

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт систем информатики им. А.П. Ершова
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи



ПАЛЪЯНОВ Андрей Юрьевич

**Методы и алгоритмы для решения ряда актуальных задач
в области вычислительной нейробиологии, биомеханики и
молекулярной биологии**

специальность

05.13.18 – математическое моделирование,
численные методы и комплексы программ

Диссертация на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Научный консультант
д.ф.-м.н., профессор
Марчук Александр Гурьевич

Новосибирск - 2019

Оглавление

Введение	5
Глава 1. О проблемах и перспективах компьютерного моделирования процессов, лежащих в основе нервной деятельности и поведения живых организмов	18
1.1. О роли нервной системы в жизни многоклеточных организмов	18
1.2. О гипотетических возможностях компьютерной симуляции механизмов функционирования биологического мозга	21
1.3. Об энергоэффективности работы и плотности хранения информации в живых клетках и в компьютерных системах.....	22
1.4. О современном состоянии исследований, направленных на создание искусственных разумных систем и решение проблемы обратной инженерии мозга	23
1.5. О необходимом уровне детализации моделей.....	26
1.6. Современные достижения в области компьютерного моделирования: синтез белка на рибосоме	28
1.7. Современные достижения в области компьютерного моделирования: первая электронная клетка	30
1.8. О биологических нейронах и взаимодействиях между ними	32
1.9. О проекте «The Blue Brain»	35
1.10. О роли нематоды <i>Caenorhabditis elegans</i> в решении проблемы обратной инженерии нервной системы	37
1.11. О перспективах дальнейших исследований	41
Глава 2. Организм <i>Caenorhabditis elegans</i> в контексте задач моделирования его нервной активности и поведения.....	45
2.1. Общие сведения о <i>Caenorhabditis elegans</i>	45
2.2. Нервная система	47
2.3. О диаграмме связности нервной системы <i>C. elegans</i>	50
2.3.1. О динамике активности нейронов <i>C. elegans</i>	52
2.3. Сенсорная система	54
2.4. Мышечная система	62
2.5. Биомеханика движения <i>C. elegans</i>	64
2.6. О методах компьютерного моделирования систем, образующих организм <i>C. elegans</i>	68

2.6.1. Тело и мышечная система, моделирование движения.....	69
2.6.2. О проблемах в области изучения и моделирования нервной деятельности <i>C. elegans</i>	74
2.6.3. О методах и программных средствах моделирования динамики нейронной активности.....	78
Глава 3. Механистическая 3D-модель тела <i>C. elegans</i> под управлением фрагмента нервной системы	85
3.1. Моделирование тела и мышечной системы	86
3.2. Моделирование нейронов и связей между ними	88
3.4. Моделирование движения тела и его взаимодействия с поверхностью	91
3.5. Моделирование нейронов и связей между ними	92
3.6. Значение созданной программной системы и её применение в научной и преподавательской деятельности	94
Глава 4. Sibernetis – симулятор нового поколения, ориентированный на задачи в области биомеханики беспозвоночных	97
4.1. Моделирование динамики несжимаемой жидкости методом PCISPH	100
4.2. Алгоритм поиска соседей.....	107
4.3. Моделирование эластичных объектов одновременно с жидкостью	111
4.3.1. Базовый эластичный материал	111
4.3.2. Водонепроницаемые эластичные пленки.....	113
4.3.3. Моделирование мышечных клеток.....	115
4.4. Создание модели тела и мышечной системы <i>C. elegans</i>	125
4.5. Численные эксперименты по симуляции движения <i>C. elegans</i> в различных режимах и средах	129
4.5.1. Определение фактической вязкости моделируемой жидкости	130
4.5.2. Моделирование плавания в жидкостях с низкой вязкостью.....	135
4.5.3. О влиянии шага интегрирования по времени на результаты вычислений	138
4.5.4. Плавание в двухчастотном режиме. Воспроизведение результатов эксперимента в симуляции.	143
4.5.5. Зависимость фактической вязкости жидкости от значения коэффициента вязкости в симуляции.	145
4.5.6. Биомеханика ползания по поверхности агара	146

4.5.7. Моделирование ползания по поверхности агара в <i>Sibernetic</i>	154
4.6. Об особенностях параллельной реализации и вычислительной производительности <i>Sibernetic</i>	161
4.7. О связи между активностью кальция в мышечных клетках <i>C. elegans</i> в процессе ползания, их сокращением и формой тела.....	165
Глава 5. На пути к биологически обоснованному моделированию динамики нейронной активности в нервной системе <i>C. elegans</i>	179
5.1. Об архитектуре нервной системы <i>C. elegans</i>	179
5.2. Об электрофизиологии нейронов <i>C. elegans</i>	180
5.3. О генерации периодических сигналов в нервно-мышечной системе <i>C.</i> <i>elegans</i>	185
5.4. Генерация периодических сигналов мышечной клеткой глоточной системы <i>C. elegans</i>	187
5.4.1. Электрофизиология и ионные каналы мышечной клетки <i>rm3</i>	188
5.4.2. Подготовка к моделированию электрофизиологической активности мышечной клетки <i>rm3</i>	191
5.4.3. Потенциал покоя глоточной мышечной клетки	193
5.4.4. Проводимость утечки через мембрану и потенциал покоя.....	193
5.4.5. Ионные каналы: кальциевый канал L-типа <i>EGL-19</i>	194
5.4.6. Калиевый ионный канал <i>Kv</i> -типа <i>EXP-2</i>	195
Глава 6. Развитие «гидродинамического» подхода к анализу процесса формирования белковой структуры.	205
6.1. Объект и методы исследования	209
6.2. Гидродинамический подход	211
6.3. Стандартный анализ на основе поверхности свободной энергии	213
5.4. Анализ на основе гидродинамического подхода.....	216
5.5. Итоги	221
Заключение	223
Литература	227

Введение

Актуальность темы исследования

Проблема создания сложной многоуровневой компьютерной модели живого организма, включающей его нервную систему, рассматривается как новое перспективное направление на стыке нейробиологии, кибернетики, вычислительных технологий и наук об искусственном интеллекте. Начиная с работы Джона Уайта с соавторами [White et al., 1986], в которой была определена структура нервной системы беспозвоночного *C. elegans*, насчитывающей всего 302 нервных клетки (для сравнения, у человека их около 86 млрд.), задача создания виртуального организма именно на его основе рассматривается как первый необходимый шаг на пути к более сложным нервным системам. Попытки её решения предпринимались с 2005 года [Suzuki et al., 2005] (подробнее – в разделах 2.6.1, 2.6.2) и в итоге привели к осознанию того, что проблема слишком масштабна, сложна и многогранна, чтобы коллектив одной лаборатории смог решить её за разумное время. В то же время продолжались работы в области экспериментального изучения механизмов, лежащих в основе функционирования нервной системы *C. elegans* [Schuske et al., 2004; Schafer, 2005; Piggott et al., 2011; Gjorgjieva et al., 2014; Laurent et al., 2015 и др.], в том числе с использованием нового подхода на основе оптогенетики, позволяющего визуализировать динамику нейронной активности [Liewald et al., 2008; Shipley et al., 2014] и влиять на неё [Gengyo-Ando et al., 2017], которые также привели к появлению новых знаний и выявили значительную сложность исследуемых процессов.

В связи с этим актуальным представляется комплексный подход на основе программной платформы с модульной архитектурой и открытым исходным кодом, способный охватить все ключевые стадии передачи и обработки информации в организме, от сенсорной системы до осуществления движения организма посредством сокращения мышечных клеток, которое, в свою очередь, приводит к новому положению в пространстве и изменению набора регистрируемых сенсорных сигналов (подробнее – в 1.10). Данный подход позволит создать «стартовую площадку» для проведения цифрового эксперимента, обеспечив исследователям возможность как использовать или усовершенствовать уже имеющиеся в системе модели, так и встраивать в неё новые. Ранее он не применялся ввиду высокой сложности и трудоемкости создания соответствующей программной системы, а также необходимости наличия у разработчика достаточно основательных представлений о свойствах и механизмах работы основных систем, образующих моделируемый организм. Проектирование и реализация такой системы потребуют развития методологических аспектов как в области обратной инженерии нервной системы, так и в более широкой постановке проблемы, подразумевающей создание первого виртуального организма, построенного на основе знаний о структуре и механизмах функционирования своего реального прообраза, что определяет как теоретическую, так и практическую значимость работы (которая более подробно рассмотрена в соответствующем разделе на стр. 12).

Предположительно, в процессе работы над данной проблемой возникнет необходимость оперировать уровнями рассмотрения системы от тела организма и его отдельных клеток до ионных каналов и белков, которые играют важную роль во множестве различных внутри- и внеклеточных процессов. В связи с этим в работе рассматриваются вопросы, связанные как с компьютерным моделированием биомеханики движения *C. elegans* и активности его нервной, мышечной и сенсорной систем, так и с развитием вычислительных методов анализа процессов формирования структуры белков, которые впоследствии могут быть применены к проблеме изучения и моделирования структурных перестроек

ионных каналов клетки в процессе их функционирования.

Цель работы заключалась в создании методов, алгоритмов и эффективной программной платформы для осуществления компьютерной симуляции как внутреннего строения организма *C. elegans*, так и его движения в виртуальной трехмерной среде с действующими физическими законами. Рассматриваемые при моделировании уровни структурной организации - от мышечных и нервных клеток до ионных каналов и токов.

Основные задачи исследований:

- Анализ имеющихся данных о структуре и функциях систем организма *C. elegans*, связанных с его нервной деятельностью и двигательной активностью, а также о физических свойствах его среды обитания.
- Проектирование и реализация прототипа модульной системы, включающего компоненты для моделирования тела, мышечной системы, среды обитания и нервной системы, включая 3D визуализацию.
- Реализация поддержки высокопроизводительных параллельных вычислений на многоядерных процессорах и графических картах на основе технологии OpenCL. Оптимизация производительности.
- Развитие нового перспективного «гидродинамического» подхода к анализу процесса формирования белковой структуры, предложенного в работе [Chekmarev, Palyanov, Karplus, 2008, Phys. Rev. Letters], в том числе для расчета одномерного профиля свободной энергии вдоль координаты реакции.
- Сравнение результатов моделирования с известными экспериментальными данными, настройка физических и электрофизиологических параметров.

Фактический материал и методы исследований

Для решения поставленной проблемы значительное внимание было уделено изучению имеющихся данных об объекте исследования, включая следующие основные категории:

- Морфологические, физические и биологические характеристики организма

C. elegans, а также управляющих его движением мышечных клеток, которых насчитывается 95 штук;

- Электрофизиологические и геометрические характеристики нервных и мышечных клеток;
- Связи между нервными клетками, которых насчитывается около 7 тысяч, а также между моторными нервными клетками и мышцами (около 2 тысяч);
- Типы этих связей, их параметры, нейромедиаторы, ионные токи и каналы;
- Биомеханика движения в различных средах, главным образом плавания в толще жидкости и ползания по поверхности гелеобразного вещества (агара), включая поступательное движение, повороты и реверс, а также переходы между этими средами.

На стадии проектирования и реализации прототипа программной платформы для создания виртуального *C. elegans* и её отдельных модулей использовались следующие алгоритмы, языки программирования и технологии:

- C++ - для написания основного программного кода;
- OpenCL – для поддержки высокопроизводительных параллельных вычислений на многоядерных процессорах и графических картах;
- OpenGL – для 3D-визуализации;
- NEURON – для моделирования динамики активности сетей биологических нейронов, а также электрической активности мышечных клеток;
- NMODL – для реализации моделей ионных каналов, встраиваемых в мембраны нейронов;
- Python – для интерфейса обмена данными между телом и нервной системой;
- Собственная параллельная реализация алгоритма PCISPH (Predictor-Corrector Incompressible Smoothed Particle Hydrodynamics) - модификации метода гидродинамики сглаженных частиц для моделирования гидродинамики несжимаемой жидкости с помощью схемы «предиктор-корректор» [Solenthaler et al., 2009];
- Алгоритмы и структуры данных для моделирования водонепроницаемых

эластичных пленок и сокращающихся под действием нервного импульса мышечных волокон [Palyanov et al., 2015];

- В качестве системы контроля версий и репозитория исходных кодов программ использовалась система github¹.

Положения, выносимые на защиту:

1. Разработанный алгоритм генерации трехмерной модели тела и мышечной системы *C. elegans* с использованием реальных анатомических данных благодаря изменяемому разрешению обеспечивает возможность компромисса между скоростью вычислений и точностью расчетов при симуляции движения.
2. Созданный в результате работы симулятор *Sibernetic*, основанный на алгоритме PCISPH (Predictor-Corrector Incompressible Smoothed Particle Hydrodynamics) и дополненный новыми типами данных, открывает возможности решения широкого спектра задач моделирования в области гидродинамики, механики сплошных сред, биомеханики беспозвоночных и других биологических объектов и систем.
3. Симуляция движения модели тела *C. elegans* в *Sibernetic* демонстрирует возможность воспроизведения всех его основных типов, наблюдаемых у реального организма, включая количественные характеристики в различных режимах. Впервые в явном виде в составе единой симуляции удалось осуществить симуляцию как движения тела *C. elegans* по поверхности геля, так и его плавание в толще жидкости.
4. Созданные в программной среде NEURON модели электрической активности определенных типов нервных и мышечных клеток *C. elegans* с учетом их морфологии, электрофизиологических параметров, ионных каналов и токов, обеспечивают воспроизведение наиболее важных свойств моделируемых объектов и представляют собой основу для дальнейшего расширения числа включенных в симуляцию нейронов с учетом их индивидуальных параметров.

¹ <http://github.com/openworm/sibernetic>

5. Использование нового «гидродинамического» подхода к анализу процесса формирования белковой структуры позволяет получить более детальную картину и выявить скрытые процессы, не видимые в рамках стандартного анализа на основе рассмотрения поверхности свободной энергии (ПСЭ), в частности, наличие барьера свободной энергии даже при его полном отсутствии на ландшафте ПСЭ белка.

Научная новизна работы определяется следующими результатами, полученными впервые на момент их публикации:

1. Разработан алгоритм генерации 3D модели тела *C. elegans* и связанной с ним мышечной системы, построенной по анатомическим данным с высоким разрешением.
2. Реализован алгоритм PCISPH с открытым исходным кодом и поддержкой высокопроизводительных параллельных вычислений на многоядерных CPU и GPU на основе технологии OpenCL.
3. Спроектирована и реализована уникальная среда моделирования *Sibernetic*, ориентированная на задачи в области биомеханики движения беспозвоночных в физическом окружении, которое может содержать жидкость, гель, эластичные объекты и статичные твердые тела, а также различные пространственные конфигурации на их основе.
4. Выполнено моделирование движения *C. elegans* в явном физическом окружении - плавания в объеме жидкости и ползания по поверхности геля с формированием бороздки, оставляемой телом, от краев которой организм отталкивается для поступательного движения вперед или назад, а также перехода между этими типами движения.
5. Разработан алгоритм распознавания формы тела и извлечения данных об активности мышечных клеток из видеозаписи свободнодвижущегося *C. elegans* (использована видеозапись, полученная в работе [Lefebvre et al., 2016]) и использование полученных данных об активности мышечных клеток для

управления моделью тела *C. elegans*.

6. Произведена симуляция движения виртуального *C. elegans* под действием последовательности управляющих мышцами сигналов, извлеченных из видеозаписи движения реального организма. Проведено сравнение полученных в обоих случаях траекторий движения для валидации модели на уровне взаимодействия тела и мышечной системы с внешней средой, исключив на данном этапе взаимное влияние нервной и мышечной систем.
7. Выполнен анализ современных экспериментальных данных об электрофизиологии, механизмах генерации и распространения сигналов в нервных и мышечных клетках *C. elegans* и на их основе разработаны модели в системе NEURON.
8. Произведено выравнивание профилей толщины трубок тока и свободной энергии по положению области переходных состояний в рамках нового «гидродинамического» подхода [Chekmarev et al., 2008] на примере формирования структуры белка убиквитина. Результаты свидетельствуют о наличии барьера свободной энергии - при его полном отсутствии на ландшафте поверхности свободной энергии белка в рамках стандартного анализа.

Практическое значение работы

Созданный в результате работы над диссертацией программный инструментарий, включая исходные коды и модели, в соответствии с парадигмой «Открытая наука» / «Open Science» находится в свободном доступе в репозитории github.com/openworm/sibernetic и входит в состав некоммерческого международного проекта OpenWorm (www.openworm.org) [Idili et al., 2011; Gleeson et al., 2015; Sarma et al., 2018], целью которого является биологически достоверное моделирование систем *C. elegans* и создание на его основе первого в мире виртуального организма. Открытый исходный код, поддержка основных операционных систем (Windows/Linux/macOS) и высокопроизводительных

вычислений на основе OpenCL, а также интерфейс обмена данными с симулятором NEURON [Vella, Palyanov et al., 2013; Khayrulin, Serdtseva, Palyanov, 2016] обуславливают высокую практическую ценность Sibernetis и перспективы его дальнейшего использования.

Научные публикации автора по теме диссертации имеют более 100 цитирований, в том числе в статьях из международных рецензируемых журналов - Nature Neuroscience, Journal of Computational Neuroscience, Neurocomputing, Frontiers in Computational Neuroscience, Physical Review Letters, Frontiers in Neuroinformatics, Philosophical Transactions of The Royal Society B (Biological Sciences), PLoS Computational Biology, BMC Neuroscience, BMC Bioinformatics, Archives of Computational Methods in Engineering, Journal of Neural Engineering и других.

По данным статистики GitHub, по состоянию на 2019 г. системой Sibernetis заинтересовались (добавили в свой список понравившихся проектов) более 200 человек, а 36 следят за появлением новых возможностей и обновлений программы и являются её активными пользователями. Также имеется механизм обратной связи, позволяющий пользователям контактировать с разработчиками. Система Sibernetis уже используется в проекте OpenWorm в комплексе с другими программами, в частности, с симулятором нейронной активности OpenWorm.c302 (между ними реализован интерфейс обмена данными) и системой онлайн визуализации результатов моделирования Geppetto (www.geppetto.org). Проект OpenWorm, начатый в 2011 году и объединивший исследователей, заинтересованных в компьютерном моделировании *C. elegans*, имеет русско-² и англоязычную³ страницы в Википедии, упоминающих Sibernetis как часть проекта. В качестве примера использования Sibernetis в других областях (помимо моделирования движения *C. elegans*) стоит отметить магистерскую работу А.А. Тарабрина «Алгоритмы и структуры данных для моделирования взаимодействия

² <https://ru.wikipedia.org/wiki/OpenWorm>

³ <https://en.wikipedia.org/wiki/OpenWorm>

мышечных тканей с жидкостью в программной среде *Sibernetic*», выполненную под руководством А.Ю. Пальянова и защищенную в НГУ в 2015 г. В ней с использованием программной среды *Sibernetic* была создана модель простого двухкамерного сердца с трехстворчатым клапаном.

В 2018 г. в Лондоне на конференции «Connectome to behaviour: modelling *C. elegans* at cellular resolution» автору представилась возможность пообщаться с профессором Джоном Уайтом (John White), который в 1986 г. вместе с соавторами опубликовал первую статью об архитектуре нервной системы *C. elegans* на клеточном уровне [White et al., 1986]. При встрече он выразил мнение о том, что *OpenWorm* и *Sibernetic* выполнены на высочайшем научно-техническом уровне и являются правильным развитием идеи о моделировании *C. elegans*, а также пожелал дальнейших успехов. Многие специалисты как по экспериментальному изучению, так и по компьютерному моделированию *C. elegans* также проявили свой интерес и выразили одобрение относительно полученных результатов и перспектив. Таким образом, проект получил практическое применение и достаточно широкую известность среди специалистов.

Апробация работы

Высокая степень достоверности разработанных моделей обусловлена как использованием современных экспериментальных данных о морфологии, электрофизиологии и биомеханике исследуемых объектов, так и обоснованным выбором и применением надежных численных методов, и подтверждается в расчетах путем сравнения результатов с известными численными и экспериментальными данными при решении аналогичных задач. Достоверность эффективности параллельных алгоритмов и прикладных программ подтверждается их практическим применением на высокопроизводительных вычислительных системах и сравнением с ближайшими по функциональности существующими аналогами.

Результаты работы были представлены в 19 докладах на конференциях,

совещаниях и семинарах разного уровня: «Connectome to behaviour: modelling *C. elegans* at cellular resolution», The Royal Society, London, 2018. (приглашенный устный доклад); 1st NIPS Workshop on Worm's Neural Information Processing (WNIP 2017), Long Beach, CA, USA, 2017; 2nd International Conference «Mathematical modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology», Новосибирск, 2016 (приглашенный устный доклад), 2018 (приглашенный устный доклад); International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology, Novosibirsk, 2008, 2010, 2012, 2016, 2018; Symposium «Cognitive Sciences, Genomics and Bioinformatics», Novosibirsk, 2016 (устный доклад); Международная конференция, посвященная 90-летию со дня рождения академика Г.И. Марчука «Актуальные проблемы вычислительной и прикладной математики», Новосибирск, 2015; 24th Annual Computational Neuroscience Meeting, Prague, Czech Republic, 2015; International conf. «Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology», Novosibirsk, 2014; 22nd Annual Meeting for Computational Neuroscience, Paris, France, 2013; 5th INCF Congress of Neuroinformatics, Munich, Germany, 2012; Международная конференция «Современные проблемы математики, информатики и биоинформатики», Новосибирск, 2011; Ершовская конференция по информатике, рабочий семинар «Наукоёмкое программное обеспечение», Новосибирск, 2011, 2009; 4th INCF Congress of Neuroinformatics, Boston, United States, 2011; XV Международная конференция по нейрокибернетике, Ростов-на-Дону, 2009.

Также результаты диссертационной работы были представлены на различных научных семинарах институтов Сибирского отделения Российской академии наук, в том числе в Институте систем информатики им А.П. Ершова СО РАН, Институте математики им С.Л. Соболева СО РАН, Федеральном исследовательском центре Институте цитологии и генетики СО РАН и Институте гидродинамики им. М.А. Лаврентьева СО РАН.

Гранты и проекты

Работа над диссертацией проводилась при частичной финансовой поддержке следующих грантов и проектов:

- Грант РФФИ №18-07-00903-А «Компьютерное моделирование и валидация механизмов генерации периодических сигналов и управления мышцами тела в нервной системе *C. elegans*», 2018-2020 гг., руководитель - А.Ю. Пальянов.
- Грант Президента РФ № МК-5714.2015.9 «Разработка методологии и алгоритмической базы для создания первого виртуального организма под управлением биологически обоснованной компьютерной модели его нейронной сети», 2015-2016 гг., руководитель - А.Ю. Пальянов.
- Грант РФФИ №14-14-00325 «Развитие гидродинамического подхода к исследованию процесса укладки белков: поля потоков укладки, потенциал движущих сил и явления турбулентности», 2014-2016 гг., руководитель - д.ф.м.н., проф. С.Ф. Чекмарев.
- Грант РФФИ №14-07-31039-мол_а, «Разработка методологии и алгоритмической базы для задач моделирования в области биофизики живых систем», 2014-2015 гг., руководитель - А.Ю. Пальянов.
- Междисциплинарный интеграционный проект СО РАН №136 «Исследование информационных и молекулярно-генетических механизмов функционирования сетей нейронов на основе экспериментально-компьютерных подходов», 2012-2014 гг. (руководитель проекта - академик РАН Н.А. Колчанов, ИЦиГ СО РАН; руководитель блока «Компьютерный анализ и моделирование нейронов и сетей нейронов нематоды *C. elegans*» в ИСИ СО РАН - А.Ю. Пальянов).
- РФФИ 08-04-91104-АФГИР_а «Гидродинамический подход к анализу укладки белков и других сложных реакций», 2008-2009 гг., руководитель - д.ф.м.н., проф. С.Ф. Чекмарев.
- Базовый проект НИР IV.39.1.5 «Алгоритмы и программные средства для моделирования сложных систем»

Публикации.

По теме диссертации опубликовано 38 печатных работ, включая 20 статей в рецензируемых научных журналах, 14 из которых удовлетворяют требованиям ВАК. Из них 13 индексируются в системе Web of Science, 14 – в Scopus, 4 – входят в список ВАК.

Структура и объем работы.

Диссертация состоит из введения, шести глав и заключения, общим объемом 256 страниц, содержит 89 рисунков и 12 таблиц. Список литературы включает 287 наименований.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в проектировании и реализации всех созданных в рамках работы над диссертацией программных средств, проведении с их помощью вычислительных экспериментов и расчетов, анализе полученных результатов и их интерпретации. Содержание диссертации и основные положения, выносимые на защиту, отражают персональный вклад автора в опубликованные работы. У автора отсутствует конфликт интересов с соавторами по публикациям.

Благодарности

Автор благодарен своим коллегам и соавторам, с которыми на разных этапах выполнения исследований имел возможность обсуждать проблемы, рассматриваемые в диссертации: руководителю проекта OpenWorm доктору С.Д. Ларсону (Stephen D. Larson, University of California, San Diego), доктору П. Глисон (Dr. P. Gleeson, University College, London), нобелевскому лауреату, профессору М. Карплусу (M. Karplus, Harvard University), профессору Дж.Г. Уайту (J.G. White, University of Cambridge), академику РАН Н.А. Колчанову (ФИЦ ИЦиГ СО РАН), член-корреспонденту РАН А.В. Кочетову (ФИЦ ИЦиГ СО РАН), д.ф.-

м.н., профессору С.Ф. Чекмареву (ИТ СО РАН), д.б.н. А.С. Ратушняку (ИВТ СО РАН), к.ф.-м.н. Ф.А. Мурзину (ИСИ СО РАН) и своим основным соавторам в рамках данного направления исследований - С.С. Хайрулину (ИСИ СО РАН), Н.В. Пальяновой (НИИМББ СО РАН) и А.А. Диберту (НГУ), а также д.г.-м.н. Ю.Н. Пальянову (ИГМ СО РАН) и д.г.-м.н. Г.А. Пальяновой (ИГМ СО РАН) за помощь с общими вопросами подготовки диссертации.

Особую благодарность выражаю профессору, д.ф.-м.н. А.Г. Марчуку (ИСИ СО РАН) за внимание к работе, обсуждение многих сложных вопросов, возникавших в ходе исследований, и за научное консультирование на финальных этапах подготовки диссертации.

Глава 1. О проблемах и перспективах компьютерного моделирования процессов, лежащих в основе нервной деятельности и поведения живых организмов

1.1. О роли нервной системы в жизни многоклеточных организмов

Согласно современным научным представлениям, именно нервная система обеспечивает управление организмом и саморегуляцию его жизнедеятельности, а также получение, хранение и переработку информации из внешней и внутренней среды, вплоть до высших психических функций, таких как память, интеллект, эмоции, субъективное восприятие, сознание. Основной структурной единицей нервной системы является нервная клетка, или нейрон, отличающаяся от других типов клеток наличием отростков, иногда весьма протяженных, способных образовывать контакты с другими нейронами и клетками (сенсорными, мышечными, эндокринными и другими), а также способностью обмениваться с ними электрическими сигналами.

«Появление нервных клеток, а затем и мозга у некоторых многоклеточных организмов – исключительное событие, значение и важность которого сложно переоценить. Это особый механизм, благодаря которому индивидуум реагирует на альтернативные ситуации соответствующим изменением поведения, механизм адаптации к изменяющейся окружающей обстановке. Это наиболее сложный и замысловатый из подобных механизмов, и где бы он ни появился, он быстро завоевывает доминирующую роль» [Шрёдингер, 1958].

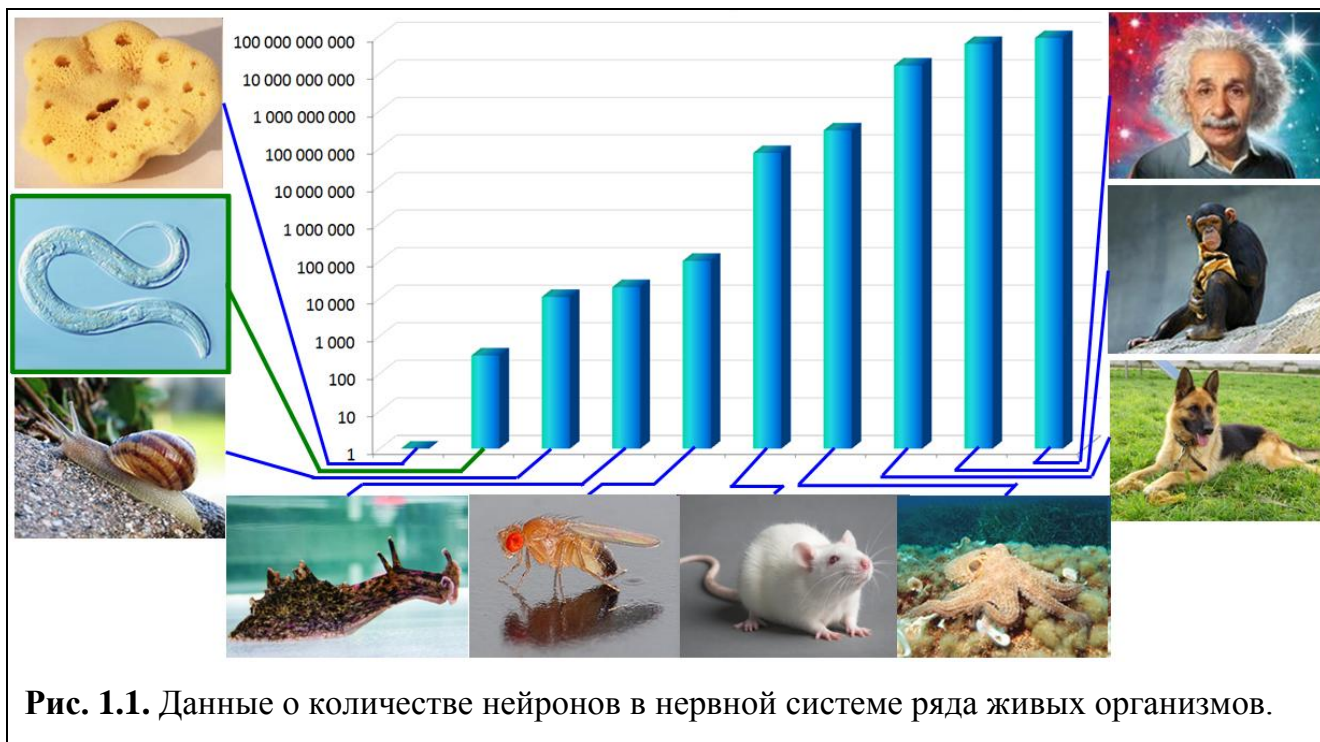
На Земле обитает множество различных организмов, наделенных нервной системой, сложность которой варьирует от сотен до сотен миллиардов нейронов. Несмотря на огромные различия в условиях обитания, образе жизни и анатомии, их нервная система основывается на общих принципах и состоит из нейронов, аналогично тому, как все живые организмы используют единый механизм хранения и передачи генетической информации.

Таблица 1. Данные о приблизительном количестве нейронов и межнейронных связей в нервной системе ряда живых организмов

Биологический вид	Количество нейронов в мозге	Количество нейронов в коре мозга	Количество межнейронных связей (синапсов)
Губка	0	-	0
Нематода <i>C. elegans</i>	302	-	$\sim 7.5 \cdot 10^3$
Улитка (прудовик)	$1.1 \cdot 10^4$	-	нет данных
Моллюск <i>A. californica</i>	$1.8 \cdot 10^4$	-	нет данных
Плодовая мушка <i>D. melanogaster</i>	$1.0 \cdot 10^5$	-	$\sim 10^7$
Муравей	$2.5 \cdot 10^5$	-	зависит от вида
Пчела	$9.6 \cdot 10^5$	-	10^9
Таракан	$1.0 \cdot 10^6$	-	нет данных
Лягушка	$1.6 \cdot 10^7$	-	нет данных
Мышь	$7.1 \cdot 10^7$	$1.4 \cdot 10^7$	10^{12}
Крыса	$2.0 \cdot 10^8$	$3.1 \cdot 10^7$	$\sim 4.48 \times 10^{11}$
Осьминог	$5.0 \cdot 10^8$		нет данных
Сова	$6.9 \cdot 10^8$	$4.4 \cdot 10^8$	
Кошка	$7.6 \cdot 10^8$	$2.5 \cdot 10^8$	$\sim 10^{13}$
Собака	$2.3 \cdot 10^9$	$5.3 \cdot 10^8$	нет данных
Шимпанзе	$2.8 \cdot 10^{10}$	$6.2 \cdot 10^9$	нет данных
Человек	$8.6 \cdot 10^{10}$	$1.6 \cdot 10^{10}$	$\sim 1.5 \cdot 10^{14}$
Слон	$2.5 \cdot 10^{11}$	$5.6 \cdot 10^9$	нет данных

Таблица 1 характеризует нервную систему различных организмов, от простейших многоклеточных до человека, по ряду параметров, отражающих сложность её строения (по данным⁴ и [Herculano-Houzel, 2009]).

Данные о количестве нейронов также наглядно представлены на Рис. 1.1:



Колоссальные возможности мозга человека издавна привлекают ученых. Во-первых, с целью понять, как функционируют все эти механизмы и тем самым больше узнать о самих себе (еще во времена древних греков на стене храма Аполлона была надпись, гласившая: «Познай самого себя»⁵). Во-вторых, чрезвычайно привлекательна идея о том, чтобы научиться строить искусственные системы, воспроизводящие функции нервной системы на базе иной архитектуры, нежели биологический мозг.

⁴ http://en.wikipedia.org/wiki/List_of_animals_by_number_of_neurons

⁵ https://ru.wikipedia.org/wiki/Познай_самого_себя

1.2. О гипотетических возможностях компьютерной симуляции механизмов функционирования биологического мозга

К настоящему времени ученые еще не пришли к единому мнению относительно того, возможно ли осуществить симуляцию работы биологического мозга на электронном (компьютерном) носителе, и, по-видимому, точку в этом вопросе можно будет поставить только в случае, если такая симуляция будет успешно осуществлена и признана функционально идентичной оригиналу. Высокий интерес ученых к исследованиям в данной области объясняется следующими соображениями: Во-первых – биологический мозг стареет, как и весь остальной организм, а компьютер, если правильно организовать резервное копирование данных и периодически заменять оборудование на новое, может хранить их практически неограниченное время. Во-вторых, у биологического мозга есть неприятное свойство – после 5 минут без снабжения кислородом необратимые повреждения нейронов становятся настолько сильными, что смерть становится практически неизбежной. Необратимые повреждения вскоре после выключения питания, напротив, совершенно несвойственны компьютерам – они могут годами пребывать в выключенном состоянии. Здесь стоит отметить, что имеются и исключения – например, известны случаи клинической смерти людей, сопровождавшиеся переохлаждением до 13-14 °С на протяжении нескольких часов, после чего пациентов удалось вернуть к жизни с последующим полным восстановлением⁶[Gilbert et al., 2000], а также зарегистрированы факты задержки дыхания на период до 20 и более минут у профессиональных ныряльщиков [Tetzlaff and Thorsen, 2005]. В-третьих - компьютеры функционируют на частотах, исчисляемых гигагерцами (до $4.5 \cdot 10^9$ Гц и более), тогда как у генерируемых биологическими нейронами сигналов частота достигает значений, лишь немногим превышающих 600 Гц [Wang et al., 2016]. Однако, фундаментальные принципы функционирования мозга, до полного понимания которых, вероятно, еще далеко,

⁶ <https://www.msn.com/en-gb/news/other/girl-survives-13-degree-body-temperature/ar-AAmSEW>

позволяют ему без видимых усилий решать когнитивные задачи, с большинством которых современные суперкомпьютеры, симулирующие работу нейронных сетей, пока в принципе не способны справиться. В идеале хотелось бы объединить в искусственных системах будущего преимущества обеих архитектур.

1.3. Об энергоэффективности работы и плотности хранения информации в живых клетках и в компьютерных системах

Любопытно в данном контексте упомянуть проблему эффективности работы и энергопотребления настоящего мозга и его модели. Возьмем, к примеру, суперкомпьютер IBM Sequoia, обладающий производительностью в 16.3×10^{15} операций с плавающей запятой в секунду и энергопотреблением 7.9 мегаватт (самый мощный суперкомпьютер в мире на 2012 год, 10-й по мощности в настоящее время). Простой расчет показывает, что его использование позволило бы моделировать по технологии BlueBrain до 12 миллионов нейронов, что составляет 0.7% от их числа в мозге человека (по современным оценкам – около 86 миллиардов). Таким образом, моделирование полного их числа в наши дни потребовало бы 1.13 гигаватт энергии. Давайте сравним со средним энергопотреблением мозга взрослого человека – оно составляет, согласно расчетам [Kandel and Schwartz, 1985], всего около 25 ватт (!), а сам мозг с впечатляющим отрывом выигрывает у техники, в том числе по компактности и функциональным возможностям. Нельзя оставить без внимания столь серьезную и масштабную проблему, имеющую ключевое значение для дальнейшего прогресса науки и технологий. Попробуем выяснить причину столь значительного разрыва.

В живых организмах наследственная информация хранится в молекулах дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) и кодируется 4-х буквенным алфавитом, образуемым, соответственно, четырьмя различными нуклеотидами. Одна «ячейка информации» может содержать одно из четырех значений, т.е. хранить 2 бита. Число атомов, составляющих нуклеотид, в зависимости от его типа, составляет

25...28 атомов, т.е. получается, что около 12.5...14 атомов физически обеспечивают хранение 1 бита информации, причем в течение длительного интервала времени. А что насчет памяти современных компьютеров? Ячейка памяти (1 бит) DDR4 имеет размер 300 Å (ангстрем) или 30 нм (для простоты оценки будем считать её кубической). Диаметр атома кремния ≈ 0.24 нм, т.е. на грань куба приходится 125 атомов, а всего атомов всего в ячейке ≈ 2 млн. Чтобы просто задать координаты одного атома (x, y, z) и его скорость (vx, vy, vz) в памяти компьютера, нужно 6 переменных типа float (4 байта = 32 бита) * 6 = 192, умноженные на 2 млн. = 0.37 млрд. атомов! Т.е. разница в эффективности хранения данных между природой (ДНК) и современными компьютерами – около 28 млн. раз (!). Отношение энергопотребления симуляции мозга (не самой сложной и детальной, упомянутой в предыдущем параграфе) к энергопотреблению реального мозга, составляющее ≈ 45 млн., по порядку величины довольно близко к отношению между эффективностями хранения данных. Здесь есть над чем задуматься и ученому, и инженеру – пределы потенциальных возможностей для развития технологий впечатляют!

