

УДК 591.181:004.942

## ОБ ОСОБЕННОСТЯХ РАСПРОСТРАНЕНИЯ СИГНАЛОВ В НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ *C. ELEGANS*

© 2014 г. А.Ю. Пальянов<sup>1</sup>, А.С. Ратушняк<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт систем информатики им. А.П. Ершова  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: palyanov@iis.nsk.su;

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Конструкторско-технологический институт вычислительной техники  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия,  
e-mail: ratush@kti.nsc.ru

Поступила в редакцию 16 сентября 2014 г. Принята к публикации 31 октября 2014 г.

Среди организмов, наиболее широко используемых для изучения фундаментальных механизмов функционирования нервной системы, нематода *Caenorhabditis elegans* занимает особое место благодаря исключительно малому количеству нейронов. Уже на протяжении 25 лет она остается единственным организмом, для которого определен *коннектом* – описание всех нейронов и межнейронных связей. Однако этих данных оказалось в значительной степени недостаточно, для того чтобы разобраться в механизмах работы даже столь малой нервной системы. Последующие годы были посвящены как экспериментальным исследованиям, существенно дополнившим изначально полученные знания, так и созданию компьютерных моделей, охватывающих отдельные фрагменты нервной и мышечной систем. С 2005 г. предпринимаются попытки создания виртуальной копии *C. elegans* – сложной компьютерной модели, объединяющей нервную, сенсорную и мышечную системы, тело и фрагмент окружающей среды. Несмотря на определенный прогресс в этом направлении, результаты работы не столько приблизили исследователей к решению задачи, сколько пролили свет на ее действительную сложность. В данной работе мы проанализируем ряд проблем, возникающих перед исследователем, задавшимся целью создать биологически обоснованную модель нервной системы *C. elegans*, на примере простейшего нервного контура, связанного с реакцией на механосенсорный сигнал.

**Ключевые слова:** *C. elegans*, нейробиология, коннектом, моделирование, электротоническое проведение сигнала.

### ВВЕДЕНИЕ

Задачи анализа работы биологических информационных систем обусловлены как возникшими в последние годы новыми возможностями их реинжиниринга, так и потребностями в понимании причин возникновения нейрональных расстройств, необходимостью поиска средств и методов их коррекции. При этом основной вектор исследований ориентирован на теоретико-экспериментальный анализ молекулярных механизмов работы нервных клеток и нейронных систем достаточно продвинутых в эволюционном смысле организмов.

Однако методология анализа многоуровневых молекулярных информационных систем, какими являются нейроны таких организмов, пока недостаточно развита. Известно, что в процессе эволюции изменялись и усовершенствовались межклеточные коммуникации и структурная организация нервной системы. Однако основной вектор развития ориентирован на усложнение и усовершенствование, прежде всего, внутриклеточных молекулярных сигнальных процессов (Barbosa-Morais *et al.*, 2012). При этом молекулярная организация многих базовых функций, возникшая на ранних этапах эволюции, в той или иной мере сохранилась и

у организмов, находящихся на более высоком уровне эволюционного развития. Поэтому структурно-функциональный анализ работы более простых нейронов и нейронных систем позволяет надеяться на выявление базовых функций, лежащих в основе как простых нейронных реакций, так и более эволюционно усовершенствованных.

*C. elegans* среди простых организмов принадлежит особая роль. С точки зрения нейробиологии это, пожалуй, самый изученный на сегодня многоклеточный организм, состоящий всего из 959 клеток, 302 из которых – нейроны. Пионерская работа J.G. White с соавт. (1986) по определению строения *C. elegans* на клеточном уровне потребовала 12 лет упорного труда и положила начало целому ряду направлений в исследовании этого организма. Основной ее акцент был сделан на исследовании архитектуры нервной системы, включая морфологию нейронов, их отростков, а также связей нейронов между собой и с мышечными клетками организма. По оценкам J.G. White с соавт. (1986), коннектом *C. elegans* включает около 5 000 химических синапсов и около 2 000 эфасов (электрических щелевых контактов, «gap junctions»), которые, в отличие от первых, способны проводить сигнал в обоих направлениях. Дальнейшие исследования привели к тому, что диаграмма связности нейронной сети *C. elegans*, по оценкам L.R. Varshney с соавт. (2011), завершена приблизительно на 90 %.

Таким образом, в настоящее время *C. elegans* – пожалуй, единственный многоклеточный организм, для которого существует потенциальная возможность создания его виртуального двойника – на пределе возможностей современной науки и технологий. За десятилетия исследований уже вложены настолько значительные усилия, что никакой другой многоклеточный организм не сможет с ним сравниться в этом отношении в обозримом будущем. Несмотря на кажущуюся простоту, эта нематода имеет довольно широкий спектр поведенческих паттернов, обладает зачатками памяти и способна к формированию условных рефлексов (Rankin, 2004). Многие исследователи разделяют мнение, что именно *C. elegans* может оказаться ключом к пониманию фундаментальных принципов работы нервной системы. Сенсорная система *C. elegans*

способна воспринимать механические воздействия различного характера, концентрации широкого спектра химических веществ, температуру окружающей среды и степень освещенности в видимом диапазоне. Все эти факторы будет необходимо учесть при создании виртуального организма и изначально принимать во внимание при разработке его модели.

Предположим, однако, что мы уже сейчас обладаем достоверной информацией о расположении и типах всех межнейронных контактов в нервной системе *C. elegans*. Какая еще информация понадобится для того, чтобы достоверно описывать и рассчитывать распространение сигналов по нейронной сети? В данной работе мы попробуем вкратце познакомиться с тем, какие проблемы могут встретиться на пути исследователя, задавшегося целью создать биологически обоснованную компьютерную модель нервной системы *C. elegans*, построенную по образу и подобию живого организма. Основное внимание будет уделено коннектому, или диаграмме связности нейронной сети, нейрофизиологическим характеристикам отдельного нейрона, а также наблюдаемым характеристикам, описывающим поведение *C. elegans*, связанным с его нейронной активностью.

