perception: experiments on visual masking and word recognition. *Cognitive Psychology*, 15, 197-237.
- Mattingley, J.B., Bradshaw, J.L. & Bradshaw, J.A. (1995) The effects of unilateral visuospatial neglect on perception of Müller-Lyer illusory figures. *Perception*, 24, 415-433.
- McCauley, C., Parmelee, C.M., Sperber, C.D. & Carr, T.H. (1980) Early extraction of meaning from pictures and its relation to conscious identification. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 6, 265-276.
- McCormick, P.A. (1997) Orienting attention without awareness. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 23, 168-180.
- Merikle, P. M. (1984) Toward a definition of awareness. *Bulletin of the Psychonomic Society*, 22, 449-450.
- Merikle, P. M. (1992) Perception without awareness: critical issues. *American Psychologist*, 47, 792-795.
- Merikle, P. M. & Daneman, M. (2000) Conscious vs. unconscious perception. In: M.S. Gazzaniga (Ed.), *The new cognitive neurosciences* (2nd ed., pp. 1295-1303). Cambridge, MA: MIT Press.
- Merikle, P.M. & Joordens, S. (1997a) Measuring unconscious influences. In: J. D. Cohen, & J.W. Schooler (Eds.), *Scientific approaches to consciousness* (pp. 109-123). Mahwah, NJ: Erlbaum.
- Merikle, P. M. & Joordens, S. (1997b) Parallels between perception without attention and perception without awareness. *Consciousness and Cognition*, 6, 219-236.
- Merikle, P.M., Joordens, S. & Stolz, J. A. (1995) Measuring the relative magnitude of unconscious influences. *Consciousness and Cognition*, 4, 422-439.
- Merikle, P. M. & Reingold, E. M. (1998) On demonstrating unconscious perception. *Journal of Experimental Psychology: General*, 127, 304-310.
- Meyer, D. E. & Schvaneveldt, R. W. (1976). Meaning, memory structure, and mental processes. *Science*, 192, 27-33.
- Miller, J.G. (1942) *Unconsciousness*. New York: Wiley.
- Moore, C.M. & Egeth, H. (1997) Perception without attention: evidence of grouping under conditions of inattention. *Journal of Experimental Psychology: Human Perception and Performance*, 23, 339-352.
- Morris, J.S., Öhman, A. & Dolan, R.J. (1998) Conscious and unconscious emotional learning in the human amygdala. *Nature*, 393, 467-470.

- Murphy, S.T. & Zajonc, R.B. (1993) Affect, cognition, and awareness: affective priming with optimal and suboptimal stimulus exposures. *Journal of Personality and Social Psychology*, 64, 723-739.
- Newman, S. S. (1933) Further experiments in phonetic symbolism. *Amer. Journ. Psychol.* 45, 53-75.
- Ohala, J. J. (1983) Cross-language use of pitch: an ethological view. *Phonetica*, 40, 1-18.
- Orr, J. (1944) On some sound values in English. / *Brit Journ of psychol.* 35, 1-8. (цит. по: Fitch, 1986)
- Osgood, C. E. (1952) The nature and measurement of meaning. *Psychological Bulletin*, 49, 197-232.
- Osgood, C. E., Suci, G. J. & Tannenbaum P.H. (1957) The measurement of meaning. Univ. Illinois Press, Urbana, 342p.
- Posner, M. I. & Rothbart, M. K. (1992) Attentional mechanisms and conscious experience. In: A.D. Milner & M. D. Rugg (Eds.), *The neuropsychology of consciousness* (pp. 91-111). London: Academic Press.
- Reingold, E. M. & Merikle, P.M. (1990) On the inter-relatedness of theory and measurement in the study of unconscious processes. *Mind & Language*, 5, 9-28.
- Sapir, E. (1929) A study in phonetic symbolism. / *Journ of Exper. Psychol.* 12, N3, 225-239. Русск. пер.: Сепир Э. Об одном исследовании в области фонетического символизма. / Сепир Э. Избранные труды по языкознанию и культурологии. М., «Прогресс» 1993, с. 323-335.
- Saussure, F. (1916) *Course in general linguistics*. N-Y: McGraw-Hill.
- Searle, J. R. (1992) *The rediscovery of the mind*. Cambridge, MA: MIT Press.
- Sidis, B. (1898) *The psychology of suggestion*. New York: D. Appleton.
- Skinner, B. F. *About behaviorism*. N-Y: Knopf.
- Smith, S. D. & Merikle, P.M. (1999, June) Assessing the duration of memory for information perceived without awareness. Poster presented at the 3rd annual meeting of the Association for the Scientific Study of Consciousness, London, Canada.
- Snodgrass, M., Shevrin, H. & Kopka, M. (1993) The mediation of intentional judgments by unconscious perception: the influence of task reference, word meaning, and motivation. *Consciousness and Cognition*, 2, 169-193.
- Stroh, M., Shaw, A. M. & Washburn, M. F. (1908) A study of guessing. *American Journal of Psychology*, 19, 243-245.
- Taylor, I. K. (1963) Phonetic symbolism re-examined. *Psychological Bulletin*, 60 (2), 200-209.
- Tsur, R. (1992) *What makes sound patterns expressive? The poetic mode of speech perception*. Durham, NC: Duke Univer. Press.
- Whalen, P.J., Rauch, S.L., Etcoff, N.L., McInerney, S.C., Lee, M.B. & Jenike, M.A. (1998) Masked presentations of emotional facial expressions modulate amygdala activity without explicit knowledge, *Journal of Neuroscience*, 18, 411-418.
- Whissell, C. M. (1989) The dictionary of affect in language. / In: *Emotion. Theory, reseach, and experience*. Vol. 4. Chapter 5, 113-129, Acad. Press, Inc.
- Whissell, C. M. (1999) Phonosymbolism and the emotional nature of sounds: evidence of the preferential use of particular phonemes in texts of differing emotional tone. / *Percept. and motor skills*. 89, 19-48.
- Whissell, C. M. (2000) Phonemoemotional profiling: a description of the emotional flavour of English texts on the basis of the phonemes employed in them. *Percept. and motor skills*. 91, 617-648.
- Whissell, C. M. (2003) The emotional symbolism of two English E-sounds: /i/ as in "cheap" is pleasant and /I/ as in "chip" active. / *Percept. And motor skills*. 96, 149-165.
- Williams Jr., A. C. (1938) Perception of subliminal visual stimuli. *Journal of Psychology*, 6, 187-199.

Автоматизм и параллелизм ранних этапов обработки речевой информации мозгом: нейрофизиологические данные на основе негативности рассогласования

Обрабатывает ли наш мозг лингвистическую информацию различных типов одновременно или в определенном порядке? Требуется ли для этого наше внимание к речи или какие-то этапы ее обработки могут происходить автоматически? Как в психолингвистике, так и в психофизиологии нет однозначного ответа на эти вопросы. В настоящем обзоре мы рассмотрим ряд недавних исследований обработки речи мозгом человека, в которых использовалась т. н. негативность рассогласования (НР). Они показали, что, даже в условиях отсутствия внимания, характеристики этого мозгового отклика отражают физиологическую активацию следовых процессов памяти, связанных с различными элементами языка. Знакомые звуки родного языка вызывают более выраженную активацию, чем незнакомые; на более содержательном уровне, слова приводят к большей активации, чем бессмысленные словоподобные сочетания. Даже в отсутствие внимания к ним, такие словесные раздражители вызывают четкую последовательность активации коры головного мозга, которая начинается с верхних височных областей, а затем быстро распространяется в нижние фронтальные отделы левого полушария. Различные пространственно-временные паттерны такой корковой активности зависят от лексических и семантических свойств речевых стимулов, предоставляя таким образом разнообразные данные о конфигурации кодирующих такую информацию объединениях нервных клеток коры. На уровне более крупных высказываний возможна регистрация НР, отражающей соответствие предъявляемых сочетаний слов грамматическим правилам и семантическому контексту. Этот непрерывно пополняющийся комплекс данных указывает на то, что самые ранние этапы фонологической, лексической, семантической и синтаксической обработки речи центральной нервной системой могут происходить автоматическим образом вне фокуса внимания. Анализ таких независимых от внимания откликов на языковые стимулы показывает, что доступ к разнообразной лингвистической информации происходит в мозге достаточно быстро (в течение ~200 миллисекунд) и носит практически одновременный, а возможно и параллельный характер.

Введение

Традиционные психолингвистические модели восприятия языка (Morton, 1969; Fromkin, 1973; Garrett, 1980; Dell, 1986; MacKay, 1987), находящие отражение и в разнообразных современных подходах к пониманию и производству речи (Levelt et al., 1999; Norris et al., 2000), различают несколько задействованных в этом процессе типов информации. Несмотря на обилие различий между этими теориями, они в целом соглашаются друг с другом в существовании: (1) уровня фонологической обработки, на котором (после примитивного акустического анализа) анализируются фонетические и фонологические характеристики зву-

ков речи, (2) лексической обработки, иногда в виде концепции поиска информации в т.н. «ментальном лексиконе», т.е. своеобразном мысленном словаре, (3) семантической обработки, которая имеет отношение к восприятию конкретного смысла услышанного слова, (4) и наконец, синтаксического уровня, на котором идет анализ грамматической информации, обеспечивающей связь между словами в предложениях. В зависимости от конкретной теории, эти «модули» иногда объединяются, опускаются или увеличиваются в количестве. Однако, главный камень преткновения в современной психолингвистике заключается не в этом, а в разногласиях между моделями, предполагающими последовательный характер обработки этой информации, с одной стороны, и моделями, считающими, что все эти процессы происходят либо полностью параллельно, либо приблизительно одновременно, с другой. Этот вопрос может быть потенциально разрешен при помощи нейрофизиологии, которая, используя такие инструменты как электроэнцефалография (ЭЭГ) или магнитоэнцефалография (МЭГ), способна неинвазивно отслеживать мозговые процессы с большой временной точностью и регистрировать миллисекундные различия между ними.