1.4. О современном состоянии исследований, направленных на создание искусственных разумных систем и решение проблемы обратной инженерии мозга

Развитие компьютерных технологий привело к впечатляющим успехам в области высокопроизводительных и суперкомпьютерных вычислений, теории алгоритмов, кибернетики, робототехники и многих других направлений, в том числе в области искусственного интеллекта. Однако, одна из глобальных задач в области компьютерных технологий, к решению которой люди так стремились начиная с появления первых вычислительных машин – наделить компьютеры разумом – пока так и осталась нерешенной. В настоящее время не существует ни одной искусственной компьютерной системы, обладающей субъективным восприятием или сознанием, поскольку принципиально непонятен фундаментальный механизм, лежащий в основе этого явления. В ранние годы

исследований, направленных на создание искусственных разумных систем, ученые и инженеры, работающие в этой области на протяжении нескольких десятилетий в основном разделяли идею о том, что для решения этой задачи нет необходимости изучать мозг и не обязательно копировать его архитектуру, что можно выдумать свою собственную, альтернативную, не хуже.

В итоге, при анализе основных причин неудач в области ИИ в 1996 году были отмечены следующие: 1) «большинство исследователей ищут простые объяснения для сложнейших явлений» и 2) для достижения успеха «необходимо копировать биологию – ведь в мозге, несомненно, существуют сотни различных видов механизмов, специализирующихся на разных типах задач, объединенные не менее сложными структурами управления»⁷.

Один из современных подходов к решению этой проблемы заключается именно в воспроизведении биологических механизмов работы реальной нервной системы в форме компьютерной симуляции – с учетом архитектуры сетей биологических нейронов, различных типов контактов между нейронами, ионных каналов и ионных токов и различных других факторов, влияющих на нейроинформационные процессы и их обеспечивающих. Ожидается, что при определенном уровне точности, даже довольно впечатляющем по современным меркам, созданная симуляция может оказаться существенно отличной от оригинала. Однако, это уже будет некоторым приближением, отправной точкой, с которой можно двигаться дальше, выявляя наиболее существенные причины расхождений и учитывая их в последующий, более точных моделях или узнавая новые необходимые данные из экспериментов.

В настоящее время междисциплинарные исследования на стыке нейробиологии и информатики уже не являются недооцененными – были начаты и продолжают выполняться такие масштабные проекты, как Blue Brain Project⁸

⁷ Singh's manifesto, titled "Why AI Failed" (with Bill Gates' response).

https://openwetware.org/wiki/User:Bill_Flanagan/docs/Why_AI_Failed, MIT, 1996.

⁸ <https://bluebrain.epfl.ch/>

(исследование и моделирование мозга крысы), Human Brain Project⁹ (исследование и моделирование мозга человека), Human Connectome Project¹⁰ (определение архитектуры мозга человека на уровне карты связей между отдельными нейронами). По имеющимся оценкам, число нейронов в мозге человека составляет около 86 миллиардов [Azevedo et al., 2009], а число связей между ними – около $1.5 \cdot 10^{14}$. Постоянно увеличивающиеся вычислительные мощности современных суперкомпьютеров сподвигают ученых на создание все более масштабных моделей нейроподобных систем [Markram, 2006; Izhikevich and Edelman, 2008; Eliasmith et al., 2012; Reimann et al., 2013] - в надежде приблизиться к разгадкам принципов работы мозга, в том числе мозга человека. Например, нейронная сеть, представленная в работе [Eliasmith et al., 2012], включает 2.5 млн. нейронов и воспроизводит ряд нейроанатомических и нейрофизиологических аспектов реальных биологических сетей нейронов.

В последние годы интерес к данному направлению неизменно растет. При этом чрезвычайно актуальной остается проблема проверки адекватности работы подобных систем, которая, по сути, невозможна без обеспечения работающей модели потоком входящих сигналов, а ее исследователя – средствами анализа нейронной активности и ее результатов. Такая проверка представляется возможной, только если при моделировании организма не ограничиваться лишь одной нервной системой. Необходима также модель тела, снабженная сенсорной и мышечной системами под управлением нейронной сети, образующая в совокупности с виртуальной внешней средой самодостаточную нейроинформационную систему, подобную реальному организму [Palyanov et al., 2011; Пальянов, Пальянова и др., 2012; Cohen and Sanders, 2014; Szigeti et al., 2014]. До настоящего времени ни один биологический организм не был смоделирован подобным образом.

⁹ <https://www.humanbrainproject.eu/en/>

¹⁰ <http://www.humanconnectomeproject.org/>

Несмотря на положительную тенденцию в области «наведения мостов» и интеграции между нейробиологией и компьютерным моделированием, проекты по моделированию мозга человека вызывают довольно неоднозначную реакцию со стороны мирового сообщества, поскольку игнорируется принцип «от простого к сложному». Многие разделяют точку зрения о том, что научно-технологический уровень, необходимый для понимания сложнейшего объекта во вселенной – человеческого мозга, еще не достигнут, а для его достижения на начальном этапе необходимо создание компьютерной симуляции как можно более простой биологической нервной системы, воспроизводящей ее структуру настолько детально, насколько потребуется для корректного воспроизведения происходящих в ней нейроинформационных процессов. Возможно, потребуется детализация на уровне отдельных нейронов и соединений между ними, но также возможен и вариант, когда потребуется также моделировать работу ионных каналов и нейромедиаторов, а может быть и более глубинных механизмов. Движение в этом направлении сопряжено с основной целью нейронаук – понять, как информация распространяется и обрабатывается в нервной системе.

1.5. О необходимом уровне детализации моделей

Вполне реальным сценарием представляется положение дел, при котором для нейробиологически достоверного моделирования процессов в нервной системе того или иного живого организма действительно придется моделировать работу каждой его нервной клетки. На данном этапе развития вычислительной техники, по всей видимости, не представляется возможным смоделировать абсолютно все известные нам процессы, происходящие в мозге. При разработке модели будет необходимо выбирать, что является существенным, на какой уровень детализации хватит имеющихся вычислительных мощностей и объемов памяти, а также учитывать перспективы дальнейшего развития модели.

Гипотетическое обладание неограниченными вычислительными возможностями позволило бы с помощью метода молекулярной динамики [Alder,

Wainwright, 1959] просчитать изменение этой системы во времени с небывалой детализацией, включая работу генетического аппарата, синтез и работу белков, процесс деления клетки и т.д., задав исходную пространственную конфигурацию координат, скоростей и состояний атомов, образующих, скажем, одноклеточный организм в некоторой естественной среде в данный момент (для небольших организмов имеются технологии обратимой заморозки¹¹ – в таком состоянии значительно проще произвести «оцифровку»).

Имеется еще один гипотетический подход, даже более радикальный, чем предыдущий – вместо оцифровки и симуляции взрослого организма в качестве исходных данных можно использовать оплодотворенную яйцеклетку, включая её геном. Моделирование процесса развития организма на молекулярном уровне позволит в итоге получить готовую нервную систему сразу в электронном виде. Причем все это – не вдаваясь в механизмы, лежащие в основе данных процессов, исходя лишь из общих физических принципов взаимодействия между атомами, молекулами и ионами. Однако, вопрос о возможности успешного осуществления подобных проектов, даже через десятки или сотни лет, остается открытым. Слабое место заключается в том, что потенциалы взаимодействия между атомами и ионами в молекулярной динамике заданы приближенными функциями, и в большинстве случаев не учитывают более тонкие квантовые эффекты¹², что сразу вносит в систему определенный уровень ошибки, который впоследствии будет только накапливаться. Расчет уравнений движения частиц системы, производимый с конечным шагом интегрирования по времени, также будет вносить определенную погрешность.

Попробуем, однако, оценить объем вычислений, необходимый для подобных молекулярно-динамических расчетов. Рассмотрим, для примера, один из мельчайших одноклеточных организмов – бактерию *Mycoplasma genitalium*,

¹¹ <https://www.popmech.ru/science/45095-pochemu-zamorozhennye-lyagushki-vozvrashchayutsya-k-zhizni/>

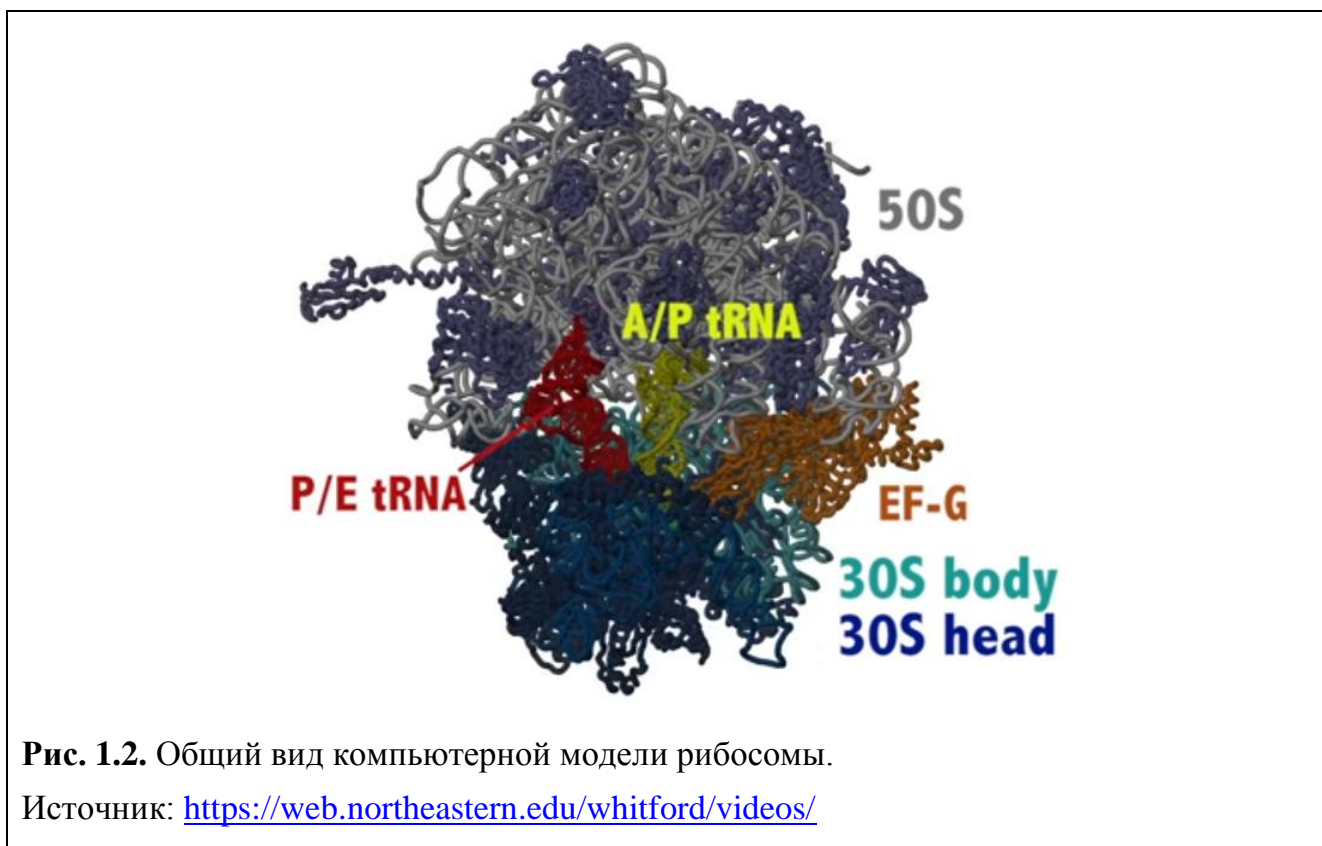
¹² https://ru.wikipedia.org/wiki/Квантовая_химия

обладающую размером ~ 250 нм, или 2.5×10^{-7} м. Объем куба со стороной такого размера составит 1.5×10^{-20} м³, что с учетом плотности воды = 1000 кг/м³ и массы одной молекулы воды = 3×10^{-26} кг даст нам оценку числа молекул воды, занимающих этот объем - 5×10^8 , или полмиллиарда (как известно, и в организме человека и в живой клетке вода составляет подавляющую долю всего вещества). С одной стороны, полмиллиарда молекул не являются запредельно большим количеством, чтобы осуществить симуляцию такой системы. Объем памяти, требуемый для хранения данных, описывающих координаты и скорости подобной системы (3 атома в молекуле воды, каждый атом описывается, как минимум, тремя координатами и тремя компонентами вектора скорости, каждая из которых – число с плавающей запятой, занимающее 4 байта в памяти компьютера), составляет $5 \times 10^8 \times 3 \times 6 \times 4 = 36$ Гбайт. В 2018 г. мощный современный настольный компьютер уже может быть оснащен объемом оперативной памяти вплоть до 64 Гбайт, не говоря уже о суперкомпьютерах. Однако, в задачах такого класса лимитирующим фактором является не объем памяти, а вычислительная мощность, требуемая для работы алгоритма, которая может быть наглядно проиллюстрирована на следующем примере.

1.6. Современные достижения в области компьютерного моделирования: синтез белка на рибосоме

Одним из недавних рекордов в вычислительной биологии можно назвать успешное молекулярно-динамическое моделирование механизмов функционирования *рибосомы* (одного из важнейших немембранных органоидов живой клетки, обладающей характерным диаметром 10...20 нм), выполняющей биосинтез белка в соответствии с процессируемым ею фрагментом генетического кода, записанным на матричной РНК. Характерная молекулярная масса рибосомы оставляет 1340 кДа, или 2.2×10^{-21} кг; она состоит примерно из 250 тыс. атомов. Дополнительно в симуляции необходимы водное окружение, фрагмент мРНК и компоненты, необходимые для сборки белка – тРНК и аминокислоты. Это увеличивает количество атомов в модели до 2.6 млн. Ученые из лаборатории в

Лос-Аламосе (США) впервые в мире смоделировали описанную систему на суперкомпьютере «ASCI Q machine», оснащенном 8192 процессорами. Для того, чтобы полностью просчитать этот процесс, продолжающийся в течение 2-х нс (наносекунд), потребовалось около 260 дней (8.7 месяцев) непрерывной работы суперкомпьютера [Sanbonmatsu et al., 2005] – в результате был смоделирован процесс, называемый аккомодацией, включающий движение тРНК внутрь рибосомы. Спустя 8 лет, в результате развития вычислительных технологий была осуществлена симуляция 1.3 мс (микросекунд) функционирования рибосомы [Whitford et al., 2013] (см. Рис. 1.2). Это в 650 раз больше, чем в 2005 г. Конфигурация включала 2.1 миллиона атомов; временные затраты на вычисления составили около 5 месяцев при использовании 1024 процессорных ядер.



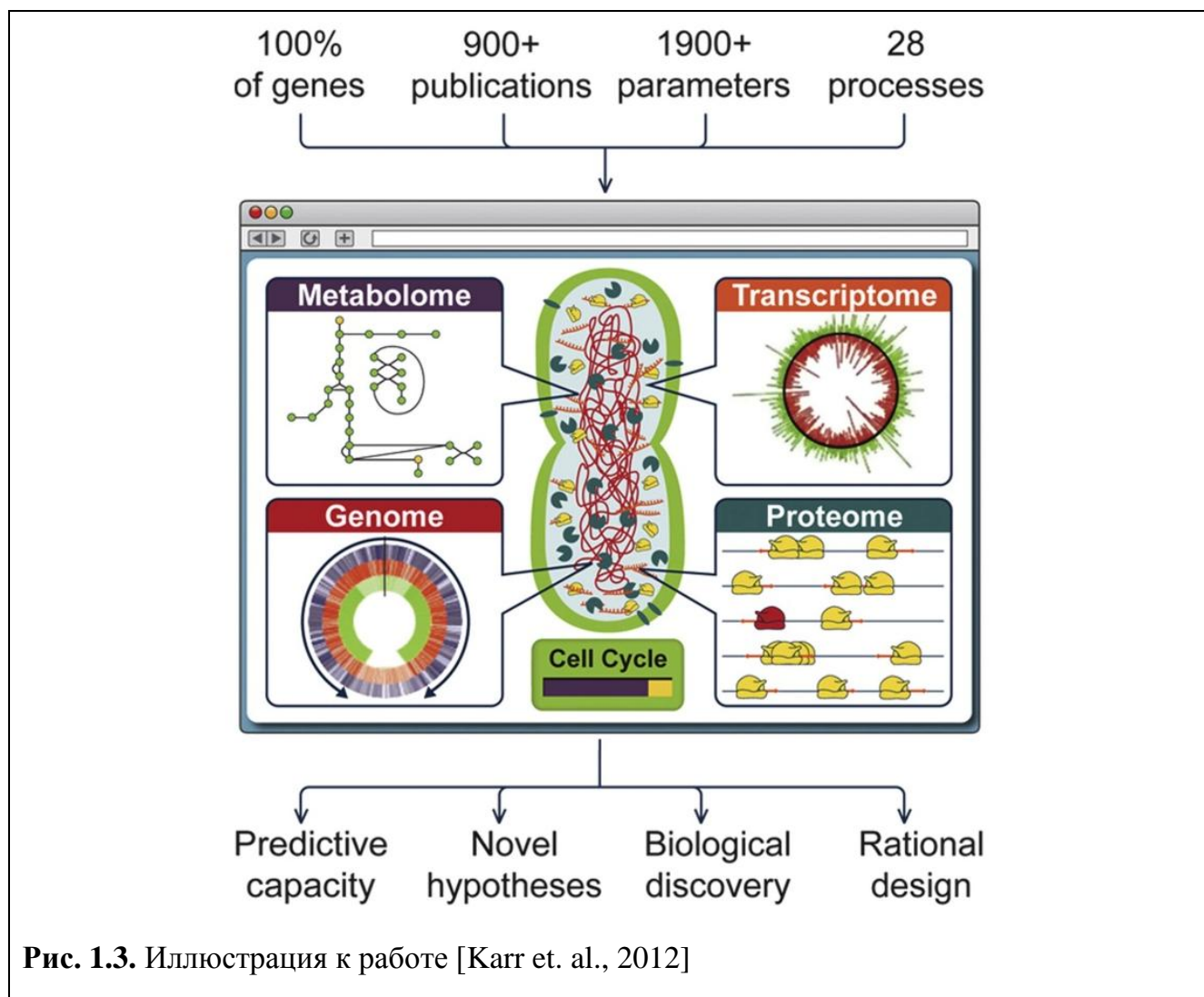
В описанной выше работе [Sanbonmatsu et al., 2005] был использован шаг по времени, равный 10^{-16} с, или 0.1 фс (фемтосекунд). В молекулярной динамике обычно используют значения шага интегрирования по времени до 0.5-1.0 фс, определяемые частотами колебаний межмолекулярных связей, поскольку дальнейшее увеличение приводит к увеличению погрешности и ошибкам в

расчетах. Это и есть существенное ограничение, лимитирующее возможности использования молекулярной динамики для процессов, протекающих в течение значительно более продолжительного времени. Так, генерация нейроном потенциала действия, порождающего одиночный нервный импульс, происходит за характерное время 4 мс (миллисекунд). Это уже примерно в миллион раз больший интервал времени, чем 2 нс в только что рассмотренном примере. Да и рассматривали мы не клетку целиком, а лишь ее малый фрагмент. Однако, даже миллисекунда расчетов для одного нейрона, как мы уже поняли, недостижимая при данной детализации, не обеспечила бы достижения наших целей – ведь на практике необходим не один нейрон, а для начала – несколько сотен, как у *C. elegans*. При этом желательно, чтобы время в системе отсчета объекта моделирования составляло, как минимум, минуты, а лучше часы или дни.

1.7. Современные достижения в области компьютерного моделирования: первая электронная клетка

Итак, на примере, рассмотренном в предыдущем разделе, мы только что наглядно убедились, что полноатомное моделирование для объектов, сравнимых с живой клеткой или более крупных – недоступный путь при существующих вычислительных возможностях, и останется таковым еще долгие годы. Однако, это вовсе не означает, что нужно на годы перестать заниматься моделированием и сфокусироваться на разработке более мощных компьютеров. Правильно выбранный баланс между сложностью модели и ограничениями на допустимую продолжительность времени расчетов на выбранном компьютере или суперкомпьютере позволит максимально эффективно использовать имеющиеся возможности и ресурсы. Например, это удалось авторам первой цифровой модели простого одноклеточного организма *Mycoplasma genitalium* [Karr et. al., 2012], который мы уже недавно рассматривали в примере оценки сложности вычислений на основе молекулярной динамики. Бактерия привлекает исследователей в первую очередь минимальным размером своего генетического аппарата - всего 525 генов, что почти в 10 раз меньше, чем у более привычной

лабораторной *E. coli*, у которой их 4288. Малый размер бактерии также является положительным фактором. Модель, описанная в работе [Karr et. al., 2012], включает 28 отдельных модулей, взаимодействующих между собой (см. Рис. 1.3).



В модель были включены процессы, происходящие в живой клетке, определяемые более чем 1900 параметрами. Для создания модели были использованы 900 различных научных отчетов об исследовании данного организма. Вычислительная сложность модели довольно высока, но не запредельна – для моделирования процесса деления клетки требуется 10 часов симуляции. Конечно, речь идет не о 3D моделировании цитоплазмы, мембраны, деления ядра и т.д., а о корректной динамике концентраций молекулярных компонентов, вовлеченных в процесс.

Данная разработка – отличный пример компромисса между сложностью

модели и разумным временем симуляции, на который стоит ориентироваться и которого хотелось бы достичь в отношении нейронов, для которых пока отсутствуют модели отдельной нервной клетки, сравнимые по уровню сложности.

1.8. О биологических нейронах и взаимодействиях между ними

Согласно современным научным представлениям, нервная система функционирует благодаря специализированным клеткам – нейронам, объединенным в сложно организованную нервную сеть при помощи синапсов – контактов между нервными клетками (см. Рис. 1.4).

Для обозначения полного описания структуры связей в нервной системе организма был введен специальный термин – коннектом. Первый и пока единственный коннектом принадлежит нематоде *C. elegans*, обладающей нервной системой из 302 нейронов.

Роль нейрона в сети определяется набором медиаторов и рецепторов, экспрессирующихся в конкретной клетке. Под действием нервного импульса медиатор выделяется в синаптическую щель, захватывается рецепторами следующей клетки и запускает в ней каскад реакций, приводящий к передаче нервного импульса дальше. Известны десятки медиаторов и подобных им соединений; для каждого медиатора известно большое количество рецепторов, обуславливающих разнообразие нейронного ответа.

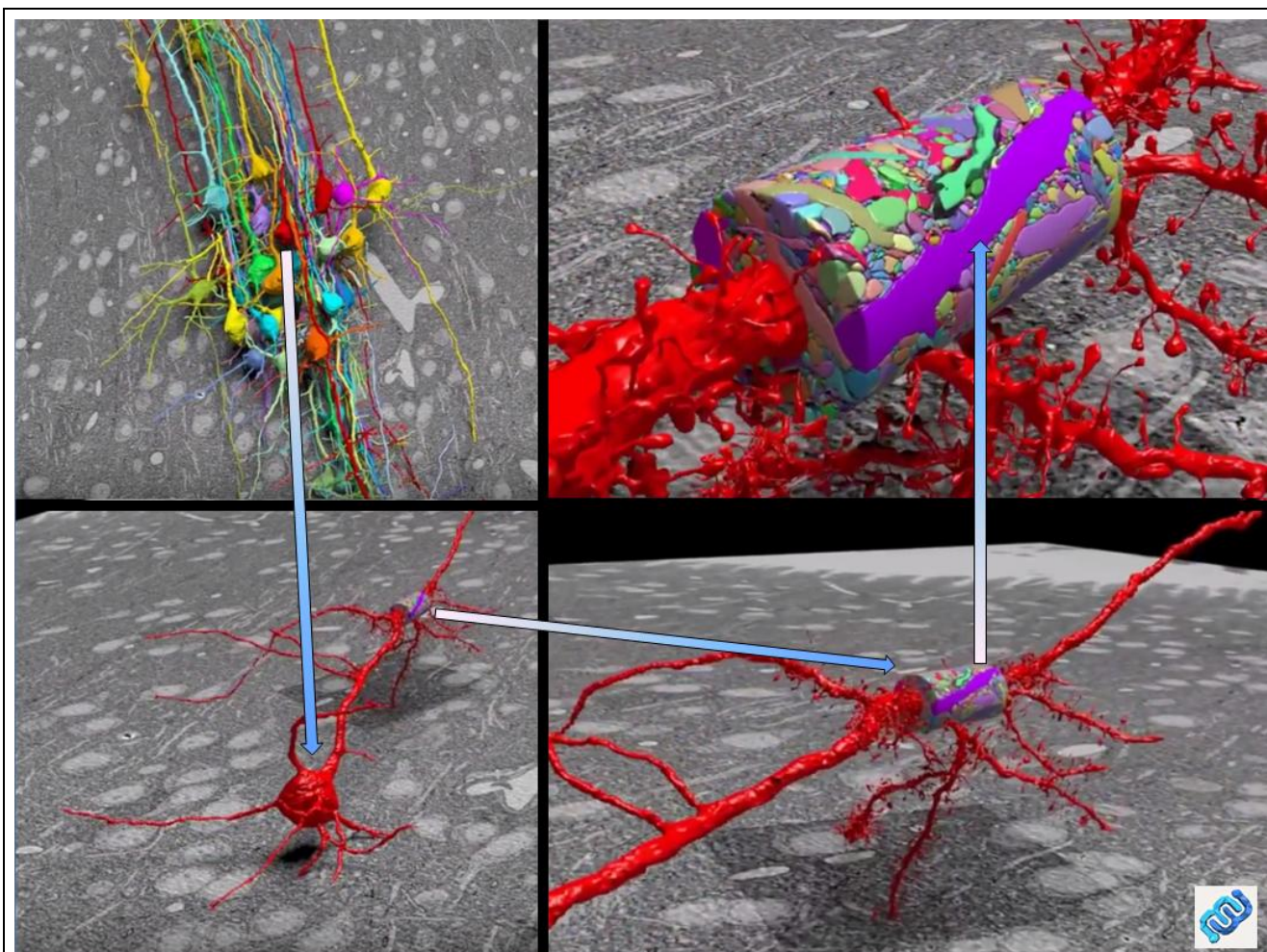


Рис. 1.4. Иллюстрация сложности трехмерной структуры как одиночного нейрона, так и нервной ткани. Источник: EyeWire Project, 3D-реконструкция на основе серии микрофотографий.

Несмотря на то, что от нейрона к нейрону импульс передается химически, вдоль клетки и по ее отросткам импульс идет в виде локальных изменений разности потенциалов на мембране. С помощью электрофизиологических методов была получена важная информация о свойствах мембраны нейрона - обнаружены каналы для различных типов ионов, зависимые от разности потенциалов или регулируемых внутриклеточными или внеклеточными сигналами. Более детально с описанием этих механизмов можно ознакомиться, например, в хорошо известной нейробиологам книге «От нейрона к мозгу» [Николлс и др., 2003].

О том, что группа нейронов способна эффективно обрабатывать информацию, например, в задачах распознавания образов, было известно давно.

Ученые пытались конструировать модели нейронных сетей для решения широкого спектра задач, однако долгое время под моделью нейрона понимали математическую абстракцию, лишь весьма отдаленно похожую на свой биологический прообраз. Модели воспроизводили лишь немногие присущие настоящему нейрону свойства – такие, как восприятие и суммирование сигналов, приходящих по дендритам, последующая передача по неветвящемуся аксону при определенных условиях и перенастройка параметров дендритов для обучения¹³. Долгое время нейрохимия и многие другие важные аспекты оставались вне сферы внимания создателей моделей нейронов, и для этого существовал ряд причин.

Качественное и количественное описание, а тем более моделирование всех этих процессов является кропотливой и трудоемкой задачей, над которой трудятся сотни научно-исследовательских групп во всем мире. А ведь кроме проведения импульса, нейрон, как и любая клетка, метаболизирует питательные вещества, обновляет белки, удаляет отходы, в геноме постоянно происходит запуск экспрессии одних генов и подавление других, что регулируется как внешними для нейрона факторами (уровень эстрогенов или инсулина), так и внутренними (метиляция, уровень тех или иных метаболитов). Кроме того, нейроны чувствительны к уровню кислорода и глюкозы, а значит, их работа тесно связана с локальным состоянием сосудов. Также следует принимать во внимание физико-химические свойства мембраны нейрона, влияющие на скорость проведения импульса. Учесть все эти процессы при моделировании пока невозможно, но работа постоянно идет и модели совершенствуются. Охватить все многообразие процессов, вовлеченных в механизмы работы нейрона на различных уровнях иерархии, в рамках данной работы не представляется возможным, однако стоит отметить, что многие из них детально описаны в работах [Гутман, 1984; Самойлов, 1999; Ratushnyak, Zapara, 2009] и ряде других источников.

¹³ https://en.wikipedia.org/wiki/Artificial_neural_network

1.9. О проекте «The Blue Brain»

Одним из масштабных современных проектов, посвященным моделированию биологической нервной ткани, является The Blue Brain Project [Markram, 2006]. Наряду с кратким описанием достижений авторов проекта попробуем оценить на его основе пределы современных вычислительных возможностей применительно к данной проблеме. Цель, которую исследователи планировали достигнуть в течение первой фазы проекта, состояла в построении компьютерной модели колонки неокортекса молодой крысы, состоящей из 10^4 нейронов. Неокортекс - новые области коры головного мозга, которые у низших млекопитающих только намечены, а у человека составляют основную часть коры. Новая кора располагается в верхнем слое полушарий мозга, имеет толщину 2-4 миллиметра и отвечает за высшие нервные функции – сенсорное восприятие, выполнение моторных команд, осознанное мышление и, у людей, речь. Колонка – минимальный функциональный элемент периодической структуры, составляющей неокортекс. У молодой крысы в возрасте 2.5 недель, рассматриваемой авторами, колонка неокортекса имеет 0.5 мм в диаметре, 2.5 мм в высоту и состоит из 10 тысяч нейронов, связанных между собой 10^8 синапсов. Для сравнения, в колонке человека – 60 тысяч нейронов.

Созданию модели такого масштаба непременно должен предшествовать огромный объем предварительной работы по изучению объекта моделирования. На начальном этапе необходимо разработать параметрическую модель нейрона с учетом особенностей изучаемого организма, определить набор наиболее важных в нейроинформационном аспекте процессов, происходящих в нем, а также уровень детализации, с которой планируется их воспроизведение. Определившись с тем, что именно и с какой точностью потребуется для модели, можно будет приступить к получению этих данных, т.е. к оцифровке изучаемого фрагмента нервной ткани, результатом которой станет сложная трехмерная структура, включающая нейроны, дендриты, аксоны, синапсы, а также типы синаптических соединений, если разрешающая способность используемого микроскопа позволит

их идентифицировать. Исследователями из Blue Brain описанная работа по оцифровке данных о строении колонки неокортекса была проделана впервые. При этом в процессе был задействован роботизированный комплекс, ранее разработанный руководителем проекта Г. Марккрамом и коллегами, позволивший команде Blue Brain получить необходимый объем данных за 6 месяцев вместо 30 лет, которые бы потребовались при выполнении этой работы «вручную».

Через три года после официального старта проекта Blue Brain в 2005 году первая намеченная цель была достигнута - на суперкомпьютере EPFL IBM Blue Gene/L, включающем 8192 процессора PowerPC 440 с тактовой частотой 700 МГц, была смоделирована колонка неокортекса крысы, состоящая из 10000 нейронов, образующих 13 миллионов синапсов. Позднее в симуляцию были включены несколько колонок, соединенных между собой (см. Рис. 1.5).

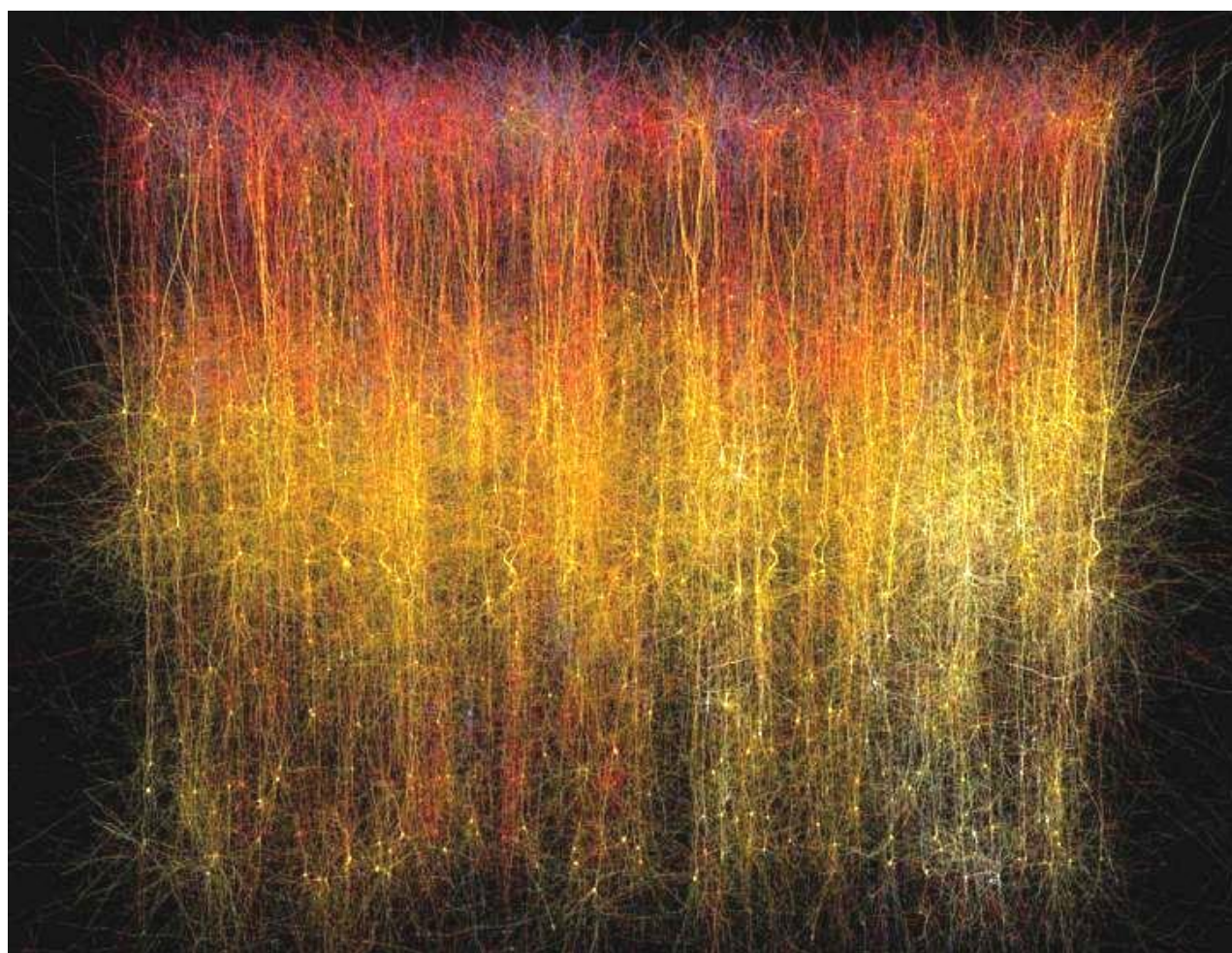


Рис. 1.5. Фрагмент нервной ткани, смоделированный в рамках проекта The Blue Brain.
Источник: Markram et al. / Cell 2015

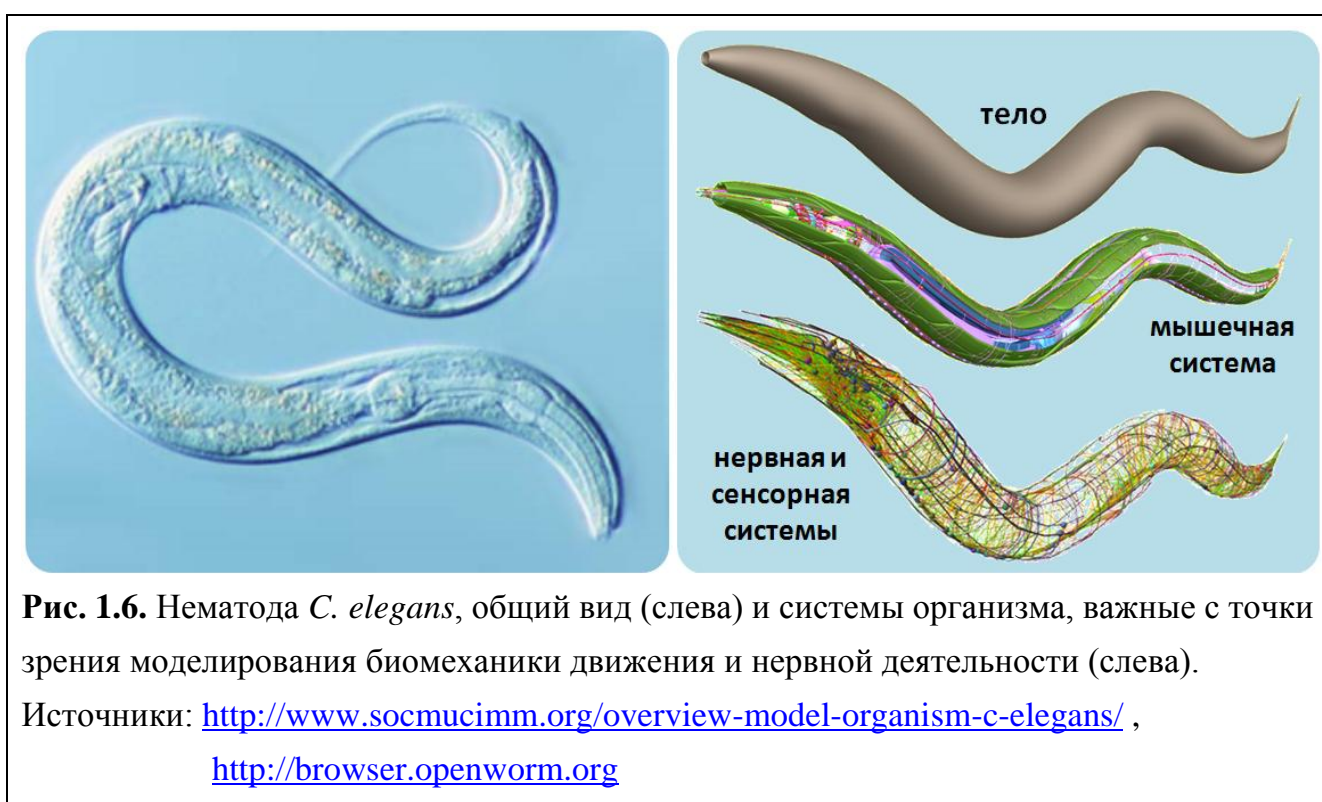
По сравнению с вышеупомянутым ASCII Q machine, на котором был рассчитан синтез белка на рибосоме в 2005 году, данная модель обладает в 10 раз большей производительностью - 136.8×10^{12} операций с плавающей запятой в секунду по сравнению 13.8×10^{12} . Для разработки моделей нейронов и межнейронных взаимодействий использовался программный пакет «NEURON»¹⁴, ориентированный на создание моделей нейронов и сетей биологических нейронов, основанных на экспериментальных данных. Отметим, что число нейронов и число процессоров в системе достаточно близки, то есть практически один процессор моделировал один нейрон. Ведется работа над «режимом реального времени», при котором 1 секунда реального времени работы мозга моделируется процессорами за 1 секунду. Также в «фазе II» запланирована калибровка модели за счет сравнения электрической активности модели с микроЭЭГ (микроэлектро-энцефалограммы) реальной биологической колонки. При этом остается весьма важный вопрос о режиме работы модели колонки, связанный с тем, что в настоящем мозге она непрерывно получает поток сенсорных сигналов от множества других участков мозга, с которыми она соединена, а как его удастся воспроизвести в рамках модели – пока непонятно.