## ДИАГРАММА СВЯЗНОСТИ НЕЙРОННОЙ СЕТИ

Нервная система взрослой особи *C. elegans* мужского пола содержит 383 нейрона, а гермафродита – 302, других полов нет (White *et al.*, 1986). Последняя, вероятно, из-за меньшего числа нейронов является более изученной, и именно о ней будет идти речь в данной работе. Информация о коннектоме на сегодняшний день представлена различными источниками данных. Основная информация по данному вопросу представлена в табл. 1.

Интерактивная веб-страница, отображающая информацию о нейронах и связях между ними, основанная на объединенных данных, полученных до 1999 г., доступна онлайн (<http://wormweb.org/details.html>) и включает в себя 5 396 химических синапсов, 1 783 эфаса и 1 290 нейромышечных соединений. С другой стороны, согласно данным проекта WormWiring.org (более детальная реконструкция, вклю-

Таблица 1

Число синаптических контактов в нервной системе *C. elegans*  
по данным разных источников

Число химических синапсов	Число эфаспов («gap junctions»)	Число нейромышечных соединений	Литературный источник
~ 5000	~ 2000	?	White <i>et al.</i> , 1986
5396	1883	1290	<a href="http://wormweb.org/details.html">http://wormweb.org/details.html</a>
3419	2190	?	<a href="http://wormwiring.org">http://wormwiring.org</a>
6393	890	1410	<a href="http://wormatlas.org">http://wormatlas.org</a>

чающая морфологию нейритов и координаты контактов между ними), к настоящему времени обнаружено 3 419 химических синапсов и 2 190 эфаспов. Этот проект находится в процессе реализации и к настоящему времени данные реконструкции базируются на двух сериях электронных микрофотографий (ТЭМ) поперечных срезов *C. elegans* в интервалах примерно от 0,09 до 0,61 («N2U», 5041 изображение) и от 0,85 до 1,0 («JSE», 2143 изображения), где 0 – головной, а 1 – хвостовой конец (полный список серий доступен на веб-ресурсе <http://www.wormimage.org/wormList.php>). Наиболее современный взгляд на достигнутые результаты реконструкции нервной системы *C. elegans* изложен в работе L.R. Varshney с соавт. (2011). Согласно мнению авторов, хотя нейронная сеть *C. elegans* относительно мала и практически идентична для каждого экземпляра данного вида, опубликованные ранее диаграммы связности между нейронами не являются ни точными, ни полными, ни самосогласованными. Им удалось на основе тех же и новых серий микрофотографий создать полную, самосогласованную диаграмму связности нейронной сети, включающую 6 393 химических синапса, 890 эфаспов и 1 410 нейромышечных соединений. Относительно предыдущей версии было добавлено более 3 000 синаптических контактов, включая химические синапсы, эфаспы и нейромышечные соединения. Поскольку сумма для WormWiring.org составляет 8 469, а по Varshney с соавт. (2011) – 8 693, то, по-видимому, из 3 000 новых синаптических контактов значительная часть заменила прежние ошибочные данные. Varshney с соавт. (2011) считают, что несмотря на значительный прогресс, диаграмма связности нейронной сети

*C. elegans* завершена приблизительно на 90 % из-за недостающих данных и технических трудностей. Описанные результаты реконструкции доступны на веб-ресурсе WormAtlas.org.

### ОБ ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИИ НЕЙРОНОВ *C. ELEGANS*

В нервной системе *C. elegans* имеется обычный набор ионных каналов. Геном содержит все известные семейства  $K^+$  каналов, потенциал-зависимые  $Ca^{2+}$  каналы, и другие катионные каналы,  $Cl^-$  каналы, а также каналы, зависимые от циклических нуклеотидов (cyclic-nucleotide-gated) (Wei *et al.*, 1996; Bargmann, 1998). Однако есть одно фундаментальное отличие – отсутствие потенциал-зависимых  $Na^+$  каналов, лежащих в основе передачи, кодирования и обработки сигналов посредством потенциалов действия (ПД) в большинстве нервных систем. Это подтверждается как отсутствием  $Na^+$  каналов в геноме *C. elegans*, так и электрофизиологическими экспериментами, показывающими отсутствие быстрых  $Na^+$  токов. Таким образом, функции, выполняемые в нервных системах других организмов посредством потенциала действия, у *C. elegans*, по-видимому, осуществляют градуальная деполяризация и электротоническое проведение. Предположительно, ионные каналы *C. elegans* адаптированы для этого необычного режима функционирования (Nickell *et al.*, 2002).

Ключевая роль в электротоническом проведении принадлежит ионам  $Ca^{2+}$ , участвующим в генерации тока через возбудимую мембрану нейрона (исключительно важная деталь в свете того, что нейроны *C. elegans* не способны генерировать ПД) (Goodman *et al.*, 1998). Кальций

выполняет также ряд других специализированных функций: высвобождение синаптических везикул, содержащих нейромедиатор, модуляцию активности ионных каналов. Важную роль играют также калиевые каналы, модулирующие потенциал покоя нейрона и являющиеся, таким образом, определяющими факторами для возбуждения нейрона и работы синапсов. Исследование 43 различных нейронов из латерального, вентрального и дорсального ганглиев (содержащих сенсорные нейроны, интернейроны и мотонейроны) методом фиксации потенциала (**voltage clamp**) выявило сходную для всех них картину. Ток ионов  $K^+$  наружу клетки и встречный ток ионов  $Ca^{2+}$  внутрь клетки, активируемые при деполяризации, обеспечивают околонулевой полный ток через мембрану в интервале от  $-30$  до  $-90$  мВ, ее высокое сопротивление и высокую чувствительность к сенсорным или синаптическим сигналам. За пределами этого интервала гиперполяризация активирует ток внутрь клетки, а деполяризация – наружу. Таким образом, все вышеупомянутые нейроны *C. elegans* оказались практически изопотенциальными в состоянии покоя (Goodman *et al.*, 1998). Также имеется свидетельство, что для хемосенсорного нейрона AWA потенциал, соответствующий нулевому току через мембрану (**zero-current potential**), равен  $-40$  мВ, а область высокого сопротивления лежит в интервале от  $-40$  до  $-60$  мВ; помимо этого, для множества (21) различных неидентифицированных нейронов головного нервного ганглия 17 нейронов имели потенциал нулевого тока в интервале от  $-16$  до  $-22$  мВ, а остальные 4 показали значения  $-65$ ,  $-31$ ,  $-37$  и  $-44$  мВ (Nickell *et al.*, 2002). Потенциал нулевого тока иногда используют как оценочную величину для потенциала покоя, однако в данном случае, как мы видим, околонулевой ток регистрируется в достаточно широком интервале напряжений.