Нейрофизиологические эксперименты, действительно, сыграли заметную роль в этих дебатах. Разнообразные исследования, проведенные с использованием различного лингвистического материала, сформировали уже устоявшийся взгляд на последовательный характер различных лингвистических процессов в мозге. После вычленения мозгом примитивных акустических характеристик из звукового сигнала (уже через 20–50 мсек после начала стимуляции, напр., Krumbholz et al., 2003; Lutkenhoner et al., 2003), фонологический характер экспериментальных задач, как оказалось, способен изменять нервную деятельность только в диапазоне 100–200 мсек (Roepel et al., 1996; Obleser et al., 2004). Обработка информации более «высокого» уровня, согласно некоторым исследованиям, требует от человеческого мозга значительно большего времени — компонент вызванных потенциалов под названием N400, имеющий свой максимум в диапазоне около 400 мсек после зрительного предъявления словесного стимула (Kutas & Hillyard, 1980), обычно считается индексом семантических процессов. Иногда дополнительно выделяется его более ранний (350 мсек) субкомпонент, который, как предполагается, имеет отношение к лексическому доступу (Bentin et al., 1999; Embick et al., 2001; Pyllkanen et al., 2002; Stockall et al., 2004), что, кроме всего прочего, способствуют в целом спорному различению лексического и семантического уровней обработки. В случае синтаксических процессов, ситуация еще более усложняется. С латентностью около 100 мсек регистрируется т.н. ранняя левая фронтальная негативность (ELAN, early left anterior negativity), которая увеличивается в ответ на некоторые грамматические нарушения в предъявляемых предложениях (Neville et al., 1991; Friederici et al., 1993). Дополнительно, в ответ на синтаксический материал регистрируются более поздние (>250 мсек) отклики, имеющие негативную полярность во фронтальных областях (Münte et al., 1998; Gunter et al., 2000). И наконец, одним из наиболее заметных синтаксических откликов является P600, поздний сдвиг вызванного потенциала, достигающий своей максимальной амплитуды (положительной полярности) около 600 мсек в центрально-теменных областях (см. обзор Osterhout et al., 1997; Osterhout & Nagoort, 1999).

Такие данные, указывающие на последовательный доступ к различным типам информации, и сформировали доминирующую в нейрофизиологии языка и речи точку зрения (см. обзор Friederici, 2002). Она, однако, вступает в конфликт с целым рядом поведенческих данных, полученных в психолингвистических экспериментах. Речь идет об экспериментах, указавших на параллельный характер обработки мозгом информации о поступающих словах и о контексте их предъявления, и на быстроту этой обработки, которая может иметь ме-

сто в течение первых ~200 мсек после того, как имеющаяся информация позволяет распознать то или иное слово (Marslen-Wilson, 1973; Marslen-Wilson, 1987; Rastle et al., 2000; Mohr & Pulvermüller, 2002). Например, испытуемые могут совершать моторные ответы (нажатие кнопки) на зрительно предъявляемые слова в зависимости от своей оценки их фонетических и семантических свойств через 400–450 мсек после появления стимула (Marslen-Wilson & Tyler, 1975). Поскольку значительное время требуется на подготовку и выполнение самого акта моторного ответа, то наиболее ранние психолингвистические процессы, связанные с предъявленным словом, должны иметь место намного раньше. Еще более удивительным оказалось то, что даже в этом раннем диапазоне времени лингвистические процессы подвержены влиянию семантических и синтаксических факторов (Marslen-Wilson & Tyler, 1975). Более того, исследования с использованием методики повторения услышанного (*shadowing*) указали на то, что производство речи инициируется уже через 150–200 мсек после поступления языкового стимула (Marslen-Wilson, 1985). Ранние поведенческие эффекты, отражающие семантические процессы и контекстную интеграцию, были также получены в опытах с кросс-модальным праймингом, в которых было показано, что доступ к информации о предъявляемом слове может происходить задолго до его окончания, в течение 200 мсек после того, как имеющаяся информация позволяет его идентификацию, или даже раньше (Zwitsersloot, 1989; Moss et al., 1997; Tyler et al., 2002). Эксперименты, использующие методику отслеживания движений глаз (*eye-tracking*) также показали, что ряд психолингвистических свойств предъявляемых стимулов оказывает влияние на движения глаз с такой же ранней латентностью (Serenio & Rayner, 2003). Исследования такого рода предлагают альтернативную точку зрения, согласно которой одновременный доступ к различным типам лингвистической информации может инициироваться в мозге в течение 200 мсек после поступления соответствующих раздражителей. Это, в свою очередь, ставит под сомнение последовательные модели обработки языка мозгом, предложенные в психолингвистике и поддержанные, по крайней мере частично, ранними нейрофизиологическими экспериментами.

Другим спорным вопросом речевой науки является вопрос о том, насколько человеческая способность к обработке языка требует ресурсов других когнитивных систем, прежде всего внимания, и, наоборот, в какой степени она обладает автоматизмом. Та легкость, с которой мы можем воспринимать весь сложный комплекс поступающей в нашу слуховую систему речи, и простота, с которой мы, казалось бы, мгновенно расшифровываем заключающуюся в ней грамматическую, морфологическую, семантическую и прочую информацию, зачастую занимаясь при этом другими делами, привели к предположениям, что лингвистическая деятельность осуществляется мозгом в значительной степени автоматизированным образом (Fodor, 1983; Garrett, 1984; Garrod & Pickering, 2004; Pickering & Garrod, 2004). Чтобы рассмотреть этот вопрос в контексте настоящего обзора, мы разберем нейрофизиологические данные, полученные вне фокуса внимания с использованием пассивной экспериментальной парадигмы и мозгового отклика известного под названием «*mismatch negativity (MMN)*», чей русский перевод «негативность рассогласования (НР)» мы будем использовать в дальнейшем. НР — это мозговой отклик (отклонения вызванного потенциала или произведенного им магнитного поля) вызываемый редкими (т.н. девиантными) акустическими посылками, предъявляемыми изредка на фоне частых (т.н. стандартных) стимулов (Alho, 1995; Näätänen, 1995). Одной из важных особенностей НР является возможность ее генерации в отсутствие внимания испытуемых к слуховым раздражителям (Tiitinen et al., 1994; Schröger, 1996). В связи с этим считается, что она отражает автоматическую детекцию мозгом изменений в поступающей звуковой информации, являясь своего рода уникальным

индикатором того, как наш мозг обрабатывает акустические события (Näätänen, 1995). В последнее время НР все больше и больше используется и для исследований нервных механизмов лежащих в основании речевой функции (Näätänen, 2001; Pulvermüller & Shtyrov, 2006). Сначала давайте рассмотрим основные предпосылки для такого использования НР. Нами предлагается четыре основных определяющих фактора: (а) НР является ранним мозговым откликом; (b) НР обладает автоматизмом; (с) она является откликом на индивидуальный раздражитель; (d) НР является откликом на перемену в стимуляции. Первые два момента относятся к известным свойствам НР, связанным тем или иным образом с механизмами ее генерации в мозге, а последние два пункта представляют из себя важность в связи с техническими, методологическими особенностями исследований активности мозга в ответ на языковые стимулы.

Ранняя латентность НР

Как уже говорилось, ряд поведенческих исследований указывает на запуск психолингвистических процессов в мозге в течение 200 мсек после поступления достаточной для этого речевой информации. Если эти процессы находят отражение в динамике событийно-связанной мозговой активности, то соответствующие мозговые отклики, регистрируемые на поверхности головы, должны иметь место в том же диапазоне времени или даже раньше. Это является обязательным (хотя и недостаточным) условием для установления их прямой связи с вышеуказанными лингвистическими процессами; в противном случае, они могут быть всего лишь отдаленными последствиями этих процессов. Это автоматически исключает поздние сдвиги вызванных потенциалов (ВП; N400, M350, P600) из рассмотрения в качестве потенциальных кандидатов в индикаторы ранних языковых явлений в мозге. Ранние, т. н. облигаторные слуховые потенциалы (P1, N1) не обнаружили чувствительности к лингвистическим факторам. ELAN, ранний синтаксический отклик, вполне соответствует временным требованиям, но не регистрируется в большинстве лингвистических задач (и более того, может быть найден далеко не во всех синтаксических опытах). С другой стороны, НР, во-первых, является ранним компонентом (обычная латентность в пределах 100–200 мсек), а во-вторых, прочно связана с такими когнитивными явлениями как память, внимание и его ориентирование, примитивный интеллект слуховой системы (Näätänen, 1995; Näätänen & Alho, 1995; Näätänen, 2000; Näätänen et al., 2001). Известно, что НР обладает чувствительностью к крайне абстрактным свойствам звуковых сигналов и таким образом является потенциальным кандидатом для идентификации предполагаемой ранней языковой деятельности в мозге.

Автоматизм НР

Хотя вопрос о том, подвержена ли НР влиянию процессов внимания, и если да, то до какой степени, нерешен, неопровержимо то, что НР легко вызывается в отсутствие прямого внимания к стимуляции. Таким образом, НР не требует активного участия испытуемого в осмыслении предъявляемого материала; как правило, испытуемый занят не связанной со слуховыми стимулами задачей (напр., просмотр фильма), в то время как НР, тем не менее, генерируется редкими случайными изменениями в поступающих слуховых сигналах. По крайней мере в этом смысле НР может считаться автоматическим мозговым откликом. Это, в свою очередь, имеет важное значения для ее использования в речевых исследованиях.

Обычно в языковых экспериментах испытуемым дается задание внимательно воспринимать предъявляемые им слова или предложения (напр., Neville et al., 1991; Osterhout & Swinney, 1993; Friederici et al., 2000). Зачастую, инструкция включает в себя проведение какой-либо оценки лингвистического материала (напр., знакомые-незнакомые, правильные-неверные слова) вплоть до сложных лингвистических задач — таких как оценка грамматики предложения или лексическое решение (lexical decision). Поскольку в таком эксперименте требуется активное внимание со стороны испытуемого, невозможно удостовериться в том, что регистрируемая нейронная активность не связана скорее с мозговыми коррелятами процессов внимания, чем с языковыми процессами как таковыми. Связанные с процессами внимания явления, как известно, модулируют ряд вызванных откликов, в том числе связанных с мозговыми структурами находящимися вблизи основных языковых областей или даже перекрывающимися с ними (см. напр. Picton & Hillyard, 1974; Alho, 1992; Woods et al., 1993a; Woods et al., 1993b; Tiitinen et al., 1997; Escera et al., 1998; Yamasaki et al., 2002; Yantis et al., 2002). Вполне возможно, что испытуемые уделяют больше внимания необычным или содержащим преднамеренные ошибки стимулам (в подобных экспериментах зачастую используются псевдослова, бессмысленные предложения и грамматические ошибки) в то время, как они пытаются осмыслить их; возможно, что они применяют различную стратегию при обработке правильно сформированных и намеренно ошибочных стимулов. Такие специфические изменения стратегии и вариации в уровне внимания могут, в свою очередь, найти отражение в измеряемой активности, перекрываясь с подлинно языковой деятельностью мозга. Таким образом, крайне важным представляется ограничение влияния процессов внимания и эффектов специфики поставленной задачи. Для решения этой проблемы НР представляет собой идеальный инструмент, т. к. она регистрируется, когда испытуемые не концентрируют внимание на стимуляции и не выполняют никаких связанных со стимулами заданий.