В июле 2011 г. было заявлено о следующем достижении – моделировании комплекса из 100 таких колонок, т.е. состоящего из 1 млн. нейронов. По прогнозам исследователей из Blue Brain, смоделировать на суперкомпьютере число нейронов, эквивалентное таковому в мозге человека, на основе их нынешней технологии можно будет к 2023 году.

1.10. О роли нематоды *Caenorhabditis elegans* в решении проблемы обратной инженерии нервной системы

¹⁴ <http://www.neuron.yale.edu/neuron/>

В контексте проблемы обратной инженерии нервной системы особая роль принадлежит нематоду *C. elegans* (см. Рис. 1.6). С точки зрения нейробиологии это, пожалуй, самый изученный на сегодня многоклеточный организм, состоящий всего из 959 клеток. Объект пристального внимания нейробиологов уже более 30 лет [White et al., 1986], почвенная нематода *C. elegans* (с нервной системой всего из 302 нейронов), представляется идеальным кандидатом для того, чтобы стать прообразом своего виртуального двойника. Дж. Сальстону, лауреату Нобелевской премии 2002 года, полученной за исследование этой нематоды, принадлежит следующее высказывание: «Когда мы разгадаем червя – мы поймем жизнь»¹⁵.



Попытки создания виртуального организма на основе данных и знаний о строении внутренних систем *C. elegans*, исследованных методами оптической и электронной микроскопии, электрофизиологии, оптогенетики и др., предпринимались, начиная с работы Сузуки с соавторами [Suzuki et al., 2005]. Этими исследованиями занимаются сотни научных коллективов по всему миру, интерес к задаче неуклонно растет и имеются значительные успехи, однако

¹⁵ <https://www.theguardian.com/science/2002/oct/09/genetics.science>

уверенно спрогнозировать сроки её окончательного решения по-прежнему не представляется возможным. Основные системы, которые необходимо включить в симуляцию, с учетом взаимодействий между ними, представлены на Рис. 1.7:



Казалось бы, довольно трудоёмкой части, связанной с компьютерным моделированием тела и биомеханики его движения, можно было бы избежать, заменив его робототехнической системой. Такая попытка была предпринята [Yuk, Kim et al., 2011], однако создать робота, столь же миниатюрного как реальный организм, не удалось – вместо 1 мм. получившийся образец обладает длиной 30 см. (см. Рис. 1.8), а дальнейшая миниатюризация затруднена техническими ограничениями. При такой разнице в размерах получается существенное иное соотношение между силами, оказывающими влияние на движение – поверхностным натяжением, вязкостью, силой притяжения и другими факторами, однако, это не единственная проблема, возникающая при данном подходе.

Сложности возникнут при реализации сенсорной системы, которая, как уже ранее упоминалось, способна регистрировать механические, тепловые и химические воздействия, а также обладает светочувствительностью. Также необходимы датчики локальной кривизны тела на всем его протяжении, которая возникает как результат совместного действия сил, возникающих при сокращении мышц, и сил, обусловленных взаимодействием организма с внешней средой. Также, очевидно, понадобится интерфейс взаимодействия между роботом и компьютерным симулятором нервной системой.

Реализация и настройка такой системы может оказаться весьма трудоемкой, а также, предположительно, могут возникнуть сложности с воспроизведением и интерпретацией результатов при использовании разных или даже нескольких одинаковых роботов в разных лабораториях, в то время как программный комплекс, включающий компьютерную модель тела, внешней среды и нервной системы, будет лишен перечисленных проблем и недостатков и доступен любой научно-исследовательской группе, что и определило направление исследований.

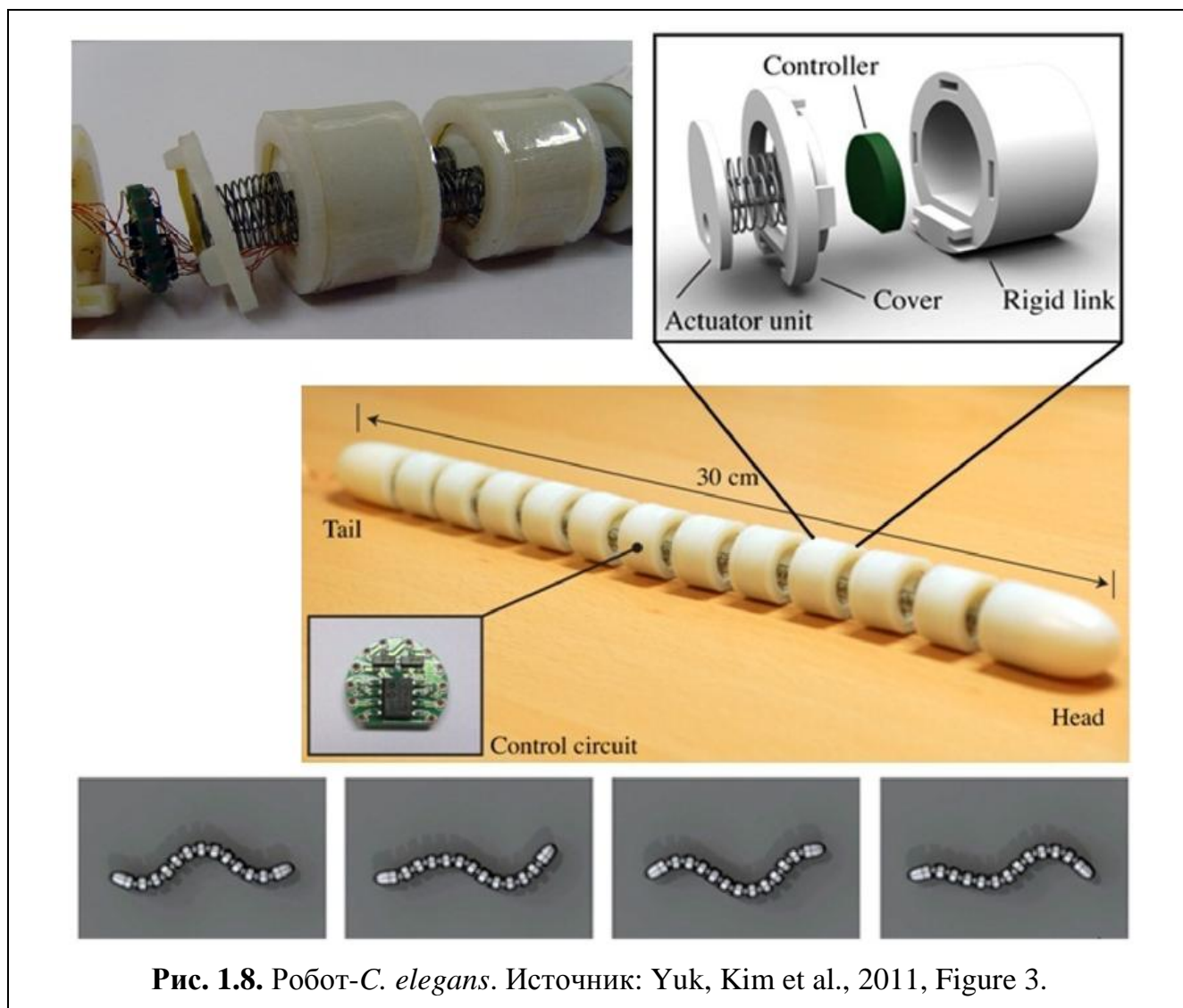


Рис. 1.8. Робот-*C. elegans*. Источник: Yuk, Kim et al., 2011, Figure 3.

Диссертация в основном посвящена вкладу автора в решение ряда задач, необходимых для решения описанной научной проблемы, включая вопросы разработки прикладного программного обеспечения, в том числе ориентированного на высокопроизводительные параллельные вычисления, предназначенного для моделирования динамики различных систем, составляющих организм *C. elegans* и лежащих в основе механизмов его функционирования.

1.11. О перспективах дальнейших исследований

К моменту, когда виртуальный организм на основе *C. elegans* будет, наконец, создан, его нейронные механизмы всесторонне изучены, а поведение «цифрового организма» будет отличаться от поведения реального при

аналогичных условиях не более, чем отличается поведение двух произвольно взятых особей *C. elegans*, с учетом полученного опыта и знаний можно будет приступить к изучению и моделированию более сложных объектов. Их ряд начинается, предположительно, достаточно хорошо изученный моллюск *Aplysia californica*, обладающий нервной системой из 18000-20000 крупных нейронов и зрительной системой, каждый глаз которой содержит около 7000 клеток-рецепторов [Jacklet, 1969], а завершается он мозгом человека, состоящим приблизительно из 86 миллиардов нейронов. Сложность зрительного аппарата человека также весьма впечатляет – типичное количество светочувствительных клеток в сетчатке глаза составляет около 122-127 миллионов (115-120 млн. клеток, обеспечивающих дневное цветное зрение и около 7 млн. клеток, реагирующих не на цвет, а на интенсивность светового потока – благодаря которым мы также обладаем сумеречным зрением).

Одна из наиболее изученных к настоящему моменту структур человеческого мозга – так называемая колонка неокортекса, новой коры головного мозга, являющаяся её периодическим структурным элементом, состоящим примерно из 50000 нервных клеток. Помимо связей внутри одной колонки неокортекса мозга, структура которых уже довольно хорошо изучена, имеется также значительное количество связей, соединяющих как соседние, так и более дальние колонки, а также и другие отделы мозга. Спектр функций различных областей новой коры довольно широк, от восприятия и анализа визуальной информации до принятия решений, так что, вполне вероятно, каждая из них обладает собственными структурными особенностями и собственными связями с другими отделами мозга, не говоря уже о самих этих отделах, необходимых для нормальной работы мозга не менее, чем новая кора. Также нельзя упускать из виду, что для создания полноценной модели мозга человека, весьма вероятно, будет необходим коннектом именно этого человека, целиком, поскольку он будет нести в себе его память, навыки, личность...

В 2009 году Национальным Институтом Здоровья США был начат проект

«Коннектом Человека»¹⁶ с первоначальным финансированием в 30 млн. долларов¹⁷. Предполагаемые сроки создания электронной копии мозга человека, построенной на основе его коннектома, по-прежнему остаются достаточно неопределенными, однако к настоящему времени командой исследователей, задействованных в проекте, опубликовано уже более 250 статей в высокорейтинговых международных журналах¹⁸.

Впрочем, сложности с прогнозами и сроками достижения определенных результатов свойственны любому подобному проекту, поскольку определить работоспособность модели можно будет лишь после того, как она будет полностью закончена и подключена к источникам внешней информации – зрительной, звуковой, тактильной и т.д. Если проект окажется успешным, а симуляция мозга в реальном времени – способной на коммуникацию, то это будет одним из величайших научно-технических прорывов в истории человечества, по сути предоставляющим ключ к «цифровому бессмертию»: в модели можно будет «отключить» или просто не учитывать процессы, связанные со старением нервной системы и нейродегенеративными заболеваниями, поддерживая мозг в состоянии расцвета его интеллектуальных способностей на протяжении сколь угодно долгого времени. Разумеется, эта возможность будет представлять практический интерес для потенциального носителя разума лишь в том случае, если окажется, что подобная симуляция окажется достаточной для возникновения сознания, как это происходит в реальном мозге. О природе сознания и механизмах его функционирования в настоящее время известно недостаточно для того, чтобы предсказать успех или неудачу данного проекта.

В описанной ситуации, когда промежуточные результаты не позволяют судить о финальном результате проекта, желательно параллельно развивать и другие подходы, тоже способствующие получению новых знаний в области

¹⁶ <http://www.humanconnectomeproject.org>

¹⁷ <https://www.nih.gov/news-events/news-releases/nih-launches-human-connectome-project-unravel-brains-connections>

¹⁸ <https://www.humanconnectome.org/study/hcp-young-adult/publications>

фундаментальной нейробиологии, причем такие, сроки реализации которых являются существенно более сжатыми, а объекты исследования – значительно более простыми. Вспомним рассмотренный в начале главы проект по созданию электронной клетки. Своим успехом он во многом обязан простоте системы, выбранной для моделирования. В данном случае принцип «от простого к сложному» себя оправдал, и, вероятно, также оправдает применительно к направлению исследований, связанных с созданием первого виртуального организма – симуляции, построенной на основе данных о структуре и функциях систем, образующих организм *C. elegans*. Важно отметить, что столь простой организм не обладает сердцем и кровеносной системой, которая у более сложных видов напрямую связана с энергоснабжением мозга и параметрами его работы, которые могут регулироваться, в том числе посредством изменения гормонального фона организма. В случае с *C. elegans* учет этих факторов, вероятно, не потребуется, что также упрощает задачу моделирования.

Если учет более сложных уровней структурной организации систем, образующих организм *C. elegans*, все-таки понадобится в будущем, то при построении необходимых для этого моделей может быть полезен имеющийся у автора опыт работы и компьютерного моделирования биологических объектов в ряде областей, тесно связанных с данной тематикой: расчет вторичной структуры РНК для решения прямой и обратной задачи ее укладки [Titov, Palyanov, 2004]; поиск сайтов трансляции в геномных последовательностях [Kochetov, Palyanov et al., 2007] изучение РНК-белковых взаимодействий посредством компьютерного анализа экспериментальных данных о влиянии белков на экспрессию генов [St. Laurent et al., 2013]; моделирование и анализ процессов укладки (самоорганизации) белковых молекул на основе их 3D моделей [Palyanov, Titov, 2004; Palyanov et al., 2006; Palyanov et al., 2007; Chekmarev, Palyanov, Karplus, 2008], разработка программного обеспечения для структурного анализа и поиска молекул микроРНК [Нечкин, Пальянов и др., 2008; Пальянов, Черемушкин и др., 2010] и ряд других.

Глава 2. Организм *Caenorhabditis elegans* в контексте задач моделирования его нервной активности и поведения

2.1. Общие сведения о *Caenorhabditis elegans*.

Свободноживущая (не паразитическая) нематода *Caenorhabditis elegans* в настоящее время является основным модельным организмом, используемым в широком спектре различных биологических исследований. Спустя полвека после первой научной работы, посвященной описанию этого организма [Maupas, 1900] были проведены исследования [Nigon, 1949; Nigon et al., 1960], в результате которых были описаны его воспроизведение, мейоз (деление клеток) и развитие. Спустя еще 14 лет был проведен ряд экспериментов в области биологии развития и генетики *C. elegans* [Brenner, 1974], которые принесли ему статус важнейшего модельного организма, а С. Бреннеру – Нобелевскую премию в области медицины и физиологии в 2002 г. (вместе с Р. Хорвицем и Дж. Сальстоном). Именно *C. elegans*, миллиметровый почвенный червь (см. Рис. 2.1), был выбран в качестве модели благодаря простоте его анатомии, лёгкости выращивания в больших количествах и, самое главное, потому что он оказался исключительно подходящим для генетического анализа.

Помимо того, что этот организм был первым многоклеточным, чей геном был секвенирован [The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998], в настоящее время имеется беспрецедентно обширный объем данных и знаний о его биологии развития и устройстве на клеточном и молекулярном уровнях.



Рис. 2.1. Общий вид *C. elegans* при съемке с использованием оптического (слева) и электронного (справа) микроскопа. Источники (авторы) фотографий: Sinclair Stammers/Science Source (слева) и Prof. Dr. Ralf Sommer, Max Planck Institute for Developmental Biology

При изучении *C. elegans* был сделан ряд ключевых научных открытий, таких как молекулярные механизмы апоптоза (запрограммированной клеточной гибели) [Conradt and Xue, 2005] и сайленсинга (подавления экспрессии) генов посредством микроРНК [Grishok, 2013].

Базовая генетическая линия *C. elegans*, культивируемая в лабораториях, называется N2 и исходно была изолирована в Бристоле (Англия). Лабораторная среда для культивации *C. elegans* представляет собой слой агара (гелеподобного вещества, экстрагированного из водорослей, растительный заменитель желатина), покрытый бактериями (обычно *Escherichia coli*) в качестве источника пищи для нематод.

Длина взрослого *C. elegans* – около 1 мм, диаметр – около 0.06 мм. Имеются свидетельства в пользу того, что нематода *C. elegans* обладает способностями к краткосрочной и долгосрочной памяти и проявляет ассоциативные формы обучения, такие как выработка классического и дифференцированного условного рефлекса [Rankin, 2004]. Эти свойства представляют особенный интерес, далеко выходящий за рамки нематоды, и скорее являются фундаментальными для любой более-менее развитой нервной системы. То, что они имеются даже у такого

относительно простого организма, существенно повышает интерес к его исследованию.

2.2. Нервная система

Нейробиологи обратили внимание на *C. elegans*, который ранее уже широко использовался в генетических экспериментах, небезосновательно полагая, что ввиду малого размера и простоты устройства организма он будет обладать небольшим числом нейронов. 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. В ней насчитывается более 7000 тысяч межнейронных соединений (синаптических контактов и электрических щелевых контактов, англ. «gap junctions») и около 2000 – между нейронами и мышцами; также имеется 95 мышечных клеток (управляющих движением тела; есть и другие типы мышц), несколько десятков сенсорных клеток разного типа и примерно 86 соединений между нейронами и сенсорными клетками [White et al., 1986; www.wormatlas.org; <http://caltech.wormbase.org/virtualworm>]. Общее количество клеток, образующих тело нематоды, тоже известно – 959.

Большинство нейронов *C. elegans* сосредоточено в нескольких головных нервных ганглиях, в брюшной нервной цепочке и в хвостовом отделе. Большая часть нейронов имеет простую структуру – тело нейрона с одним или двумя отростками (длина которых может достигать длины тела организма), но имеется небольшое число нервных клеток, таких как механосенсорные нейроны FLP и PVD, имеющие весьма разветвленную систему отростков [Dong et al., 2013]. Помимо дендритов сенсорных нейронов, распознать которые обычно несложно, большинство нейритов (отростков нейронов) весьма затруднительно классифицировать как аксоны или дендриты, поскольку они являются как источниками, так и приёмниками сигналов, передаваемых/получаемых посредством синаптических контактов. Нейриты образуют синапсы друг с другом

в четырех основных областях: нервное кольцо (окружающее глоточную систему), брюшная нервная цепочка, спинная нервная цепочка и хвостовой нейропилль (область переплетения нервных волокон). Помимо нейронов, у *C. elegans* имеется несколько вспомогательных клеток, напоминающих глиальные, которые в основном ассоциируются с сенсорными нейронами, но они не столь многочисленны, как у позвоночных [Oikonomou and Shaham, 2010].

Распространение сигналов в нервной системе *C. elegans* представляется в основном пассивным, поскольку в нейронах не было обнаружено Na^+ -зависимых потенциалов действия [Goodman et al., 1998]; также и в геноме *C. elegans* не было обнаружено генов, соответствующих потенциал-зависимым Na^+ -каналам [Bargmann, 1998]. Отсутствие потенциалов действия может объясняться весьма высоким электрическим сопротивлением клеточных мембран нейронов *C. elegans*. Действительно, многие из них являются изопотенциальными - изменения напряжения происходит практически одновременно по всей клетке [Goodman et al., 1998], т.е. в потенциалах действия может не быть необходимости [Lockery and Goodman, 2009]. В нейронах экспрессируется довольно обширный набор ионных каналов [Hobert, 2013], включая неожиданно большое число генов, кодирующих калиевые ионные каналы [Salkoff et al., 2005].

Еще одним отличием от млекопитающих является устройство синаптических контактов *C. elegans*: нейроны не посылают для их формирования отростки с утолщениями на конце – большинство соединений образованы просто в местах прохождения отростков рядом друг с другом. Химические синапсы идентифицируют на микрофотографиях, основываясь на затемнении между мембранами контактирующих отростков нейронов и на присутствии синаптических везикул (пузырьков с нейромедиаторами). В нервной системе *C. elegans* используется множество наиболее известных нейротрансмиттеров, таких как ацетилхолин, глутамат, гамма-аминомасляная кислота (ГАМК), дофамин и серотонин, а также рецепторы для их детектирования [Hobert, 2013]. Электрические щелевые контакты видны на электронных микрофотографиях как области соприкосновения мембран нейронов. Как и у других беспозвоночных,

электрические щелевые контакты *C. elegans* образованы иннексинами [Starich et al., 2001] – белковыми каналами, пронизывающими одновременно мембраны обеих контактирующих клеток, обеспечивая возможность передачи электрических сигналов напрямую от одной клетки к другой. В дополнение к химическим контактам (синапсам) и электрическим щелевым контактам, на нейроны *C. elegans* могут влиять многочисленные нейроэндокринные сигналы [Li and Kim, 2008]. Таким образом, с точки зрения перспектив исследования механизмов работы нервной системы на клеточном и молекулярном уровне, большинство из них вполне можно изучать на базе *C. elegans*.

Также стоит отметить, что у *C. elegans* некоторые отдельные нейроны выполняют функции, которые в нервной системе позвоночных выполняются несколькими нейронами. Например, отдельные обонятельные нейроны экспрессируют несколько различных рецепторов на базе G-белков [Troemel et al., 1995; Wes and Bargmann, 2001], тогда как у позвоночных – один; каждый из пары зеркальных билатеральных хемосенсорных нейронов ASE производит ответ на несколько различных ионов [Hobert, 2010]; структура связей нейронов-рецепторов прикосновения подразумевает, что их стимуляция инициирует несколько различных процессов [Chalfie et al., 1985]. Также было обнаружено, что интернейрон AIY регулирует два различных процесса – скорость движения при ползании («аналоговый» сигнал) и переключение направления движения («цифровой» сигнал) [Li et al., 2014]. Таким образом, функции нескольких нейронов у позвоночных в нервной системе *C. elegans* оказываются «сжатыми» до одного нейрона. Эта многофункциональность (или «полиmodalность») может быть как эволюционным следствием малого числа нейронов в нервной системе *C. elegans*, так и отражать общее свойство нервной системы, выявленное в результате детальных исследований механизмов работы одиночных нейронов у этого организма [Corsi et al., 2015].

2.3. О диаграмме связности нервной системы *C. elegans*

Работа по определению архитектуры нервной системы с точностью до отдельных нейронов и связей *C. elegans* потребовала более десяти лет кропотливого труда исследователей [White et al., 1986]. Тысячи микроскопических срезов были проанализированы вручную, идентифицирован каждый нейрон, определена морфология нейронов и их отростков, а также предприняты усилия по установлению всех связей между парами «нейрон-нейрон» и «нейрон-мышечная клетка». Поэтому для определения коннектомов организмов с более сложной нервной системой потребуется существенно ускорить и автоматизировать этот процесс. Дальнейшие исследования архитектуры нервной системы *C. elegans* привели к тому, что диаграмма связности его нейронной сети, по оценкам [Varshney et al., 2011], завершена приблизительно на 75-90%. Информация о коннектоме на сегодняшний день представлена различными источниками данных. Основная информация по данному вопросу представлена в Таблице 2.

Таблица 2. Число синаптических контактов в нервной системе *C. elegans* по данным разных источников.

число химических синапсов	число электрических контактов («gap junctions»)	число нейромышечных соединений	источник
≈ 5000	≈ 2000	нет данных	White et. al., 1986
5396	1883	1290	http://wormweb.org/details.html
3419	2190	нет данных	http://wormwiring.org
6393	890	1410	http://wormatlas.org

Интерактивная веб-страница, отображающая информацию о нейронах и связях между ними, основанная на объединенных данных, полученных до 1999 г.,

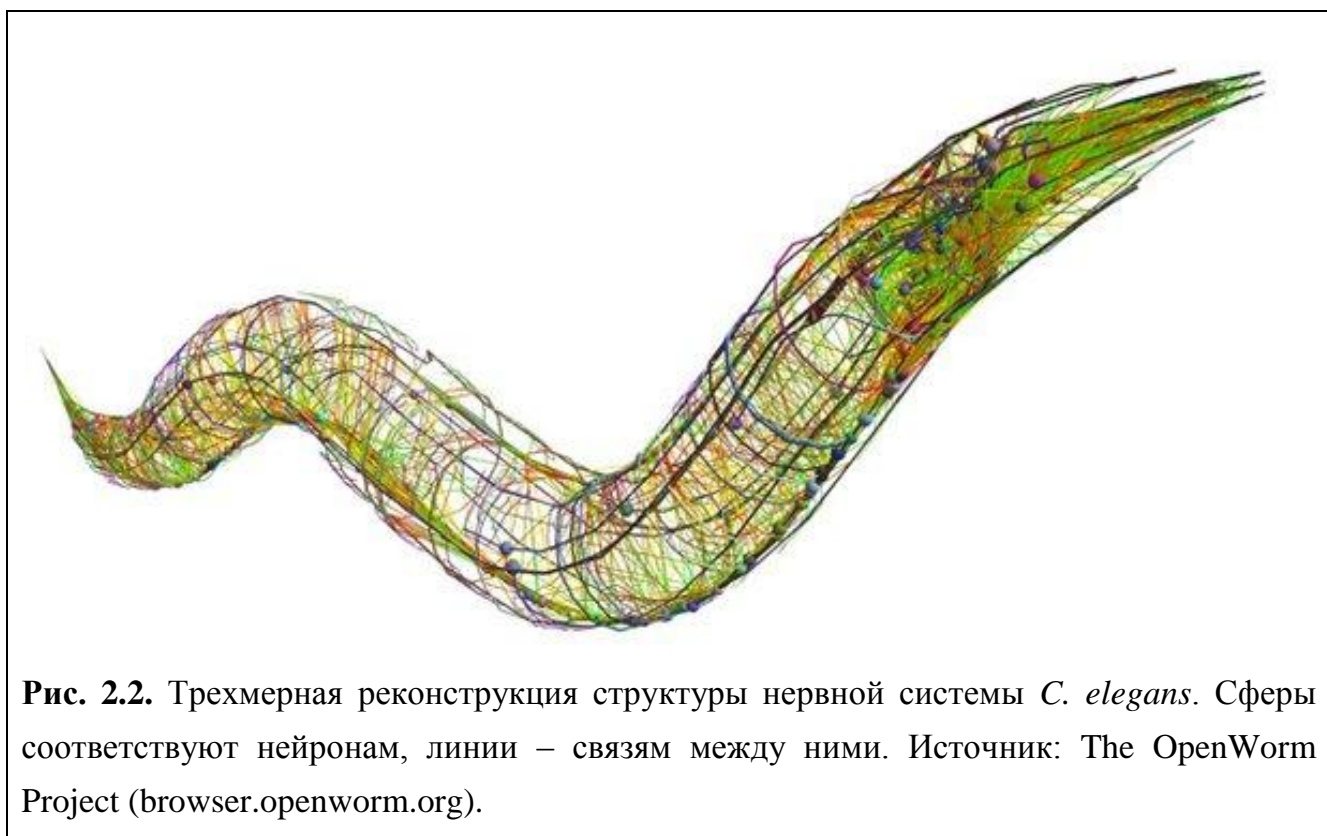
доступна онлайн¹⁹ и включает в себя 5396 химических синапсов, 1783 электрических контактов и 1290 нейромышечных соединений. С другой стороны, согласно данным проекта WormWiring.org (более детальная реконструкция, включающая морфологию нейритов и координаты контактов между ними), к настоящему времени обнаружено 3419 химических синапсов и 2190 электрических контактов. Данный 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 изображений) и от 0.85 до 1.0 (“JSE”, 2143 изображения), где 0 – головной, а 1 – хвостовой конец (полный список серий доступен на веб-ресурсе WormImage.org²⁰).

В одной из относительно недавних работ [Varshney et. al., 2011], посвященных этой проблеме, изложен следующий взгляд на достигнутые результаты реконструкции нервной системы *C. elegans*: «Несмотря на то, что 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». Авторы утверждают, что им удалось на основе тех же и новых серий микрофотографий создать полную, самосогласованную диаграмму связности нейронной сети, включающую 6393 химических синапса, 890 электрических контактов и 1410 нейромышечных соединений. Относительно предыдущей версии было добавлено более 3000 синаптических контактов, включая химические синапсы, электрические контакты и нейромышечные соединения. Поскольку сумма для WormWiring.org составляет 8469, а для [Varshney et. al., 2011] – 8693, то, по-видимому, из числа 3000 новых синаптических контактов значительная часть заменила прежние ошибочные данные. Согласно утверждению авторов, несмотря на значительный прогресс, диаграмма связности нейронной сети *C. elegans* завершена приблизительно на 75-

¹⁹ <http://wormweb.org/details.html>

²⁰ <http://www.wormimage.org/wormList.php>

90% из-за недостающих данных и технических трудностей. Описанные результаты реконструкции доступны на веб-ресурсе WormAtlas.org. Также имеется трехмерная реконструкция позиций нервных клеток и расположения их отростков в теле нематоды (см. Рис. 2.2), которая пока не включает информацию о связях между нейронами, но может быть чрезвычайно полезна для определения кратчайших путей прохождения сигнала из определенной позиции на отростке одного нейрона до контакта с другим нейроном (если, например, из другого источника известно, что такой контакт имеется). Коллективом проекта OpenWorm было создано программное обеспечение для преобразования трехмерного представления нейронов в формат NeuroML (Busbice et al., 2013).



2.3.1. О динамике активности нейронов *C. elegans*

Несмотря на множество рассмотренных примеров о той или иной активности, происходящей в нервной системе *C. elegans*, информация о её механизмах по-прежнему остается существенно недостаточной для понимания их функционирования. В соответствии с данными [Lockery et al., 2009],

распространение сигналов в нервной системе *C. elegans* посредством потенциалов действия (быстро и без затухания) не было зарегистрировано и является маловероятным, т.к. в его геноме отсутствуют потенциал-зависимые натриевые ионные каналы, лежащие в основе этого механизма [Bargmann, 1998]. Наиболее вероятным механизмом, с учетом высокого сопротивления мембран нейронов *C. elegans*, считается пассивное распространение посредством градуальных потенциалов, которое происходит значительно медленнее, чем в случае потенциалов действия. Также имеет место затухание сигнала из-за утечки через мембраны нейронов и их отростков, которое является достаточно существенным, но при этом все-таки обеспечивает прохождение сигнала от одного конца тела до другого.

Однако, нельзя полностью исключать, что помимо потенциалов действия и пассивного распространения сигналов в нервной системе *C. elegans* не может быть каких-либо иных, ранее неизвестных механизмов передачи информации. Возможно, что при определенных условиях возможны потенциалы действия, производимые другой системой ионов и ионных каналов, нежели классический натрий-калиевый потенциал действия. Так, например, детальное изучение механизмов работы нейрона RMD позволило выявить, что возможны квази-стабильные уровни потенциала, заметно отличающиеся от потенциала покоя. При этом определенные события, например, положительный импульс тока, могут переводить нейрон на такой уровень, а отрицательный импульс тока может возвращать обратно, к уровню потенциала покоя [Lockery and Goodman, 2009].

Новую информацию для построения гипотез, объясняющих наблюдаемую динамику нейронной активности, можно надеяться почерпнуть из экспериментов по визуализации нейронной активности в свободно движущемся *C. elegans*. Например, данная видеозапись²¹, полученная в работе [Kato et al., 2015], показывает нейронную активность нескольких десятков нейронов одновременно (визуализация активности выполнена на основе уровня Ca^{2+} в его нейронах).

²¹ <https://www.youtube.com/watch?v=NZAtqY7OZzQ>

Запись активности 77 нейронов одновременно в течении 4 минут также осуществлена еще одним коллективом исследователей [Nguyen et al., 2016]²². Еще более новый результат – одновременная запись активности 156 нейронов в течении 8 минут [Nguyen et al., 2017]. По-видимому, запись активности всех нейронов одновременно в течение любого необходимого периода времени – вопрос нескольких лет. Также недавно была продемонстрирована возможность не только осуществлять мониторинг активности нейронов, но и избирательно управлять их активностью посредством оптогенетических методов [Gengyo-Ando et al., 2017]. К сожалению, при имеющемся уровне разрешения методы регистрации активности нейронов могут отражать только активность тел нервных клеток (имеющих характерный диаметр порядка нескольких микрон), тогда как динамика распространения сигналов по отросткам (диаметр которых – порядка десятых долей микрона) и активность синапсов не регистрируется. Таким образом, получаемая информация в значительной мере недостаточна для установления причинно-следственных связей между происходящими в нервной системе событиями, поскольку, как было упомянуто выше, даже в пределах одного нейрона различные области одного и того же отростка могут обладать независимой активностью [Hendricks and Zhang, 2013].

Следующий раздел посвящен сенсорной системе – источнику данных организма о внешнем мире – и её связям с нервной системой.

2.3. Сенсорная система

Несмотря на малый размер и жесткую детерминированность архитектуры нервной системы, характерную для простых организмов, *C. elegans* обладает широким спектром поведенческих реакций и восприятия информации об окружающей среде, которое происходит посредством механо-, хемо- и терморцепторов; также обнаружено несколько сенсорных нейронов, реагирующих на изменение освещенности. Нематода может обучаться:

²² <https://www.youtube.com/watch?v=2Go4LjX5eHo>

приближаться или, наоборот, избегать источников вкуса, запаха или изменений температуры, которые на основе прежнего опыта позволяют прогнозировать наличие или отсутствие пищи или, наоборот, быть связанными с негативными воздействиями.

Для более детального знакомства с сенсорной системой рассмотрим фрагмент механосенсорной системы, ответственный за восприятие слабых прикосновений к телу нематоды. В нервной системе *C. elegans* имеются шесть механосенсорных нейронов, обладающих длинными отростками. Нейриты первых трех (ALML, ALMR и AVM) иннервируют переднюю половину тела, а оставшихся трех (PLML, PLMR и PVM) – заднюю [Chalfie et al., 1985]. Слабые прикосновения (от 0.1 μH) способны вызывать быстро активирующиеся механорецепторные токи; большие силы вызывают большие токи, выходящие на насыщение в области 1-2 μH [O’Nagan et al., 2005]. Начиная от 100 μH , активируются другие нейроны, реагирующие на сильное давление. Обычно в экспериментах, чтобы вызвать реакцию на слабое прикосновение, используют одиночный волосок от ресницы. При этом нематода почти сразу после касания меняет направление своего движения с прямого на обратное²³. Такое поведение сформировалось в ходе эволюции и предназначено для того, чтобы избежать попадания в кольца-ловушки хищных грибов *Drechsterella 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

²³ <http://www.youtube.com/watch?v=olrkWpCqVCE>

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 and Tsien, 2000]. 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 эксперименте [Suzuki et al., 2003] было показано, что легкое касание передней половины тела червя (продолжительность стимула – 90 мс) на расстоянии около 350 μm до тела нейрона ALM привело к достижению статистически значимого уровня активации самого нейрона (основываясь на уровне 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 позволяют нам оценить минимальную скорость электротонического распространения сигнала, равную 350 μm / 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 друг с другом электрические контакты, 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, 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 1 секунду позже, чем произошла смена направления движения нематоды [Shipley et al., 2014, Fig. 2B], 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 [Shipley et al., 2014, Fig. 2B] 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 видеофрагмент²⁴ на

²⁴ <https://www.youtube.com/watch?v=olrkWpCqVCE>

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.