Для большинства изученных нервных систем в зависимости от типа нейрона мембранный потенциал покоя имеет величину от  $-30$  до  $-100$  мВ. Относительно значения потенциала покоя нейронов *C. elegans* имеются весьма скудные данные ввиду чрезвычайной сложности такого измерения, обусловленной по меньшей мере двумя существенными факторами. Во-первых, тело взрослой нематоды имеет длину

всего  $1,0 \dots 1,2$  мм и покрыто достаточно прочной эластичной оболочкой, форму которой поддерживает избыточное внутреннее давление (гидростатический скелет), так что добраться сквозь нее до нейронов само по себе является нелегкой задачей. Во-вторых, нейроны чрезвычайно малы: всего  $2-3$   $\mu\text{m}$  (Schafer, 2006); для сравнения, размеры тела нейрона человека варьируют от  $5$  до  $120$   $\mu\text{m}$ . Несмотря на описанные сложности, недавно (Piggott *et al.*, 2011) методом фиксации тока (**current clamp**) удалось провести измерения для сенсорного нейрона ASH и интернейронов AVA, AIB и R1M. Показано, что потенциал покоя R1M имеет значение около  $-20$  мВ, а AIB – около  $-50$  мВ, что достаточно близко к рассмотренным выше значениям потенциала нулевого тока. Для сравнения, потенциал покоя нейронов значительно более крупной нематоды *Ascaris suum* также имеет достаточно высокое значение: около  $-40$  мВ.

Электротоническое проведение сигналов имеет существенные отличия по сравнению с потенциалами действия. Амплитуда и длительность ПД фиксированы благодаря лежащему в его основе механизму активного распространения, позволяющему преодолевать значительные расстояния (до  $1-1,5$  м) при скорости до  $100-150$  м/с и частоте импульсов до  $500$  Гц (в нервной системе человека). Электротоническое проведение, происходящее без участия импульсных процессов, основано на пассивном распространении сигнала. Напряжение, приложенное к нервному волокну, не распространяется на значительное расстояние из-за низкой проводимости аксоплазмы и утечек тока через мембрану нейрона. В результате напряжение в зависимости от расстояния между отводящим электродом и точкой инъекции тока спадает экспоненциально и характеризуется постоянной длиной волокна  $\lambda$  (расстояние, на котором потенциал снижается в  $e$  раз, т. е. до  $37\%$  от начального значения). Постоянная длины волокна зависит от удельного сопротивления мембраны  $R_m$  (Ом·см<sup>2</sup>), удельного сопротивления аксоплазмы  $R_i$  (Ом·см) и диаметра нервного волокна  $d$ :  $\lambda = \sqrt{\frac{d \cdot R_m}{4R_i}}$ , (Rall, 1989).

Диаметр нервного волокна у нейронов *C. elegans* варьирует в пределах от  $0,1$  до  $0,5$   $\mu\text{m}$ , а длина некоторых нейритов превышает  $1$  мм.

Измерение  $R_m$  и  $R_i$  для *C. elegans* ввиду малого размера нейронов представляется чрезвычайно сложным, однако имеются данные, полученные на 4 мотонейронах нематоды *Ascaris suum*:  $R_m$  лежало в пределах 61–251 кОм·см<sup>2</sup> (среднее значение 150 кОм·см<sup>2</sup>), а  $R_i$  – в пределах от 79 до 314 Ом·см (среднее значение 180 Ом·см) (Roehrig, 1998). Для сравнения, при измерениях на животных других видов данные варьировали в диапазоне от 1 до 50 кОм·см<sup>2</sup> ( $R_m$ ) и от 30 до 250 Ом·см ( $R_i$ ). Это согласуется с наблюдением, что нейроны *C. elegans* имеют заметно более высокое сопротивление мембраны нейрона, чем у других организмов, благодаря малому числу ионных каналов на единицу площади. Расчеты на основе приведенных величин дают значение  $\lambda$  (с учетом различных  $d$  в пределах от 0,2 до 0,3 мкм) в пределах от 0,3 до 1,5 мм (среднее – 0,73 мм), что действительно подтверждает возможность электротонического распространения сигнала на всю длину нейритов *C. elegans*.

Нейроны с электротоническим проведением сигнала также встречаются в сетчатке и других отделах ЦНС позвоночных, в глазу усоногих раков, в нервной системе насекомых и в стоматогастральном ганглии ракообразных. Обычно общая длина этих клеток не превышает нескольких миллиметров, и, как правило, для них характерно высокое удельное сопротивление мембраны, благодаря чему достигается эффективное электротоническое распространение сигналов с малым затуханием. По мере распространения подобные сигналы угасают, однако их амплитуда остается все же достаточно высокой, для того чтобы, дойдя до окончаний нейронов, они могли инициировать высвобождение медиатора. (Эккерт и др., 1991, Гл. 6).