НР как отклик на индивидуальный раздражитель

Несмотря на то, что наличие ранних психолингвистических процессов следует из имеющихся поведенческих данных, нейрофизиологам в основном не удалось найти мозговых коррелятов этой деятельности. Одна из возможных причин этой неудачи может иметь методологическую природу. В большинстве экспериментов по физиологии речи исследуются и сравниваются друг с другом большие группы стимулов; усредненные отклики при этом используются для обобщения результатов в применении ко всему материалу, относящемуся к той или иной категории лингвистических стимулов. Это приводит к проблеме физической вариативности стимулов, так как раздражители различаются по своим физическим свойствам (напр., длительность, спектральные характеристики, распределение звуковой энергии и т. п.). Как известно, даже минимальные различия в простых физических свойствах могут приводить к различиям в регистрируемой активности мозга (Näätänen & Picton, 1987; Korh & Nguyen, 1997), которые могут перекрываться во времени с лингвистическими эффектами, маскировать или скрывать их, или даже ошибочно казаться таковыми. Другой проблемой является психолингвистическая вариативность, т. к. стимулы, как правило, различаются по своим лингвистическим признакам, таким как частота встречаемости в языке или временные параметры распознавания слова. Последние при этом особенно трудно поддаются контролю, т. к. различные слова, даже при одинаковой общей длительности, поддаются распознаванию и выделению из круга своих лексических конкурентов в различные моменты

времени — в экстремальных случаях вскоре после начала слова или только чрез некоторое время после его окончания (Marslen-Wilson, 1987). Несомненную пользу при этом может приносить традиционное выравнивание средних параметров между различными категориями стимулов в эксперименте, которое, тем не менее, по-прежнему не решает всех проблем. Как правило, все известные ранние компоненты событийно-вызванных откликов имеют относительно малую амплитуду и короткое время проявления; если гипотетические ранние корреляты языковой деятельности обладают теми же свойствами, то вариативность внутри группы стимулов приведет к их размыву или полному исчезновению в среднем отклике по группе (Pulvermüller, 1999; Pulvermüller & Shtyrov, 2006). С другой стороны, более поздние отклики (такие как N400, P600), менее подвержены такому деструктивному воздействию процедуры усреднения, т. к. они обладают значительной амплитудой и длятся на протяжении сотен миллисекунд. Поэтому, чтобы обнаружить предполагаемые ранние эффекты, необходимо максимально уменьшить влияние вариативности раздражителей. Поскольку НР является откликом на один и тот же девиантный стимул, который для улучшения соотношения сигнала к шуму многократно повторяется случайным образом, то она предоставляет полное решение проблемы вариативности, сводя последнюю к нулю.

НР как отклик на изменение

По своему определению, НР регистрируется как разница между откликами на девиантный и стандартный стимулы, контраст между которыми и приводит к ее появлению. Это, в свою очередь, дает уникальную возможность контроля над акустическими параметрами стимуляции в языковых экспериментах. Предлагаемый контроль состоит в использовании идентичных акустических контрастов в различных категориях стимулов, при одновременной манипуляции их лингвистическими свойствами. Рассмотрим следующие гипотетические сочетания раздражителей, используя английский язык, который применялся во многих наших экспериментах: (1) слово «tau» (луч, ед.ч.) в качестве стандартного стимула и «rays» (лучи, мн.ч.) — в качестве девиантного, (2) «lay» (класть, неопр.ф.)- «lays» (кладет, ед.ч. 3 л.), (3) «gray» (серый) — «graze» (пастись), (4) «tay» — «taze». Во всех четырех сочетаниях, НР будет вызываться одним и тем же акустическим контрастом, который состоит в наличии звука [z] в конце девиантного стимула в том положении, где стандартный раздражитель уже завершился. Таким образом, чисто акустическая НР в ответ на этот контраст должна остаться неизменной во всех четырех условиях. Однако эти четыре комбинации, несмотря на идентичность акустических контрастов, резко различаются по своему лингвистическому контексту: в первом из гипотетических экспериментальных блоков этот контраст представляет собой склонение существительного (изменение в числе); во втором блоке мы имеем спряжение глагола (в 3-е лицо). В третьем условии тот же самый акустический контраст приводит к полной лексической и семантической перемене — стандартные и девиантные стимулы не связаны общим смыслом и даже относятся к разным частям речи. Наконец, четвертая пара представляет из себя бессмысленные псевдослова, давая, таким образом, дополнительную возможность контроля над акустическими параметрами. Таким образом, записывая НР в ответ на такие акустически идентичные контрасты, можно сосредоточиться на эффектах различных лингвистических контекстов, не имея обычных ограничений, связанных с различием акустических параметров стимулов. Более того, возможно предъявление тех же самых девиантных стимулов в качестве частых стандартных раздражителей в отдельном экспериментальном блоке; в таком случае, НР может быть рассчитана как разница

в отклике на физически один и тот же стимул в качестве девиантного и стандартного, что дает возможность еще более строгого контроля над физическими параметрами стимуляции. Использование строго контролируемых таким образом параметров стимуляции оказалось крайне успешным в ряде экспериментов. К их рассмотрению мы и перейдем в следующем разделе.

Экспериментальные данные

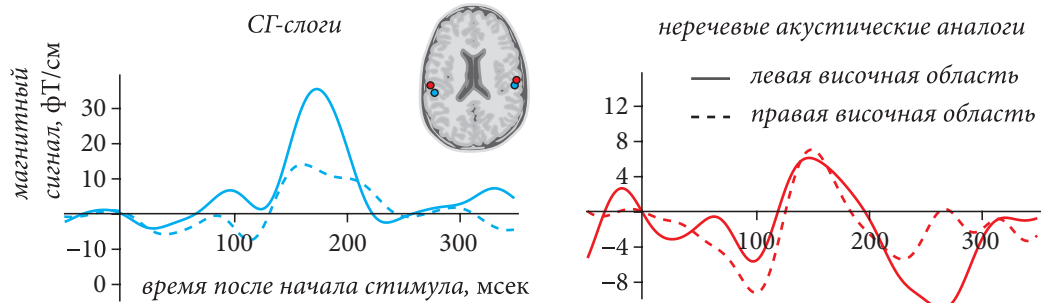
На момент написания этого обзора (2008 год), имеющиеся экспериментальные данные показали чувствительность НР к языковым процессам, относящимся ко всем основным типам лингвистической информации: фонологическому, лексическому, семантическому и синтаксическому (рис. 1, 2).

Фонологические процессы

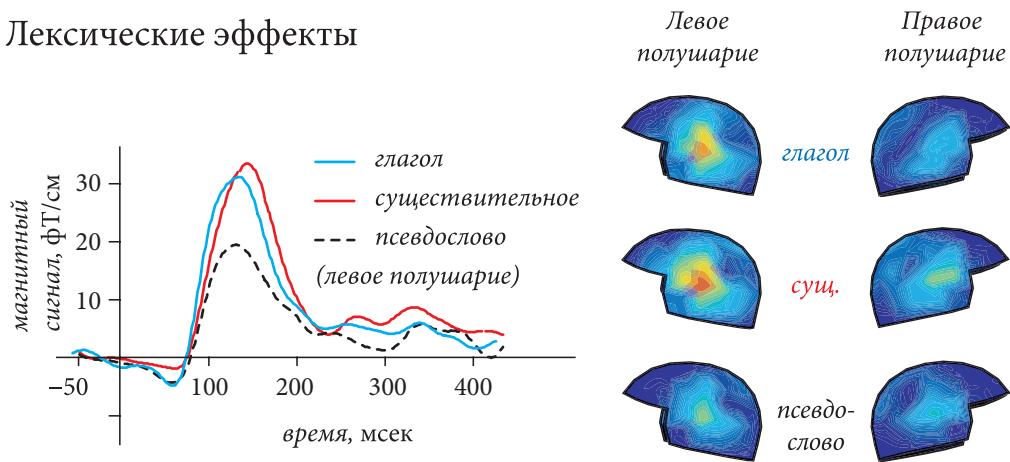
Отдельные фонемы и их простые комбинации — слоги — были первым лингвистическим материалом, испытанным в парадигме рассогласования. Как показали эти эксперименты, звуки родного языка, например, гласные, вызывают более выраженную НР, чем их аналоги, не представленные в родной фонологической системе испытуемых (Dehaene-Lambertz, 1997; Näätänen et al., 1997). Важно, что это наблюдается вне зависимости от величины акустических различий между стандартными и девиантными стимулами. Более того, тогда как обычно НР имеет симметричную топографию, иногда с тенденцией к правополушарному преимуществу (Paavilainen et al., 1991), фонетическая НР имеет преимущественно левостороннее распределение, что предполагает возможную связь ее происхождения с языковыми областями коры, расположенных в левом полушарии головного мозга (Näätänen et al., 1997; Shtyrov et al., 1998; Shtyrov et al., 2000). Дальнейшие эксперименты показали, что изменения в паттерне НР могут отражать развитие новых фонологических представлений при освоении языковых навыков детьми или изучении нового языка взрослыми испытуемыми (Cheour et al., 1998; Winkler et al., 1999). Последующие опыты продемонстрировали чувствительность НР к фонотактическим факторам (Dehaene-Lambertz et al., 2000; Bonte et al., 2005; Bonte et al., 2007), паттернам ударения (Honbolygo et al., 2004; Weber et al., 2004), аудио-визуальной интеграции фонетической информации (Colin et al., 2002; Colin et al., 2004) и ряду других фонологических переменных. Время проявления этих фонетических и фонологических эффектов в НР варьируется от примерно 100 мсек (Rinne et al., 1999) до ~200 мсек (Shtyrov et al., 1998, 2000).