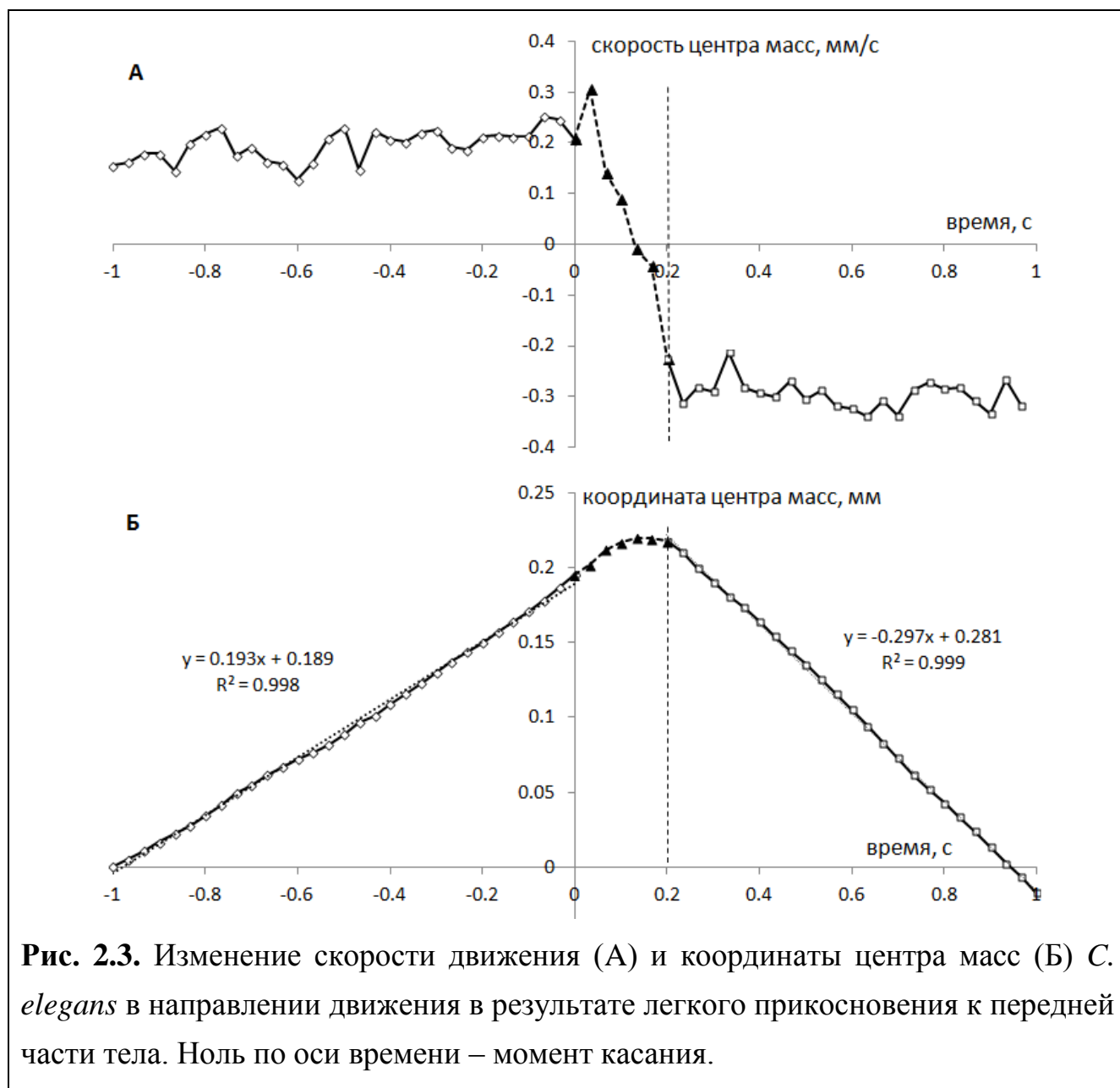


Рис. 2.3. Изменение скорости движения (А) и координаты центра масс (Б) *C. elegans* в направлении движения в результате легкого прикосновения к передней части тела. Ноль по оси времени – момент касания.

Как видно из Рис. 2.3, равномерное движение вперед (со скоростью ≈ 0.19 мм/с) после касания тела *C. elegans* сменяется переходным периодом, продолжающимся в течение 7 кадров, т.е. ≈ 0.23 с, после чего наблюдается

равномерное движение в направлении назад (со скоростью ≈ 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 1.5 раза больше, чем исходная скорость движения вперед, что может свидетельствовать о различных нейронных механизмах, управляющих движением вперед и назад. Согласно данным [Faumont et al., 2011], обнаружены мотонейроны, активные как во время движения вперед, так и назад; по мнению авторов, необходимо продолжать исследования в области регистрации нейронной активности в свободно движущихся нематодах.

Далее, анализ видеозаписи показал, что скорость распространения волны мышечных сокращений при движении вперед по поверхности агара составила 0.26 мм/с. Данная 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 электрических контактов), таким образом, не может объяснить наблюдаемую скорость распространения мышечных сокращений.

Существует 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 тела [Gjorgieva et al., 2014]. 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 синапсов отросток, одно и то же направление –

от головы к хвосту, поэтому, 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 and Sanders, 2014], до сих пор остается необъясненным. С учетом того, что все 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 ≈ 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 методике измерения, либо о существенной задержке сигнала от механосенсорных нейронов при их возбуждении не путем касания *C. elegans*, а посредством оптогенетической активации.

По итогам рассмотрения аспектов устройства нервной и механосенсорной систем *C. elegans*, направленного на создание предпосылок для моделирования этих систем, была накоплена информация, имеющая отношение к поставленной цели, и попутно произведены необходимые расчеты, попытки анализа и соотнесения между собой разрозненных фактов, полученных разными авторами и т.д. Основные данные, имеющие отношение к описанию нейронов *C. elegans* и связей между ними, приведены в Таблице 3:

Таблица 3. Основные электрофизиологические и морфологические характеристики нейронов *C. elegans*.

Параметр	Значение	Источник
Потенциал нулевого тока (для выборки из 43 различных нейронов)	-30...-90 мВ	Goodman et. al., 1998
Потенциал нулевого тока (для выборки из 21 нейрона из головного нервного ганглия)	-16...-22 мВ	Nickell et al., 2002
Потенциал нулевого тока (для 4-х 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 et al., 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 and Goodman, 2009
Длина нейрита	до 1 мм и более	WormAtlas.org; caltech.wormbase.org/virtualworm/
Удельное сопротивление мембраны нейрона	61...251 кΩ·см ²	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 ²	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	

Новые горизонты в исследованиях механизмов работы нервной системы *C. elegans* открывают методы, основанные на оптогенетике: можно визуализировать (с высоким пространственным и временным разрешением) активность нейронов, тесно связанную с концентрацией Ca^{2+} в теле нейрона и его отростках [Miyawaki, Tsien, 2000]. С использованием этой методики в последние годы были проведены такие исследования, как оптогенетический анализ синаптических функций [Liewald et al., 2015], мультимодальный оптический контроль нейронов и мышц в свободно движущемся *C. elegans* в режиме реального времени [Stirman et al., 2011] и синхронная оптогенетическая манипуляция и регистрация уровня кальция в свободно движущемся *C. elegans* [Shipley et al., 2014].

2.4. Мышечная система

Тело *C. elegans*, обладающее веретенообразной формой, приводится в движение 95-ю мышечными клетками, прикрепленными к внутренней поверхности его оболочки и образующими четыре симметричных продольных тяжа, простирающихся от головного до хвостового конца (Рис. 2.4).

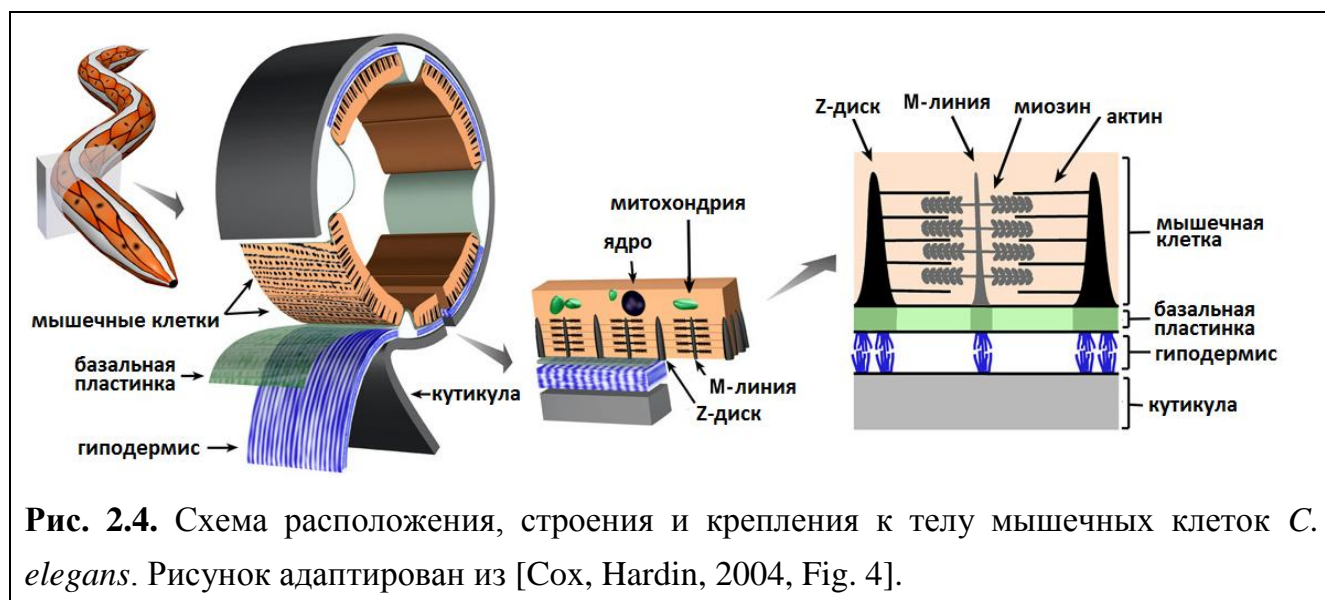
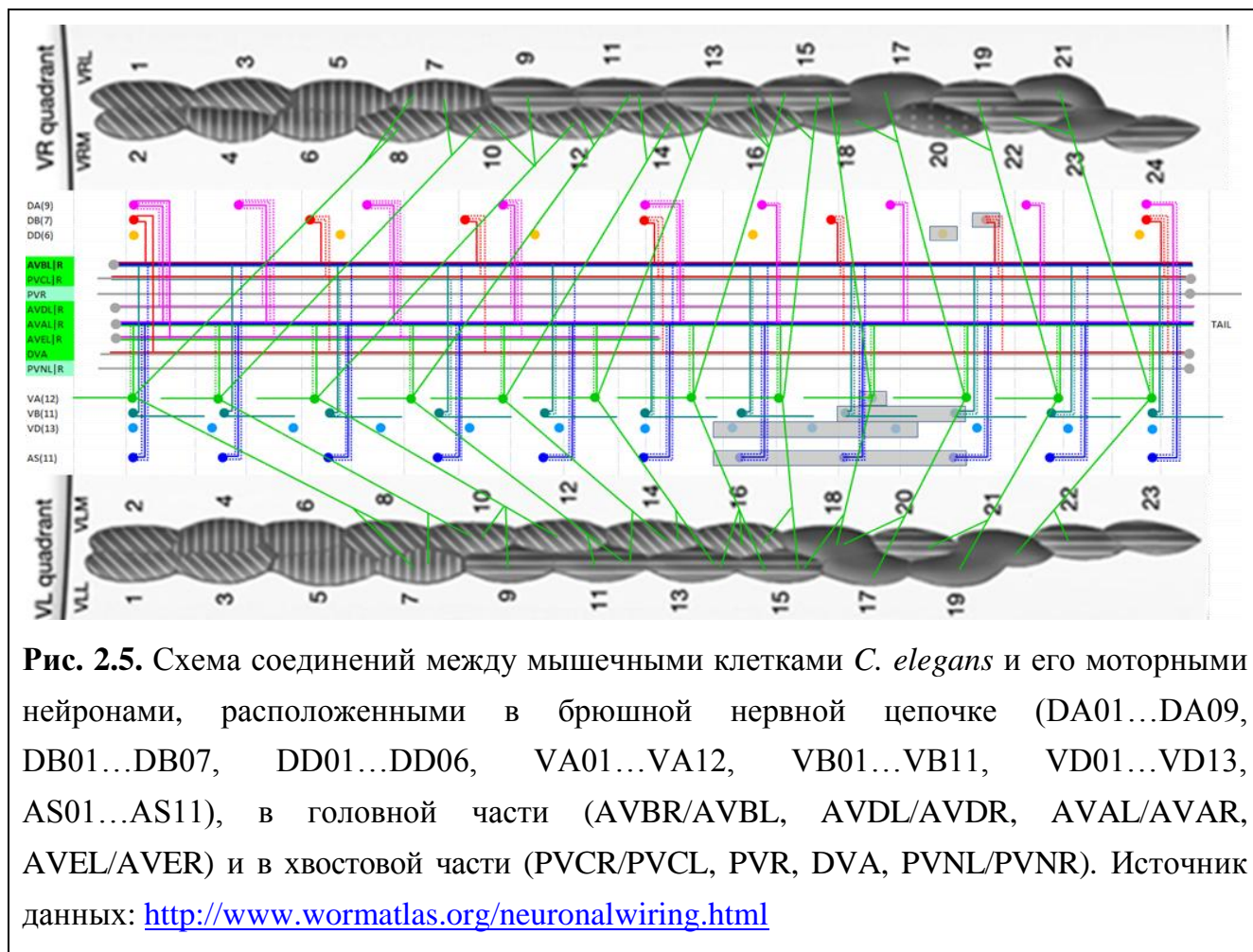


Рис. 2.4. Схема расположения, строения и крепления к телу мышечных клеток *C. elegans*. Рисунок адаптирован из [Cox, Hardin, 2004, Fig. 4].

Вопросам внутренней структуры мышечных клеток и теории их сокращения посвящена работа [Huxley, 1957]. Непосредственное управление активацией мышечных клеток осуществляется моторными нейронами, расположенными в

брюшной или спинной нервной цепочке. В отличие от других организмов, у которых нейроны подключаются к мышечным клеткам посредством своих отростков, у *C. elegans*, наоборот, мышечные клетки посылают отростки, которые подключаются к моторным нейронам. Как правило, каждый моторный нейрон связан с несколькими соседними мышечными клетками (см. Рис. 2.5).



У *C. elegans* имеются и другие мышечные системы, в частности глоточная нервно-мышечная система, осуществляющая захват и измельчение пищи (бактерий), которая затем поступает в пищеварительную систему. Глоточная нервно-мышечная система замечательна тем, что включает всего 20 мышечных клеток и 20 нейронов и практически изолирована от всего остального организма. Периодические сокращения глоточной мускулатуры, осуществляются на частоте от 0.5 до 5 Гц (по другим данным – от 0.7 до 4.4 Гц) в зависимости от сытости организма и количества пищи вокруг него [Scholz et al., 2016]. Даже будучи отделенной от остального организма, она некоторое время продолжает

производить периодические сокращения в нормальном режиме. Исследования, направленные на изучение механизмов возникновения этих осцилляций показали, что они продолжаются, хотя и со сниженной менее чем до 1 Гц частотой и потерей скоординированности, даже если уничтожить с помощью лазера все нейроны глоточной нервной системы [Avery, Horvitz, 1989] – т.е. по сути остаются только мышечные клетки. Также известно, что при определенных обстоятельствах эта активность может быть остановлена самим организмом - в состоянии "сна" в периоды линьки и стресса в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды.

С учетом изложенных фактов напрашивается вывод о том, что генерация периодических мышечных сокращений порождается самими мышечными клетками (фоновая активность на низкой частоте), а дополнительное воздействие сигналов от некоторых нейронов (в особенности МС и М4) ее усиливает и регулирует. Как показал анализ литературы по данной теме, в некоторых гладких мышцах потенциалы действия действительно генерируются спонтанно, при отсутствии внешних стимулов, включая клетки глоточной мышечной системы [Rogers et al., 2001] и мышцы, управляющие движением тела [Liu et al., 2011]. Также возможно, что организм в определенных ситуациях может вырабатывать вещества, подавляющие спонтанную мышечную активность.

2.5. Биомеханика движения *C. elegans*

В данном разделе тело и мышечная система *C. elegans* рассматриваются с точки зрения физики и биомеханики движения в различных условиях, включая типичную природную среду и лабораторные условия.

Строение тела *C. elegans* в контексте биомеханики представляется следующим: имеется внешняя трубка, состоящая из мускулатуры тела, гиподермиса и коллагеновой кутикулы (эластичные объекты), и внутренняя трубка – полость тела, заполненная жидкостью, вмещающая глоточный аппарат, кишечник и репродуктивную систему [Conte et al., 2015]. В случае нарушения

целостности внешней оболочки содержимое внутренней полости быстро оказывается снаружи, что свидетельствует о высоком внутреннем давлении жидкости [Gilpin et al., 2015]. Один из упрощенных подходов к представлению внутренней структуры тела при моделировании состоит в его рассмотрении как пружинной конструкции без рассмотрения жидкости (см. Рис. 2.6), который мы применяем при разработке модели, представленной в **Главе 2** данной диссертации.

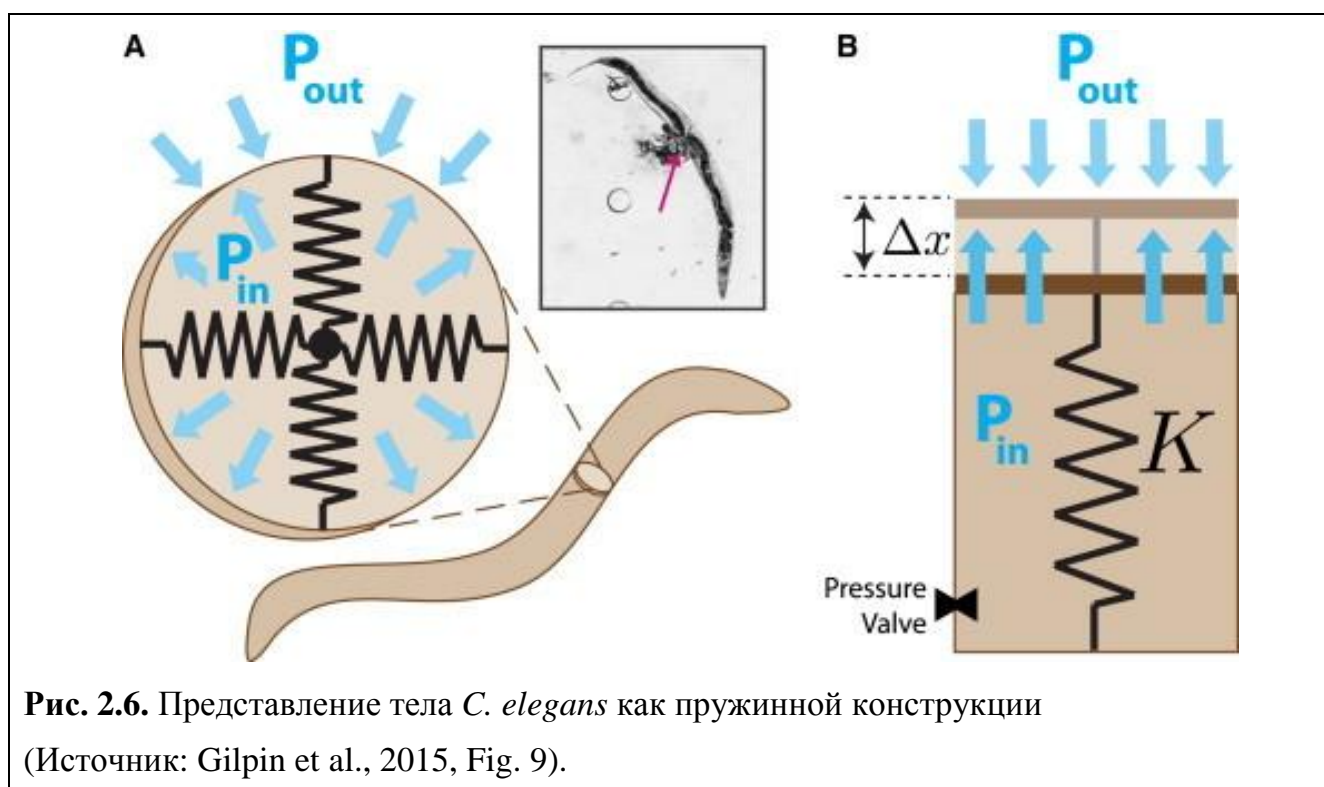


Рис. 2.6. Представление тела *C. elegans* как пружинной конструкции (Источник: Gilpin et al., 2015, Fig. 9).

В **Главе 3** представлена более сложная, детальная и совершенная 3D модель тела *C. elegans*, в которой впервые в мировой практике внешняя трубка тела представлена эластичным материалом, а её внутреннее содержимое – жидкостью, смоделированной методом гидродинамики сглаженных частиц – в модификации, позволяющей рассчитывать динамику несжимаемой жидкости, «predictor-corrector incompressible smoothed particle hydrodynamics», или кратко PCISPH [Solenthaler et al., 2009].

Согласно одному из недавно проведенных исследований [Zhen, Samuel, 2015], жесткость тела обеспечивается благодаря высокому коэффициенту жесткости кутикулы (модуль Юнга которой оценивается в пределах 10-400 МПа;

для сравнения, в данный интервал попадает значение для резины). Используя данные измерений вязкоэластичных свойств тела, можно оценить мышечную силу, необходимую для изгиба тела или для осуществления движений, позволяющих двигать тело, отталкиваясь от препятствий. В средах с низким сопротивлением, таких как вода, большая часть мышечной силы тратится на осуществление изгибов тела, которое является достаточно жестким. Только когда вязкость окружающей среды возрастает примерно в ~ 100 раз, мышечная сила, необходимая для отталкивания от среды для осуществления движения, становится сравнимой с силой, необходимой для изгибов тела. Даже при увеличении вязкости среды в ~ 10000 раз относительно вязкости воды мышечная сила, необходимая для осуществления движения, возрастает менее чем вдвое [Fang-Yen et al., 2010]. Следовательно, моторный контур *C. elegans* работает «на низкой передаче», обеспечивая продвижение его тела сквозь среды с высоким сопротивлением, и переходит в несколько более ускоренный режим в средах с низким сопротивлением.

В ходе исследования этого же вопроса другим коллективом авторов были получены существенно отличающиеся результаты: несмотря на полученные в измерениях высокие значения жесткости кутикулы *C. elegans*, анализ на основе изгибающих моментов, наблюдаемых при плавании нематоды, приводит к существенно более низкой оценке модуля Юнга для тела нематоды как целого эластичного объекта - 3.77 кПа [Stephens et al., 2008]. Механическая нагрузка на тело *C. elegans* в этом эксперименте обеспечивалась работой его собственных мышц в процессе плавания, что затрудняло интерпретацию и, возможно, являлось причиной заниженной оценки модуля Юнга.

Также имеются результаты работы, в которой измерялся модуль изгиба тела нематоды под действием приложенной в одной точке силы: расчет модуля Юнга тела нематоды дает интервал значений от 110 кПа до 1.3 МПа, в зависимости от того, каким образом моделируется тело – как однородный цилиндр или цилиндрическая оболочка [Backholm et al., 2013].

И, наконец, еще в одной недавней работе описаны результаты и расчеты, свидетельствующие о том, что механические свойства тела *C. elegans* не зависят от кутикулы [Gilpin et al., 2015]. По мнению её авторов, значительный разброс полученных в результате различных оценок и измерений модуля Юнга тела нематоды свидетельствует о том, что до полного понимания механических свойств тела нематоды еще далеко и необходимы дополнительные исследования, которые смогут пролить свет на роль кутикулы и взаимодействия между внутренним и внешним давлением в этом вопросе.

Основными типами движения *C. elegans* являются ползание по поверхности агара (геля) и плавание в толще жидкостей (пример – здесь: <https://www.youtube.com/watch?v=qDvSYxNGSNg>), которые характеризуются различными паттернами мышечной активности и траекториями движения. Эксперименты с плаванием в жидкостях с различными коэффициентами вязкости показали, что характеристики движения, такие, как длина волны синусоиды, аппроксимирующей форму тела *C. elegans* и частота генерируемых телом волнообразных движений плавно изменяются в широком диапазоне значений, от плавания в жидкостях с коэффициентом вязкости ~ 1 мПа·с до 28000 мПа·с, достигая при этом значений, близких к режиму ползания по поверхности агара (см. Рис. 2.7).

Пример видеозаписи движения в режиме плавания, ползания и перехода между этими режимами при пересечении границы сред имеется, например, здесь²⁵: [Vidal-Gadea *C. elegans* lab, 2017]. Также стоит отметить такие элементы движения, периодически наблюдаемые при изучении поведения *C. elegans*, как реверс – быстрая, в течение десятых долей секунды, смена направления движения с прямого на обратное, начинающегося как возврат назад по траектории прежнего движения вперед благодаря сформированному в агаре желобку (хвостовым концом вперед)²⁶, а также омега-поворот, при котором движение все время

²⁵ <https://www.youtube.com/watch?v=j5yHechH0qE>

²⁶ <http://www.youtube.com/watch?v=olrkWpCqVCE>

происходит головным концом вперед и в итоге осуществляется поворот на угол до 360 градусов²⁷.

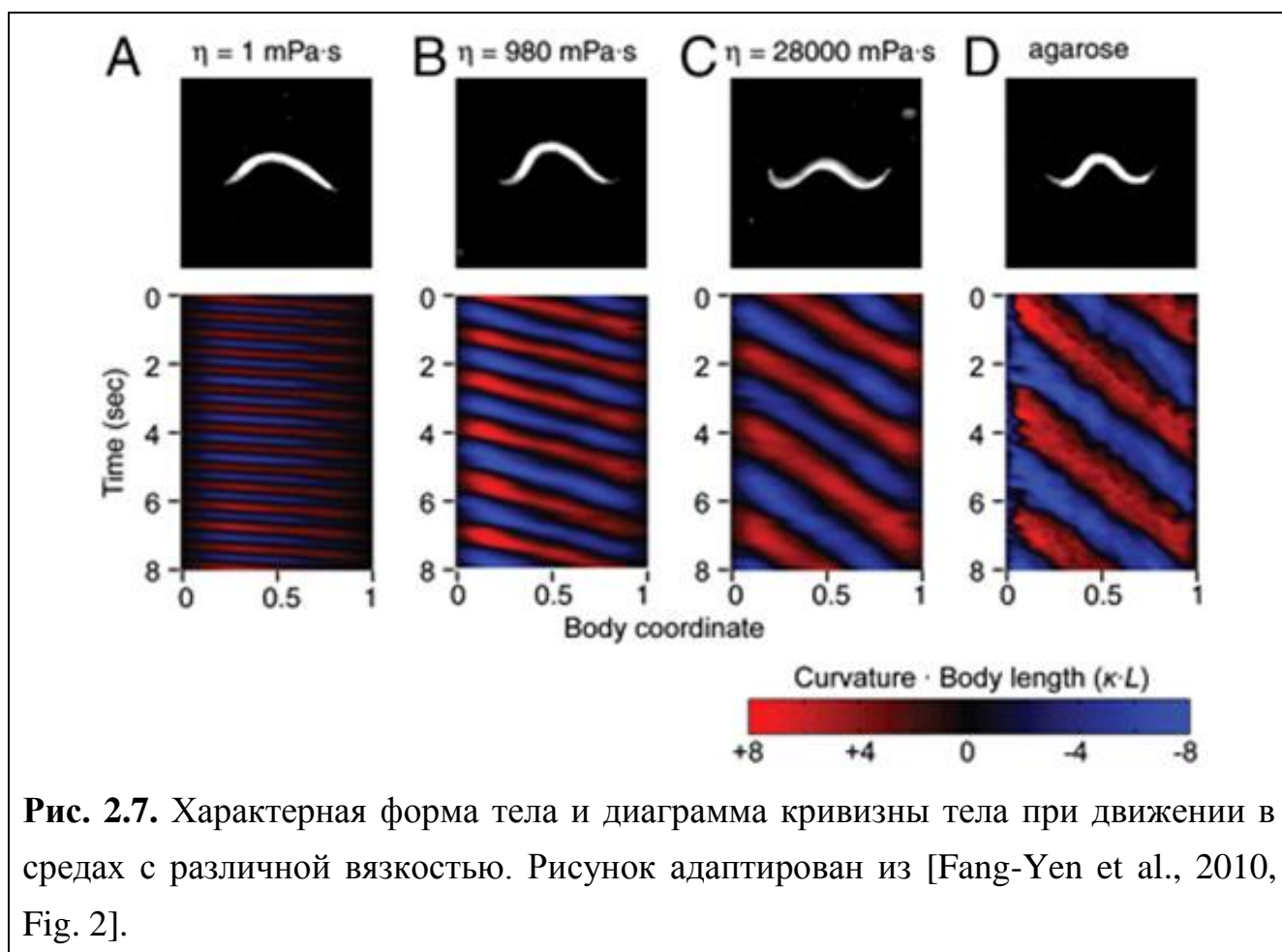


Рис. 2.7. Характерная форма тела и диаграмма кривизны тела при движении в средах с различной вязкостью. Рисунок адаптирован из [Fang-Yen et al., 2010, Fig. 2].

2.6. О методах компьютерного моделирования систем, образующих организм *C. elegans*.

В данном разделе представлен обзор имеющихся методов компьютерного моделирования различных систем, образующих организм *C. elegans*, и происходящих в них процессов. Первая работа, посвященная компьютерному моделированию движения тела *C. elegans* была опубликована в 1993 году [Niebur and Erdős, 1993], а первая попытка создания виртуальной копии *C. elegans* (сложной компьютерной модели, объединяющей нервную, сенсорную и мышечную систему, тело и фрагмент окружающей среды) предпринята в 2005-м году [Suzuki et al., 2005]. В дальнейшем исследователи разрабатывали более

²⁷ <https://www.youtube.com/watch?v=NZAtqY7OZzQ> (на 22-й секунде)


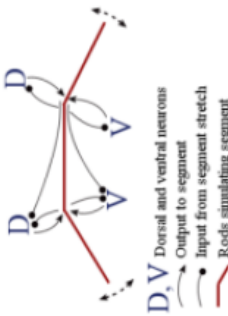
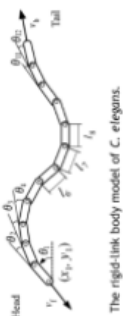
сложные и реалистичные модели, в которых учитывались новые экспериментальные данные об исследовании *C. elegans*, однако, несмотря на определенный прогресс в этом направлении, результаты позволили не только продвинуться в направлении решения этой задачи, но и по-новому взглянуть на её действительную сложность, которая раньше была сильно недооценена.

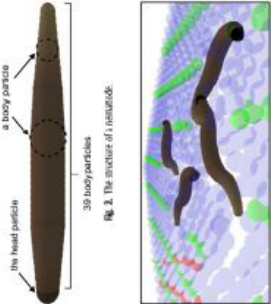
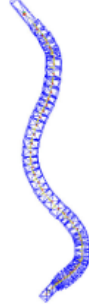

2.6.1. Тело и мышечная система, моделирование движения

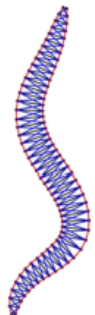
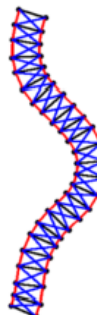
Долгое время одним из существенных ограничений для осуществления биологически обоснованного моделирования движения *C. elegans* в различных средах являлся недостаточный уровень быстродействия вычислительных систем на базе настольных ПК, доступных широкому кругу пользователей, однако это не останавливало ученых, а лишь приводило к определенным компромиссам в создании моделей. В основном они сводились к представлению тела нематоды в виде ряда сегментов, движение которых рассчитывалось при помощи численного моделирования с учетом сил, действующих на каждый из сегментов. В Таблице 4 приведены наиболее заметные работы в области моделирования тела, мышечной системы и биомеханики движения *C. elegans*.

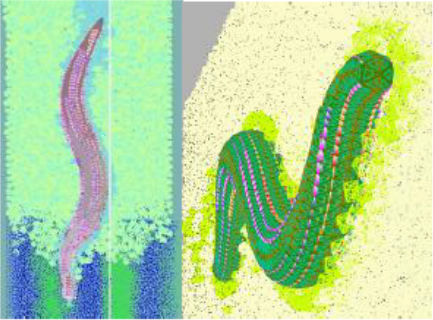
Ситуация заметно улучшилась с появлением графических карт (GPU), способных решать широкий спектр вычислительных задач с использованием параллельных вычислений, что позволило начать разработку и использование существенно более сложных моделей, в том числе перейти от двумерных к трехмерным. Современные графические карты имеют тысячи вычислительных ядер и превосходят по производительности обычные процессоры (CPU) в десятки раз. К примеру, 4-х ядерный процессор Intel® Core™ i5-2500K CPU (3.3 ГГц) имеет производительность 105.6-118 GFLOPS (операций с плавающей запятой в секунду) в расчете на 1 ядро и ≈ 480 GFLOPS на весь процессор, тогда как видеокарта NVIDIA GeForce GTX 980 Ti обладает производительностью ≈ 5600 -6060 GFLOPS (примерно в 12 раз больше).

Таблица 4. Сравнение различных подходов к моделированию движения *C. elegans*

Авторы, год, внешний вид модели	Сложность модели	Сложность и разнообразие среды	Биологическая обобщенность	2D или 3D	Прямое соответствие мышечных клеток модели и оригинала	Типы движения	Исходный код
Niebur and Erdős, 1993 	40 частиц (19 сегментов)	низкая	-	2D	нет	ТОЛЬКО ПОЛЗАНИЕ	нет данных
Bryden and Cohen, 2004 	11 сегментов, каждый описывается только значением угла наклона	низкая	-	2D	нет	ТОЛЬКО ПОЛЗАНИЕ	нет данных
Suzuki et al., 2005 	13 жестких сегментов	низкая	-	2D	нет	ТОЛЬКО ПОЛЗАНИЕ	нет данных
Karbowski et al., 2008 (изображения нет)	12 сегментов	низкая	-	2D	нет	ТОЛЬКО ПОЛЗАНИЕ	База данных ModelDB

<p>Rónkő and Wong, 2008</p> 	<p>39 частиц: частично перекрывающиеся сферы, каждая с собственным радиусом, соединенные связями для формирования тела <i>C. elegans</i>.</p>	<p>«гель», «жидкость», «почва». Гидродинамика жидкости не моделируется, разные типы среды отличаются только размерами частиц, коэффициентом демпфирования и гравитацией.</p>	<p>Имяются «частицы жидкости», но плавание не показано и не описано в статье</p>	<p>3D</p>	<p>нет</p>	<p>плавание (движение сквозь «частицы жидкости») + ползание</p>	<p>закрытый исходный код</p>
<p>Mailler et al., 2010</p> 	<p>100 частиц: 25 кубических 3D сегментов, геометрия которых основана на фотографиях реального <i>C. elegans</i></p>	<p>«поверхность агара»</p>	<p>модель кросс-вали- дирована с использова- нием видео- записей ползания <i>C. elegans</i></p>	<p>3D</p>	<p>да</p>	<p>только ползание</p>	<p>основана на Open Dynamics Engine (ODE), взаимо- действующей с JME Physics</p>
<p>Rayanov et al., 2011</p> 	<p>244 частицы, более тысячи пружинных соединений. В поперечных сечениях – восьмигранники</p>	<p>«agar»</p>	<p>средняя</p>	<p>3D</p>	<p>да</p>	<p>только ползание</p>	<p>открытый исходный код</p>

Boyle et al., 2012 	98 частиц: 49 жестких стержней + набор пружинных соединений	'агар'	средняя	2D	да, с учетом ограничений 2D	только ползание	открытый исходный код
Williamson, 2012 	25 жестких стержней и 50 точечных масс + амортизирующие пружины	'агар'	средняя	2D	да, с учетом ограничений 2D	только ползание	не указано в статье, не найденно в других источниках
Мажмудар et al., 2012 	Модель из шариков, соединенных эластичными пружинами. Учитываются взаимодействия с преградами	жидкость, преграды	средняя	2D	нет	только плавание	не указано в статье, не найденно в других источниках
Cohen and Ranner, 2017 	Нет частиц, метод конечных элемен- тов. Континуальная модель биомеха- ники движения. Нерастяжимое несжимаемое тело	Модель воспроизводит поведение в широком спектре сред и позволяет моделировать произвольные типы движения.	довольно высокая	2D	«гладкое и однородное распределение мышц вдоль тела»	результаты модели- рования представ- лены только для ползания	Для модели- рования использо- вался программный пакет UMFRASC (Davis, 2004).

Fieseler et al., 2018	2D 12 сегментов, каждый разделен на 3 подсегмента, проприоцепция	«вода», «агар»	средняя	2D	да	ТОЛЬКО ПОЛЗАНИЕ	открытый исходный код
Palyanov et al., 2018 (Sibemetic) 	10143 эластичных частицы и 11436 частицы жидкости, образующие модель тела <i>C. elegans</i> + сотни тысяч частиц, представляющих окружающую среду. 2290 эластичных частиц и 388 частиц жидкости для упрощенной модели с низким разрешением.	Жидкость, гель, эластичное тело, статичные твердые объекты, любые составные 3D объекты из упомянутых материалов	высокая	3D	да	плавание, ползание, реверс, омега- поворот, укорочение тела при сокраще- нии всех мышц одновре- менно	открытый исходный код: sibemetic.org

Вслед за развитием вычислительного оборудования и параллельно с ним создавались и совершенствовались алгоритмы, а также программные технологии, способные предоставить пользователю возможности решения собственных вычислительных задач с использованием данных мощностей. Несмотря на это, моделирование движения *C. elegans*, в соответствии с данными, приведенными в Таблице 4, в основном сводилось к более или менее точному воспроизведению механизма ползания в случае, когда внешняя среда представлялась в неявном виде (т.е. формирующаяся бороздка не рассматривалась вовсе – различались лишь коэффициенты трения в продольном и поперечном направлениях относительно модели тела). Попытки моделирования плавания *C. elegans* представлены моделями, описанными в работах [Tyson et al., 2008; Majmudar et al., 2012; Fieseler et al., 2018 и др.].