Одним из важнейших параметров, описывающих электротоническое проведение сигнала, является скорость распространения электрического возбуждения по мембране нейрита. Согласно расчетам Johnston и Wu (1995), она выражается формулой:

$$\theta = \sqrt{\frac{2d}{R_m \cdot R_i \cdot C_m^2}},$$

где  $C_m$  – удельная емкость единицы площади мембраны нейрона, составляющая около 1 мкФ/см<sup>2</sup> для всех нервных и мышечных волокон (клеточные мембраны образованы липидным бислоем толщиной всего 5 нм, благодаря

чему могут накапливать достаточно большой заряд). Таким образом, получаем, что для нейронов *C. elegans* предполагаемые значения лежат в интервале от 7,1 до 35,3 мм/с, т. е. даже при минимальной скорости сигнал пройдет от головного до хвостового конца за 0,14 с. Стоит отметить, что поскольку  $\lambda$ , и  $\theta$  зависят одновременно от  $R_m$  и  $R_i$ , причем различным образом, то максимум и минимум  $\lambda$  вовсе не совпадают с максимумом или минимумом  $\theta$ . Так, для минимального  $\lambda = 0,3$  мм  $\theta = 14,4$  мм/с, для максимального  $\lambda = 1,5$  мм  $\theta = 17,4$  мм/с; минимальному  $\theta = 7,1$  мм/с соответствует  $\lambda = 0,63$  и максимальному  $\theta = 1,54$  мм/с соответствует  $\lambda = 0,76$  мм. При этом в результате затухания сигнала на участке нейрита длиной 1 мм его амплитуда составит, предположительно, от 3 % (для  $\lambda = 0,3$  мм) до 51 % (для  $\lambda = 1,5$  мм) относительно исходного значения. Видно, что степень затухания может изменяться достаточно существенно в зависимости от  $\lambda$ , поэтому весьма желательно знать как можно более точное ее значение.

Теперь, обладая базовыми представлениями о распространении сигналов в нервной системе *C. elegans*, попробуем применить эти знания на практике для анализа простейшего фрагмента ее нейронной сети.

### НЕЙРОННЫЙ КОНТУР, ОТВЕТСТВЕННЫЙ ЗА ВОСПРИЯТИЕ СЛАБЫХ ПРИКОСНОВЕНИЙ. СВЯЗЬ НЕЙРОННОЙ АКТИВНОСТИ И НАБЛЮДАЕМЫХ ПАРАМЕТРОВ ДВИЖЕНИЯ

В нервной системе *C. elegans* имеются 6 механосенсорных нейронов, обладающих длинными отростками. Нейриты первых 3 (ALML, ALMR и AVM) иннервируют переднюю половину тела, а оставшихся 3 (PLML, PLMR и PVM) – заднюю (Chalfie et al., 1985). Слабые прикосновения (от 0,1 мН) способны вызывать быстро активирующиеся механорецепторные токи; большие силы вызывают большие токи, выходящие на насыщение в области 1–2 мН (O'Hagan et al., 2005). Начиная от 100 мН активируются другие нейроны, реагирующие на сильное давление. Обычно в экспериментах для того чтобы вызвать реакцию на слабое

прикосновение, используют одиночный волосок ресницы. При этом нематода почти сразу после касания меняет направление своего движения с прямого на обратное (<http://www.youtube.com/watch?v=olrkWpCqVCE>). Такое поведение сформировалось в ходе эволюции и предназначено для того, чтобы избегать попадания в кольца-ловушки хищных грибов *Drechlerella doedycoides*, встречающихся в естественной среде обитания *C. elegans*. Показано, что задержка между моментом касания внутренней стороны кольца и срабатыванием ловушки составляет около 5 с (Maguire *et al.*, 2011). Описанная реакция *C. elegans* на прикосновение представляет собой пример того, как нейронная сеть преобразует входной сенсорный сигнал в координированный двигательный ответ. Попробуем разобраться, как устроен и как работает данный нейронный контур.

Упомянутая выше высокая сложность электрофизиологических измерений активности нейронов *C. elegans* и неизбежное при этом повреждение оболочки тела, исключающее возможность наблюдения поведения интактной нематоды одновременно с регистрацией ее нейронной активности, побудили исследователей искать альтернативные способы для решения этой задачи. Весьма успешным оказался подход, основанный на оптогенетике. Была создана трансгенная линия *C. elegans*, у которой в вышеупомянутых 6 механосенсорных нейронах экспрессировался флюоресцентный белок YC2.12, содержащий одновременно CFP и YFP компоненты (Suzuki *et al.*, 2003). В присутствии ионов  $Ca^{2+}$  отношение между интенсивностями флюоресценции на длинах волн, соответствующих CFP (Cyan Fluorescent Protein) и YFP (Yellow Fluorescent Protein), отражает изменение внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  (Miyawaki *et al.*, 1997). Значительный интерес представляет эксперимент по измерению времени распространения сигнала по дендриту нейрона ALM (точнее билатерально симметричная пара нейронов – левый ALML или правый ALMR; какой именно был задействован в эксперименте – не уточняется). Тело нейрона ALM расположено в средней части нематоды (относительно направления голова–хвост), а длинный дендрит идет в направлении к голове, иннервируя переднюю половину тела. В экспе-

рименте Suzuki с соавт. (2003) было показано, что легкое касание передней половины тела червя (продолжительность стимула – 90 мс) на расстоянии около 350  $\mu$ м до тела нейрона ALM привело к достижению статистически значимого уровня активации самого нейрона (на основании уровня  $Ca^{2+}$ ) через 45 мс после момента начала стимуляции. В течение первых 22 мс не было никакого свидетельства ответа нейрона на возбуждение. По мнению авторов, неясно, какая доля 20–30 мс задержки соответствует времени распространения сигнала по дендриту до тела нейрона. Однако эти данные все-таки позволят нам оценить минимальную скорость электротонического распространения сигнала, равную 350  $\mu$ м/22 мс, т. е. около 16 мм/с, что вполне согласуется с нашей оценкой, полученной выше, – интервалом от 7,1 до 35,3 мм/с.