Для объяснения этих результатов было предложено, что, в дополнение к детекции слуховых изменений и процессам кратковременной памяти, НР обладает чувствительностью к долговременным следам памяти, которые сформировались в нервной системе испытуемых в процессе их предыдущего взаимодействия с устной речью (Näätänen et al., 1997; Shtyrov et al., 2000; Näätänen, 2001). Из этого следуют важный вывод о том, что такие долговременные следы памяти могут активироваться предъявлением соответствующего девиантного стимула в парадигме рассогласования, и что эту активацию можно зарегистрировать нейрофизиологически даже в отсутствие внимания к стимуляции и какой бы то ни было связанной со стимулами задачи. Это послужило мотивацией к последующим экспериментам с использованием НР, которые ставили своей целью исследование лингвистических процессов более «высокого» уровня.

Фонологические контрасты



Лексические эффекты



Семантика

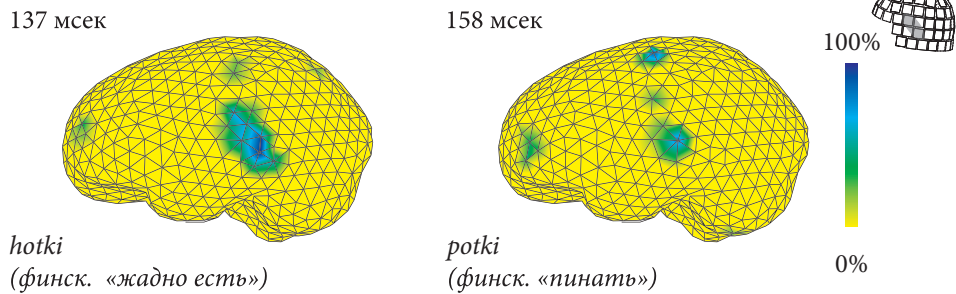
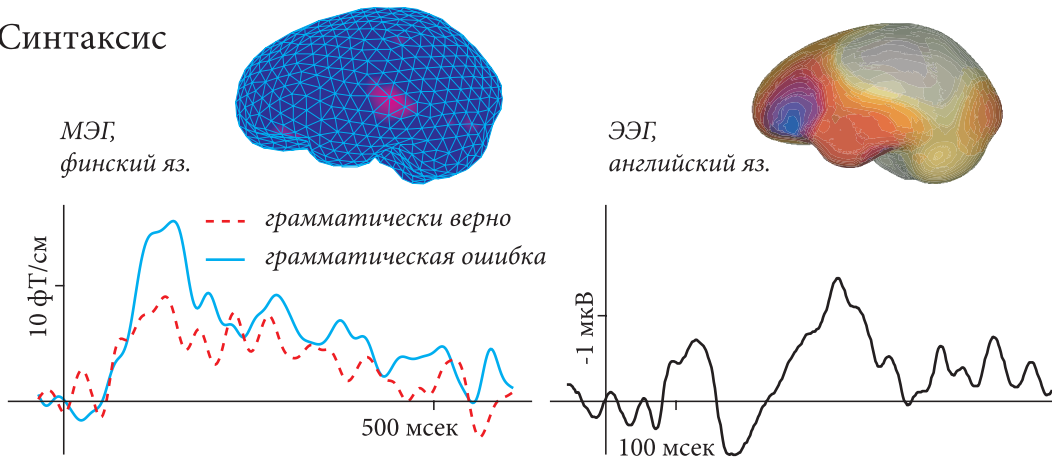
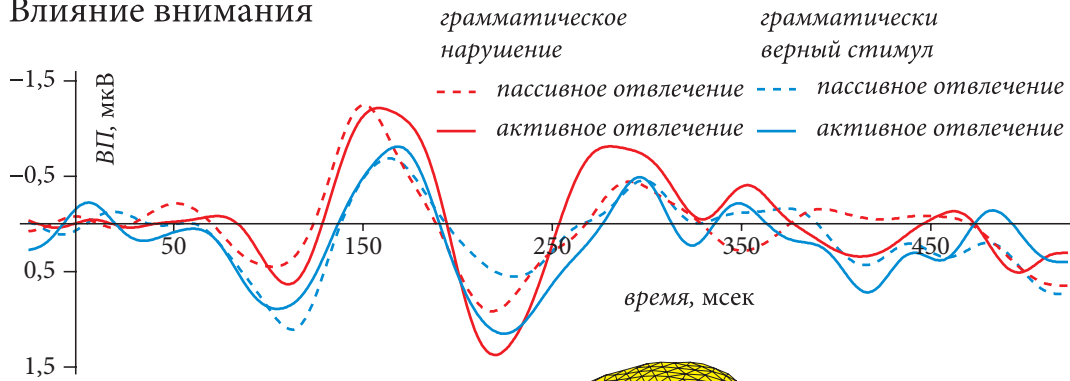


Рис. 1. НР как индекс обработки лингвистической информации мозгом: усиление НР в ответ на слоги родного языка (адаптировано из Shtyrov et al., 2000), лексическое усиление НР в ответ на значимые слова (адаптировано из Shtyrov et al., 2005), проявление семантических свойств слов в конфигурации источника НР (адаптировано из Pulvermüller et al., 2005).

Синтаксис



Влияние внимания



Контекстная семантика

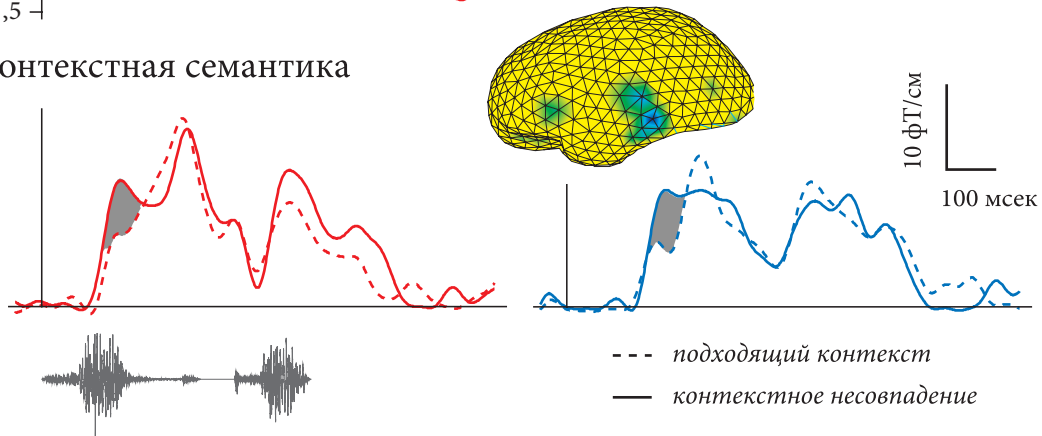


Рис. 2. НР в ответ на предъявление лингвистической информации «высокого порядка»: синтаксическая НР при использовании грамматически верных и ошибочных фраз (адаптировано из Pulvermüller & Shtyrov, 2003, и Shtyrov et al., 2003), ранний автоматизм и последующая подверженность процессам внимания в синтаксической НР (адаптировано из Pulvermüller & Shtyrov, 2008), НР и контекстно-семантическая интеграция (адаптировано из Shtyrov & Pulvermüller, 2007).

Лексические процессы

Наподобие того, как НР демонстрирует фонологическое увеличение в ответ на предъявление фонем и слогов родного языка, негативность рассогласования, вызванная отдельными словами, обладает большей амплитудой, нежели НР в ответ на подобные бессмысленные словоподобные (т.е. подчиняющиеся фонологическим принципам языка) стимулы (рис. 1). В проведенной нами серии исследований на эту тему мы предъявляли испытуемым наборы акустически сбалансированных слов и псевдослов и обнаружили увеличение амплитуды НР в тех случаях, когда в девиантной позиции находится значимое слово (Pulvermüller et al., 2001; Shtyrov & Pulvermüller, 2002; Pulvermüller et al., 2004; Shtyrov et al., 2005). Это усиление амплитуды, обычно имеющее свой пик в диапазоне 100–200 мсек, лучше всего объясняется активацией следов памяти для данных слов, реализованных в коре головного мозга в виде связанных между собой распределенных популяций нейронов (Pulvermüller & Shtyrov, 2006). Лексическое усиление НР было неоднократно подтверждено нашей группой и другими исследователями, причем в этих опытах использовались различные параметры стимуляции, методики регистрации откликов и языки (Korpilahti et al., 2001; Kujala et al., 2002; Sittiprapaporn et al., 2003; Endrass et al., 2004; Pettigrew et al., 2004). Как оказалось, для появления этого эффекта критическое значение имеет лексический статус именно девиантного стимула. В то же время мы не нашли эффектов лексического статуса стандартных раздражителей на амплитуду НР (Shtyrov & Pulvermüller, 2002), хотя в некоторых работах предлагается, что вызванные отклики на стандартные речевые посылки также могут реагировать на их лексический статус (Diesch et al., 1998; Jacobsen et al., 2004).

Исследования вызванной словесными стимулами активации рассогласования с помощью современных методик картирования мозга, таких как многоканальная магнитоэнцефалография (МЭГ) в сочетании с математическими алгоритмами оценки источников активности, позволили, в свою очередь, изучить связанные с восприятием слов мозговые процессы с недоступной прежде пространственно-временной точностью. Используя НР полученную в ответ на отдельные слова, мы смогли продемонстрировать, что эта активация сначала проявляется в верхних височных областях коры. Это происходит вскоре (~130 мсек) после того, как доступная информация позволяет идентификацию стимула. Затем, в строго определенном порядке (с задержкой около 20 мсек), она распространяется в нижние фронтальные области, что, возможно, отражает поток передачи информации в перисильбиевых языковых областях в процессе лексического доступа (Pulvermüller et al., 2003). Более того, мы обнаружили корреляцию между латентностью НР у индивидуальных испытуемых и индивидуальными моментами распознавания слова (word recognition points, WRP, см. Marslen-Wilson, 1987), определенными поведенческим путем, что непосредственно указывает на способность НР к отражению процессов распознавания слов и на связь между этими двумя явлениями (Pulvermüller et al., 2006).