Наиболее известными и широко используемыми из них в настоящее время являются CUDA (работающая с видеокартами NVIDIA) и OpenCL (работающая с видеокартами любого производителя, удовлетворяющими стандарту, а также с CPU). Именно эти новые возможности были использованы при создании программной системы *Sibernetis* для решения задачи моделирования структуры тела *C. elegans* и его движения.

2.6.2. О проблемах в области изучения и моделирования нервной деятельности *C. elegans*

За определением структуры нервной системы *C. elegans*, опубликованной в работе [White et al., 1986] последовали попытки использовать данную информацию для моделирования нервной деятельности данного организма. Они начинались с попыток использования простой моделью нейрона-сумматора, однако вскоре стало понятно, что этого будет недостаточно. Во-первых, оказалось, что динамика нейронной активности и механизмы их функционирования гораздо сложнее, чем представлялось. Во-вторых, хотя диаграмма связности нервной системы содержит информацию о морфологии электрических и химических синапсов, это не даёт представления об их

функциональных свойствах. Также стоит отметить, что базовые свойства отдельных нейронов – то, как они реагируют на химические, электрические и сенсорные стимулы, и как эти ответы меняются в соответствии с полученным ими ранее опытом – для большинства нейронов *C. elegans* по-прежнему неизвестны [Schafer, 2005], а отдельные нейроны, для которых были проведены детальные исследования лежащих в их основе механизмов, продемонстрировали свою сложность и индивидуальность.

Например, для моделирования динамики Ca^{2+} в сенсорном нейроне ASH пришлось учесть биологические события и молекулярные каскады, вовлеченные в гомеостаз кальция. Состояния ионных каналов описывались их вероятностями активации / инактивации, а остальные молекулярные состояния описывались кинетическими уравнениями, параметры которых были основаны на экспериментальных данных [Mirzakhali et al., 2018]. В этом же нейроне другим коллективом исследователей была обнаружена петля обратной связи, зависящая от концентрации Ca^{2+} , которая может модулироваться нейромедиатором серотонином, что приводит к изменениям в возбудимости нейрона, параметров его синаптических связей и, в итоге, в поведении [Williams et al., 2018].

Другой пример – пара сенсорных нейронов URX (URXL/URXR, левый и правый), являющихся детекторами концентрации кислорода (пороговое значение – 21% O_2) и индикатором пребывания тела *C. elegans* на поверхности (т.е. в контакте с атмосферой). Их срабатывание приводит к тонической активации пары интернейронов RMG(L/R), что, в свою очередь, вызывает изменение глобального состояния организма, включающее повышенную двигательную активность, изменение экспрессии нейропептидов, метаболических ферментов и ряда других генов, не относящихся к нервной деятельности [Laurent et al., 2015]. Возможность получить такую информацию просто из анализа диаграммы связности между нейронами *C. elegans* представляется маловероятной. Состояние «сна» также является глобальным состоянием нервной системы данного организма [Nichols et al., 2017].

Имеются и другие примеры, иллюстрирующие сложность механизмов, функционирующих в нейронах *C. elegans*, несмотря на то, что их размер очень мал по сравнению с таковым для более сложных и крупных организмов. Ранее была уже упомянута пара нейронов RIA(L/R), в которых различные области одного и того же отростка нейрона могут обладать независимой активностью [Hendricks and Zhang, 2013]. Возможно, что детальные исследования каждого из нейронов *C. elegans* индивидуально и при взаимодействии с соседями (с которыми имеются контакты), а также с привязкой к связанному с их активацией поведению, позволят в будущем построить функциональную карту нервной системы в дополнение к уже имеющейся диаграмме связности между нейронами.

Несмотря на описанные сложности, некоторые исследователи полагают, что эффективное моделирование работы нервной системы *C. elegans* возможно даже в условиях существенного недостатка данных о ней. Одна из первых работ в этом направлении, объединявшая простейшую модель тела и модель нейронной сети брюшной нервной цепочки, включала 58 моторных нейронов, принадлежавших к 6 классам (VB, VA, DB, DA, VD и DD) [Suzuki et al., 2005]. Сходство электрофизиологических свойств нейронов в пределах одного класса существенно упрощало ситуацию. В дополнение к этому, уже было известно, что классы VB и DB связаны с движением вперед, VA и DA – с движением назад [Riddle et al., 1998], а также то, что VB, VA, DB, DA являются активирующими мотонейронами, а VD и DD – ингибирующими.

Работы в области моделирования работы брюшной нервной цепочки, управляющей движением тела (за исключением головного конца, управляемого нейронами окологлоточного нервного кольца) по-прежнему актуальны, поскольку механизм генерации периодических сигналов, порождающих синусоидальное движение тела, остается неизвестным. Так, в работе [Olivares et al., 2017] в результате сегментационного анализа диаграммы связности нервной системы *C. elegans* был выделен повторяющийся элемент структуры брюшной нервной цепочки, включающий 12 нейронов (по два AS, DA, VD, VB, VA и по одному DB

и DD). К этой системе был применен эволюционный алгоритм, чтобы определить неизвестные физиологические параметры каждого нейрона, обеспечивающие максимальное сходство между экспериментом и моделью в режимах движения вперед и назад. Согласно экспериментальным данным, полученным несколькими исследовательскими коллективами, интернейроны А- и В- классов способны осциллировать [Faumont et al., 2011; Haspel et al., 2010; Haspel and O'Donovan, 2011; Kawano et al., 2011]. Являются ли сами эти нейроны источником периодической активности, или сигналы для их активации поступают извне – до сих пор неизвестно. В работе [Olivares et al., 2017] состояния командных интернейронов А- и В- классов (т.е. DA, VD, VB и VA) моделировались сигналами постоянного уровня, принимающими одно из двух значений, соответствующих состояниям «включено» (высокая активность) и «выключено» (низкая или нулевая активность), т.е. вопрос о природе и механизмах периодической активности, к сожалению, остается за пределами рассмотренной модели.

Еще один актуальный вопрос в контексте моделирования нервной деятельности *C. elegans* – взаимосвязь между регистрируемыми сигналами интенсивности флуоресценции тел нейронов, внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в них и нейронной активностью. В рамках работы [Kuramochi and Iwasaki, 2010] была предложена математическая модель, количественно описывающая динамику нейронной активности на примере нейронного контура *C. elegans*, осуществляющего хемотаксис (движение по градиенту определенного химического вещества). Параметры модели были подобраны таким образом, чтобы она воспроизводила нейрофизиологические экспериментальные данные, и в результате было получено хорошее сходство между ними. Однако, было обнаружено, что нейронная активность, измеренная на основе интенсивности флуоресценции, показывает количественные отличия от таковой, полученных на основе мембранных потенциалов (в некоторых нейронах). В работе обсуждаются причины этих различий с точки зрения механизмов функционирования нейронов. Другие авторы также отмечают сложность определения параметров,

определяющих внутриклеточную кальциевую динамику нейронов, располагая лишь электрофизиологическими данными [Fuchs et al., 2017].

Рассмотренные проблемы моделирования нейронной динамики и лежащих в её основе механизмов являются далеко не исчерпывающими. Помимо индивидуальной активности нейронов, которая может быть существенно различной [Kato et al., 2015], имеются более комплексные феномены, такие, как обучение [Ardiel and Rankin, 2010], память [Lau et al., 2013; Sasakura and Mori, 2013; Stein and Murphy, 2014] и принятие решений [Macosko et al., 2009]. На нынешнем научно-технологическом уровне определить все необходимые параметры, описывающие данную систему, путем их непосредственного определения из экспериментов не представляется возможным. Поэтому необходим метод, позволяющий осуществлять оптимизацию параметров индивидуальных нейронов, задействуя в качестве исходных данных глобальную динамику нейронной активности (активности всех нейронов нервной системы или их значительной доли), которую, как уже было отмечено выше, удастся получить с разрешением по времени в десятые доли секунды и меньше.

Среди недавних тенденций в области интерпретации и моделирования нервной деятельности *C. elegans* также можно отметить использование подходов на основе аттракторов, описывающих состояния нервной системы и переходы между ними [Kato et al., 2015; Kunert-Graf et al., 2017; Nichols et al., 2017].

2.6.3. О методах и программных средствах моделирования динамики нейронной активности

Среди программных средств профессионального уровня, предназначенных для моделирования динамики электрической активности как отдельных нейронов, так и сетей взаимодействующих между собой нервных клеток (которые могут контактировать между собой посредством электрических или химических синапсов) с учетом их морфологии и электрофизиологии, наиболее известными

являются NEURON²⁸ [Carnevale and Hines, 2006] и GENESIS²⁹. В рамках данной работы использовался NEURON, поскольку он имеет ряд удобных особенностей программной реализации – встроенный язык программирования и Neuron Model Description Language (NMODL) [Hines and Carnevale, 2000; Gleeson et al., 2010] – язык описания модели нейрона, включающий такие структурные уровни модели, как ионные токи, ионные каналы, кальциевые насосы и кальциевые депо, а также иные вне- и внутриклеточные механизмы. Он позволяет значительно расширять стандартный репертуар моделей и механизмов дополнительными, пользовательскими.

В основе метода моделирования электрической активности нервной клетки лежит её представление в виде эквивалентной электрической схемы. Отростки нейронов имеют свойство ветвиться и могут обладать различными значениями диаметра на разных участках, поэтому обычно клетка представляется в виде совокупности неветвящихся секций и точек ветвления (Рис. 2.8):

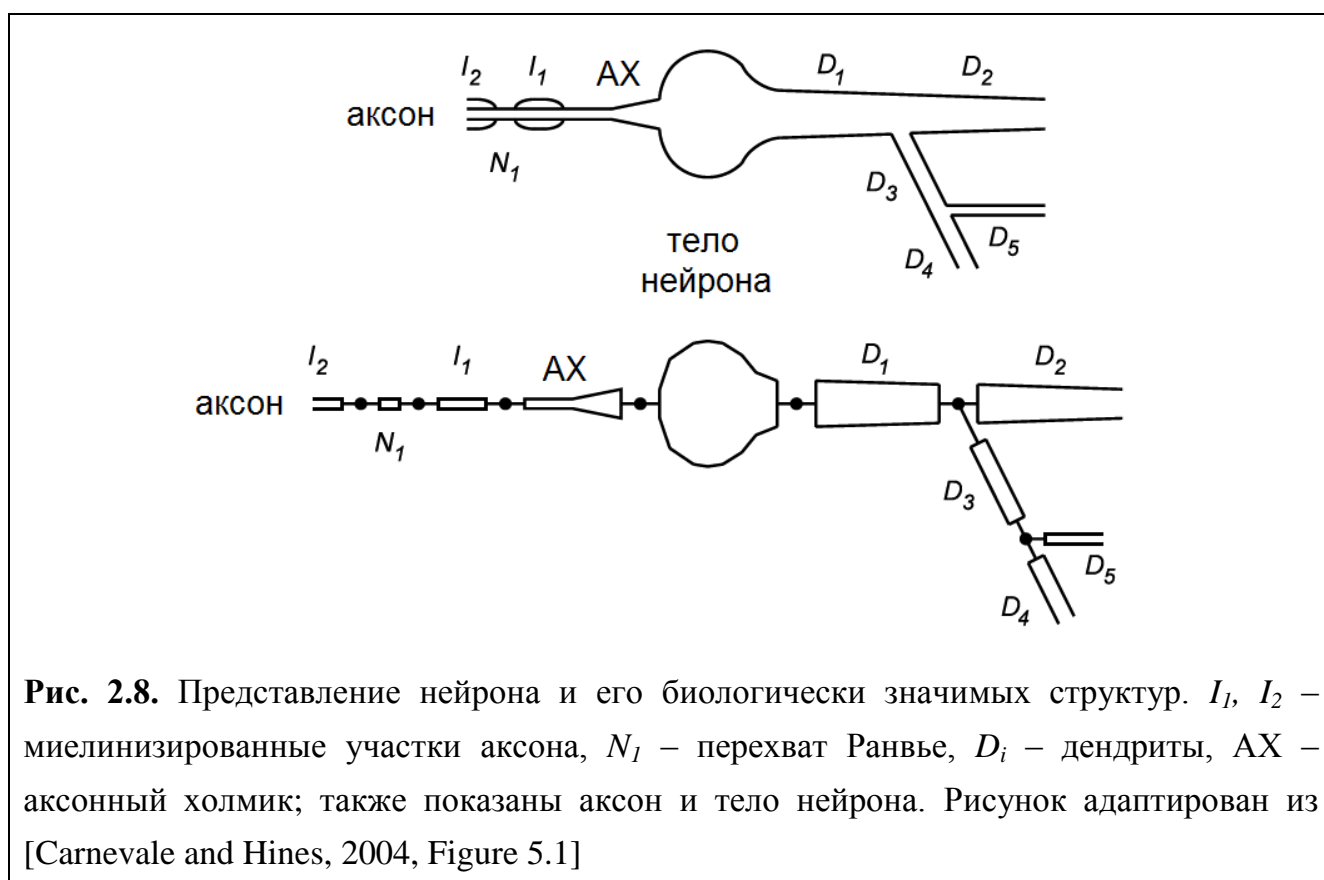


Рис. 2.8. Представление нейрона и его биологически значимых структур. I_1 , I_2 – миелинизированные участки аксона, N_1 – перехват Ранвье, D_i – дендриты, AX – аксонный холмик; также показаны аксон и тело нейрона. Рисунок адаптирован из [Carnevale and Hines, 2004, Figure 5.1]

²⁸ <https://www.neuron.yale.edu/neuron/>

²⁹ <http://genesis-sim.org/>

Каждый из линейных участков во внутреннем представлении программы дополнительно разбивается на ряд более мелких участков (дискретизация может быть либо выбрана по умолчанию, либо задана пользователем при создании объекта). На Рис. 2.9 показано, как соотносится линейный участок отростка нейрона с переменным диаметром и его электрическая схема:

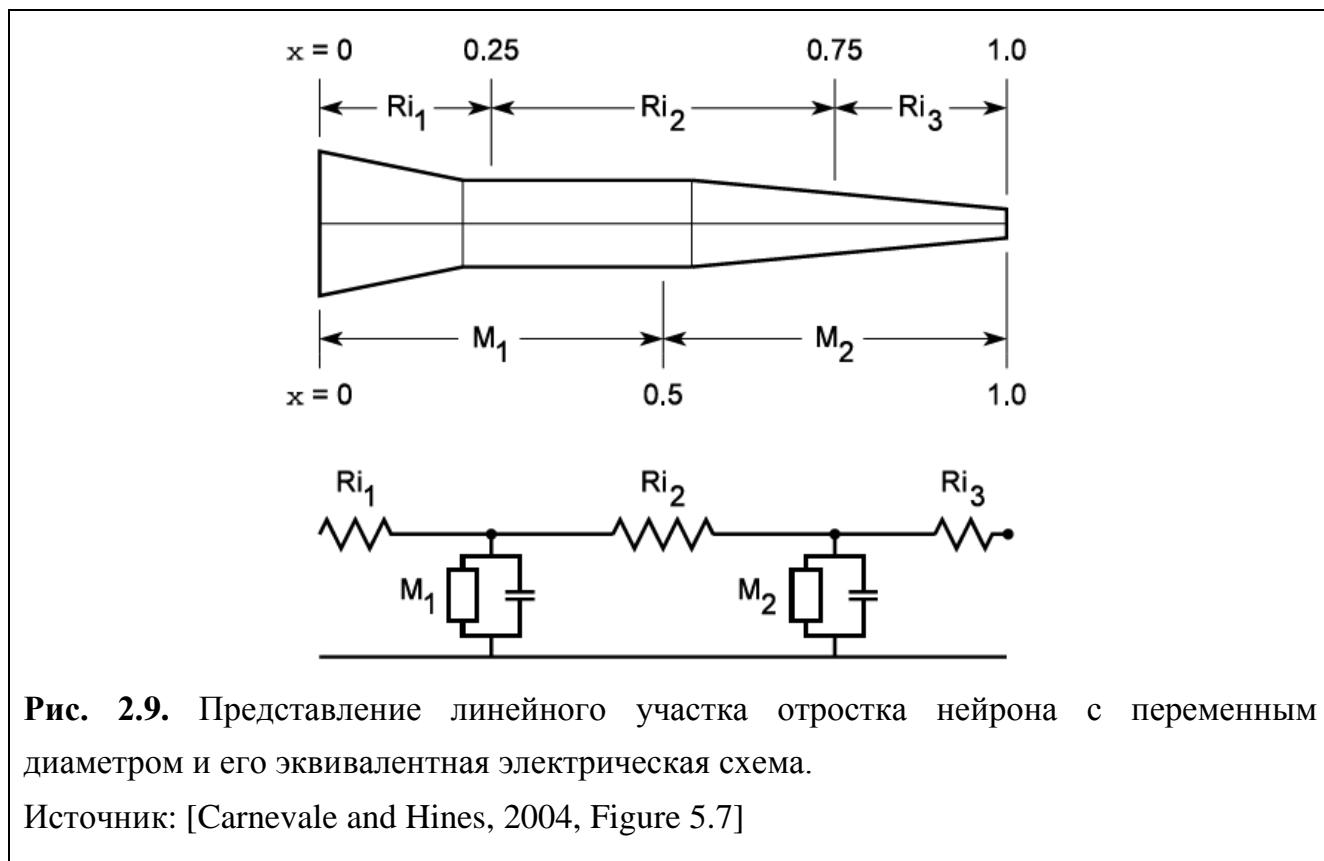


Рис. 2.9. Представление линейного участка отростка нейрона с переменным диаметром и его эквивалентная электрическая схема.

Источник: [Carnevale and Hines, 2004, Figure 5.7]

Данное базовое представление уже позволяет наделять моделируемый участок отростка нейрона такими электрофизиологическими свойствами, как удельная емкость участка мембраны, сопротивление току утечки через мембрану и сопротивление аксоплазмы. Распространение электрических сигналов вдоль неветвящегося участка цепи определяется одномерным кабельным уравнением [Rall, 1977]:

$$\frac{\partial V}{\partial T} + V = \frac{\partial^2 V}{\partial X^2},$$

Где $V = V_m - E_r$ соответствует отклонению мембранного потенциала клетки, V_m , от его значения в покое, E_r . При этом $X = x/\lambda$, где $\lambda = \sqrt{r_m/r_i} = \sqrt{(R_m/R_i)(d/4)}$, где d – диаметр отростка нейрона, r_m – удельное сопротивление мембраны

клетки, r_i – удельное сопротивление внутриклеточной среды (intracellular medum). Аналогично, $T = t/\tau_m$, где $\tau_m = r_m c_m$, а c_m – удельная электрическая емкость участка мембраны.

Для случая ветвления отростка нейрона, который схематично представлен на Рис. 2.10, закон сохранения заряда требует, чтобы сумма всех токов, входящих в любую область, была равна нулю:

$$\sum i_a - \int_A i_a dA = 0,$$

где первое слагаемое – сумма всех токов вдоль нейритов (отростков нейрона – дендритов или аксонов), текущих через границы с их соседними сегментами, а второе слагаемое – суммарный трансмембранный ток (интегрирование идет по поверхности мембраны рассматриваемой области).

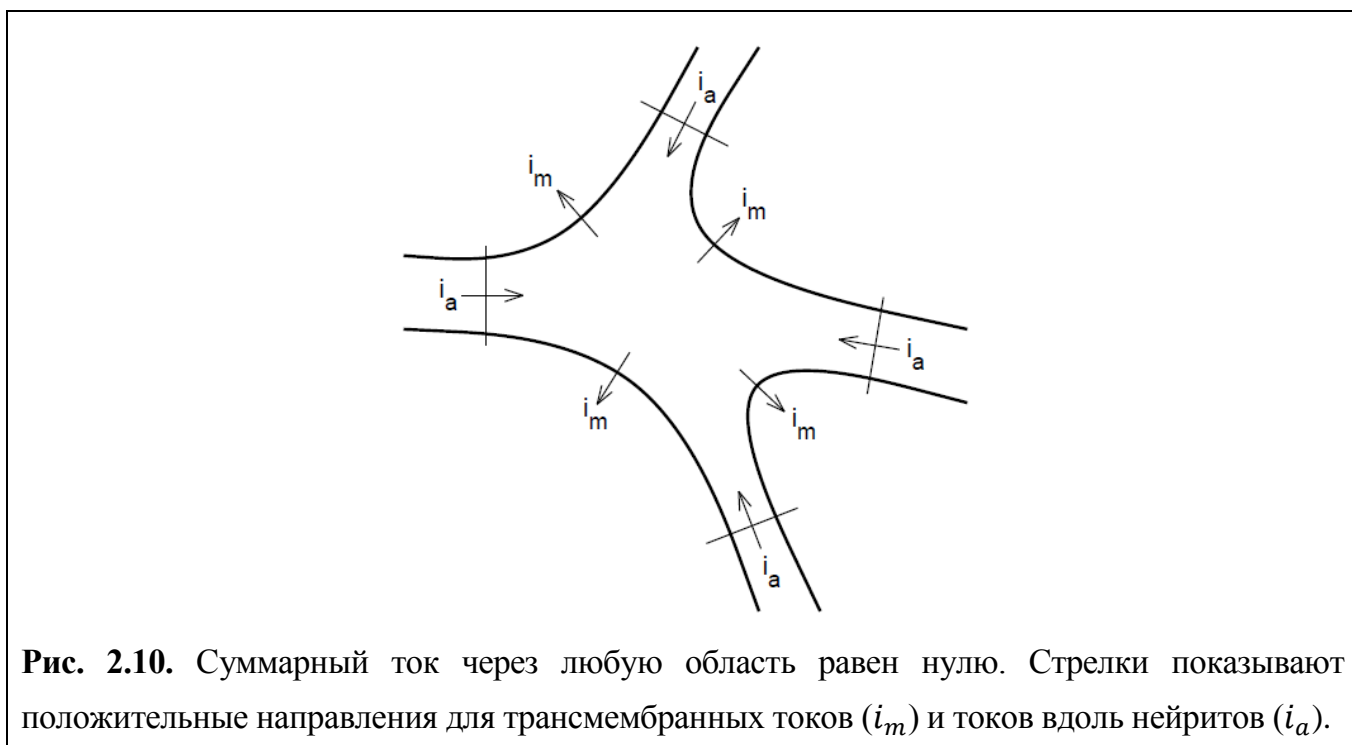


Рис. 2.10. Суммарный ток через любую область равен нулю. Стрелки показывают положительные направления для трансмембранных токов (i_m) и токов вдоль нейритов (i_a).

В случае, если в системе присутствуют электроды, введенные в клетку, уравнение принимает следующий вид:

$$\sum i_a - \int_A i_a dA + \int_A i_s dA = 0.$$

Физический размер электрода обычно мал по сравнению с диаметром нейрита, поэтому математическая форма записи для i_s обычно представляется дельта-функцией позиции i_s на нейрите - $i_s \cdot \delta(x - x_0, y - y_0, z - z_0)$.

Стандартный подход при компьютерной симуляции состоит в разделении нейрона на области (компарменты), достаточно малые для того, чтобы изменения i_m при изменении координаты в направлении вдоль нейрита для любого компартамента j хорошо аппроксимировались значением i_m в центре компартамента. При этом приведенная ранее запись в интегральной форме преобразуется к следующему виду:

$$i_{m_j} A_j = \sum_k i_{a_{kj}},$$

где A_j – площадь поверхности компартамента j . До этого момента мы полагались только на закон сохранения заряда. Теперь задействуем закон Ома, чтобы рассчитать аксиальные токи между компарментом j и его соседями: каждый аксиальный ток аппроксимируется изменением потенциала между центрами компарментов, отнесенным к сопротивлению на пути между этими точками:

$$i_{a_{kj}} = (v_k - v_j)/r_{jk},$$

$$i_{m_j} A_j = \sum_k (v_k - v_j)/r_{jk}.$$

Это автоматически обеспечивает корректный учет направлений аксиальных токов, принимая что $v_j < v_k$ соответствует току, втекающему в компармент j . Суммарный мембранный ток определяется суммой емкостных и ионных компонентов:

$$i_{m_j} A_j = c_j \frac{dv_j}{dt} + i_{ion_j}(v_j, t),$$

Где c_j – емкость мембраны компартамента j , а i_{ion_j} соответствует вкладу от ионных каналов с изменяющимися проводимостями (например, есть потенциал-зависимые ионные каналы). Пространственная дискретизация для ветвящегося

нейрита приводит в итоге к следующей системе обыкновенных дифференциальных уравнений (по одному на каждый компартмент):

$$c_j \frac{dv_j}{dt} + i_{ion_j}(v_j, t) = \sum_k (v_k - v_j)/r_{jk}.$$

Источники тока могут быть добавлены к правой стороне уравнения. Помимо этого в программе возможно использовать усилители сигнала и различные внутриклеточные электрохимические механизмы, которые подробно описаны в [Carnevale and Hines, 2004] и документации к программе.

Рассмотрим для простоты неветвящийся сегмент с постоянным диаметром. Аксиальный ток для j -го компартмента состоит из двух слагаемых, связанных с соседними компартментами – $(j-1)$ и $(j+1)$:

$$c_j \frac{dv_j}{dt} + i_{ion_j}(v_j, t) = \frac{v_{j-1} - v_j}{r_{j-1,j}} + \frac{v_{j+1} - v_j}{r_{j+1,j}}.$$

Если каждый компартмент имеет длину Δx и диаметр d , то его емкость будет равна $C_m \pi d \Delta x$, а аксиальное сопротивление – $R_a \Delta x / \pi (d/2)^2$, где C_m - удельная емкость мембраны клетки, а R_a – удельное сопротивление аксоплазмы. Тогда уравнение преобразуется к следующему виду:

$$C_m \frac{dv_j}{dt} + i_j(v_j, t) = \frac{d}{4 R_a} \frac{v_{j+1} - 2v_j + v_{j-1}}{\Delta x^2}.$$

При $\Delta x \rightarrow 0$ правая часть становится второй частной производной мембранного потенциала по координате в области компартмента j (который при этом становится инфинитезимальным):

$$C_m \frac{dv_j}{dt} + i(v, t) = \frac{d}{4 R_a} \frac{\partial^2 v}{\partial x^2}.$$

Умножая обе стороны уравнения на R_m и учитывая, что $i R_m = v$, получаем:

$$R_m C_m \frac{dv}{dt} + v = \frac{d R_m}{4 R_a} \frac{\partial^2 v}{\partial x^2}.$$

Масштабирование t и x с использованием временной и пространственной констант $\tau_m = R_m C_m$ и $\lambda = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{d R_m}{R_a}}$ ($T = t/\tau_m$ и $X = x/\lambda$) приводит это уравнение к уже знакомому виду, в котором оно было представлено на стр. 81.

Для численного интегрирования уравнений, описывающих изменения потенциалов и токов в компартментах нейрона или системы взаимодействующих нейронов в NEURON используется метод Крэнка-Николсона [Crank and Nicholson, 1947], явный интегратор, который эквивалентен подвигению вперед на пол-шага обратным методом Эйлера, а затем еще на полшага – прямым методом Эйлера. На практике он показал себя достаточно стабильным и точным по сравнению с более простыми вариантами. Вопросы стабильности и точности при численном интегрировании в NEURON подробно рассмотрены в [Carnevale and Hines, 2004, Chapter 4].

Глава 3. Механистическая 3D-модель тела *C. elegans* под управлением фрагмента нервной системы

В соответствии с изложенными в предыдущей главе фактами о современном состоянии исследований в области биологически обоснованного компьютерного моделирования нервных систем на начальном этапе данной работы, в 2008-2009 г., было принято решение о разработке собственного прототипа модели тела и мышечной системы *C. elegans*, активностью которой управляет подключенный к ней фрагмент брюшной нервной цепочки [Palyanov et al., 2011].

Для создания модели был разработан собственный «физический движок», осуществляющий расчет динамики системы, состоящей из точечных масс и соединяющих их пружин. При расчетах учитываются силы взаимодействия между пружинами, силы трения между частицами и статичными поверхностями, сила тяжести и сила реакции опоры от горизонтального пола и вертикальных стен, образующих невысокий цилиндр – «чашку Петри», в которой обычно и обитает содержащийся в лабораторных условиях *C. elegans*. На основе рассчитываемых на каждом шаге сил, действующих на каждую точечную массу, производится численное интегрирование по времени для вычислений координат частиц системы в следующий момент времени, аналогично тому, как это обычно делается в подобных системах [Grzeszczuk and Terzopoulos, 1995]. Для стабильной работы системы оказалось достаточно шага интегрирования, равного $8 \cdot 10^{-3}$ с. Код симулятора реализован на C++/STL, графический интерфейс и 3D-визуализация –

на OpenGL. Имеется readme и встроенная в программу справка по основным функциям, доступная по нажатию кнопки «F1». Исходный код проекта, включая все необходимые файлы данных и документацию, доступны в системе GitHub: <https://github.com/openworm/CyberElegans>

3.1. Моделирование тела и мышечной системы

C. elegans является беспозвоночным организмом, имеющим тело веретенообразной формы длиной около 1 мм и диаметром около 0.06 мм в средней, наиболее широкой части. Форма тела поддерживается благодаря избыточному внутреннему давлению [Boyle et al., 2007] и управляется системой из 95 мышечных клеток, образующих 4 продольных мышечных тяжа, простирающихся на всю длину организма, от головного до хвостового концов, крепящихся к внутренней поверхности оболочки тела. Поперечные сечения модели тела являются восьмиугольниками, соседние точечные массы в которых соединены пружинами; точечные массы, образующие соседние восьмиугольники, а также дополнительные точечные массы, расположенные вдоль центральной линии тела, также соединены пружинами; в совокупности они образуют модель тела. В каждом из 4-х мышечных тяжей реального *C. elegans* имеется два ряда мышечных клеток, т.е. всего 8 рядов, сгруппированных попарно, что и определяет выбор в пользу восьмигранника вместо квадрата, который использовался в более ранних моделях. Также восьмигранник значительно ближе к реальной форме сечения – кругу, и позволяет посредством соответствующего паттерна активации мышц осуществлять вращение тела вокруг собственной продольной оси, на которое способен и реальный *C. elegans* [Bilbao et al., 2018]. Размеры восьмигранников определяются зависимостью радиуса тела от координаты вдоль него, для расчета которой была использована микрофотография из работы [Altun and Hall., 2009, Fig 7A], а число использованных восьмигранников составляет 26 штук. Головной и хвостовой концы также представлены точечными массами, соединенными пружинами с соответствующими восьмигранниками. Данная конструкция тела также позволяет ему при соответствующей активации

мышечных клеток воспроизводить типичную для *C. elegans* синусоидальную форму, характерную для ползания (Рис. 3.1).

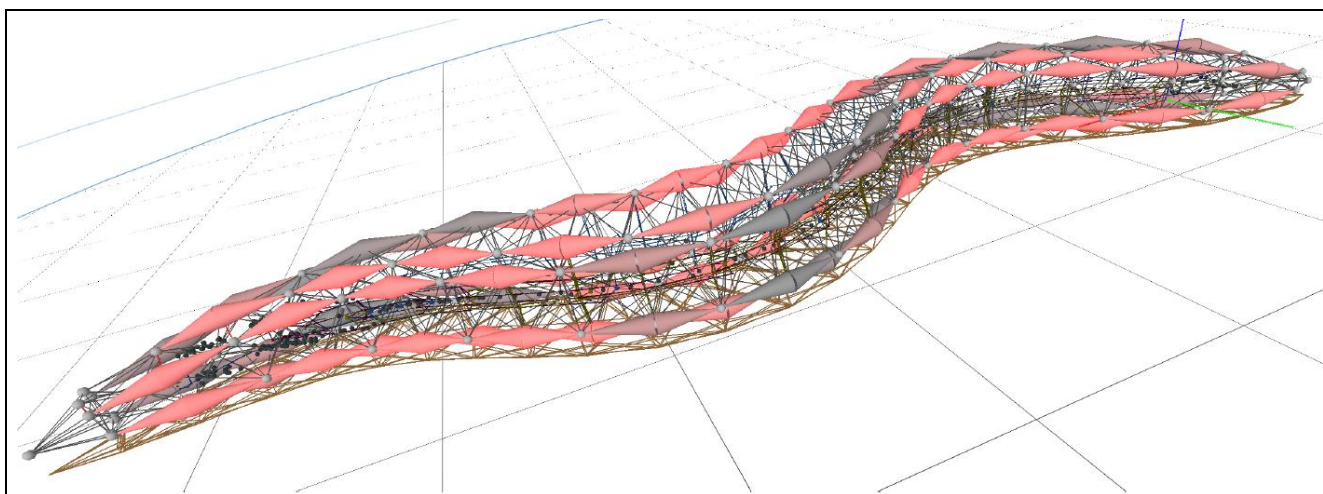


Рис. 3.1. Общий вид модели тела, мышечной системы и фрагмента нервной системы *C. elegans*

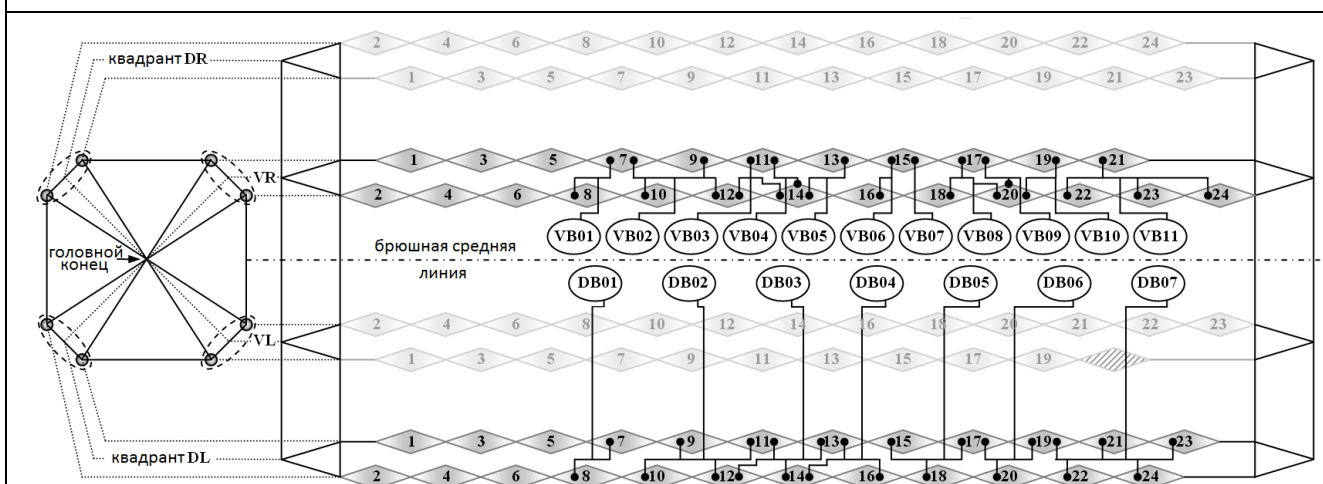


Рис. 3.2. Схема расположения мышечных клеток и связей между ними и моторными нейронами, связанными с движением вперед. Для каждой группы (VB и DB) показана только одна сторона для удобства представления информации – противоположная устроена симметрично за исключением единственной клетки в секторе VR, в котором одна мышечная клетка не имеет пары в VL (отсутствующая клетка заштрихована), поэтому общее число клеток не 96, а 95, как и у реального организма.

Для создания модели мышечной системы использовалась схема расположения мышечных клеток в теле *C. elegans* и их наименования согласно [Altun and Hall., 2009, Fig. 15], которая с учетом периодической дискретной

конструкции тела была адаптирована до схемы, представленной на Рис. 3.2. При этом число клеток и их взаимное расположение полностью сохранены.

Под действием управляющих сигналов, приходящих к мышечным клеткам от моторных нейронов, последние могут сокращаться пропорционально уровню активирующего сигнала. В модель включены соединения между моторными нейронами и мышечными клетками тела, соответствующими брюшной нервной цепочке. При этом мышцы головного и шейного отделов, MVR01...MVR06, MDR01...MDR06, MVL01...MVL06, MDL01...MDL06, управляемые нейронами окологлоточного нервного кольца, в данной модели присутствуют, но их соединения с соответствующими нейронами не реализованы, т.к. эта часть нервной системы является наименее исследованной и в рамках данной главы не рассматривалась.

3.2. Моделирование нейронов и связей между ними

За основу для расчетов динамики активности нейронов была взята модель МакКаллока-Питтса [McCulloch and Pitts, 1943; Haykin, 1999] с линейной функцией активации на интервале $(-1,1)$ для обеспечения возможности работы как с активирующими, так и с ингибирующими синапсами. Данные о позициях, связях и других свойствах нейронов были взяты из следующих источников:

1. Наименования нейронов и их свойства - <http://www.wormatlas.org/images/NeuronType.xls> и [Chen et al., 2006]
2. Соединения между нейронами – <http://www.wormatlas.org/neuronalwiring.html>
<http://www.wormatlas.org/images/NeuronConnect.xls>
3. Связи между нейронами и мышцами / сенсорами <http://www.wormatlas.org/images/NeuronFixedPoints.xls>
4. 3D-координаты всех 302 нейронов были извлечены из данных, представленных на сайте проекта VirtualWorm <http://caltech.wormbase.org/virtualworm/>

Нейроны *C. elegans*, входящие в состав брюшной нервной цепочки, имеют длинные отростки, в некоторых случаях проходящие по всей длине организма.