Какими путями сигнал, воспринятый нейронами ALM(L/R), будет распространяться дальше? ALM(L/R) и AVM имеют протяженные дендриты и формируют эфасы друг с другом, а также значительное число соединений со многими другими нейронами; позиции этих межнейронных контактов расположены в области головного нервного ганглия (White *et al.*, 1986). Обычно в статьях, посвященных изучению работы нервного контура *C. elegans*, обрабатывающего слабые прикосновения, упоминаются химические синапсы от ALM(L/R) и AVM к паре командных интернейронов AVD(L/R), которые, в свою очередь, образуют синапсы с сериями мотонейронов DA (DA1...DA9) и VA (VA1...VA12), обеспечивающих движение нематоды назад (Chalfie *et al.*, 1985; Rankin, 2002). Также имеются данные о том, что в результате стимуляции механосенсорных нейронов ALML, ALMR или AVM активируются нейроны AVA(L/R) (основываясь на уровне  $Ca^{2+}$ ), правда, судя по приведенным графикам, примерно на одну секунду позже, чем произошла смена направления движения нематоды (Shiple *et al.*, 2014, Fig. 2, B), хотя благодаря химическим синапсам от AVD к AVA это должно происходить значительно быстрее (мы теперь имеем представление о характерных скоростях распространения сигналов по нейритам *C. elegans*). Из того же графика скорости распространения волны мышечных

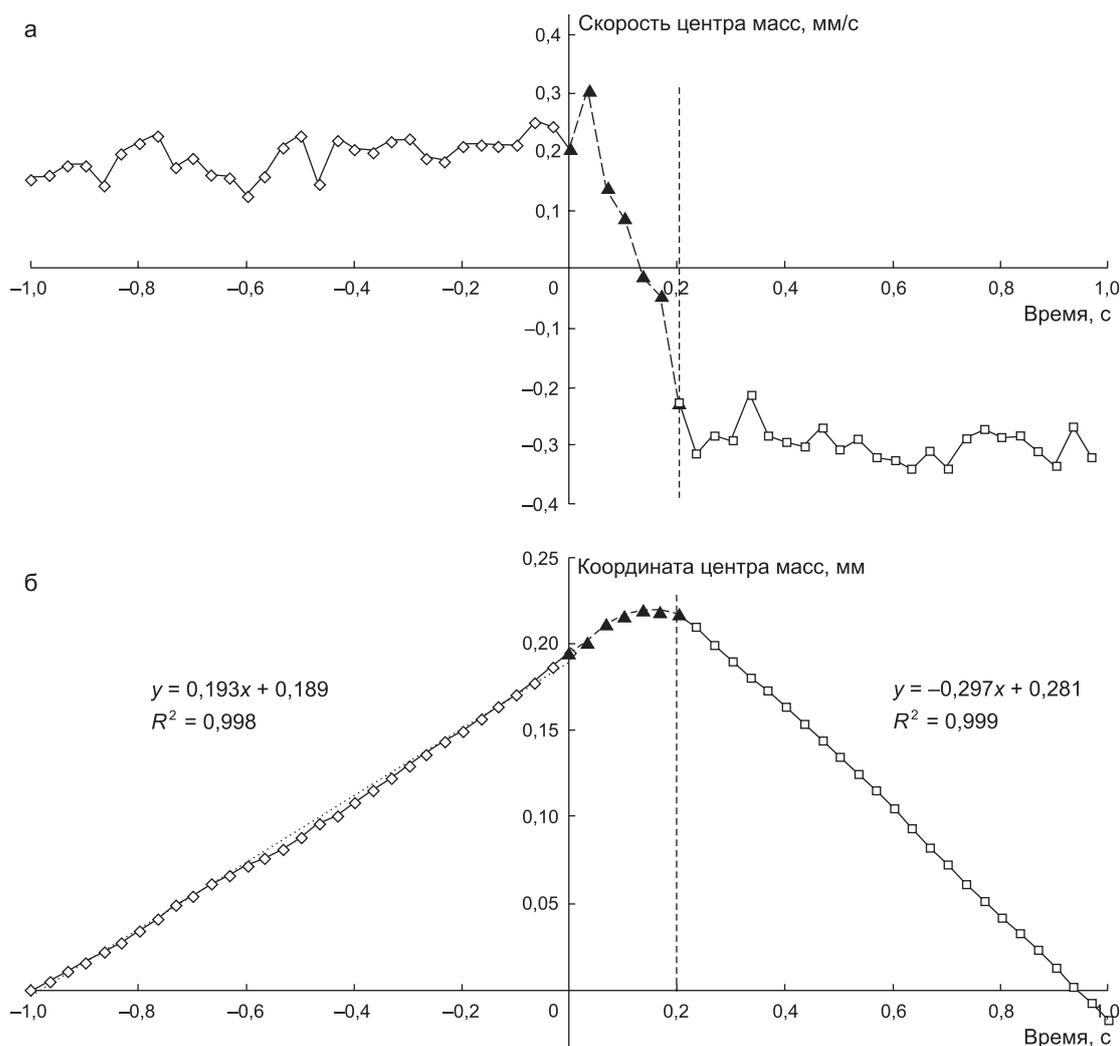
сокращений (Shiple *et al.*, 2014. Fig. 2, B) следует, что смена направления движения на противоположное происходит примерно через 1,5 с после начала оптической стимуляции механосенсорного нейрона ALM генетически модифицированного *C. elegans*. Однако покадровый анализ видеозаписей движения *C. elegans* в моменты реверса позволяет выявить, что смена направления движения нематоды происходит практически мгновенно после прикосновения к ней. Попробуем на его основе оценить, с какими масштабами времен и скоростей мы имеем дело при реверсе направления движения.