В результате непрерывного накопления данных такого рода, паттерн откликов рассогласования в ответ на девиантные словесные раздражители стал считаться своего рода индикатором, показывающим индивидуальные характеристики следовых процессов памяти для этих слов. Это, в свою очередь, дало возможность исследовать связанные со словами мозговые процессы без влияния со стороны механизмов внимания и вне зависимости от связанных со стимуляцией задач. Действительно, последующие исследования языковой функции с помощью НР помогли составить более полную пространственно-временную картину активации мозга, потенциально связанной с заключенной в словах семантической информацией.

Семантические процессы

Первые эксперименты, использовавшие НР для изучения семантической обработки языка мозгом, были связаны с моделью, предсказывающей соматотопию связанных с движениями слов (*somatotopy of action words*, Pulvermüller, 1999; 2005). Эта модель является частью общего теоретического направления, в котором предполагается, что слова представлены в нервной системе в виде специфических следов памяти, существующих как распределенные сети нейронов. Последние формируются в результате усиления двусторонних связей между различными (в т.ч. удаленными друг от друга) областями мозга по мере того, как индивидум получает опыт взаимодействия с движениями, объектами и концепциями одновременно с описывающими их словами (Hebb, 1949; Pulvermüller, 1999). Такая связь слова с его конкретным значением является неотъемлемой частью его семантики (Frege, 1980). Связанные с движениями слова, например, такие как описывающие движения нижних конечностей «бежать» или «пинать», или относящиеся к моторике рук «брать» или «рисовать», используются для описания движений тела. Таким образом, данные моторные действия являются сущностной характеристикой описывающих их слов (хотя вся семантика последних, возможно, этим и не исчерпывается). Если лексическое представительство такого слова проявляется в коре головного мозга в виде нейронной сети, то именно связи между группами нейронов в задействованных корковых областях (в данном случае языковых и двигательных) и должны реализовывать семантические взаимоотношения между внешней формой слова и описываемым им действием. Как известно, моторная кора организована соматотопически (Penfield & Rasmussen, 1950), что в свою очередь ведет к выводу, что относящиеся к разным частям тела слова должны активировать, наряду с классическими языковыми областями коры, соответствующие части моторного неокортекса. Этот вывод, получивший подтверждение в ряде экспериментов с картированием мозга при помощи фМРТ и ЭЭГ (Hauk et al., 2004; Hauk & Pulvermüller, 2004), был также подвергнут проверке с помощью НР. При этом использовались различные методики записи НР (ЭЭГ, МЭГ) в совокупности с разными языками стимуляции (английский, финский).

В этих экспериментах (Shtyrov et al., 2004; Pulvermüller et al., 2005), кроме обычно наблюдаемых источников активности в верхних височных областях, слова, относившиеся к движениям лица и рук, приводили к активации нижних и центральных областей фронтального неокортекса, включая, очевидно, корковое представительство верхней части тела. Более того, слова связанные с движениями нижних конечностей приводили к дорзально-центральной активации, возможно связанной с сенсомоторным представительством ног (рис. 1). Эта специфическая дорзальная активация в ответ на связанные с движениями ног словами проявляется позднее (~170 мсек), чем более латерально распределенная активация в ответ на слова, связанные с движениями рук и лица. Такие пространственно-временные характеристики указывают на то, что источники НР в перисильвиевых областях, вкуче с почти одновременной активацией вдали от силвиевой борозды, могут отражать доступ к смыслу слов в коре головного мозга человека. Минимальные задержки между локусами активности, возможно, обусловлены расстоянием и скоростью передачи потенциалов действия между задействованными областями коры.

Эти данные указали на то, что обработка семантической информации, содержащейся в связанных с движениями словах, находит свое отражение в НР уже через 140–180 мсек после того, как акустический сигнал позволяет идентификацию слов. Следовательно, как и в рассмотренном выше случае лексического доступа и отбора, доступ к смыслу сказан-

ного очевидно является ранним мозговым процессом, который также имеет место в рамках первых 200 мсек; таким образом, можно сделать вывод о том, что оба эти процесса происходят примерно одновременно.

Не менее интересны результаты, полученные в опытах с НР и контекстной семантической интеграцией. В этих экспериментах целые предложения или комбинации слов предъявлялись испытуемым в пассивной парадигме рассогласования; в то же время их физико-акустические свойства находились под жестким контролем. Некоторые девиантные комбинации включали в себя семантический конфликт между словами, наподобие традиционной парадигмы семантических нарушений, обычно производящей отклик N400. Эти контекстные нарушения на уровне фраз, к удивлению самих исследователей, оказали влияние на динамику НР на довольно ранней стадии (рис. 2), но в то же самое время не привели к отклику, который можно было бы интерпретировать как N400. В одной из этих работ такая модуляция НР была обнаружена уже через ~115 мсек после того, как слова можно было различить; было найдено, что эта модуляция опосредована активностью в верхних височных и нижних лобных областях левого полушария (Shtyrov & Pulvermüller, 2007). В другой работе (Menning et al., 2005), контекстно-семантические аномалии нашли свое отражение в НР в диапазоне 150–200 мсек. Надо заметить, что эти показавшие контекстно-семантическую НР работы были проведены в разных лабораториях с использованием различного оборудования, протоколов стимуляции и языка стимулов (финский, немецкий). В этих работах впервые было показано, что семантические процессы высшего порядка — контекстной интеграции устной речи — могут происходить в рамках 200 мсек после предъявления необходимой информации, т. е. задолго до ранее известного феномена N400. Таким образом, вместе с рассмотренными выше данными фонетических, лексических и семантических работ, они предоставляют дополнительные доказательства в пользу раннего и параллельного доступа к разным типам лингвистической информации. Дополнительная поддержка этого взгляда на речевые процессы была также найдена и в опытах со зрительной стимуляцией (Serenio et al., 2003; Penolazzi et al., 2007), показавших эффекты контекстно-семантической интеграции на зрительные отклики мозга с латентностью менее 200 мсек.

Синтаксические процессы

Наконец, давайте рассмотрим последний из основных типов лингвистических процессов, перечисленных нами ранее — обработку морфосинтаксической информации в мозге человека. Нами проведен ряд экспериментов по этой тематике, результаты которых также нашли свое подтверждение и в работах других лабораторий. Для обеспечения точного контроля над физическими свойствами раздражителей мы опять-таки предъявляли идентичные вербальные стимулы в различном контексте. В этих экспериментах критическое слово следовало за контекстным словом, которому оно либо соответствовало грамматически, либо находилось с ним в синтаксическом конфликте; это стандартный подход в нейрофизиологии синтаксиса (Osterhout, 1997). Использовались различные методики (МЭГ, ЭЭГ) и языки стимуляции (финский, немецкий, английский); это дает возможность делать общие выводы, что особо важно в экспериментах с НР, т. к. они обычно используют ограниченный набор стимулов. Первая из этих работ имела дело с нейрофизиологическими откликами на финские фразы, состоявшие из местоимения и глагола, имевшего либо верное в своем спряжении окончание (напр., «он идет», «ты идешь»), либо рассогласованного с местоимением в лице («он идешь», «ты идет»). Одни и те же стимулы использовались в синтаксиче-

ски верных и аграмматических фразах; таким образом, влияние физических факторов было устранено.

Результаты показали увеличение амплитуды НР в аграмматических контекстах по сравнению с НР на те же слова, предъявляемые в грамматически верных фразах (рис. 2). Подобные результаты были получены в экспериментах с использованием английского и немецкого языков (Pulvermüller & Shtyrov, 2003; Pulvermüller & Assadollahi, 2007). Латентность, в которой регистрируются грамматические эффекты, различается в этих работах, но в целом они были найдены в пределах 200 мсек после пункта идентификации слова, а иногда и заметно раньше — около 100 мсек (Pulvermüller & Shtyrov, 2003; Shtyrov et al., 2003). Также разнятся и корковые структуры, в которых были найдены источники синтаксической НР. Магнитоэнцефалографические результаты указывают на распределение основных источников этой активности в верхне-височной области коры и на возможное участие нижне-фронтальных областей, тогда как опыты с ЭЭГ указали на обратное, сильную активацию левых нижне-фронтальных областей вкупе со слабым участием височной коры. Эти различия можно отметить и в предыдущих работах по картированию синтаксиса в мозге, в которых эта функция локализуется иногда в лобных, а иногда в височных долях (напр., Kaan & Swaab, 2002; Bornkessel et al., 2005; Kircher et al., 2005). Таким образом, возможно, что в грамматико-синтаксические процессы вносят свой вклад различные области персильвиева неокортекса, и что их активность находит различное отражение в ЭЭГ и МЭГ, которые, как известно, отличаются по своей чувствительности к различному положению и направлению источников тока в мозге.

Наши данные были также подтверждены работами других исследователей, которые при использовании схожих методов обнаружили специфическую НР с пиком в диапазоне 150–200 мсек при предъявлении фраз содержащих синтаксический конфликт (напр., Menning et al., 2005; Hasting et al., 2007).

Ранняя синтаксическая НР напоминает компонент ELAN (Neville et al., 1991; Friederici et al., 1993), ранее предложенный в качестве индекса построения мозгом синтаксической структуры фразы (Friederici, 2002). Эта интерпретация поддерживается и данными о синтаксической НР. Не менее важно то, что они также указывают на то, что такие ранние синтаксические процессы не требуют внимания к речевой информации. В этом плане ранняя синтаксическая обработка представляется достаточно автоматическим процессом. Этот автоматизм проявляется даже в описанном выше случае нарушения согласования между подлежащим и спряжением сказуемого, которое является более ресурсоемким с точки зрения вычисления зависимостей и поэтому неспособным, как считалось прежде, к вызову ELAN. Более поздний сдвиг положительной полярности (P600), как оказалось, полностью отсутствует в пассивной парадигме рассогласования, и в свою очередь, видимо, отражает вторичные контролируемые (с участием внимания) попытки интерпретации последовательности после того, как первичный автоматический парсинг не удался (Osterhout & Holcomb, 1992; Friederici, 2002).