В соответствии с данными [Lockery et al., 2009], распространение сигналов в нервной системе *C. elegans* посредством потенциалов действия (быстро и без затухания) не было зарегистрировано и является маловероятным, т.к. в его геноме отсутствуют потенциал-зависимые натриевые ионные каналы, лежащие в основе этого механизма [Bargmann, 1998]. Наиболее вероятным механизмом, с учетом высокого сопротивления мембран нейронов *C. elegans*, считается пассивное распространение посредством градуальных потенциалов. Оно происходит значительно медленнее, чем в случае потенциалов действия, и с затуханием сигнала из-за утечки через мембраны нейронов и их отростков, однако при этом все-таки обеспечивает прохождение сигнала от одного конца тела до другого. Для учета этих особенностей модель нейрона была модифицирована следующим образом: вместо подразумеваемого моделью МакКаллока-Питтса прямого соединения между парой нейронов каждый отросток нейрона разбивается на сегменты, что позволяет аппроксимировать их трехмерную конфигурацию, включая ветвление. Каждый узел, соединяющий два (при отсутствии ветвления) или три и более (при его наличии) сегмента в текущий момент времени принимает входящий сигнал, а на следующей итерации передает его далее с некоторым ослаблением, и, соответственно, с задержкой на 1 шаг по времени. Активность как нейрона, так и узла, соединяющего сегменты нейрита (аксона или дендрита), может быть записана следующим образом:

$$u_i(t + dt) = \min(u_i(t) \cdot \alpha + \sum_j w_j \cdot u_j(t), 1),$$

где dt – шаг по времени, $\alpha \in (0,1]$ - коэффициент затухания сигнала i -го нейрона с течением времени, а w_j - «вес» j -го синапса, посылающего сигнал i -му нейрону. В случае отсутствия ветвления отростка нейрона для промежуточного узла на нем множество входящих в узел нейритов представляется единственным элементом, как и множество исходящих. Распространение прямоугольного импульса вдоль такого отростка проиллюстрировано на Рис. 3.3:

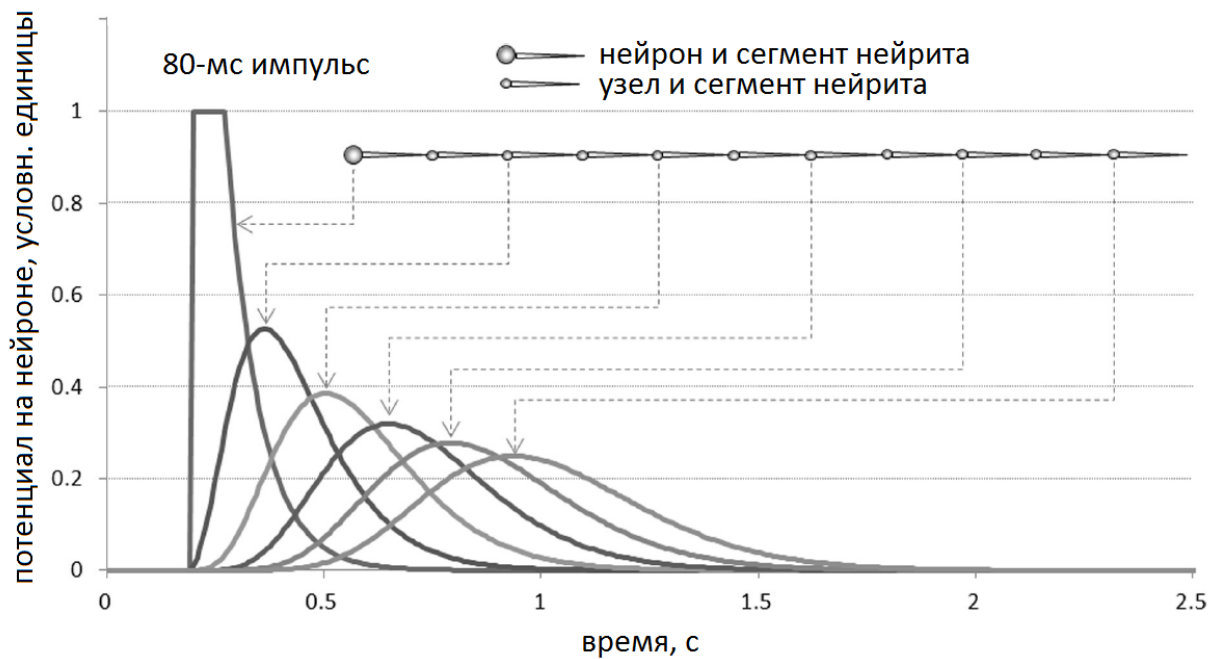


Рис. 3.3. Иллюстрация распространения сигнала вдоль аксона, разделенного на сегменты. Каждый сегмент представлен в виде конуса, острый конец которого указывает направление распространения сигнала.

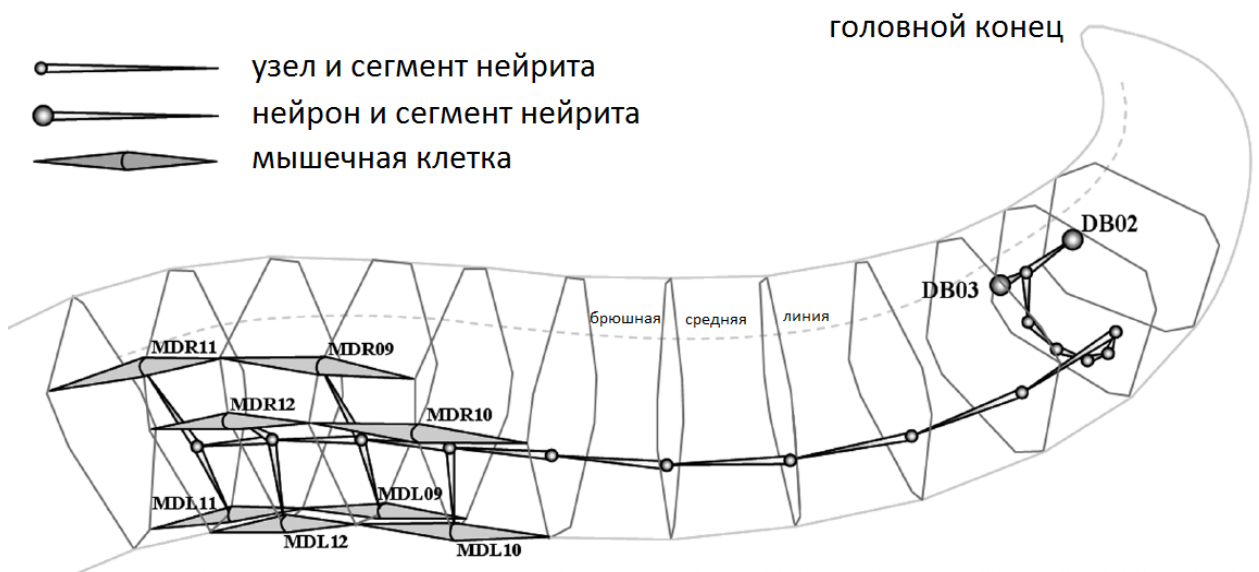


Рис. 3.4. Фрагмент нервно-мышечной системы, включающий пару моторных нейронов (DB02 и DB03), расположенных в брюшной нервной цепочке, иннервирующих мышцы на противоположной, спинной стороне тела. С помощью сегментирования воспроизведена трехмерная конфигурация отростка нейрона, близкая к реальной.

В симуляторе реализована привязка координат узлов, задающих ход нейритов, к системе координат, связанной с моделью тела *C. elegans* (каждый узел – к

конкретному сегменту тела, определяемому парой соседних восьмигранников), что отчасти проиллюстрировано на Рис. 3.4.

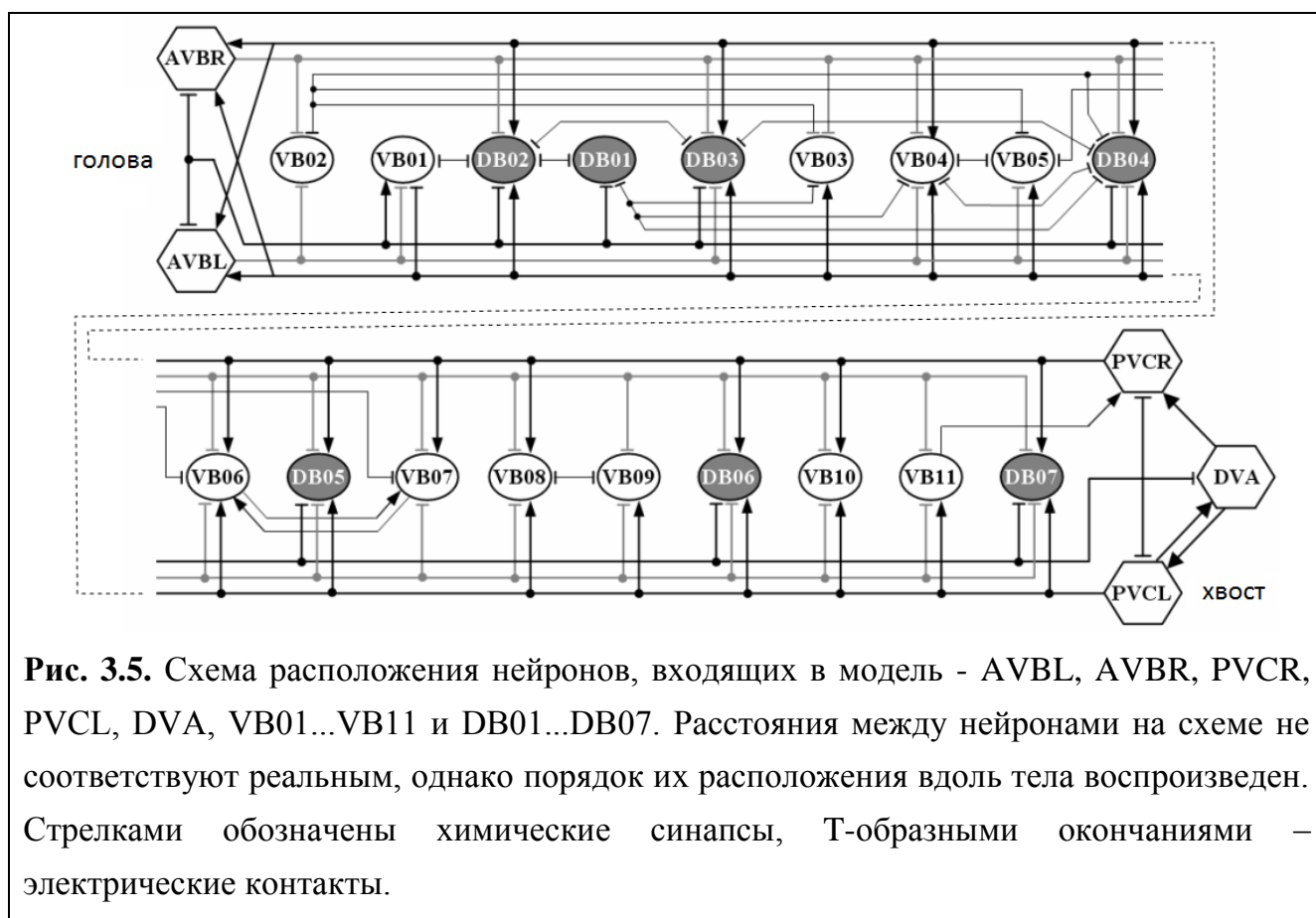
3.4. Моделирование движения тела и его взаимодействия с поверхностью

В процессе движения по поверхности агара (геля), типичной среды обитания *C. elegans* в лабораторных условиях, на его тело действуют силы трения, детально изученные в работе [Berri et al., 2009]. Её авторы измерили отношение коэффициентов трения $K = C_{\perp}/C_{\parallel}$ (C_{\perp} - тангенциальный, C_{\parallel} - нормальный относительно поверхности тела) и заключили, что движение по поверхности агара или желатина, происходящее в режиме ползания, определяется и адекватно описывается единственным параметром – этим самым отношением коэффициентов трения (K), определяющим вязкоэластичную модель среды. Данный подход был также применён в работе [Boyle et al., 2012]; при этом использовалась оценка значения $C_{\parallel, \text{agar}} = 3.2 \cdot 10^{-3}$ кг/с [Niebur and Erdös, 1991] и $C_{\perp, \text{agar}} \approx (30 \dots 40) \cdot C_{\parallel, \text{agar}}$ [Berri et al., 2009]. Значения K из данного интервала, примененные в нашей модели, также привели к визуально реалистичным результатам. Помимо этого K также было получено в результате теоретических расчетов и составило около 10 [Shen et al., 2012].

При движении в режиме ползания (по поверхности агара или другой среды) *C. elegans* лежит на боку, а группы «спинных» и «брюшных» мышц сокращаются таким образом, что тело имеет синусоидальную форму, причем фаза синусоиды медленно меняется, обеспечивая движение тела вперед или назад в зависимости от того знака изменения фазы [Boyle et al., 2007]. Первый тест заключался в подаче синусоидальных сигналов на мышцы тела (в противофазе для брюшных и спинных мышц) – это вызвало движение вперед по синусоидальной траектории. Смена знака приращения фазы синусоиды меняет движение на противоположное, как и происходит при реверсе движения реального *C. elegans*. В следующем тесте были задействованы не только мышечные, но и нервные клетки.

3.5. Моделирование нейронов и связей между ними

Для исследования возможностей генерации периодических сигналов, управляющих активностью мышечных клеток, приводящей к поступательному движению вдоль синусоидальной траектории, в симуляцию были включены следующие нейроны и связи, которые, согласно имеющимся представлениям, образуют нейронный контур, ответственный за движение вперед [Chalfie et al., 1985]: AVBL, AVBR, PVCR, PVCL, DVA, VB01...VB11 и DB01...DB07 (см. Рис. 3.5).



Однако, поскольку для нейронов *C. elegans* возможность генерации спонтанной активности пока не обнаружена и её гипотетический механизм не известен, реализованная модель нейронной активности, основанная на пассивном механизме распространения сигналов, оказалась не способна на самопроизвольную генерацию периодических сигналов. Однако, удалось

достигнуть промежуточного результата, определив, что подача синусоидального сигнала на нейроны VB01...VB11 и комплементарного сигнала в противофазе на DB01...DB07 приводит к достаточно реалистичному поступательному движению вперед по синусоидальной траектории. Небольшое отличие от движения реального *C. elegans* состоит в том, что у него синусоидальную форму имеет всё тело, а в нашей модели – всё за исключением головного сегмента, который, предположительно, управляется отдельно нейронами окологлоточного нервного кольца, пока недостаточно изученного для моделирования, поэтому соответствующие мышцы в данной модели не активны (см. Рис. 3.6.).



Рис. 3.6. Общий вид модели тела *C. elegans* при симуляции синусоидального движения вперед при активации моторных нейронов брюшной нервной цепочки. Визуализация включает точечные массы и пружины, образующие тело, мышечные клетки (веретенообразные структуры, ориентированные вдоль тела), цвет которых отражает их текущую активность (серый – активности нет, ярко-розовый – максимальная активность), а также тела нейронов и их отростки.

Видеозаписи описанных тестов доступны в интернете по следующему адресу:

<https://www.youtube.com/watch?v=3uV3yTmUlgo>

3.6. Значение созданной программной системы и её применение в научной и преподавательской деятельности

На момент публикации описанная в данной главе разработка, получившая название CyberElegans, во многом превосходила уже имеющиеся в мире модели по следующим параметрам:

- Воспроизведен профиль диаметра тела вдоль направления от головы к хвосту. В поперечном сечении тело представлено не квадратом, как в более ранних моделях, а восьмиугольником.
- Первая трехмерная модель, в которой явным образом представлены и правильно расположены все 95 мышечных клеток, управляющих движением тела (см. Рис. 3.1, Рис. 3.2).
- При расчете распространения сигналов между нейронами учитываются не только сами связи, но и их длина и, соответственно, затухание сигнала и его задержка во времени.
- 3D визуализация движения тела, активности нервных и мышечных клеток и распространения сигналов между ними в процессе симуляции – первый шаг в направлении концепции виртуального *C. elegans*.
- Реализована возможность выбирать и активировать нейроны в процессе симуляции, прослеживая распространение сигналов и их влияние на функционирование системы.
- Быстродействие CyberElegans позволяет производить симуляцию в режиме реального времени на персональных компьютерах на базе Intel Core i5 3.0 ГГц и мощнее. Данный этап работы позволил получить ценный практический опыт в области моделирования различных систем *C. elegans* и выявить аспекты, которые будет необходимо принципиально улучшить при проектировании следующего прототипа, который создавался уже в контакте с коллегами по международному проекту OpenWorm, включая специалистов по анатомии и нейрофизиологии *C. elegans*.

Созданная система симуляции движения и 3D-визуализации различных объектов, сконструированных из частиц и пружин, нашла несколько различных применений в научной и образовательной сферах.

- 1) Программная система CyberElegans была использована в серии работ по обучению нервной системы модели *C. elegans* управлению движением организма в условиях градиентов значимых для нематоды химических веществ [Дёмин, Пальянов, 2012; Дёмин 2013; Demin and Vityaev, 2014].
- 2) На базе физического симулятора системы CyberElegans автором была спроектирована (с научно-образовательными целями) интерактивная модель робота, управляемого командами с клавиатуры компьютера (см. Рис. 3.7). Данная разработка использовалась на нескольких Летних школах юных программистов (ЛШЮП), проводимых ежегодно ИСИ СО РАН. Видео-демонстрация базовых возможностей данной модели доступна здесь: <https://www.youtube.com/watch?v=LzX99fOUeRQ>
- 3) В ходе работы, выполненной на 34-й ЛШЮП (2009 г.) коллективом школьников под руководством и с помощью автора была выполнена модификация программного кода физического симулятора CyberElegans и работы по оцифровке формы корпуса игрушечной модели машины и проектированию её ходовой части. Это позволило создать относительно несложный 3D симулятор движения модели машины, управляемой командами с клавиатуры ПК (повороты влево/вправо, движение вперед, назад, торможение, управление камерой) (см. Рис. 3.8). Трёхмерный редактор позиций опорных точек и связанных с ними плоскостей был реализован в CyberElegans в рамках данной работы как вспомогательное средство.

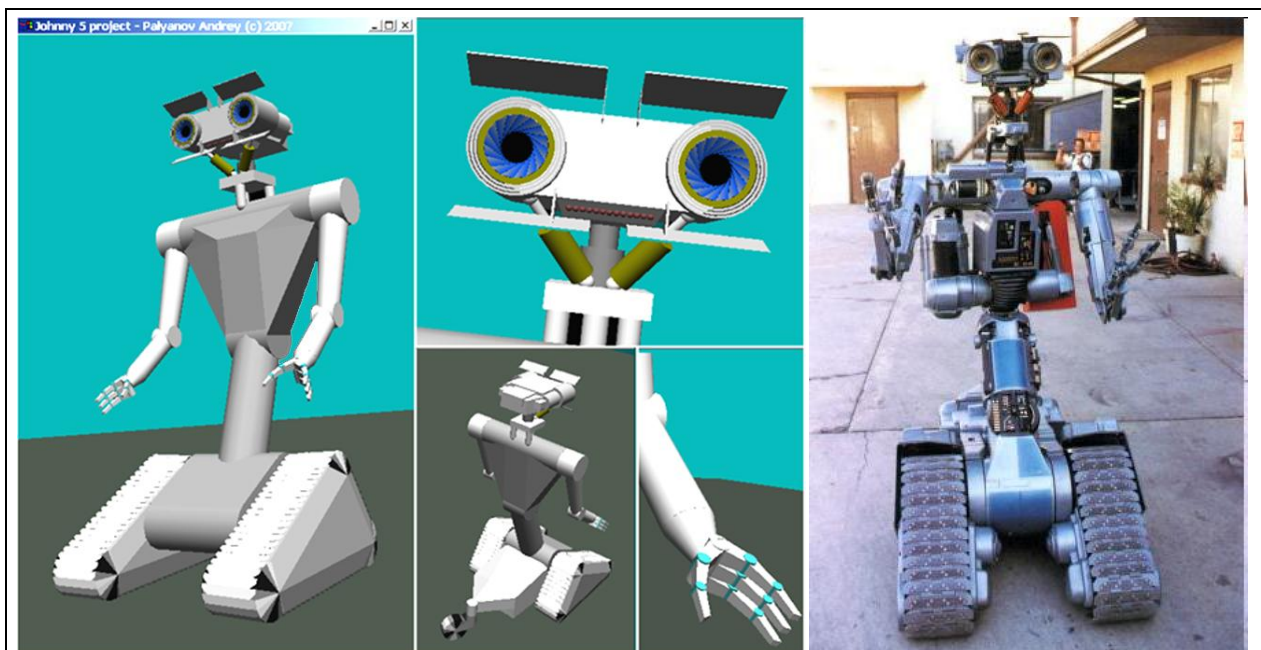


Рис. 3.7. Слева и по центру – модель робота на базе системы CyberElegans, справа – прообраз из научно-фантастического фильма «Короткое замыкание» (1986 г.)

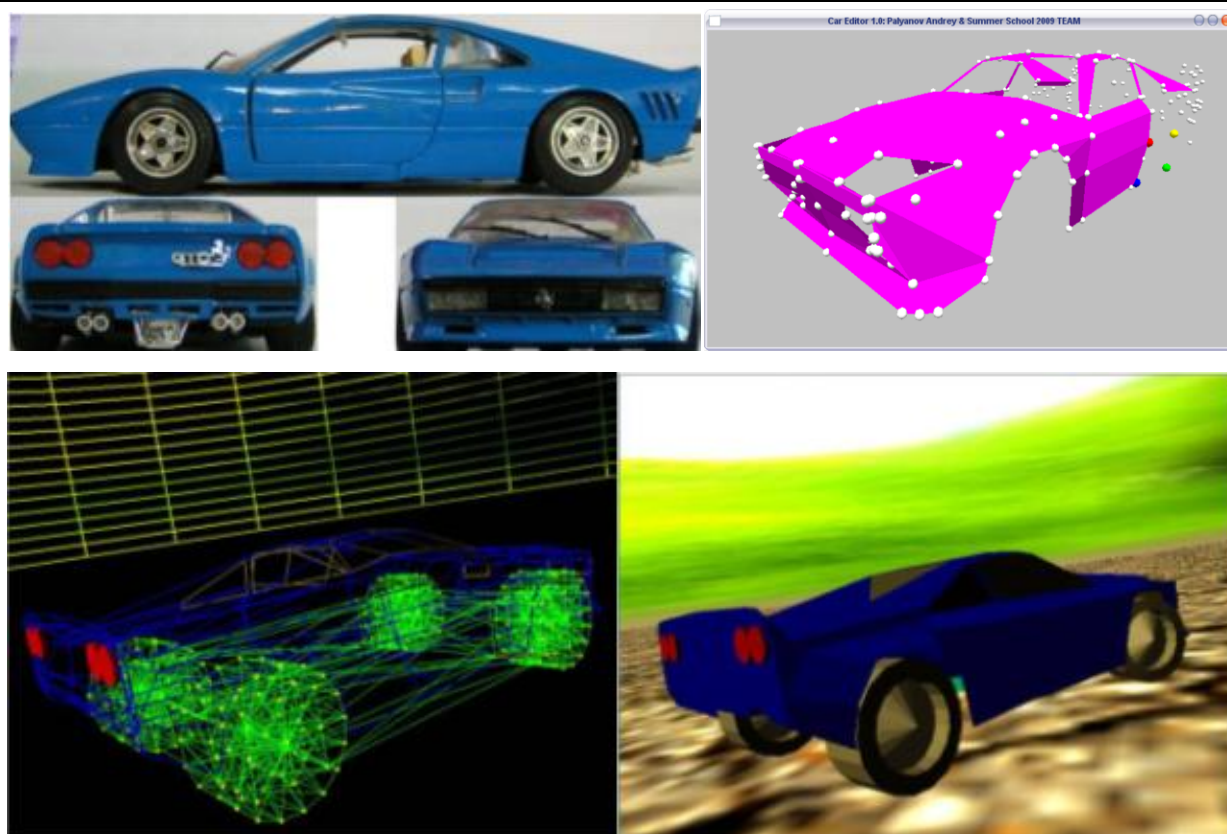


Рис. 3.8. Фотография прообраза модели - игрушечной машины (сверху слева), промежуточная стадия оцифровки формы корпуса (сверху справа), физическая модель (снизу слева), 3D-визуализация (снизу справа).

Глава 4. Sibernetic – симулятор нового поколения, ориентированный на задачи в области биомеханики беспозвоночных

Данная глава посвящена разработке программной системы нового поколения, названной Sibernetic, открывающей возможности решения широкого спектра задач моделирования в области гидродинамики, механики сплошных сред, биомеханики беспозвоночных и других биологических объектов [Пальянов, Хайрулин, 2014; Palyanov et al., 2016]. Главной особенностью системы является возможность моделирования динамики несжимаемой жидкости (методом PCISPH) с использованием высокопроизводительных параллельных вычислений на графических картах и многоядерных процессорах на базе технологии OpenCL. Также в данной главе представлены результаты использования Sibernetic применительно к задачам биологически реалистичного моделирования движения *C. elegans* в различных средах, главным образом плавания в жидкости и ползания по поверхности геля [Palyanov et al., 2018].

В течении последних лет наблюдается значительный рост интереса к исследованиям в области моделирования целых организмов, их органов и тканей. Были произведены симуляции сердечной мышцы [McQueen and Peskin, 2000; Killmann et al., 1991], ткани мозга [Miller et al., 2000] и печени [Peterlik et al., 2012; Peterlik et al., 2014]. Были разработаны методы для виртуальной хирургии [Delingette and Ayache, 2004; Zhang et al., 2009], в том числе включающие ток

крови через эластичные ткани [Hughes et al., 1998; Xiao et al., 2011], а также были разработаны программные платформы для симуляции искусственных автономных агентов, такие как AnimatLab [Cofer et al., 2010]. Благодаря этим достижениям были получены многие важные результаты и разработаны программные решения, исходные коды которых находятся в свободном доступе, однако многие направления в сфере программной реализации симуляции динамики биологических тканей в силу различных причин всё ещё остаются неохваченными. Одна из причин этого состоит в том, что механика биологических объектов отличается от механики инженерных устройств, в составе которых, как правило, нет таких объектов, как эластичные оболочки (кожа живых организмов или мембраны клеток) и внутренние резервуары, заполненные жидкостью или гелем (кровь, мозговая жидкость, цитоплазма и др.). Системы организма, ответственные за активное движение (мышцы) требуют для моделирования одновременно воспроизведения свойств эластичного материала и способности сокращаться под воздействием приходящего электрического сигнала. Также биологические объекты зачастую взаимодействуют с жидкостями и гелями, присутствующими во внешней среде, что требует учета взаимодействия между их границами. Таким образом, необходимо объединить в единой симуляции как минимум эластичные объекты, жидкость и мышечную ткань.

Методы моделирования динамики жидкости делятся в основном на Лагранжевы, когда сплошная среда представляется в виде множества материальных частиц (к которым относится и гидродинамика сглаженных частиц), и Эйлеровы, сеточные методы.

Среди семейства SPH-методов моделирования жидкости имеется базовый метод SPH [Gingold and Monaghan, 1977], не обеспечивающий несжимаемости, метод WCSPH (weakly compressible SPH, слабосжимаемая жидкость) [Becker and Teschner, 2007] и, наконец, метод PCISPH [Solenthaler et al., 2009], обеспечивающий несжимаемость в пределах заданной точности. Основные программные реализации симуляторов динамики жидкости представлены в Таблице 5:

Таблица 5. Характеристики программных реализаций симуляторов динамики жидкости

Название	стабильность	сетка или частицы?	несжимаемость жидкости	открытый программный код	параллельные вычисления	поддержка эластичных мембран	поддержка моделирования мышц
FLOW-3D ³⁰	+++	сетка	да	нет	да, MPI	да	нет
OpenFOAM ³¹	+++	сетка	да	да	да, MPI	нет	нет
FLUID v2, v3 ³²	++	частицы	нет	да	да, CUDA	нет	нет
Interactive SPH simulation ³³	+ прогр. код недоступен	частицы	нет	нет	да, CUDA	нет	нет
ISPH ³⁴	+ нет релиз-версии	частицы	да	да	да	нет	нет
AnimatLab ³⁵	+++	сетка ³⁶	нет	да	нет	нет	да
OpenTissue ³⁷	++	частицы	нет	да	нет	нет	нет
Bullet-Fluid ³⁸	+	частицы	нет	да	да, OpenCL	нет	нет
PhysBAM ³⁹	++	оба	да	да	да, MPI	да	да
Sibernetic ⁴⁰	+++	частицы	да	да	да, OpenCL	да	да

Особенностью PCISPH является использование схемы «предиктор-корректор» для вычисления давления в точках пространства, занятых частицами. Для этого информация о флуктуациях плотности активно распространяется в

³⁰ <http://www.flow3d.com>

³¹ <http://openfoam.com>

³² <http://www.rchoetzlein.com/fluids3/>

³³ [Goswami et al, 2010]

³⁴ <http://isph.sourceforge.net/>

³⁵ <http://animatlab.com/>

³⁶ Упрощенная модель. Поверхность жидкости всегда горизонтальная, плоская.

Моделируется плавучесть менее плотных объектов, вязкое трение.

³⁷ <http://image.diku.dk/kenny/download/opentissue/gallery.html>

³⁸ <http://bulletphysics.org/wordpress/>

³⁹ <http://physbam.stanford.edu/>

⁴⁰ <https://github.com/openworm/sibernetic>

жидкости и значения давления обновляются до тех пор, пока значения плотности во всей системе не станут удовлетворительными. Такой подход позволяет избежать вычислительных затрат на решение уравнения Пуассона и при этом использовать достаточно большие значения шага интегрирования в симуляции. Сравнение с методом WCSPH показывает превосходство PCISPH в производительности более чем в 10 раз, при том, что результаты расчетов находятся в хорошем согласии друг с другом [Solenthaler, 2010].

Свойство несжимаемости чрезвычайно важно для корректного моделирования динамики жидкости и практически столь же важна вычислительная производительность, поэтому выбор был сделан именно в пользу PCISPH, несмотря на его сложность и на то, что до его реализации в составе системы *Sibernetis* в мире не существовало открытого исходного кода данного алгоритма - ни в однопоточной версии, ни в параллельной реализации (была опубликована только статья, описывающая алгоритм). Реализация метода PCISPH в составе *Sibernetis* (на языке C++ с поддержкой высокопроизводительных параллельных вычислений на базе OpenCL) упомянута в статье «Гидродинамика сглаженных частиц» в Википедии в разделе «Использование в биологии». В ходе реализации выяснилось, что некоторые существенные детали алгоритма PCISPH описаны в работах Solenthaler недостаточно определенно, однако, в результате переписки с автором их удалось прояснить.

4.1. Моделирование динамики несжимаемой жидкости методом PCISPH

В данном разделе изложены теоретические основы вычислительного метода PCISPH (predictor-corrector incompressible smoothed particle hydrodynamics) [Solenthaler et al., 2009; Solenthaler, 2010], позволяющего осуществлять моделирование динамики несжимаемой жидкости методом гидродинамики сглаженных частиц (SPH) по схеме «предиктор-корректор». Он основан на лагранжевом подходе к описанию движущихся жидкостей, которые представляются набором частиц, переносящих материальные и динамические свойства среды. В основе любого метода, основанного на SPH, значение любой

физической величины A в точке r задается следующей формулой [Müller et al, 2003]:

$$A(r) = \sum_j m_j \frac{A_j}{\rho_j} W(|r - r_j|, h),$$

где m_j - масса частицы j , A_j - значение величины A для частицы j , ρ_j - плотность жидкости в области пространства с центром в частице j , h - радиус сглаживания и $W(r, h)$ - сглаживающая функция ядра с радиусом ядра h . Данная формула представляет собой взвешенную сумму вкладов от всех частиц, попавших внутрь сферы, определяемой радиусом сглаживания ядра.

При вычислениях, связанных с SPH-расчетами, возникает также необходимость расчета первой и второй производных различных величин. В SPH это достаточно просто, поскольку производная величины A вычисляется следующим образом:

$$\frac{\partial}{\partial r} A(r) = \frac{\partial}{\partial r} \sum_j m_j \frac{A_j}{\rho_j} \nabla W(|r - r_j|, h),$$

что эквивалентно следующей записи,

$$\frac{\partial}{\partial r} A(r) = \sum_j m_j \frac{A_j}{\rho_j} \frac{\partial}{\partial r} W(|r - r_j|, h),$$

поэтому

$$\nabla A(r) = \sum_j m_j \frac{A_j}{\rho_j} \nabla W(|r - r_j|, h),$$

и, аналогично,

$$\nabla^2 A(r) = \sum_j m_j \frac{A_j}{\rho_j} \nabla^2 W(|r - r_j|, h).$$

Движение несжимаемой жидкости описывается системой дифференциальных уравнений Навье-Стокса:

$$\rho \left(\frac{\partial}{\partial t} + v \cdot \nabla \right) v = -\nabla p + \mu \nabla \cdot (\nabla v) + f, \text{ (сохранение момента)}$$

$$\frac{\partial}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho v) = 0, \text{ (сохранение массы)}$$

где μ - коэффициент вязкости, f - сумма всех внешних сил, действующих на частицу, v – скорость частицы, p - давление. Использование частиц существенно упрощает оба эти уравнения. Во-первых, поскольку число частиц постоянно и масса каждой из них неизменна, то сохранение массы гарантировано и второе уравнение становится ненужным. Во-вторых, поскольку частицы движутся вместе с жидкостью, полная производная поля скоростей обращается в частную производную скорости по времени, т.е. для системы частиц конвективный член $v \cdot \nabla v$ равен нулю [Müller et al., 2003]. Для i -й частицы уравнение движения можно записать следующим образом:

$$m_i \frac{\partial v_i}{\partial t} = F_i^{pressure} + F_i^{external} + F_i^{viscosity}$$

Сила давления и сила вязкости рассчитываются по следующим формулам [Müller et al., 2003]:

$$F_i^{pressure} = -\frac{m_i p_i + p_j}{\rho_i} \frac{1}{2} \nabla W(r_{ij}, h),$$

$$F_i^{viscosity} = \frac{m_i}{\rho_i} \sum_j \frac{m_j \mu_i + \mu_j}{\rho_j} \frac{1}{2} (v_j - v_i) \nabla^2 W(r_{ij}, h).$$

В *Sibernetics* использованы общепринятые в SPH ядра сглаживания, обеспечивающие хорошую точность расчетов и стабильность поведения системы [Müller et al., 2003]:

$$W_{poly6}(r, h) = \begin{cases} \frac{315}{64\pi h^9} (h^2 - r^2)^3 & \text{при } 0 \leq r \leq h \\ 0 & \text{в остальных случаях} \end{cases},$$

$$W_{spiky}(r, h) = \begin{cases} \frac{15}{\pi h^6} (h - r)^3 & \text{при } 0 \leq r \leq h \\ 0 & \text{в остальных случаях} \end{cases},$$

$$W_{viscosity}(r, h) = \begin{cases} \frac{15}{2\pi h^3} \left(-\frac{r^3}{2h^3} + \frac{r^2}{h^2} + \frac{h}{2r} - 1 \right) & \text{при } 0 \leq r \leq h \\ 0 & \text{в остальных случаях} \end{cases}.$$

Ядро $W_{poly6}(r, h)$ используется во всех случаях, кроме двух, для которых нужны остальные два ядра: $W_{spiky}(r, h)$ - для расчета давления и $W_{viscosity}(r, h)$ для расчета сил вязкости.

Алгоритм PCISPH в самых общих чертах выглядит следующим образом:

```
1 while simulation do
2   for all  $i$  do
3     произвести поиск соседей  $N_i(t)$ 
4   end for
5   for all  $i$  do
6     рассчитать силы  $F^{v,g,ext,\dots}(t)$  // силы вязкости, гравитации и другие
7     инициализировать давление  $p(t) = 0$ 
8     инициализировать силу давления  $F_p(t) = (0,0,0)$ 
9   end for
10  while ( $\rho^*_{err}(t + 1) > \Delta\rho_{max}$ ) || (iter < minIterations) do
11    for all  $i$  do
12      «предсказать» скорость  $v_i(t + 1)$ 
13      «предсказать» координаты  $r_i(t + 1)$ 
14    end for
15    for all  $i$  do
16      «предсказать» плотность  $\rho_i(t + 1)$ 
17      «предсказать» отклонение плотности  $\rho^*_{err}(t + 1)$ 
18      обновить значение давления  $p_i(t) += f(\rho^*_{err}(t + 1))$ 
19    end for
20    for all  $i$  do
21      рассчитать силу давления  $F_p(t)$ 
22    end for
23  end while
24  for all  $i$  do
25    рассчитать скорость  $v_i(t + 1)$ 
26    рассчитать координаты  $r_i(t + 1)$ 
27  end for
28 end while
```

Особенностью метода является схема «предиктор-корректор», модифицирующая стандартный алгоритм SPH. На каждом последующем шаге по времени ($t + 1$) рассчитываются скорости и координаты всех частиц системы, а затем для новых позиций частиц рассчитываются (предсказываются) значения плотностей. Далее, для каждой частицы рассчитывается отклонение от исходной заданной плотности жидкости, которое используется для перерасчета (коррекции) сил давления. Этот процесс продолжается до тех пор, пока в системе не наступает сходимость, т.е. для каждой частицы отклонение от расчетной плотности

достигает значения, не превышающего наперед заданной величины (например, 1% от значения плотности жидкости). Наконец, вычисляются окончательные значения скоростей и координат для шага, соответствующего $(t + 1)$.