Как мы видим, поступательное движение при ползании по влажной поверхности (слою агара в чашке Петри) реализуется посредством волнообразных сокращений тела, форма которого при этом напоминает фрагмент синусоиды, у которой в процессе движения плавно меняется фаза: при движении вперед в одном направлении, а при движении назад – в обратном. Разбив видеофрагмент на отдельные кадры с помощью программы VirtualDub (частота их следования составляет 30 кадров в секунду), а также точно определив кадр, соответствующий моменту касания нематоды, мы решили рассмотреть серию из 30 кадров до этого момента и 30 кадров после. Благодаря хорошему отличию между фоном и телом нематоды удалось написать достаточно несложную программу, которая выделила на каждом кадре контур тела нематоды и вычислила положение его центра масс.

Как видно из рисунка, равномерное движение вперед (со скоростью  $\approx 0,19$  мм/с) после касания тела *C. elegans* сменяется переходным периодом, продолжающимся в течение 7 кадров, т. е.  $\approx 0,23$  с, после чего наблюдается равномерное движение в направлении назад (со скоростью  $\approx 0,30$  мм/с). Наши расчеты, как оказалось, находятся в согласии с экспериментальными данными о том, что скорость продвижения взрослой нематоды по поверхности агара при движении вперед варьирует от 0,1 до 0,3 мм/с (Lüersen *et al.*, 2014). Интересно, что скорость движения назад оказалась примерно в 1,3 раза больше, чем исходная скорость движения вперед, что может свидетельствовать о различных нейронных механизмах, управляющих движением вперед и назад. Согласно

данным Faumont с соавт. (2011), обнаружены мотонейроны, активные во время движения как вперед, так и назад; по мнению авторов, необходимо продолжать исследования в области регистрации нейронной активности в свободно движущихся нематодах.

Имеются данные, что скорость распространения волны мышечных сокращений при движении вперед по поверхности агара составляет 0,39 мм/с (Shen *et al.*, 2012). Анализ видеозаписи позволил рассчитать эту величину, которая в данном случае составила 0,26 мм/с. Эта скорость более чем в 10 раз меньше, чем рассмотренная нами ранее скорость распространения сигналов по нейритам *C. elegans* (от 7,1 до 35,3 мм/с). Распространение сигнала по кратчайшему пути от ALML/ALMR/AVM к AVDL/AVDR, затем к мотонейронам DA/VA (расположенным последовательно от головы к хвосту вдоль всего тела) и, наконец, к мышечным клеткам, даже с учетом задержки на синаптических контактах (которая обычно составляет около 2 мс для химических синапсов и 0,2 мс для эфаспов), таким образом, не может объяснить наблюдаемую скорость распространения мышечных сокращений. Имеется гипотеза о том, что отростки мотонейронов серий DB и VB, расположенных вдоль брюшной нервной цепочки, имеющие достаточно длинные концевые отделы, не образующие синаптических контактов, могут служить проприоцепторами, реагирующими на растяжение тела червя в местах изгибов. Влияние этих дополнительных сигналов могло бы, например, подавлять распространение основного сигнала далее вдоль тела нематоды до тех пор, пока предыдущий участок не произведет достаточный изгиб или, наоборот, не станет достаточно прямым. Однако у каждого нейрона, имеющего такой не образующий синапсы отросток, одно и то же направление – от головы к хвосту. Даже если эта гипотеза сможет объяснить распространение волны мышечных сокращений при движении вперед, то с движением назад возникают сложности. Таким образом, на сегодняшний день механизм, лежащий в основе генерации волн мышечных сокращений, несмотря на многочисленные попытки разобраться в принципах его действия (Cohen, Sanders, 2014), до сих пор остается необъясненным. С учетом того что все



**Рис.** Изменение скорости движения (а) и координаты центра масс (б) *C. elegans* в направлении движения в результате легкого прикосновения к передней части тела.

Ноль по оси времени – момент касания.

**Fig.** Dependence of *C. elegans* velocity (a) and center of mass coordinate (b) along the direction of movement as a result of gentle touch to the anterior part of its body.

Zero of the time axis corresponds to the moment of touch.

наши вычисления, касающиеся видеозаписи реакции *C. elegans* на слабое прикосновение, оказались в согласии с имеющимися экспериментальными фактами, есть все основания считать верным и интервал продолжительностью  $\approx 0,23$  с, который требуется нематоде, чтобы переключиться с режима движения вперед на движение назад. Однако в упомянутом нами ранее оптогенетическом эксперименте (Shiple *et al.*, 2014) для этого потребовалось около 1,5 с, что может свидетельствовать либо об ошибках в их методике измерения, либо о существенной

задержке сигнала от механосенсорных нейронов при их возбуждении не путем касания *C. elegans*, а посредством оптогенетической активации.

В данной работе, посвященной созданию предпосылок для моделирования нервной системы *C. elegans*, мы попытались собрать информацию, имеющую отношение к поставленной цели, попутно производя необходимые расчеты, предпринимая попытки анализа и соотнесения между собой разрозненных фактов, полученных разными авторами, и т. д.

Таблица 2

Основные электрофизиологические и морфологические характеристики нейронов *C. elegans*