Отсутствие внимания и автоматизм

Представляется вполне возможным, что обычное требование к испытуемым сосредоточиться на просмотре фильма или чтении книги во время слуховой стимуляции не гарантирует полного отсутствия внимания к раздражителям. Обычно делаемый из таких экспериментов вывод об автоматизме изучаемых процессов подразумевает, что испытуемые строго

следуют данной инструкции, в чем трудно полностью убедиться. Таким образом, предпочтительным представляется более строгий контроль над уровнем внимания испытуемых к стимуляции. В связи с этим нами был проведен эксперимент по более подробному исследованию роли внимания в языковой функции. В нем мы сравнили классическую парадигму НР с ее традиционно умеренным уровнем отвлечения испытуемых от стимуляции при помощи просмотра видеофильма и более требовательную задачу для испытуемых, в которой от них требовалось непрерывное выполнение задания по классификации альтернативных слуховых стимулов. Речевые стимулы проигрывались только в правое ухо, в то время как неречевые акустические раздражители, требовавшие определения, подавались в левое ухо. В одном из экспериментальных блоков испытуемым было необходимо внимательно слушать неречевую стимуляцию в левом слуховом канале и нажимать кнопку всякий раз, когда там появлялся девиантный сигнал; в то же самое время, языковая стимуляция поступала в правое ухо. В другом блоке, испытуемым была дана инструкция смотреть видеофильм, как в большинстве предыдущих работ, в то время как оба вида стимулов предъявлялись каждый в своем канале, но без задания уделять им какое-либо внимание. При использовании синтаксических языковых стимулов, мы снова получили грамматический эффект, т. е. более сильный отклик НР в ответ на грамматически неверные сочетания по сравнению с правильными фразами. В диапазоне времени до 150 мсек не было обнаружено достоверных различий между задачами с различным уровнем отвлечения внимания (рис. 2). Лишь позднее, после 150 мсек, мы обнаружили статистически достоверное взаимодействие между экспериментальными факторами, указавшее на то, что эти более поздние стадии обработки грамматической информации мозгом, находящие свое проявление в НР, подвержены влиянию внимания и типа экспериментального задания. Наша интерпретация данных результатов заключается в выводе о независимости ранней части НР от внимания и автоматическом характере раннего синтаксического анализа (Pulvermuller et al., 2008).

Заключение: выводы и нерешенные вопросы

В настоящем обзоре мы рассмотрели предпосылки к нейрофизиологическому исследованию самых ранних стадий восприятия языка мозгом и то, как для их обнаружения и исследования можно использовать негативность рассогласования. Важными предпосылками для такого использования НР нам представляются ранний характер НР, автоматизм ее генерации, возможность записи откликов на индивидуальные языковые стимулы в парадигме рассогласования и уникальная характеристика НР как отклика на акустический контраст, что позволяет осуществлять дополнительный контроль над физическими свойствами экспериментальных раздражителей. Мы увидели, как НР использовалась в последние годы для исследования нервных процессов, связанных с обработкой фонологической, лексической, семантической (включая семантику на уровне отдельных слов и на более высоком уровне контекстной интеграции фраз) и синтаксической информации мозгом. НР не только обнаружила чувствительность к этим типам лингвистической информации; более того, она оказалась полезной для выделения мозговых коррелятов лингвистической обработки из общей массы процессов, связанных также со вниманием и стратегией анализа раздражителей. Не менее важным представляется то, что работы с использованием НР дали возможность строго контролировать свойства раздражителей, минимизировав таким образом возможность того, что обнаруженные эффекты вызваны акустически или психолингвистически несбалансированными наборами стимулов.

Важно также и то, что эти работы пролили новый свет на временную динамику доступа к лингвистической информации. В различных экспериментах различные типы стимулов, включая фонетические/фонологические, лексические, семантические и синтаксические контрасты, модулировали НР в диапазоне латентности 100–200 мсек после того, как соответствующая акустическая информация становилась доступна на входе в слуховую систему. Эти данные недвусмысленно говорят в пользу параллельного или приблизительно одновременного доступа к различным типам лингвистической информации, быстро происходящего вскоре после того, как услышанные слова можно идентифицировать. Такой доступ был ранее предложен некоторыми психолингвистическими исследованиями, но по сию пору являлся предметом острых теоретических дискуссий.

В структурном плане, полученные с помощью НР результаты четко указывают на существование распределенных нейронных сетей, лежащих в основании обработки поступающей речевой информации. Например, был показан комплексный характер активации верхне-височных и нижних лобных областей коры в процессе восприятия слова. В зависимости от конкретных семантических свойств предъявляемых слов, они приводят к активации целого набора областей в височной, ниже-фронтальной, латерально- и дорзофронтальной коре, иногда распространяющейся и в правое полушарие (Pulvermüller et al., 2004). Предоставляемые НР возможности для исследования таких сложных пространственно-временных паттернов, связанных с восприятием и пониманием языка, очевидно, далеко не исчерпаны на данном этапе.

Полученные с помощью НР результаты ни в коем случае не отрицают более ранние работы по определению нейрофизиологических параметров лингвистических процессов. Скорее, они придают новое измерение нейрофизиологии языка, указывая на то, что более поздние процессы, находящие свое отражение, напр., в N400, P600 или синтаксических негативностях (LAN), могут являться дополнением и продолжением ранних автоматических этапов и таким образом, могут быть связаны со вторичными умственными процессами, запускаемыми ранним доступом к лингвистическим следам памяти и зависимыми от внимания и индивидуальных стратегий.

Исследования языковых процессов с помощью НР имеют, тем не менее, и ряд нерешенных вопросов. Одним из наиболее часто подвергающихся критике моментов такого подхода является контроль над вниманием в экспериментах с НР. Традиционные пассивные парадигмы НР, в которых основной задачей испытуемого является просмотр фильма, чтение книги или компьютерная игра, в действительности не могут исключить возможность того, что испытуемый может время от времени «подслушивать» экспериментальные стимулы (Carlyon, 2004). Поэтому одним из направлений дальнейшего развития этих исследований является дальнейшее усовершенствование экспериментального протокола, который должен гарантировать более надежное отвлечение внимания от стимуляции. Последнее может включать в себя отвлекающие задачи, предъявляемые в той же самой модальности, для разделения независимых от внимания и потому возможно автоматических лингвистических процессов от тех, которые требуют активного участия индивидуума. Как уже указывалось, мы с успехом использовали такой подход для подтверждения независимости синтаксической НР от внимания на ее самых ранних стадиях. Представляется необходимым перенести этот подход на исследования различных типов лингвистической информации.

Другим критическим моментом подхода НР к языку является небольшое количество стимулов, которое можно использовать в контексте одного эксперимента (достоинства этого подхода мы рассмотрели выше). Малое число используемых раздражителей и свя-

занная с этим необходимость их многократного повторения для записи качественного ВП, безусловно, приводят к трудностям в обобщении любых полученных результатов на весь естественный языковой ландшафт. В данном случае, несомненно полезными оказались повторные опыты с использованием различных слов, языков и экспериментальных установок. Возможным будущим направлением представляется увеличение разнообразия стимуляции, делая ее более репрезентативной по отношению к естественной речи. Такая стратегия уже успешно применялась к отдельным фонемам (Shestakova et al., 2004). Однако, перенос этого подхода на более сложные стимулы, хотя бы на уровень слов, требует строгого контроля над их физическими и, не менее важно, психолингвистическими параметрами, а также над вариативностью этих мер в группах экспериментальных стимулов. Несомненно, такая задача окажется нетривиальной для исследователей, желающих взяться за ее решение.

И, наконец, имеет место очевидный конфликт между, с одной стороны, традиционной интерпретацией НР, которая связывает ее с механизмами определения изменений в слуховом сенсорном канале и процессами кратковременной памяти, и, с другой стороны, природой откликов НР на речевые стимулы. Последние требуют для своего появления наличия следов долговременной памяти, а также проявляют сложные пространственно-временные паттерны, зачастую распространяющиеся на области за пределами слуховой коры. Это привело к предположению, что лингвистическая активация в парадигме рассогласования является отдельным процессом, который происходит в дополнение к классической, связанной с детекцией изменений негативности рассогласования (Pulvermüller & Shtyrov, 2006). Теоретически, можно предположить, что такие процессы не обязательно требуют затратной в плане длины эксперимента парадигмы рассогласования и, возможно, могут быть зарегистрированы и в других экспериментальных условиях. Таким образом, дальнейшее изучение экспериментальных условий, необходимых для надежной регистрации активации долговременных следов памяти в мозге в отсутствие внимания и при строгом контроле над параметрами стимулов, может не только пролить свет на лежащие в их основе процессы, но и привести к появлению улучшенных экспериментальных парадигм для исследования мозговых основ языковой функции человека.

Список литературы

- Alho, K. (1992) Selective attention in auditory processing as reflected by event-related brain potentials. *Psychophysiology*, 29, 247-263.
- Alho, K. (1995) Cerebral generators of mismatch negativity (MMN) and its magnetic counterpart (MMNm) elicited by sound changes. *Ear Hear*, 16, 38-51.
- Bentin, S., Mouchetant-Rostaing, Y., Giard, M. H., Echallier, J.F. & Pernier, J. (1999) ERP manifestations of processing printed words at different psycholinguistic levels: time course and scalp distribution. *J Cogn Neurosci*, 11, 235-260.
- Bonte, M.L., Mitterer, H., Zellagui, N., Poelmans, H. & Blomert, L. (2005) Auditory cortical tuning to statistical regularities in phonology. *Clin Neurophysiol*, 116, 2765-2774.
- Bonte, M.L., Poelmans, H. & Blomert, L. (2007) Deviant neurophysiological responses to phonological regularities in speech in dyslexic children. *Neuropsychologia*, 45, 1427-1437.
- Bornkessel, I., Zysset, S., Friederici, A.D., von Cramon, D.Y. & Schlesewsky, M. (2005) Who did what to whom? The neural basis of argument hierarchies during language comprehension. *Neuroimage*, 26, 221-233.
- Carlyon, R.P. (2004) How the brain separates sounds. *Trends Cogn Sci*, 8, 465-471.