Расчет давления. Определенную сложность в методе PCISPH представляет расчет давления. Его предварительный расчет, а затем коррекция на каждой последующей итерации требует вычисления плотности (Solenthaler, 2010):

$$\begin{aligned}\rho_i(t + 1) &= m \sum_j W(r_i(t + 1) - r_j(t + 1)) \\ &= m \sum_j W(r_i(t) + \Delta r_i(t) - r_j(t) - \Delta r_j(t)) \\ &= m \sum_j W(d_{ij}(t) + \Delta d_{ij}(t)),\end{aligned}$$

где r_i и r_j – как и ранее, радиус-вектора i -й и j -й частиц, W – сглаживающая функция ядра; $d_{ij}(t) = r_i(t) - r_j(t)$, а $\Delta d_{ij}(t) = \Delta r_i(t) - \Delta r_j(t)$. Полагая Δd_{ij} относительно малым, в первом порядке приближения рядом Тейлора для $W(d_{ij}(t) + \Delta d_{ij}(t))$ получаем следующую запись:

$$\begin{aligned}\rho_i(t + 1) &= m \sum_j W(d_{ij}(t)) + m \cdot \nabla W(d_{ij}(t)) \cdot \Delta d_{ij}(t) \\ &= m \sum_j W(r_i(t) - r_j(t)) + m \cdot \nabla W(r_i(t) - r_j(t)) \cdot (\Delta r_i(t) - \Delta r_j(t)) \\ &= \rho_i(t) + \Delta \rho_i(t)\end{aligned}$$

В этом уравнении $\Delta \rho_i(t)$ является неизвестным и, как будет показано ниже, является функцией от давления p , которое мы вычисляем. Обозначив $W(r_i(t) - r_j(t))$ как W_{ij} , получаем:

$$\begin{aligned}\Delta \rho_i(t) &= m \sum_j \nabla W_{ij}(t) \cdot (\Delta r_i(t) - \Delta r_j(t)) \\ &= m \left(\sum_j \nabla W_{ij}(t) \cdot \Delta r_i(t) - \sum_j \nabla W_{ij}(t) \cdot \Delta r_j(t) \right)\end{aligned}$$

$$= m \left(\Delta r_i(t) \sum_j \nabla W_{ij}(t) - \sum_j \nabla W_{ij}(t) \cdot (\Delta r_j(t)) \right) \quad (1)$$

Δr может быть получено на основе схемы интегрирований (методом Leap-Frog). Пренебрегая всеми силами, кроме силы давления, получаем:

$$\Delta r_i = \Delta t^2 \frac{F_i^p}{m} \quad (2)$$

Если сделать упрощающее допущение, что соседние с i -й частицы имеют равные давления \tilde{p}_i и что плотность соответствует исходной плотности жидкости ρ_0 (в соответствии с условием несжимаемости), получаем в результате:

$$F_i^p = -m^2 \sum_j \left(\frac{\tilde{p}_i}{\rho_0^2} + \frac{\tilde{p}_j}{\rho_0^2} \right) \nabla W_{ij} = -m^2 \frac{2\tilde{p}_i}{\rho_0^2} \sum_j \nabla W_{ij} \quad (3)$$

Подставляя (3) в (2), получаем:

$$\Delta r_i = -\Delta t^2 m \frac{2\tilde{p}_i}{\rho_0^2} \sum_j \nabla W_{ij} \quad (4)$$

Из-за давления p_i со стороны i -й частицы позиция соседней частицы изменяется на величину $\Delta r_{j|i}$. Поскольку силы давления симметричны, j -я частица получает такое же воздействие со стороны i -й:

$$F_{i|j}^p = -m^2 \left(\frac{\tilde{p}_i}{\rho_0^2} + \frac{\tilde{p}_j}{\rho_0^2} \right) \nabla W_{ij} = -m^2 \frac{2\tilde{p}_i}{\rho_0^2} \nabla W_{ij}$$

а позиция j -й частицы изменяется на величину

$$\Delta r_{j|i} = \Delta t^2 m \frac{2\tilde{p}_i}{\rho_0^2} \nabla W_{ij}. \quad (5)$$

В данном случае было рассмотрено только влияние центральной частицы, i , т.е. $\Delta r_j = \Delta r_{j|i}$. Теперь, подставляя (4) и (5) в (1), получаем:

$$\Delta r_i(t) = m \left(-\Delta t^2 m \frac{2\tilde{p}_i}{\rho_0^2} \sum_j \nabla W_{ij} \cdot \sum_j \nabla W_{ij} - \sum_j \left(\nabla W_{ij} \cdot \Delta t^2 m \frac{2\tilde{p}_i}{\rho_0^2} \nabla W_{ij} \right) \right)$$

$$= \Delta t^2 m \frac{2\tilde{p}_i}{\rho_0^2} \left(- \sum_j \nabla W_{ij} \cdot \sum_j \nabla W_{ij} - \sum_j (\nabla W_{ij} \cdot \nabla W_{ij}) \right).$$

Решая относительно \tilde{p}_i , получаем:

$$\tilde{p}_i = - \frac{\Delta \rho_i(t)}{\beta (\sum_j \nabla W_{ij} \cdot \sum_j \nabla W_{ij} + \sum_j (\nabla W_{ij} \cdot \nabla W_{ij}))}, \quad (6)$$

$$\text{где } \beta = \Delta t^2 m \frac{2\tilde{p}_i}{\rho_0^2}.$$

Значение (6) состоит в том, что рассчитываемое давление \tilde{p}_i необходимо, чтобы достичь изменения в плотности, равного $\Delta \rho_i(t)$ [Solenthaler, 2010]. Поскольку предсказанная ошибка плотности для i -частицы $\rho_{err_i}^* = \rho_i^* - \rho_0$, мы можем её обратить, применяя к i -й частице давление

$$\tilde{p}_i = \frac{\rho_{err_i}^*}{\beta (\sum_j \nabla W_{ij} \cdot \sum_j \nabla W_{ij} + \sum_j (\nabla W_{ij} \cdot \nabla W_{ij}))}.$$

При использовании данной формулы возникают проблемы в ситуации, когда i -я частица имеет малое число соседей в пределах радиуса сглаживания и уравнения SPH дают ошибочные решения. Чтобы справиться с этим, необходимо предварительно рассчитать фактор масштаба δ в соответствии со следующей формулой для i -й частицы в полном окружении соседними частицами, плотность которых соответствует заданной, который затем используется при расчетах для всех частиц системы [Solenthaler, 2010], соответствующих жидкости с этой же плотностью:

$$\delta = \frac{1}{\beta (\sum_j \nabla W_{ij} \cdot \sum_j \nabla W_{ij} + \sum_j (\nabla W_{ij} \cdot \nabla W_{ij}))}.$$

В программной реализации *Sibernetic* так же используется этот подход. Помимо учета необходимых для расчета динамики несжимаемой жидкости сил давления и вязкости, в *Sibernetic* также учитываются силы поверхностного натяжения – с помощью метода, основанного на микроскопических свойствах молекул. Благодаря межмолекулярным силам на любую частицу жидкости оказывается влияние, описываемое данной формулой, предложенной в работе [Becker and Teschner, 2007]:

$$\frac{dv_i}{dt} = -\frac{k}{m_i} \cdot \sum_j m_j r_{ij} W_{poly6}(r_{ij}, h),$$

где v_i - скорость i -й частицы, k – коэффициент поверхностного натяжения, $r_{ij} = r_i - r_j$ – разность между радиус-векторами i -й и j -й частиц. В случае, если частица находится внутри объема жидкости, одинаковое воздействие со всех сторон приводит к нулевому суммарному результату, тогда как для частиц, находящихся на поверхности, будет возникать сила, направленная вглубь объема.

4.2. Алгоритм поиска соседей

В классической задаче N тел при расчете силы, действующей на объект, учитывается влияние всех тел в системе, т.е. сложность алгоритма равна $O(N^2)$. В алгоритмах моделирования динамики жидкости методом частиц их число может достигать миллиона и более. Реализация и работа алгоритмов при таких параметрах оказывается возможной благодаря предположению о том, что можно пренебречь незначительным влиянием достаточно далеких друг от друга частиц (в SPH – находящихся на расстоянии, превышающем определенную длину сглаживания h), что сводит сложность алгоритма к $O(M \cdot N)$, где $M \ll N$. При этом, однако, возникает необходимость эффективного поиска соседей, т.к. очевидный неэффективный способ, сводящийся для каждой рассматриваемой частицы к перебору всех остальных частиц и рассмотрению только ближайших к ней также потребует $O(N^2)$ операций вычисления расстояния между парами частиц и, соответственно, не даст заметного преимущества. Вскоре после постановки данной проблемы были предложены значительно более эффективные алгоритмы, базирующиеся на пространственном делении всей области на ячейки [Cohen et al., 1995; Teschner et al., 2003; Kipfer and Westerman, 2006; Keiser et al., 2006] и ряд других. Пространство области симуляции делится на равные кубические ячейки с ребром куба, равным $2h$, где h - радиус сглаживания.

Для расчета физических величин, вычисляемых с использованием ядер сглаживания, для каждой частицы i , очевидно, необходим список её соседей $j = 1 \dots N$, попадающих в сферу сглаживания с центром в r_i и радиусом h . Считается,

что оптимальный выбор h , обеспечивающий баланс между точностью и быстродействием, достигается при условии, что внутри сферы сглаживания для частицы, полностью окруженной жидкостью (находящейся в толще жидкости, не на границе) число соседей внутри сферы сглаживания составляет 32 ± 2 штук [Durier and Vecchia, 2012]. Для быстрого и эффективного поиска соседей каждой из моделируемых частиц на каждой итерации сопоставляется хэш-код, связанный с ортогональной трехмерной сеткой, разбивающей все пространство области симуляции на кубические ячейки. Хэш-код сконструирован таким образом, что после сортировки всего массива частиц по величине значения хэш-кода они оказываются упорядочены – частицы внутри каждого отдельного куба расположены в памяти компьютера последовательно.

$$\text{hash}(x, y, z, h) = \left(\frac{x}{h} + \frac{y}{h} \cdot X + \frac{z}{h} \cdot X \cdot Y \right),$$

где x , y и z – координаты частицы (принимаяющие значение от 0 до $X \cdot h$, 0 до $Y \cdot h$ и от 0 до $Z \cdot h$, соответственно), X , Y и Z – число ячеек вдоль координат x , y и z (задающих прямоугольный параллелепипед области симуляции), а h – радиус сглаживания ядра и одновременно шаг пространственной сетки.

Так же имеется дополнительный массив `gridCellIndex`, заполняемый за один проход по массиву частиц, в котором для каждого куба пространственной сетки указывается номер частицы, первой в списке частиц, находящихся в данном кубе в данный момент, или содержащий значение, равное -1 , если частиц в данном кубе нет. Это позволяет осуществлять быстрый доступ не только к частицам внутри рассматриваемого куба, но и внутри соседних с ним. Зачастую в реализациях SPH для поиска соседей некоторой произвольной частицы рассматривают куб, в котором она находится (в нём могут быть и другие частицы), а так же соседние 26 кубов, касающихся вышеупомянутого центрального куба гранями, ребрами или вершинами (т.е. всего 27 кубов), чтобы охватить всю область пространства, соответствующую любому возможному положению рассматриваемой частицы внутри центрального куба и сферы радиусом h , построенной вокруг неё. Однако, если разбить центральный куб на 8 кубов вдвое

меньшего размера и детализировать положение рассматриваемой частицы в центральном кубе до нахождения в одном из них, то достаточно будет рассмотреть в качестве потенциальных соседей только содержимое центрального куба и всего лишь 7 соседних кубов, граничащих с соответствующей 1/8 центрального куба (т.е. всего 8 кубов). Получается, что при таком подходе достаточно обработки всего 8 кубов вместо 27, что обеспечивает значительный выигрыш в производительности на этапе поиска соседей для каждой из частиц.

Хэширование и последующая сортировка обеспечивают высокое быстродействие в работе симуляции, однако при этом перемешиваются индексы частиц, и на каждой следующей итерации в произвольной ячейке памяти массива, хранящего структуры данных, описывающих частицы, будут храниться координаты уже другой частицы, чем на предшествующей итерации. При моделировании динамики частиц жидкости задача отслеживания траектории какой-то определенной или многих частиц возникает нечасто, однако при работе с частицами других типов, например, эластичного тела, которые связаны между собой пружинными соединениями, для расчета сил взаимодействия между ними необходимы знание их исходных индексов, посредством которых в начальной пространственной конфигурации частиц задаются пружинные соединения.

В *Sibernetis* данная проблема была решена следующим достаточно эффективным образом. Были введены два дополнительных массива, `particleIndex` и `particleIndexBack`, размер которых равен числу подвижных частиц в системе (есть еще неподвижные частицы, определяющие границы и статичные твердые объекты, для которых нет смысла производить эти расчеты). Массив `particleIndex` содержит исходные индексы частиц, которые подвергаются сортировке вместе с остальными полями данных, описывающих частицу. По нему можно определить исходный индекс частицы, обратившись к её структуре данных в сортированном массиве. Массив `particleIndexBack`, наоборот, позволяет определить по исходному индексу частицы её индекс в сортированном массиве. В Таблице 6 проиллюстрирована взаимосвязь между данными массивами.

Таблица 6. Иллюстрация состояний структур данных, связанных с частицами, до и после сортировки. `pI` = `particleIndex`, `pIB` = `particleIndexBack`. Левая половина таблицы – состояние системы до сортировки, правая половина таблицы – после. Каждая пара строк, слева и справа, имеющие один и тот же цвет, соответствуют одной и той же частице на разных стадиях выполнения программы. Для большего удобства и простоты индексы частиц совпадают с номерами строк и начинаются с 1. В программной реализации `Sibernetis` индексы массивов начинаются с 0.

индекс частицы	pI	x	y	z	hash		pI	x	y	z	hash	pIB
1	1	1	1	1	12		6	2	2	1	2	9
2	2	1	1	2	5		9	2	2	3	3	3
3	3	1	2	1	7		2	1	1	2	5	5
4	4	1	2	2	11		8	2	2	2	6	8
5	5	2	1	1	9		3	1	2	1	7	6
6	6	2	2	1	2		5	2	1	1	9	1
7	7	2	1	2	10		7	2	1	2	10	7
8	8	2	2	2	6		4	1	2	2	11	4
9	9	2	2	3	3		1	1	1	1	12	2
до сортировки							после сортировки					

Рассмотрим, для примера, частицу, которая исходно имела индекс в массиве частиц, равный 3 (в левой половине таблицы). После сортировки она оказывается на 5-й строке, а её индекс `particleIndex` по-прежнему содержит исходный индекс, 3 – тут всё просто. Однако, в ходе расчетов возникает необходимость и в обратной операции – по нужному исходному индексу определить индекс соответствующей частицы в сортированном массиве. Конечно, можно просмотреть весь массив в поисках частицы с нужным индексом – но это крайне неэффективно, и в случае осуществления данного действия для всех частиц получим сложность $O(N^2)$. Для эффективного решения этой задачи, на примере той же частицы, необходимо обратиться к строке с номером 3 в правой половине таблицы – в `particleIndexBack` содержится значение 5. Это и есть индекс

элемента отсортированного массива с исходным индексом `particleIndex`, равным 3. Благодаря этому получим сложность для всего массива частиц = $O(N)$.

Оба массива, `particleIndex` и `particleIndexBack`, заполняются за один проход по массиву частиц и требуют $O(N)$ операций. Это происходит в функции `sortPostPass()` в файле `sphFluid.cl` (файл с OpenCL-кодом). Такое устройство системы индексов позволяет при необходимости на любой стадии выполнения программы переключаться между отсортированным и несортированным массивом и, таким образом, корректно отслеживать индексы пар частиц, соединенных пружинами, и рассчитывать силы их взаимодействия.

4.3. Моделирование эластичных объектов одновременно с жидкостью

Для создания физических моделей биологических объектов, будь то бактерия, клетка или многоклеточный беспозвоночный организм, модель несжимаемой жидкости бывает часто необходима, но явно недостаточна. Как одноклеточные, так и оболочки многоклеточных организмов обладают водонепроницаемыми оболочками, а многоклеточные, помимо этого, обладают мышечной системой – т.е. системой особых клеток, способных сокращаться под действием управляющих нервных импульсов.

4.3.1. Базовый эластичный материал

Эластичный материал представляется в виде сложной упорядоченной системы частиц, связанных между собой эластичными неразрывными соединениями (пружинами) [Terzopoulos et al., 1988]. Каждая частица в такой системе обладает свойствами жидкости (на нее действуют все внутренние силы, характерные для частиц жидкости, такие, как вязкость, давление и проч.), но при этом на них дополнительно действует сила упругости (в соответствии с законом Гука):

$$F_i^{\text{elastic}} = -k \cdot \sum_j \frac{r_{ij}}{\|r_{ij}\|} (\|r_{ij}\| - r_{ij}^0),$$

где k – коэффициент упругости, i – индекс рассматриваемой частицы, индекс j пробегает по всем частицам, с которыми i -я частица имеет эластичное соединение, r_{ij} – вектор, соединяющий частицы i и j , $\|r_{ij}\|$ – расстояние между частицами i и j , r_{ij}^0 – равновесная длина пружины между парой частиц i - j . Коэффициент упругости может быть задан независимо для каждой пары частиц i и j , соединенных пружиной.

Механизм обработки взаимодействия движущихся объектов с неподвижными границами базируется на методе, описанном в работе (Ihmsen et al., 2010). Граница представляется в виде набора частиц, расположенных в узлах решетки с заданным шагом. Для каждой такой частицы используются те же характеристики, что и для обычных частиц, но, в отличие от них, граничные частицы неподвижны в течение всей симуляции и для каждой из них задан вектор нормали. При попадании i -й частицы в поле действия граничных частиц (это происходит в случае, если $\|r_i - r_b\| \leq r_0$, где $r_0 = h/2$) на нее начинают влиять силы отталкивания, пропорциональные расстояниям от частицы до границы:

$$v_i(t + \Delta t) = \varepsilon[v_i^*(t + \Delta t)]_t - \delta[v_i(t)]_n$$

$$r_i(t + \Delta t) = r_i^*(t + \Delta t) + \|(r_i^*(t + \Delta t) - r_b)\| \cdot n_b$$

где $[v_i(t)]_n = (v_i(t) \cdot n_b) \cdot n_b$ определяет компоненту скорости, нормальную к границе, а $[v_i^*(t + \Delta t)]_t = v_i^*(t + \Delta t) - [v_i^*(t + \Delta t)]_n$ – тангенциальную. ε и δ , лежащие в интервале от 0 до 1, контролируют трение и эластичность столкновения с границей. Величины со звездочкой "*" обозначают исходное значение (до учета столкновения). Индекс "b" обозначает граничную (boundary) частицу, "t" – тангенциальную и "n" – нормальную компоненты вектора.

Возможно, что при контакте с поверхностью частица i оказывается одновременно взаимодействующей с несколькими граничными частицами. В этом случае их вектора нормалей образуют усредненный вектор нормали, в который входят с различным «весом» в зависимости от расстояния между i -частицей и данной граничной частицей [Ihmsen et al., 2010]:

$$n_i^c = \sum_b w_{ib}^c n_b, \quad w_{ib}^c = \max\left(0, \frac{r_0 - \|r_{ib}^*\|}{r_0}\right)$$

где $\|r_{ib}^*\| = \|r_i^*(t + \Delta t) - r_b\|$. Затем координаты и скорость частицы i корректируются следующим образом:

$$r_i(t + \Delta t) = r_i^*(t + \Delta t) + \frac{1}{\sum_b w_{ib}^c} \sum_b w_{ib}^c \|r_0 - r_{ib}^*\| \cdot \frac{n_i^c}{\|n_i^c\|}$$

$$v_i(t + \Delta t) = \varepsilon[v_i^*(t + \Delta t)]_t$$

Данный подход позволяет корректно обрабатывать контакт с границей, а кроме того, обеспечивает возможность создавать границы различных форм.

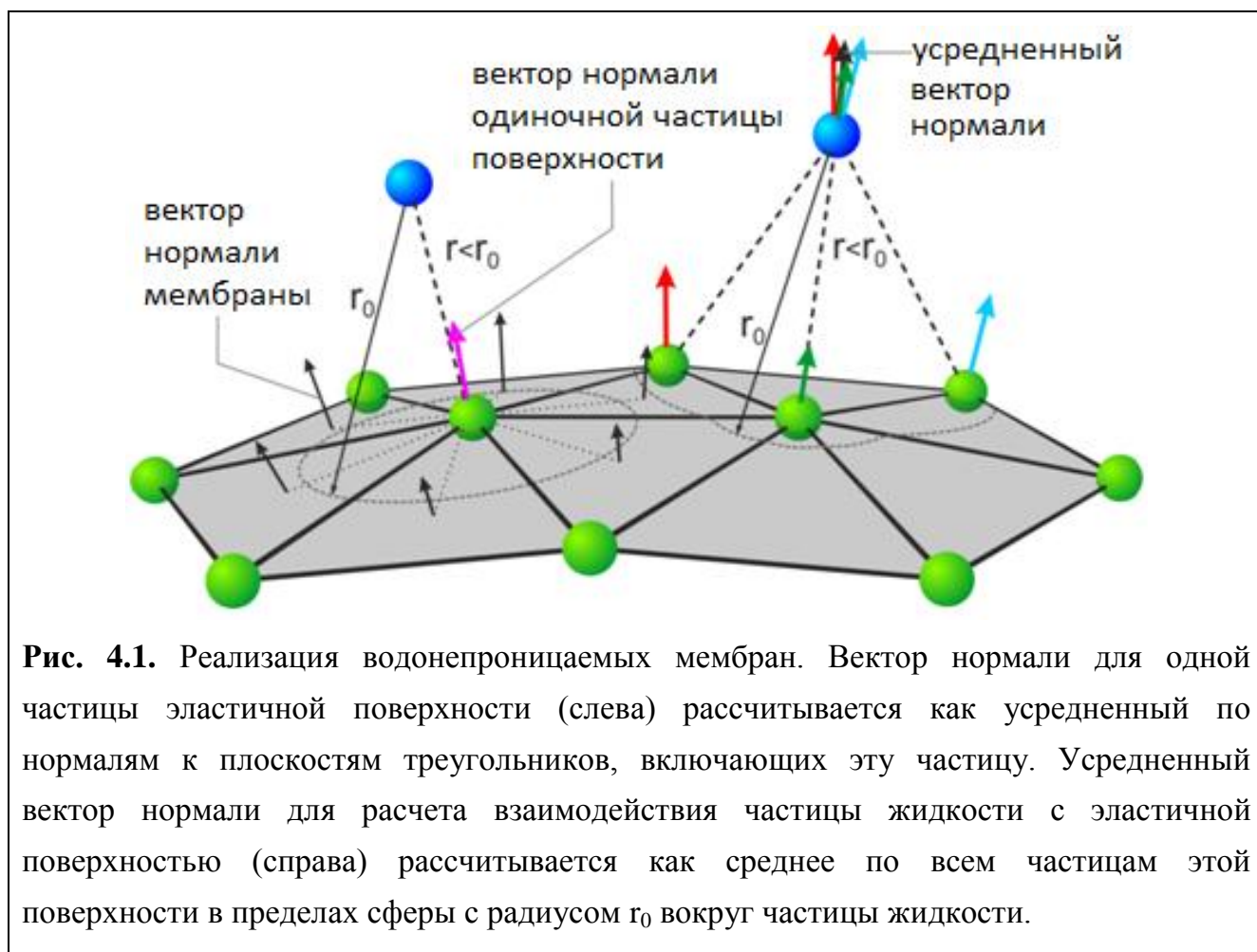
Однако, при моделировании тканей живых организмов неподвижных границ недостаточно. Многие биологические объекты обладают водонепроницаемыми оболочками, при моделировании которых посредством обычного эластичного тела наблюдается значительная утечка жидкости сквозь них. Это особенно актуально для оболочки тела *C. elegans*, форма которого поддерживается благодаря “гидростатическому скелету” – внутренней среде, находящейся под избыточным давлением [Harris et al., 1957].

4.3.2. Водонепроницаемые эластичные пленки.

Для обеспечения возможности моделирования эластичных водонепроницаемых пленок в *Sibernetica* была разработана модификация описанного выше метода, предложенного в работе [Ihmsen et al., 2010], в оригинале предназначенного для расчетов взаимодействия движущихся объектов с неподвижной границей, которая позволила также рассчитывать взаимодействия частиц с границами подвижных эластичных объектов. Для ее реализации был введен дополнительный класс физических примитивов, названных “мембранами”. Каждая мембрана представляет собой объект, составленный из трех соседних частиц эластичного тела (обычно находящихся на его поверхности), образующих треугольник. Окрестность поверхности треугольника, образованного тройкой частиц, отталкивает любую частицу жидкости, подошедшую достаточно близко с внешней или внутренней стороны. На каждом шаге симуляции при контакте частицы жидкости с окрестностью мембраны для

частицы вычисляется сила отталкивания, воздействие которой корректирует ее координаты и скорость.

На каждой итерации при контакте частицы жидкости i с частицей эластичного тела j (т.е. при $\|r_i - r_j\| \leq r_0$) определяется число элементарных мембран, в состав которых она входит (т.е. имеющих один из трех своих индексов равный j). Если это число больше нуля, то для каждой из этих элементарных мембран вычисляется сначала проекция частицы i на мембрану, затем – вектор нормали к плоскости мембраны, и, наконец, результирующий вектор нормали n_i^m , усредненный по всем мембранам. Далее скорость и позиция i -й частицы корректируются в соответствии с (1) и (2) с использованием n_i^m вместо n_i^c (см. Рис. 4.1). На Рис. 4.2. показана горизонтальная однослойная плёнка из водонепроницаемых мембран и, для сравнения, пленка из обычного эластичного материала.



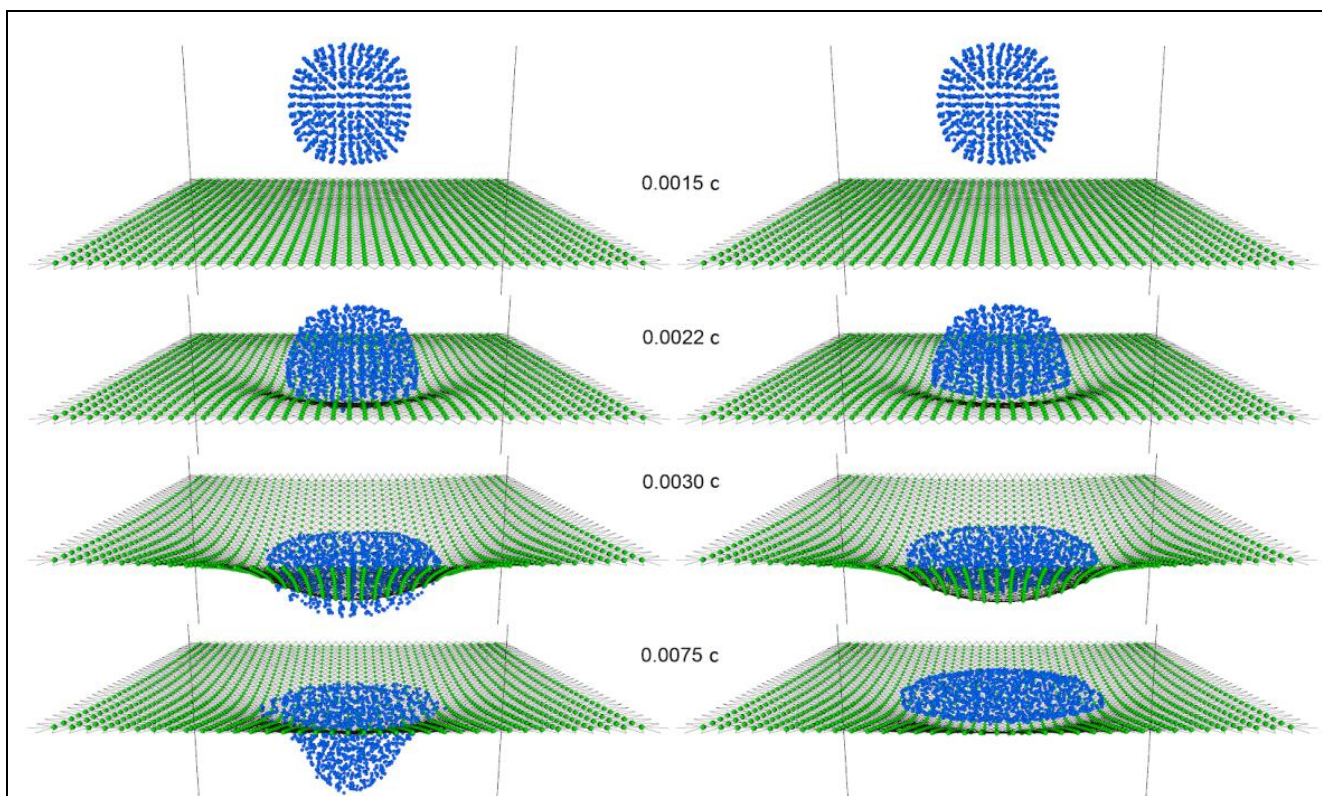


Рис. 4.2. Иллюстрация взаимодействия капли жидкости с горизонтальной эластичной плёнкой в случае, если она покрыта сетью водонепроницаемых мембран (справа) и при отсутствии такого покрытия (слева).

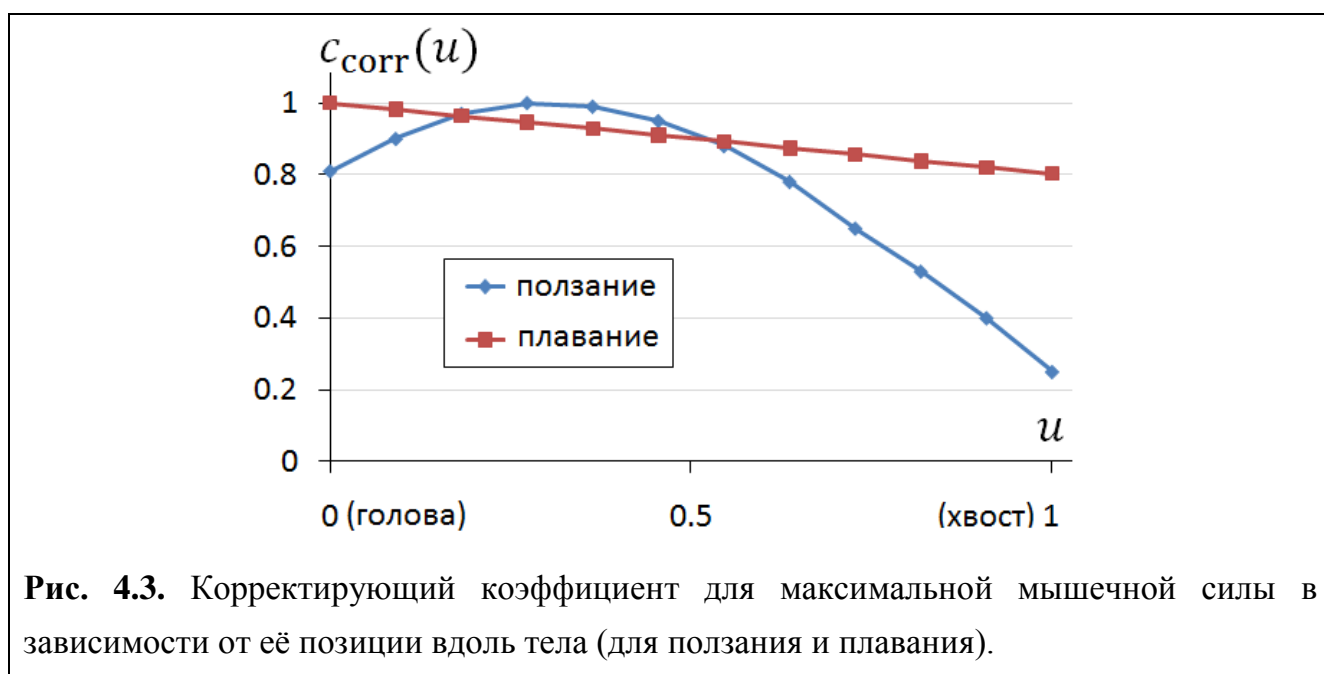
4.3.3. Моделирование мышечных клеток

Не менее важным компонентом многоклеточного живого организма и его модели являются мышечные клетки, для симуляции которых в *Sibernetis* был создан дополнительный тип «материи» - «мышечные волокна», способные сокращаться под действием приходящего внешнего сигнала в соответствии с его интенсивностью. Основой для конструирования мышечной клетки служит эластичное тело, представляющее собой систему частиц и пружинных связей между ними, в которой имеется выбранное направление, вдоль которого мышечная клетка будет сокращаться.

На каждую из пары частиц i и j , соединенных мышечным волокном, будет дополнительно воздействовать равная по величине сила, направленная в сторону второй частицы вдоль соединяющей их прямой:

$$F_{ij}^{\text{muscle}} = f_{\text{max}} \cdot c_{\text{corr}}(u(i, j)) \cdot \frac{r_{ij}}{\|r_{ij}\|} \cdot a_{ij}^{\text{muscle}},$$

где f_{\max} - максимальная сила, которую может производить одиночное мышечное волокно, c_{corr} – корректирующий коэффициент, зависящий от типа движения (плавание или ползание) и положения волокна относительно центральной продольной линии тела *C. elegans* - $u(i, j)$, измеряющегося от 0 (головной конец) до 1 (хвостовой конец), и a_{ij}^{muscle} - суммарный активирующий сигнал (диапазон значений – от 0 до 1), полученный данным мышечным волокном в рассматриваемый момент времени (от одного или нескольких нейронов и/или из других внешних источников). Зависимость корректирующего коэффициента для максимальной мышечной силы в зависимости от её позиции вдоль тела для основных типов движения – ползания и плавания – показана на Рис. 4.3.



При моделировании мышечной системы *C. elegans* необходимо ввести коэффициенты, корректирующие максимальную мышечную силу, которая возникает из-за того, что мышечные клетки, в зависимости от их расположения вдоль тела, имеют различную длину и ширину (как в реальном организме, так и в предлагаемой модели, обладающей довольно высоким пространственным разрешением).

Индексы каждой пары частиц, соединенных пружинной связью вдоль выделенного направления, которую необходимо обеспечивать способностью

сокращаться под воздействием приходящего от нейронов или из других источников активирующего сигнала, вносятся в специальный список, который затем используется при расчете сил, действующих в моделируемой системе. Помимо индексов пары частиц соответствующая структура данных содержит также номер мышцы, по которому к ней адресуется нейрон или иной источник сигнала. Как правило, в составе одной мышечной клетки все «мышечные волокна», т.е. сжимающиеся под действием сигнала пружины, имеют один и тот же номер и таким образом, при получении мышечной клеткой активирующего сигнала срабатывают одновременно.

Первая тестовая сцена для проверки функционирования мышечных клеток, представленная на Рис. 4.4, включала систему из 5 блоков, имеющих форму прямоугольных параллелепипедов, соединенных между собой и активируемых независимо командами с клавиатуры ПК (цифрами 1-5). Соответствующая видеозапись доступна здесь⁴¹.

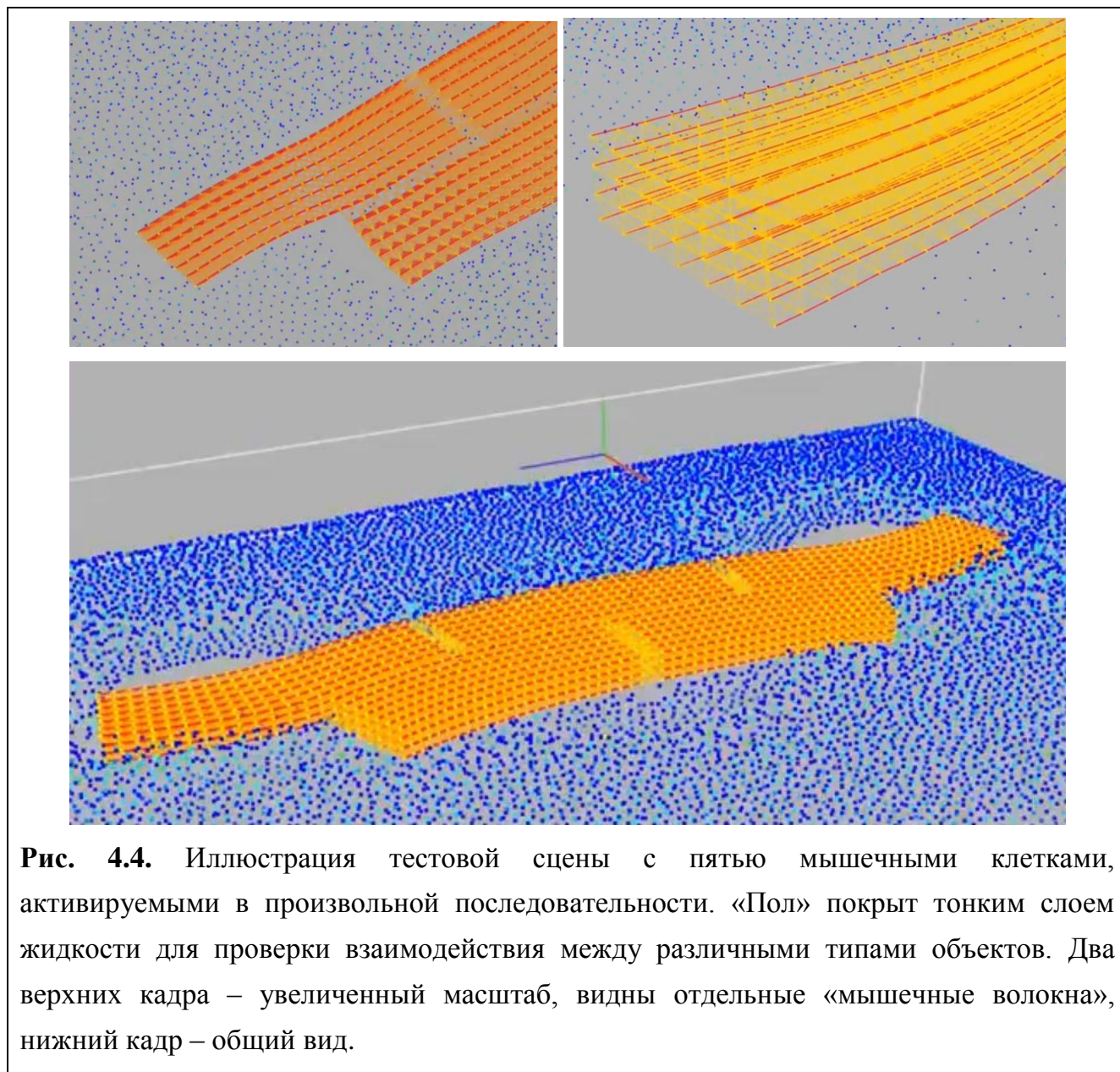
Стоит отметить, что у *C. elegans* имеются и другие типы мышечных клеток, которые сокращаются не целиком одновременно, а посредством волны возбуждения, распространяющейся от одной стороны клетки к другой. Такие клетки есть в глоточной мышечной системе – например, клетка pm5⁴² [Fang-Yen et al. 2009], обеспечивающая продвижение измельченной пищи в сторону пищевода.