Параметр	Значение	Литературный источник
Потенциал нулевого тока (для выборки из 43 различных нейронов)	-30 ... -90 мВ	Goodman <i>et al.</i> , 1998
Потенциал нулевого тока (для выборки из 21 нейрона из головного нервного ганглия)	-16 ... -22 мВ	Nickell <i>et al.</i> , 2002
Потенциал нулевого тока (для 4 других нейронов из головного нервного ганглия)	-65, -44, -37, -31 мВ	
Потенциал нулевого тока нейрона AWA	-40 мВ	
Потенциал покоя интернейрона R1M	-20 мВ	Piggott <i>et al.</i> , 2011
Потенциал покоя интернейрона A1B	-50 мВ	
Типичный размер тела нейрона (сомы)	2 ... 3 мкм	Schafer, 2006
Диаметр нейрита	0,1 ... 0,5 мкм	Roehrig, 1998; Lockery, Goodman, 2009
Длина нейрита	до 1 мм и более	WormAtlas.org; caltech.wormbase.org/virtualworm/
Удельное сопротивление мембраны нейрона	61 ... 251 кΩ·см <sup>2</sup>	Roehrig, 1998
Удельное сопротивление аксоплазмы	30 ... 250 Ω·см	Николлс и др., 2003
λ, константа длины для электротонического распространения потенциала	0,3 ... 1,5 мм	Рассчитана на основе приведенных выше значений по формуле из: (Rall, 1989)
Удельная электрическая емкость мембраны	1 мкФ/см <sup>2</sup>	Одинакова для всех типов нервных и мышечных волокон
Скорость электротонического распространения потенциала	7,1 ... 35,3 мм/с	Рассчитана на основе приведенных выше значений по формуле из: (Johnston, Wu, 1995)
Задержка сигнала на химическом синапсе	~ 2 мс	en.wikipedia.org/wiki/Electrical_synapse
Задержка сигнала на щелевом контакте («gap junction»)	~ 0,2 мс	

Основные данные, имеющие отношение к описанию нейронов и нейронных сетей *C. elegans*, приведены в табл. 2.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Данная работа позволила обобщить, соотнести и упорядочить множество фактов и данных, касающихся механизмов распространения сигналов в нервной системе *C. elegans*. Мы составили достаточно обоснованное представление о скоростях распространения сигналов, их затухании со временем и о скоростях, характеризующих движение нематоды. Показано, что электротоническое проведение сигнала на

расстояния до 1 мм и более, характерное для *C. elegans*, возможно в пределах рассмотренных интервалов значений параметров, описывающих морфологию и электрофизиологию нейронов данного организма (табл. 2). Этих данных достаточно для создания подробной, биологически обоснованной модели фрагмента нервной системы *C. elegans* – например, с помощью пакета NEURON (Carnevale, Hines, 2006), ориентированного на симуляцию биологических нейронных сетей, что и планируется предпринять на следующем этапе нашей работы.

Простое объяснение генерации волн мышечных сокращений, основанное на задержке сигнала при движении от головы к хвосту, очевидно,

не работает, а для выявления истинной картины происходящих при этом нейронных процессов, по-видимому, недостаточно данных. Таким образом, дальнейший прогресс в данном направлении исследований можно ожидать либо в результате новых оптогенетических экспериментов, одновременно регистрирующих активность многих нейронов у движущейся в естественной среде нематоды, либо посредством биологически обоснованного компьютерного моделирования нейронных контуров, по которым распространяются сигналы от механосенсорных нейронов ALML/ALMR/AVM, что и будет предпринято в ближайшем будущем. Возможно, облегчить понимание работы нейронов *C. elegans* и уточнить их функциональные характеристики помогут методы культивирования этих клеток и реконструкция нейронных сетей *in vitro*.

Согласно данным о коннектоме *C. elegans*, три механосенсорных нейрона ALML/ALMR/AVM, иннервирующих переднюю половину тела, образуют контакты по меньшей мере с 26 другими нейронами, лишь малая часть из которых учитывается в имеющихся моделях генерации волн мышечных сокращений.

Мы надеемся, что данная работа и последующие исследования в данном направлении позволят значительно приблизиться к решению этой проблемы.

Отдельно стоит отметить наблюдение о том, что движение *C. elegans* назад при реверсе начинается с той же фазы, на которой закончилось движение вперед, вероятно, оно может свидетельствовать о том, что нематода способна либо хранить информацию о своей текущей форме тела, либо считывать ее при помощи проприоцепторов.

Полученные данные и предложенные подходы также могут быть использованы при моделировании более сложно организованных биологических нейронных систем.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке интеграционного проекта СО РАН № 136 «Исследование информационных и молекулярно-генетических механизмов функционирования сетей нейронов на основе экспериментально-компьютерных подходов».

## ЛИТЕРАТУРА

- Николлс Д.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. Гл. 7. Изд-во Едиториал УРСС, 2003. 686 с.
- Nicholls J.G. From Neuron to Brain / Eds J.G. Nicholls, A.R. Martin, B.G. Wallace, P.A. Fuchs. Sunderland: Sinauer Associates, Inc., 2001. 682 p. (In Russian).
- Эккерт Р., Рэндалл Д., Огастин Д. Физиология животных. Механизмы и адаптации: Учебник в двух томах. М.: Мир, 1991. Т. 1.
- Eckert R., Randall D., Ogastin D. Animal Physiology: Mechanisms and Adaptations. M.: Mir, 1991. V. 1. (In Russian).
- Barbosa-Morais N.L., Irimia M., Pan Q., Xiong H.Y., Gueroussov S., Lee L.J., Slobodeniuc V., Kutter C., Watt S., Colak R., Kim T., Misquitta-Ali C.M., Wilson M.D., Kim P.M., Odom D.T., Frey B.J., Blencowe B.J. The evolutionary landscape of alternative splicing in vertebrate species // Science. 2012. V. 338. No. 6114. P. 1587–1593.
- Bargmann C.I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome // Science. 1998. V. 282. P. 2028–2033.
- Carnevale N.T., Hines M.L. The NEURON Book. Cambridge, UK: Cambridge Univ. Press, 2006. 413 p.
- Chalfie M., Sulston J.E., White J.G., Southgate E., Thomson J.N., Brenner S. The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans* // J. Neurosci. 1985. V. 5. P. 956–964.
- Cohen N., Sanders T. Nematode locomotion: dissecting the neuronal-environmental loop // Curr. Opin. Neurobiol. 2014. V. 25. P. 99–106.
- Faumont S., Rondeau G., Thiele T.R., Lawton K.J., McCormick K.E., Sottile M., Griesbeck O., Heckscher E., Roberts W.M., Doe C.Q., Lockery S.R. An image-free optomechanical system for creating virtual environments and imaging neuronal activity in freely moving *Caenorhabditis elegans* // PLoS ONE. 2011. V. 6. No. 9. e24666.
- Goodman M.B., Hall D.H., Avery L., Lockery S.R. Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons // Neuron. 1998. V. 20. No. 4. P. 763–772.
- Johnston D., Wu S.M.S. Foundations of Cellular Neurophysiology. MIT Press, Cambridge, MA, 1995. 750 p.
- Lockery S.R., Goodman M.B. The quest for action potentials in *C. elegans* neurons hits a plateau // Nat. Neurosci. 2009. V. 12. P. 377–378.
- Lüersen K., Faust U., Gottschling D.-C., Döring F. Gait-specific adaptation of locomotor activity in response to dietary restriction in *Caenorhabditis elegans* // J. Exp. Biol. 2014. V. 217. P. 2480–2488.
- Maguire S.M., Clark C.M., Nunnari J., Pirri J.K., Alkema M.J. The *C. elegans* touch response facilitates escape from predacious fungi // Curr. Biol. 2011. V. 21. No. 15. P. 1326–1330.
- Miyawaki A., Llopis J., Heim R., McCaffery J.M., Adams J.A., Ikura M., Tsien R.Y. Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin // Nature. 1997. V. 388. P. 882–887.
- Nickell W.T., Pun R.Y.K., Bargmann C.I., Kleene C.I. Single ionic channels of two *Caenorhabditis elegans* chemosensory neurons in native membrane // J. Membrane Biol. 2002. V. 189. P. 55–66.