- Cheour, M., Alho, K., Ceponiene, R., Reinikainen, K., Sainio, K., Pohjavuori, M., Aaltonen, O. & Näätänen, R. (1998) Maturation of mismatch negativity in infants. *Int J Psychophysiol*, 29, 217-226.
- Colin, C., Radeau, M., Soquet, A. & Deltenre, P. (2004) Generalization of the generation of an MMN by illusory McGurk percepts: voiceless consonants. *Clin Neurophysiol*, 115, 1989-2000.
- Colin, C., Radeau, M., Soquet, A., Demolin, D., Colin, F. & Deltenre, P. (2002) Mismatch negativity evoked by the McGurk-MacDonald effect: a phonetic representation within short-term memory. *Clin Neurophysiol*, 113, 495-506.
- Dehaene-Lambertz, G. (1997) Electrophysiological correlates of categorical phoneme perception in adults. *Neuroreport*, 8, 919-924.
- Dehaene-Lambertz, G., Dupoux, E. & Gout, A. (2000) Electrophysiological correlates of phonological processing: a cross-linguistic study. *J Cogn Neurosci*, 12, 635-647.
- Dell, G.S. (1986) A spreading-activation theory of retrieval in sentence production. *Psychological Review*, 93, 283-321.
- Diesch, E., Biermann, S. & Luce, T. (1998) The magnetic mismatch field elicited by words and phonological non-words. *Neuroreport*, 9, 455-460.
- Embick, D., Hackl, M., Schaeffer, J., Kelepir, M. & Marantz, A. (2001) A magnetoencephalographic component whose latency reflects lexical frequency. *Brain Res Cogn Brain Res*, 10, 345-348.
- Endrass, T., Mohr, B. & Pulvermüller, F. (2004) Enhanced mismatch negativity brain response after binaural word presentation. *Eur J Neurosci*, 19, 1653-1660.
- Escera, C., Alho, K., Winkler, I. & Näätänen, R. (1998) Neural mechanisms of involuntary attention to acoustic novelty and change. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 10, 590-604.
- Fodor, J. A. (1983) *The modularity of mind*. MIT Press, Cambridge, MA.
- Frege, G. (1980) *Über Sinn und Bedeutung* (first published in 1892). In Patzig, G. (ed.) *Funktion, Begriff, Bedeutung*. Huber, Göttingen, pp. 25-50.
- Friederici, A. (2002) Towards a neural basis of auditory sentence processing. *Trends in Cognitive Sciences*, 6, 78-84.
- Friederici, A.D., Pfeifer, E. & Hahne, A. (1993) Event-related brain potentials during natural speech processing: effects of semantic, morphological and syntactic violations. *Cognitive Brain Research*, 1, 183-192.
- Friederici, A.D., Wang, Y., Herrmann, C.S., Maess, B. & Oertel, U. (2000) Localization of early syntactic processes in frontal and temporal cortical areas: a magnetoencephalographic study. *Human Brain Mapping*, 11, 1-11.
- Fromkin, V. A. (1973) Introduction. In Fromkin, V. A. (ed.) *Speech errors as linguistic evidence*. Mouton, The Hague, Paris, pp. 11-45.
- Garrett, M. (1980) Levels of processing in sentence production. In Butterworth, B. (ed.) *Language Production I*. Academic Press, London, pp. 177-220.
- Garrett, M. (1984) The organization of processing structures for language production. In Caplan, D., Lecours, A.R., Smith, A. (eds.) *Biological perspectives on language*. MIT Press, Cambridge, MA, pp. 172-193.
- Garrod, S. & Pickering, M.J. (2004) Why is conversation so easy? *Trends Cogn Sci*, 8, 8-11.
- Gunter, T.C., Friederici, A.D. & Schriefers, H. (2000) Syntactic gender and semantic expectancy: ERPs reveal early autonomy and late interaction. *J Cogn Neurosci*, 12, 556-568.
- Hasting AS, Kotz SA, Friederici AD. (2007) Setting the stage for automatic syntax processing: the mismatch negativity as an indicator of syntactic priming. *J Cogn Neurosci*, 19, 386-400.
- Hauk, O., Johnsrude, I. & Pulvermüller, F. (2004) Somatotopic representation of action words in human motor and premotor cortex. *Neuron*, 41, 301-307.

- Hauk, O. & Pulvermüller, F. (2004) Neurophysiological distinction of action words in the fronto-central cortex. *Hum Brain Mapp*, 21, 191-201.
- Hebb, D.O. (1949) *The organization of behavior. A neuropsychological theory*. John Wiley, New York.
- Honbolygo, F., Csepe, V. & Rago, A. (2004) Suprasegmental speech cues are automatically processed by the human brain: a mismatch negativity study. *Neurosci Lett*, 363, 84-88.
- Jacobsen, T., Horvath, J., Schroger, E., Lattner, S., Widmann, A. & Winkler, I. (2004) Pre-attentive auditory processing of lexicality. *Brain Lang*, 88, 54-67.
- Kaan, E. & Swaab, T.Y. (2002) The brain circuitry of syntactic comprehension. *Trends Cogn Sci*, 6, 350-356.
- Kircher, T.T., Oh, T.M., Brammer, M.J. & McGuire, P.K. (2005) Neural correlates of syntax production in schizophrenia. *Br J Psychiatry*, 186, 209-214.
- Korpilahti, P., Krause, C.M., Holopainen, I. & Lang, A.H. (2001) Early and late mismatch negativity elicited by words and speech-like stimuli in children. *Brain Lang*, 76, 332-339.
- Korth, M. & Nguyen, N.X. (1997) The effect of stimulus size on human cortical potentials evoked by chromatic patterns. *Vision Research*, 37, 649-657.
- Krumbholz, K., Patterson, R.D., Seither-Preisler, A., Lammertmann, C. & Lutkenhoner, B. (2003) Neuromagnetic evidence for a pitch processing center in Heschl's gyrus. *Cereb Cortex*, 13, 765-772.
- Kujala, A., Alho, K., Valle, S., Sivonen, P., Ilmoniemi, R.J., Alku, P. & Näätänen, R. (2002) Context modulates processing of speech sounds in the right auditory cortex of human subjects. *Neurosci Lett*, 331, 91-94.
- Kutas, M. & Hillyard, S.A. (1980) Reading senseless sentences: brain potentials reflect semantic incongruity. *Science*, 207, 203-205.
- Levelt, W.J.M., Roelofs, A. & Meyer, A.S. (1999) A theory of lexical access in speech production. *Behavioral and Brain Sciences*, 22, 1-75.
- Lutkenhoner, B., Krumbholz, K., Lammertmann, C., Seither-Preisler, A., Steinstrater, O. & Patterson, R.D. (2003) Localization of primary auditory cortex in humans by magnetoencephalography. *Neuroimage*, 18, 58-66.
- MacKay, D.G. (1987) *The organization of perception and action. A theory of language and other cognitive skills*. Springer-Verlag, New York.
- Marslen-Wilson, W. (1973) Linguistic structure and speech shadowing at very short latencies. *Nature*, 244, 522-523.
- Marslen-Wilson, W. & Tyler, L.K. (1975) Processing structure of sentence perception. *Nature*, 257, 784-786.
- Marslen-Wilson, W.D. (1985) Speech shadowing and speech comprehension. *Speech Communication*, 4, 55-74.
- Marslen-Wilson, W.D. (1987) Functional parallelism in spoken word-recognition. *Cognition*, 25, 71-102.
- Menning, H., Zwitserlood, P., Schoning, S., Hihn, H., Bolte, J., Dobel, C., Mathiak, K. & Lutkenhoner, B. (2005) Pre-attentive detection of syntactic and semantic errors. *Neuroreport*, 16, 77-80.
- Mohr, B. & Pulvermüller, F. (2002) Redundancy gains and costs in cognitive processing: effects of short stimulus onset asynchronies. *Journal of Experimental Psychology: Learning, Memory and Cognition*, 28, 1200-1223.
- Morton, J. (1969) The interaction of information in word recognition. *Psychological Review*, 76, 165-178.
- Moss, H.E., McCormick, S.F. & Tyler, L. (1997) The time course of activation of semantic information during spoken word recognition. *Language and Cognitive Processes*, 12, 695-731.
- Münte, T.F., Schiltz, K. & Kutas, M. (1998) When temporal terms belie conceptual order. *Nature*, 395, 71-73.
- Näätänen, R. (1995) The mismatch negativity: a powerful tool for cognitive neuroscience. *Ear Hear*, 16, 6-18.
- Näätänen, R. (2000) Mismatch negativity (MMN): perspectives for application. *Int J Psychophysiol*, 37, 3-10.
- Näätänen, R. (2001) The perception of speech sounds by the human brain as reflected by the mismatch negativity (MMN) and its magnetic equivalent (MMNm). *Psychophysiology*, 38, 1-21.

- Näätänen, R. & Alho, K. (1995) Mismatch negativity--a unique measure of sensory processing in audition. *Int J Neurosci*, 80, 317-337.
- Näätänen, R., Lehtokoski, A., Lenneberg, M., Cheour, M., Huotilainen, M., Iivonen, A., Vainio, M., Alku, P., Ilmoniemi, R.J., Luuk, A., Allik, J., Sinkkonen, J. & Alho, K. (1997) Language-specific phoneme representations revealed by electric and magnetic brain responses. *Nature*, 385, 432-434.
- Näätänen, R. & Picton, T. (1987) The N1 wave of the human electric and magnetic response to sound: a review and an analysis of the component structure. *Psychophysiology*, 24, 375-425.
- Näätänen, R., Tervaniemi, M., Sussman, E., Paavilainen, P. & Winkler, I. (2001) 'Primitive intelligence' in the auditory cortex. *Trends in Neurosciences*, 24, 283-288.
- Neville, H., Nicol, J.L., Barss, A., Forster, K.I. & Garrett, M. F. (1991) Syntactically based sentence processing classes: evidence from event-related brain potentials. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 3, 151-165.
- Norris, D., McQueen, J.M. & Cutler, A. (2000) Merging information in speech recognition: Feedback is never necessary. *Behavioral and Brain Sciences*, 23, 299-370.
- Obleser, J., Lahiri, A. & Eulitz, C. (2004) Magnetic brain response mirrors extraction of phonological features from spoken vowels. *J Cogn Neurosci*, 16, 31-39.
- Osterhout, L. (1997) On the brain response to syntactic anomalies: manipulations of word position and word class reveal individual differences. *Brain Lang*, 59, 494-522.
- Osterhout, L. & Hagoort, P. (1999) A superficial resemblance does not necessarily mean you are part of the family: Counterarguments to Coulson, King and Kutas (1998) in the P600/SPS-P300 debate. *Language and Cognitive Processes*, 14, 1-14.
- Osterhout, L. & Holcomb, P.J. (1992) Event-related brain potentials elicited by syntactic anomaly. *Journal of Memory and Language*, 31, 785-806.
- Osterhout, L., McLaughlin, J. & Bersick, M. (1997) Event-related brain potentials and human language. *Trends in Cognitive Sciences*, 1, 203-209.
- Osterhout, L. & Swinney, D.A. (1993) On the temporal course of gap-filling during comprehension of verbal passives. *Journal of Psycholinguistic Research*, 22, 273-286.
- Paavilainen, P., Alho, K., Reinikainen, K., Sams, M. & Näätänen, R. (1991) Right hemisphere dominance of different mismatch negativities. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 78, 466-479.
- Penfield, W. & Rasmussen, T. (1950) *The cerebral cortex of man*. Macmillan, New York.
- Penolazzi, B., Hauk, O. & Pulvermüller, F. (2007) Early semantic context integration and lexical access as revealed by event-related brain potentials. *Biol Psychol*, 74, 374-388.
- Pettigrew, C.M., Murdoch, B.E., Ponton, C.W., Finnigan, S., Alku, P., Kei, J., Sockalingam, R. & Chenery, H. J. (2004) Automatic auditory processing of English words as indexed by the mismatch negativity, using a multiple deviant paradigm. *Ear Hear*, 25, 284-301.
- Pickering, M.J. & Garrod, S. (2004) Toward a mechanistic psychology of dialogue. *Behav Brain Sci*, 27, 169-190; discussion 190-226.
- Picton, T. & Hillyard, S. (1974) Human auditory evoked potentials: II. Effects of attention. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 36, 191-200.
- Poeppel, D., Yellin, E., Phillips, C., Roberts, T.P., Rowley, H.A., Wexler, K. & Marantz, A. (1996) Task-induced asymmetry of the auditory evoked M100 neuromagnetic field elicited by speech sounds. *Brain Res Cogn Brain Res*, 4, 231-242.
- Pulvermüller, F. (1999) Words in the brain's language. *Behavioral and Brain Sciences*, 22, 253-336.
- Pulvermüller, F. (2001) Brain reflections of words and their meaning. *Trends in Cognitive Sciences*, 5, 517-524.
- Pulvermüller, F. (2005) Brain mechanisms linking language and action. *Nat Rev Neurosci*, 6, 576-582.

- Pulvermüller, F. & Assadollahi, R. (2007) Grammar or serial order?: discrete combinatorial brain mechanisms reflected by the syntactic mismatch negativity. *J Cogn Neurosci*, 19, 971-980.
- Pulvermüller, F., Kujala, T., Shtyrov, Y., Simola, J., Tiitinen, H., Alku, P., Alho, K., Martinkauppi, S., Ilmoniemi, R.J. & Näätänen, R. (2001) Memory traces for words as revealed by the mismatch negativity. *Neuroimage*, 14, 607-616.
- Pulvermüller, F. & Shtyrov, Y. (2003) Automatic processing of grammar in the human brain as revealed by the mismatch negativity. *Neuroimage*, 20, 159-172.
- Pulvermüller, F. & Shtyrov, Y. (2006) Language outside the focus of attention: the mismatch negativity as a tool for studying higher cognitive processes. *Prog Neurobiol*, 79, 49-71.
- Pulvermüller, F., Shtyrov, Y., Hasting, A.S. & Carlyon, R.P. (2008) Syntax as a reflex: neurophysiological evidence for early automaticity of grammatical processing. *Brain Lang*, 104, 244-253.
- Pulvermüller, F., Shtyrov, Y. & Ilmoniemi, R. (2003) Spatiotemporal dynamics of neural language processing: an MEG study using minimum-norm current estimates. *Neuroimage*, 20, 1020-1025.
- Pulvermüller, F., Shtyrov, Y. & Ilmoniemi, R. (2005) Brain signatures of meaning access in action word recognition. *J Cogn Neurosci*, 17, 884-892.
- Pulvermüller, F., Shtyrov, Y., Ilmoniemi, R.J. & Marslen-Wilson, W.D. (2006) Tracking speech comprehension in space and time. *Neuroimage*, 31, 1297-1305.
- Pulvermüller, F., Shtyrov, Y., Kujala, T. & Näätänen, R. (2004) Word-specific cortical activity as revealed by the mismatch negativity. *Psychophysiology*, 41, 106-112.
- Pylkkanen, L., Stringfellow, A. & Marantz, A. (2002) Neuromagnetic evidence for the timing of lexical activation: an MEG component sensitive to phonotactic probability but not to neighborhood density. *Brain Lang*, 81, 666-678.
- Rastle, K., Davis, M. H., Marslen-Wilson, W.D. & Tyler, L.K. (2000) Morphological and semantic effects in visual word recognition: a time-course study. *Language and Cognitive Processes*, 15, 507-537.
- Schröger, E. (1996) On detection of auditory deviations: a pre-attentive activation model. *Psychophysiology*, 34, 245-257.
- Sereno, S.C., Brewer, C.C. & O'Donnell, P.J. (2003) Context effects in word recognition: evidence for early interactive processing. *Psychol Sci*, 14, 328-333.
- Sereno, S.C. & Rayner, K. (2003) Measuring word recognition in reading: eye movements and event-related potentials. *Trends Cogn Sci*, 7, 489-493.
- Shetakova, A., Brattico, E., Soloviev, A., Klucharev, V. & Huotilainen, M. (2004) Orderly cortical representation of vowel categories presented by multiple exemplars. *Brain Res Cogn Brain Res*, 21, 342-350.
- Shtyrov, Y., Hauk, O. & Pulvermüller, F. (2004) Distributed neuronal networks for encoding category-specific semantic information: the mismatch negativity to action words. *Eur J Neurosci*, 19, 1083-1092.
- Shtyrov, Y., Kujala, T., Ahveninen, J., Tervaniemi, M., Alku, P., Ilmoniemi, R.J. & Näätänen, R. (1998) Background acoustic noise and the hemispheric lateralization of speech processing in the human brain: magnetic mismatch negativity study. *Neurosci Lett*, 251, 141-144.
- Shtyrov, Y., Kujala, T., Palva, S., Ilmoniemi, R.J. & Näätänen, R. (2000) Discrimination of speech and of complex nonspeech sounds of different temporal structure in the left and right cerebral hemispheres. *Neuroimage*, 12, 657-663.
- Shtyrov, Y., Pihko, E. & Pulvermüller, F. (2005) Determinants of dominance: is language laterality explained by physical or linguistic features of speech? *Neuroimage*, 27, 37-47.
- Shtyrov, Y. & Pulvermüller, F. (2002) Neurophysiological evidence of memory traces for words in the human brain. *Neuroreport*, 13, 521-525.

- Shtyrov, Y. & Pulvermüller, F. (2007) Early MEG activation dynamics in the left temporal and inferior frontal cortex reflect semantic context integration. *J Cogn Neurosci*, 19, 1633-1642.
- Shtyrov, Y., Pulvermüller, F., Näätänen, R. & Ilmoniemi, R.J. (2003) Grammar processing outside the focus of attention: an MEG study. *J Cogn Neurosci*, 15, 1195-1206.
- Sittiprapaporn, W., Chindaduangratn, C., Tervaniemi, M. & Khotchabhakdi, N. (2003) Preattentive processing of lexical tone perception by the human brain as indexed by the mismatch negativity paradigm. *Ann N Y Acad Sci*, 999, 199-203.
- Stockall, L., Stringfellow, A. & Marantz, A. (2004) The precise time course of lexical activation: MEG measurements of the effects of frequency, probability, and density in lexical decision. *Brain Lang*, 90, 88-94.
- Tiitinen, H., May, P. & Näätänen, R. (1997) The transient 40-Hz response, mismatch negativity, and attentional processes in humans. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 21, 751-771.
- Tiitinen, H., May, P., Reinikainen, K. & Näätänen, R. (1994) Attentive novelty detection in humans is governed by pre-attentive sensory memory. *Nature*, 372, 90-92.
- Tyler, L., Moss, H.E., Galpin, A. & Voice, J. K. (2002) Activating meaning in time: The role of imageability and form-class. *Language and Cognitive Processes*, 17, 471-502.
- Weber, C., Hahne, A., Friedrich, M. & Friederici, A.D. (2004) Discrimination of word stress in early infant perception: electrophysiological evidence. *Brain Res Cogn Brain Res*, 18, 149-161.
- Winkler, I., Kujala, T., Tiitinen, H., Sivonen, P., Alku, P., Lehtokoski, A., Czigler, I., Csepe, V., Ilmoniemi, R.J. & Näätänen, R. (1999) Brain responses reveal the learning of foreign language phonemes. *Psychophysiology*, 36, 638-642.
- Woods, D.L., Alho, K. & Algazi, A. (1993a) Intermodal selective attention: evidence for processing in tonotopic auditory fields. *Psychophysiology*, 30, 287-295.
- Woods, D.L., Knight, R.T. & Scabini, D. (1993b) Anatomical substrates of auditory selective attention: behavioral and electrophysiological effects of posterior association cortex lesions. *Brain Res Cogn Brain Res*, 1, 227-240.
- Yamasaki, H., LaBar, K.S. & McCarthy, G. (2002) Dissociable prefrontal brain systems for attention and emotion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 11447-11451.
- Yantis, S., Schwarzbach, J., Serences, J.T., Carlson, R.L., Steinmetz, M.A., Pekar, J. J. & Courtney, S.M. (2002) Transient neural activity in human parietal cortex during spatial attention shifts. *Nature Neuroscience*, 5, 995-1002.
- Zwitzerlood, P. (1989) The locus of the effects of sentential-semantic context in spoken-word processing. *Cognition*, 32, 25-64.