- O'Hagan R., Chalfie M., Goodman B. The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals // Nat. Neurosci. 2005. V. 8. No. 1. P. 43–50.
- Piggott B.J., Liu J., Feng Z., Wescott S.A., Xu X.Z. The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans* // Cell. 2011. V. 147. No. 4. P. 922–933.
- Rall W. Cable theory for dendritic neurons // Methods in Neuronal Modelling: From Synapses to Networks / Eds C. Koch, I. Segev. MIT press, 1989. P. 9–62.
- Rankin C.H. From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans* // Nat. Rev. Genet. 2002. V. 3. P. 622–630.
- Rankin C.H. Invertebrate learning: what can't a worm learn? // Curr. Biol. 2004. V. 14. No. 15. R617–618.
- Roehrig C.J. Computational model of a behavior in *C. elegans* and a resulting framework for modularizing dynamical neuronal structures: PhD thesis. The University of British Columbia, 1998. 140 p.
- Schafer W.R. Ed. Neurophysiological methods in *C. elegans*: an introduction (June 2, 2006), WormBook / The *C. elegans* Research Community, WormBook, doi/10.1895/wormbook.1.111.1, <http://www.wormbook.org>.
- Shen X.N., Sznitman J., Krajacic P., Lamitina T., Arratia P.E. Undulatory locomotion of *Caenorhabditis elegans* on wet surfaces // Biophys J. 2012. V. 102. No. 12. P. 2772–2781.
- Shiple F.B., Clark M.C., Alkema M.J., Leifer A.M. Simultaneous optogenetic manipulation and calcium imaging in freely moving *C. elegans* // Front. Neural Circuits. 2014. V. 8. Art. 28. P. 1–8.
- Suzuki H., Kerr R., Bianchi L., Frøkjær-Jensen C., Slone D., Xue J., Gerstbrein B., Driscoll M., Schafer W.R. *In vivo* imaging of *C. elegans* mechanosensory neurons demonstrates a specific role for the MEC-4 channel in the process of gentle touch sensation // Neuron. 2003. V. 39. P. 1005–1017.
- Varshney L.R., Chen B.L., Paniagua E., Hall D.H., Chklovskii D.B. Structural Properties of the *Caenorhabditis elegans* neuronal network // PLoS Comput. Biol. 2011. V. 7. No. 2. e1001066.
- White J.G., Southgate E., Thomson J.N., Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans* // Phil. Trans. Roy. Soc. L. 1986. B 314. P. 1–340.
- Wei A., Jegla T., Salkoff L. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project // Neuropharmacology. 1996. V. 35. No. 7. P. 805–829.

## SOME DETAILS OF SIGNAL PROPAGATION IN THE NERVOUS SYSTEM OF *C. ELEGANS*

A.Yu. Palyanov<sup>1</sup>, A.S. Ratushnyak<sup>2</sup>

<sup>1</sup> A.P. Ershov Institute of Informatics Systems SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: palyanov@iis.nsk.su;

<sup>2</sup> Design Technological Institute of Digital Techniques SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: ratush@kti.nsc.ru

### Summary

Among organisms most widely used for investigation of fundamental mechanisms of nervous system functioning, *Caenorhabditis elegans* is unique due to exceptionally small number of its neurons, 302. Over a period of 25 years it stays the only organism with known *connectome* – a description of its neurons and interneuronal connections. However, this information appeared to be insufficient for deciphering of mechanisms underlying the work of even such a small nervous system. Further years devoted to both experimental research and development of computational models. Consolidation of simulated nervous, sensory and muscular systems united with nematode body, or virtual *C. elegans*, is a big hope for solving this problem. Recent progress rather shed light on the real complexity of the problem than brought researchers closer to its solution. Here we perform an attempt to generalize, correlate and order a set of facts and data related to mechanisms of signals propagation in the *C. elegans* nervous system. As a result it was shown that electrotonic propagation of neural signal within distance of 1 mm or slightly more, which is common in *C. elegans* nervous system, is possible for some combinations of parameters (describing morphology and electrophysiology of this organism) within theoretically possible intervals. According to this, simulation of a fragment of *C. elegans* neural network based on real morphological and electrophysiological data presents to be quite reasonable. For example, it can be performed using NEURON software oriented to simulation of biological neural networks.

**Key words:** *C. elegans*, computational neuroscience, connectome, modeling, electrotonic signal propagation.