При моделировании мышечных клеток определенного типа, принадлежащих тому или иному организму, представляется целесообразным воспроизвести геометрию клеток, их эластичные свойства, максимальную силу сокращения и т.д. Мышцы стенок тела *C. elegans*, которые управляют его формой и движением, имеют ромбовидную форму и, как и у других нематод, принадлежат к типу диагонально-полосатых [Bird and Bird, 1991]. Их ближайшим аналогом являются поперечно-полосатые скелетные мышцы позвоночных, приводимые в

⁴¹ <https://www.youtube.com/watch?v=DDNR1IoZKCs>

⁴² <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/pharynx/Images/phafig6leg.htm>

движение потенциалами действия, производимыми потенциал-зависимыми натриевыми ионными каналами.



В работе [Gao and Zhen, 2011] показано, что у *C. elegans* мышцы стенок тела также активируются посредством потенциалов действия, но не натриевых, а кальциевых, порождаемых потенциал-зависимыми кальциевыми каналами L-типа и потенциал-зависимыми калиевыми каналами типа Kv1. В этой же работе было показано, что активность активирующих и ингибирующих (подавляющих) нейронов регулирует частоту потенциалов действия, координируя сокращение и расслабление этих мышц, соответственно. Одним из результатов этого

исследования стало предоставление прямого свидетельства в пользу дуально-модуляторной модели мышечного контура *C. elegans*.

Помимо этого, был выявлен режим работы моторного контура, при котором мышечные клетки интегрируют приходящие от нервной системы градуальные сигналы и отвечают электрической активностью типа «все-или-ничего», т.е. потенциалом действия. Глоточные мышцы *C. elegans*, как оказалось, способны самопроизвольно генерировать потенциалы действия, подобные тем, что генерируются клетками сердечной мышцы; для их генерации необходимы ионы как Na^+ , так и Ca^{2+} [Franks, 2002]. В мышечных клетках стенок тела спонтанные пики активности различной амплитуды также наблюдались [Jospin et al., 2002; Jospin and Allard, 2004], в среднем на частоте 0.73 ± 0.14 Гц [Gao and Zhen, 2011], но инъекции тока в клетку вызывали в ответ лишь градуальные потенциалы [Jospin et al., 2002].

Поскольку нейромышечные системы взрослых организмов по большей части управляются потенциалами действия, «все-или-ничего», долгое время оставалось неясным, как именно у *C. elegans* происходит регуляция координированных движений. Ясность в этом вопросе принесла работа [Gao and Zhen, 2011], в которой были определены следующие факты:

- 1) Одиночный потенциал действия, сгенерированный мышечной клеткой, является достаточным для инициации процесса её сокращения;
- 2) Приходящие к мышечной клетке сигналы от активирующего мотонейрона (моторного нейрона) способны вызвать разряд потенциала действия и мышечное сокращение;
- 3) Активность ингибирующих мотонейронов блокирует разряд потенциалов действия и сопровождается мышечной релаксацией (расслаблением).

В совокупности эти факты напрямую свидетельствуют в пользу дуально-модуляторной модели управления движением. Если наблюдать под микроскопом за движением реальной нематоды, то заметить одиночный потенциал действия и следующее за ним сокращение мышечной клетки обычно не удастся – по-

видимому, вклад от активности одиночной клетки в течение малого промежутка времени на фоне тела всего организма оказывается незначительным. Если же нематода действительно решила осуществить изгиб тела в определенном месте и поддерживает соответствующие мышцы в активном состоянии посредством продолжительной последовательности потенциалов действия, следующих друг за другом с определенным интервалом времени, то отдельные сокращения-расслабления мышечных клеток также остаются незаметными. По-видимому, имеется некоторый интервал времени, в течение которого клетка остается сокращенной после пришедшего потенциала действия, и следующий потенциал действия приходит раньше, чем истекает этот интервал, т.е. мышечные клетки *C. elegans*, по сути, производят усреднение активирующего сигнала по времени, преобразуя последовательность коротких импульсов в постоянный сигнал. Данные наблюдения находятся в согласии с видеозаписью свободного движения *C. elegans*, при котором происходит визуализация концентрации ионов кальция в его мышечных клетках [Lefebvre et al., 2016]⁴³ - не наблюдается никаких быстрых пульсаций, только плавные изменения. Мышечные сокращения не происходят по принципу «всё или ничего» – большая сила сокращения производится при большей частоте потенциалов действия [Gao, Zhen, 2011].

В работе [Boyle, Berri and Cohen, 2012], упомянутой в Таблице 4 Главы 2, для двумерной модели тела нематоды, состоящего из системы жестких стержней и пружинных соединений, была использована модель мышечной клетки, кратко описанная ниже. Каждая мышечная клетка представлялась одним пружинным соединением между парой соседних участков тела, снабженная демпфером для гашения колебаний. Равновесная длина и «константа» затухания были заданы функциями, зависящими от уровня активации мышечной клетки. Такая реализация наделяла мышечные клетки свойствами, позволяющими упрощенно воспроизвести соотношения между скоростью-и-силой [Hill, 1938, Fig. 12] и длиной-и-силой [Hill, 1938, Fig. 16].

⁴³ <https://www.youtube.com/watch?v=x861P1ijpR8>

В *Sibernetic* реализация мышечных клеток в виде эластичных прямоугольных параллелепипедов с выделенным направлением сокращения, заданной ориентацией «мышечных волокон» позволила добиться похожих свойств без зависимостей равновесной длины и «константы» затухания от уровня активации мышечной клетки – в симуляции эти величины постоянны. В эластичном веществе в роли демпфера естественным образом выступает вязкое трение, поскольку частицы эластичного вещества, помимо пружинных связей друг с другом, унаследовали в нашей реализации и свойства жидкости, включая несжимаемость, так что, сокращаясь в одном направлении, мышца увеличивает свои размеры в оставшихся двух направлениях, как это и происходит в реальности. На Рис. 4.5 показана получившаяся при моделировании в *Sibernetic* зависимость скорости сокращения мышцы от нагрузки на неё, а на Рис. 4.6 – соотношение между приложенной силой и длиной мышцы, полученное при удерживании мышцы в состоянии заданной длины и измерении необходимой для этого силы. Слева – результаты [Boyle, Berri and Cohen, 2012], справа – результаты моделирования в *Sibernetic* [Palyanov et al., 2018].

Для создания модели мышечной клетки необходимо задать значение максимальной развиваемой ею силы. На этот счет для *C. elegans* имеются лишь экспериментальные данные, представленные в работе [Johari et al., 2013] – была измерена сила, развиваемая нематодой как целым объектом, а не одной мышечной клеткой, значение которой составило $\approx (8...18) \cdot 10^{-6}$ Н. Это дает некоторую оценку сверху, но насколько она превосходит силу, развиваемую одной мышечной клеткой – обосновать и рассчитать затруднительно. Поэтому автором была произведена оценка на основе информации о силе, развиваемой одиночным мышечным волокном, равной 0.2...0.8 пН на каждый интервал между двумя соседними «cross-bridges» (структурами для крепления мышечных волокон) в зависимости от типа волокна [VanBuren et al., 1995] и расчетом числа таких волокон в поперечном сечении мышечной клетки *C. elegans*, основанном на микрофотографии её поперечного среза [SlidableWorm, поперечный срез #273 в середине тела] (см. Рис. 4.7).

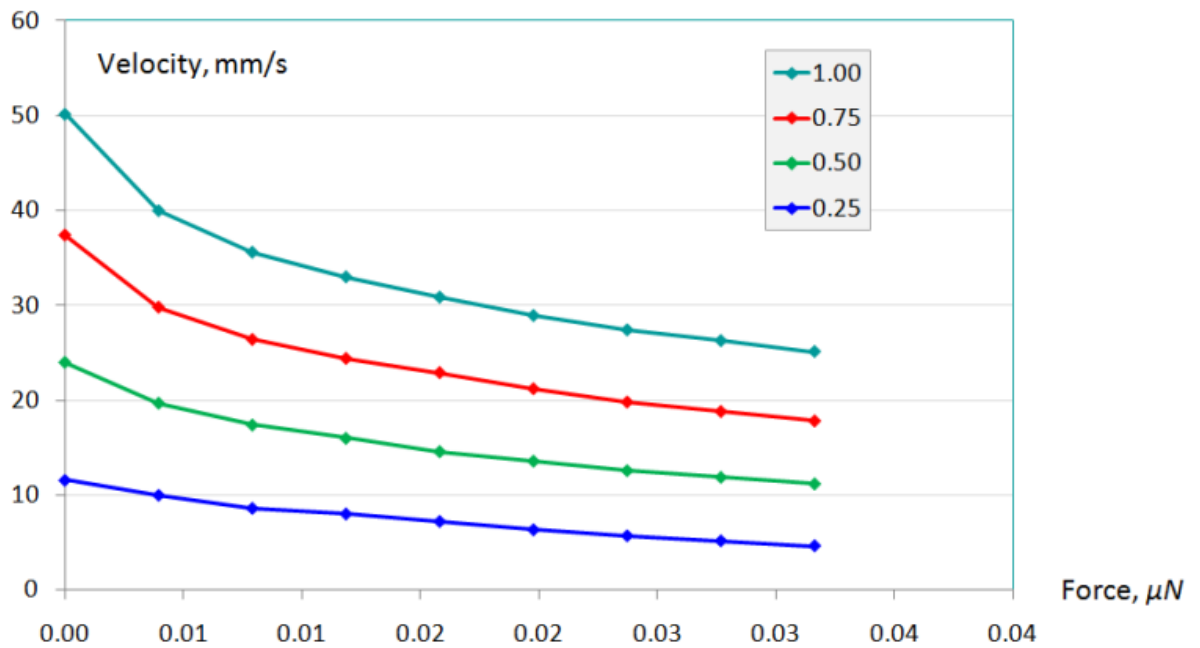


Рис. 4.5. Зависимости скорости сокращения мышцы от нагрузки на неё (при моделировании в Sibernetic) для различных значений максимальной развиваемой силы.

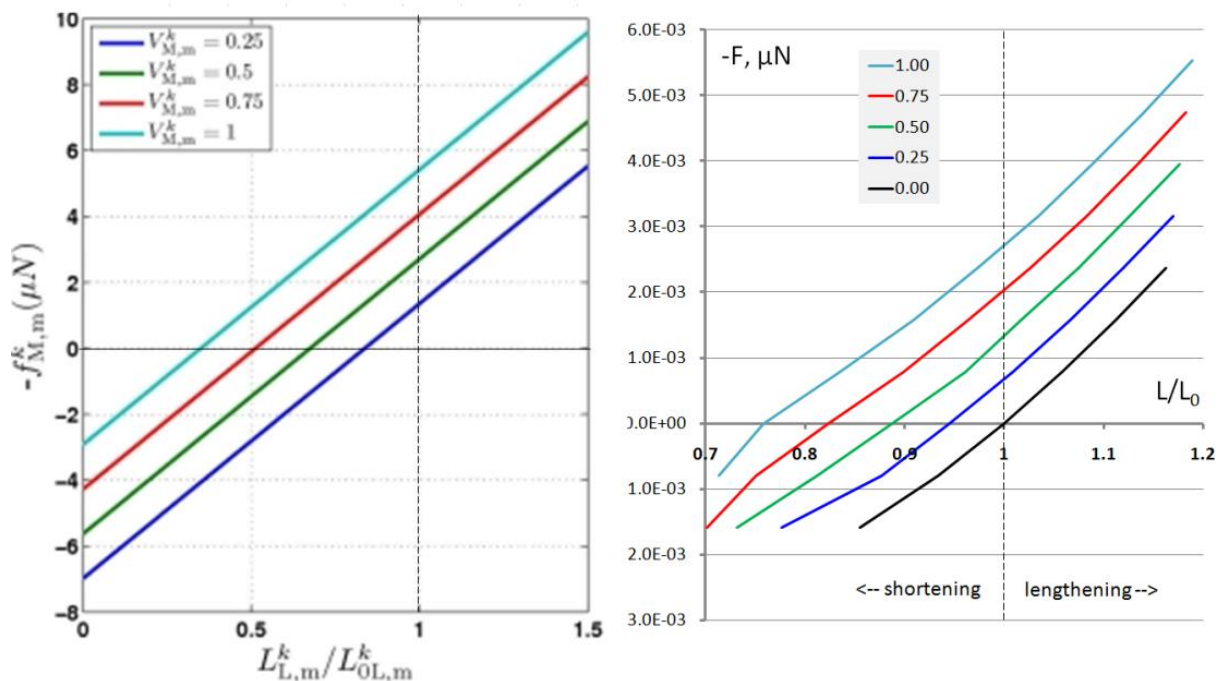


Рис. 4.6. Соотношения между приложенной силой и длиной мышцы, полученные при удерживании мышцы в состоянии заданной длины и измерении необходимой для этого силы (для различных значений максимальной развиваемой силы). Слева – результаты [Boyle et al., 2012], справа – результаты моделирования в Sibernetic [Palyanov et al., 2018].

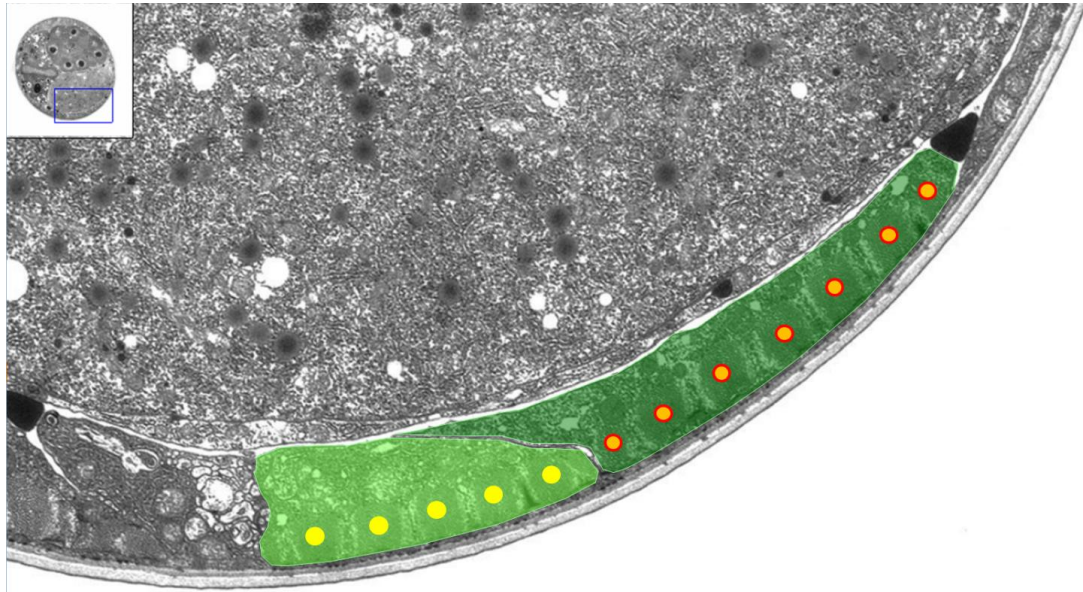


Рис. 4.7. Поперечный срез тела *C. elegans* (фрагмент). Источник: SlidableWorm, поперечный срез #273. Видна пара мышечных клеток в одном из четырех мышечных квадрантов. В одной, подсвеченной светло-зеленым цветом, имеется 5 мышечных структурных элементов (центры помечены желтыми кругами), называемых “A-band”, в другой – 7 (центры помечены оранжевыми кругами).

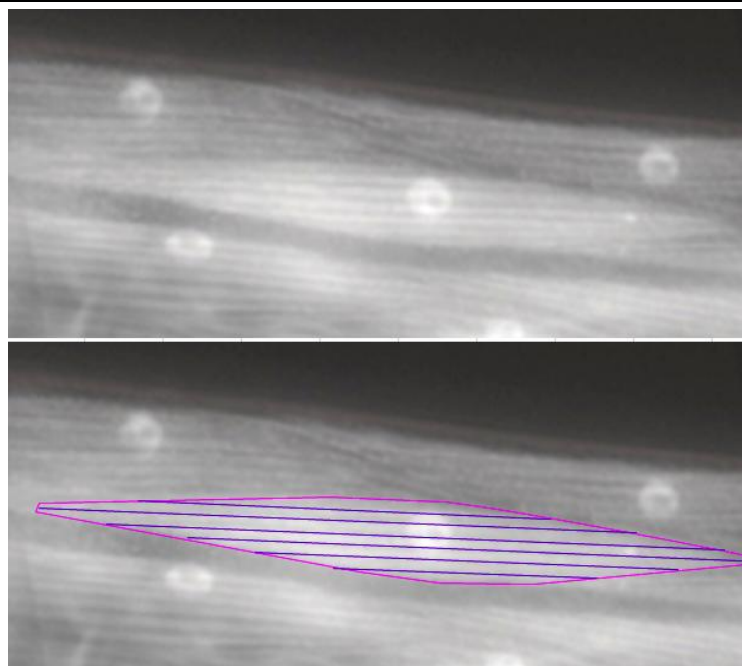


Рис. 4.8. Типичная мышечная клетка *C. elegans* (в центре) в окружении соседних мышечных клеток. Видны продольные структурные элементы и клеточные ядра. Источник: WormAtlas, фрагмент рисунка Fig7A,

<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/musclesomatic/Images/musfig7leg.htm>

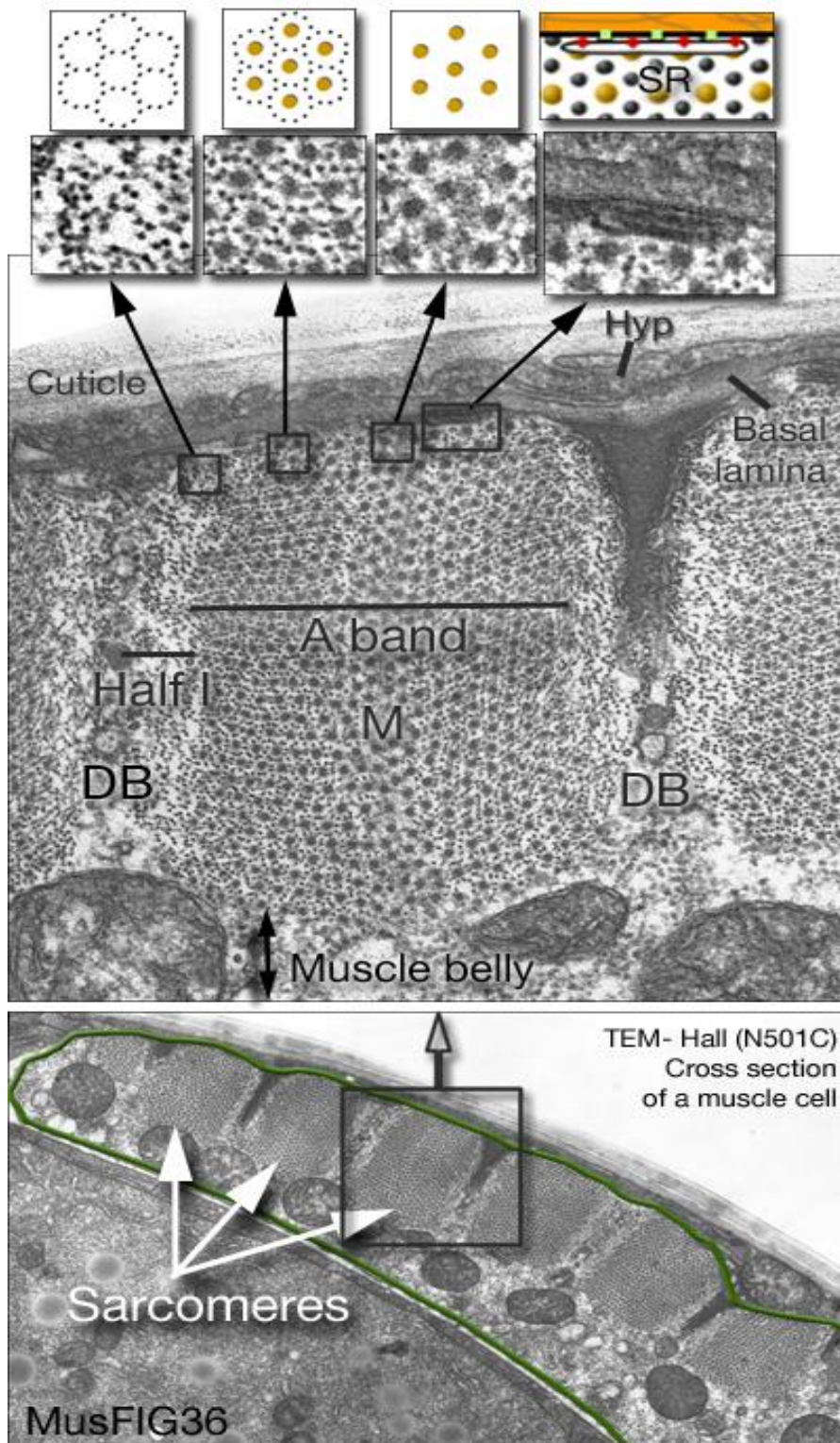


Рис. 4.9. Микроструктура поперечного среза мышечного структурного элемента «A-band», на основе которой был произведен расчет числа мышечных волокон в нём и во всей клетке. Источник: WormAtlas, MusFIG 10,

<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/musclesomatic/Images/musfig10leg.htm>

Как правило, мышечные клетки *тела C. elegans* имеют ромбообразную форму и только в самой широкой части имеют 7-8 структурных элементов “A-band” (см. Рис. 4.8). При этом длина мышечной клетки составляет около 80 μm , а интервал между двумя соседними «cross-bridges» - около 20 μm , т.е. на 1 клетку в самой длинной её части приходится около 4-х продольных структурных элементов, способных к сокращению, а в среднем – около 2-3.

Число волокон при расчете на основе Рис. 4.9 составило около 500 в одном структурном элементе «A-band», число таких элементов на клетку – 7-8, на каждое продольное сечение клетки приходится около 2-3 сократимых структурных элементов, каждое волокно в которых сокращается с максимальной силой равной 0.2...0.8 пН. Получается, что оценка силы сокращения мышечной клетки лежит в пределах $1.4...9.6 \cdot 10^{-3}$ μH . Значение максимальной силы сокращения мышечной клетки, подобранное в разработанной модели как обеспечивающее оптимальное соотношение между длиной тела и амплитудой синусоиды в режиме ползания (характерное для реальной нематоды) составило $2.7 \cdot 10^{-3}$ μH и, как видно, попадает в интервал ранее произведенной оценки данной величины.

4.4. Создание модели тела и мышечной системы *C. elegans*

Как известно из работ по экспериментальному изучению строения тела *C. elegans* [White et al., 1986; Petzold et al., 2011 и др.], оно покрыто достаточно прочной внешней оболочкой, к которой изнутри крепятся 95 мышечных клеток, управляющих движением тела, которые расположены в нем в виде 4-х мышечных тяжей, идущих вдоль тела от головного до хвостового отдела. Разработанная трехмерная модель тела включает эти объекты, как показано на Рис. 4.10 (C,D) и Рис. 4.11 А, иллюстрирующих продольную и поперечную структуру модели тела:

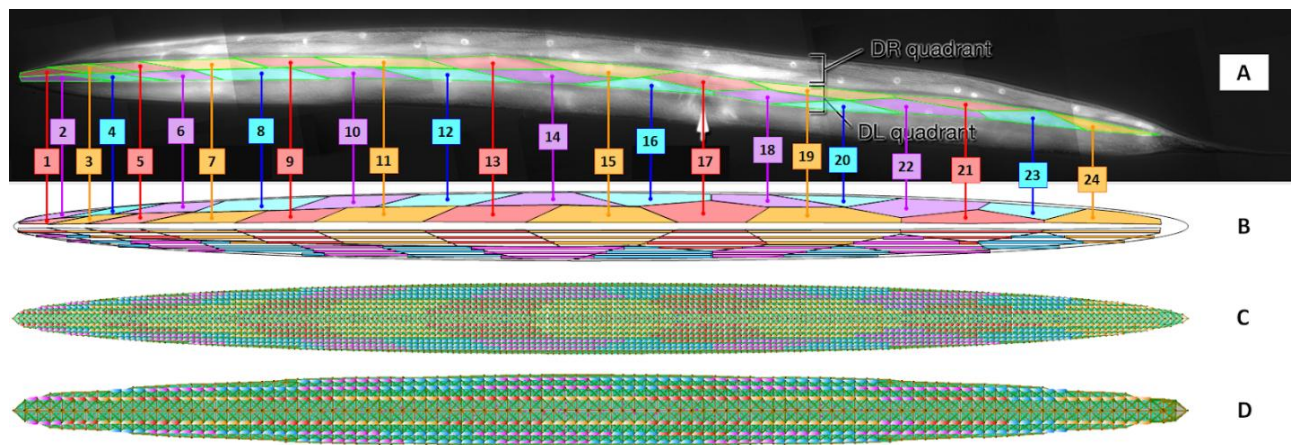
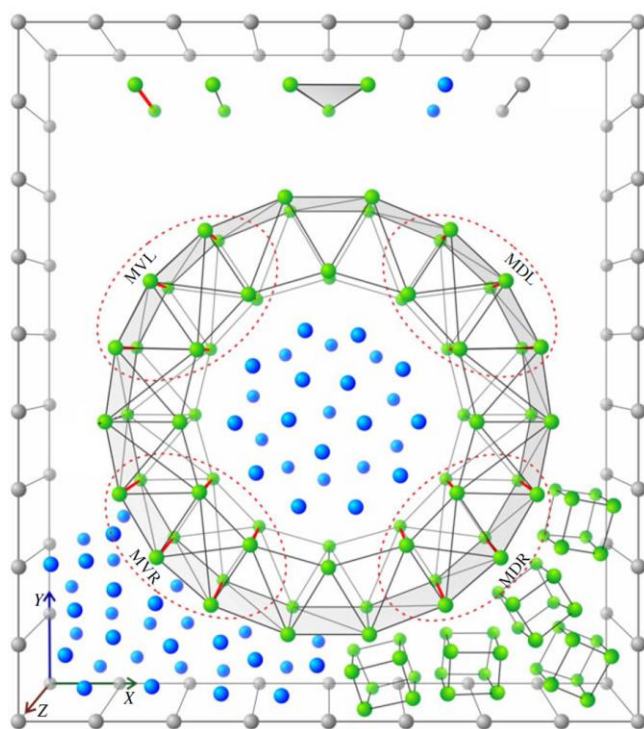


Рис. 4.10. (А) Микрофотография мышечных клеток *C. elegans*. Источник: WormAtlas, Fig7A, <http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/musclesomatic/Images/musfig7leg.htm>, (В) Геометрия мышечных клеток, перенесенная на основу для модели. (С) Расположение групп мышечных волокон, соответствующих мышечным клеткам, на поверхности тела модели *C. elegans* (нормальное разрешение) и (D) то же для вдвое более низкого разрешения.



В MVL – вентральная (брюшная) левая группа мышц,
 MVR – вентральная правая,
 MDL – дорсальная (спинная) левая,
 MDR – дорсальная правая

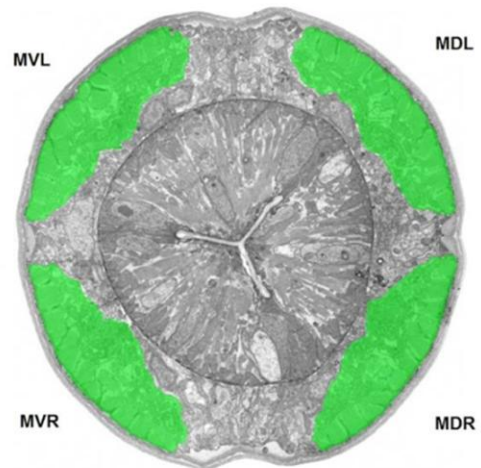


Рис. 4.11. (А) Структура поперечного сечения модели тела *C. elegans*, включающая 4 квадранта мышечных тяжей, расположенные перпендикулярно сечению. Красные линии показывают мышечные волокна, способные сокращаться по сигналу от моторных нейронов. Водонепроницаемые мембраны покрывают внешнюю поверхность тела. (В) Микрофотография поперечного сечения реального *C. elegans*, включая мышечные квадранты с указанием их названий (источник: WormAtlas, SlidableWorm, срез #54).

Модель тела включает внешнюю эластичную оболочку толщиной в два слоя частиц, внешняя поверхность которой покрыта водонепроницаемыми мембранами, описанными в разделе 4.2. Внутренняя полость тела содержит жидкость под давлением, благодаря которому поддерживается форма тела. Относительно эластичных свойств оболочки тела имеется достаточно много различных данных, но при этом они довольно противоречивы, что, по мнению авторов работы [Gilpin et al., 2015] свидетельствует о достаточно плохом уровне понимания механических свойств тела *C. elegans*. Относительно тонкой внешней оболочки тела, кутикулы, имеются данные о том, что её модуль Юнга равен 380 МПа [Park et al., 2007], 1.3 ± 0.3 МПа [Backholm et al., 2013] и 10–400 МПа, «сравнимо с резиной» [Zhen and Samuel, 2015]. Также имеется аргументированное мнение, что механические свойства *C. elegans* и вовсе не зависят от кутикулы [Gilpin et al., 2015]. В рамках этого представления также имеются как минимум два существенно отличающиеся значения модуля Юнга при рассмотрении тела *C. elegans* как однородного эластичного объекта: 140 ± 20 кПа, как для сжатия, так и для растяжения по данным [Gilpin et al., 2015] и 3.77 ± 0.62 кПа по данным [Backholm, 2015].

В модели тела *C. elegans*, созданной в рамках данной работы, значение модуля Юнга для эластичной оболочки тела составило около 41 Па. Значение было получено на основе измерения удлинения сегмента тела *C. elegans* под собственным весом при $10 \cdot g$, которое составило $\approx 7\%$ (см. Рис. 4.12), а также на основе информации о значении массы частиц, образующих один сегмент поперечного сечения и о площади этого сечения, соответствующей эластичному телу (в середине – цилиндрическая полость).

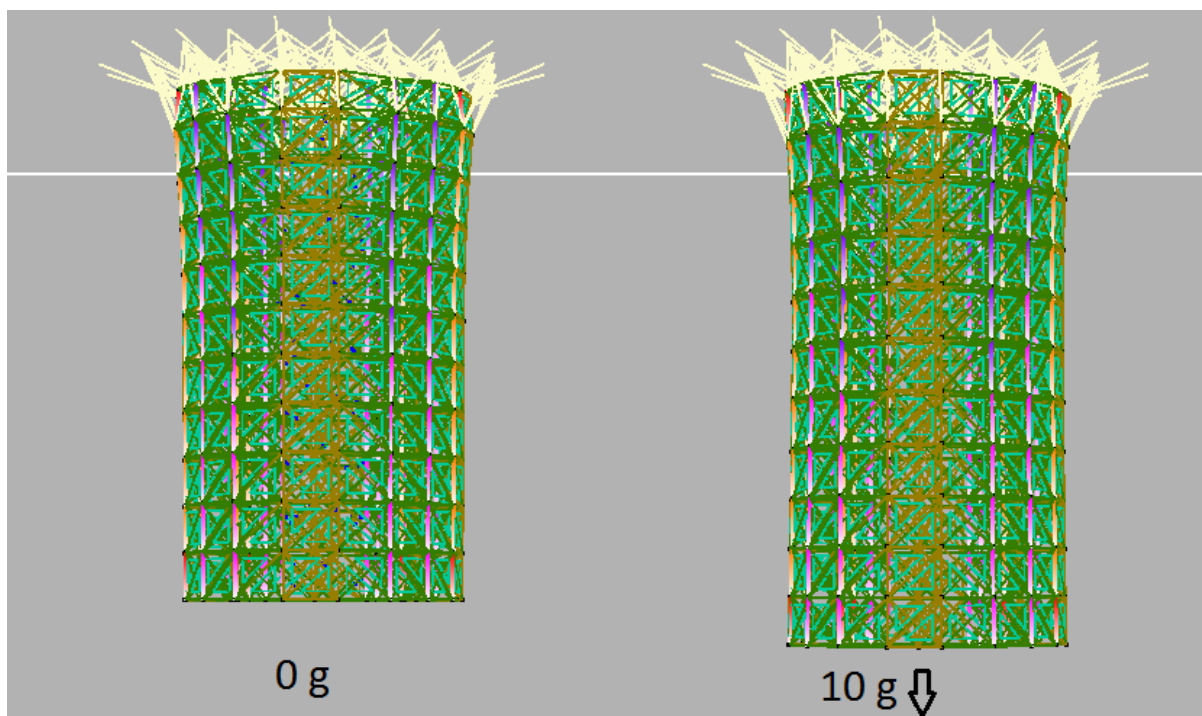


Рис. 4.12. Тестовая сцена для измерения модуля Юнга модели тела *C. elegans*.

Относительно величины избыточного давления внутри полости тела *C. elegans* экспериментальных данных не имеется, но такая информация есть для значительно более крупной паразитической нематоды *A. suum* – в ней давление оценивается как 2-30 кПа [Bird and Bird, 1991]. Оценка избыточного давления в модели тела, предложенной в рамках данной работы, основанная на величине растяжения эластичной оболочки тела в результате её наполнения жидкостью, составила около 0.01 Па. Возможно, столь значительная разница является следствием того, что ни в нашем симуляторе *Sibernetic*, ни в каком другом из предшествующих программных средств для моделирования биомеханики тела *C. elegans* не было учтено атмосферное давление (100 кПа) и, соответственно, не возникало необходимости компенсировать внешнее давление внутренним. В рамках парадигмы гидродинамики сглаженных частиц (SPH) можно было бы учесть атмосферное давление, представляя атмосферу как жидкость с плотностью, в 1000 раз меньше, чем у воды, однако это повлечет настолько значительное увеличение числа частиц в симуляции, что расчеты станут неоправданно долгими.

В дополнение к симулятору *Sibernetic* был разработан редактор объектов, в котором с помощью написания дополнительного программного кода можно генерировать различные трехмерные конфигурации, состоящие из перечисленных ранее типов частиц и связей между ними. Имеется готовый программный код для генерации тела *C. elegans*, мышечных клеток в нем, жидкости внутри и водонепроницаемой оболочки снаружи. В настоящее время имеются два варианта детализации (разрешения) модели – в одном, с «полным разрешением», тело состоит из 200 поперечных сечений, представленном на Рис. 4.10,C, в другом, с «половинным разрешением» - из 100 (Рис. 4.10,D). В полном разрешении модель тела состоит из 10143 эластичных частиц и 11436 частиц жидкости, в половинном – из 2290 эластичных и 388 частиц жидкости. Для моделирования объектов внешней среды, например, жидкости, в которой осуществляется плавание, дополнительно требуется минимум 500 тысяч частиц для полного разрешения и 80 тысяч для половинного. Для слоя агара – в несколько раз меньше.

4.5. Численные эксперименты по симуляции движения *C. elegans* в различных режимах и средах

В данном разделе представлены результаты расчетов, полученные в системе *Sibernetic* с использованием модели тела *C. elegans* [Palyanov et al., 2018], описанной в предыдущем разделе 4.4. Параметры, характеризующие плавание в жидкости и ползание по поверхности агара [Fang-Yen, 2010; Shen et al., 2012; Lüersen et al., 2014] существенно отличаются, плавно меняясь при переходе от жидкости с низкой вязкостью к все более вязкой и, в конце концов, к гелю (агару). Для настройки параметров модели и проверки её возможностей в *Sibernetic* были созданы соответствующие тестовые сцены.

Для моделирования процесса плавания модели в жидкости с низкой вязкостью и последующего анализа результатов необходимо знать значение вязкости, поскольку в реальности *C. elegans* подстраивает параметры движения – длину волны тела и частоту его осцилляций – в зависимости от вязкости среды, в

которой осуществляется движение. Тестирование движения тела, как в режиме плавания, так и в режиме ползания может осуществляться и без участия нервной системы. Для моделирования движения использовались искусственно сгенерированные периодические сигналы с соответствующими частотами и длинами волн ($f \approx 1.76$ Гц и $\lambda \approx 1.54$ для плавания и $f \approx 0.30$ Гц и $\lambda \approx 0.65$ для ползания). Активация мышечных клеток в модели тела периодическими сигналами (находящимися в противофазе для левой и правой половины тела) соответствующей частоты и подходящей амплитуды вызывает визуально реалистичные движения тела.

При моделировании движения в режиме плавания частота, длина волны и поступательная скорость зависят от вязкости жидкости, поэтому необходимо знать её значение для жидкости, используемой в симуляции. Однако, определить на основе подобных наблюдений вязкость жидкости с хоть сколько-нибудь приемлемой точностью не представляется возможным. Конечно, в модели жидкости имеется коэффициент вязкости, однако её реальное значение он не отражает и является относительным, т.е. служит скорее для возможности её уменьшения или увеличения при необходимости. Также фактическая вязкость моделируемой жидкости может измениться даже при изменении разрешения модели – при представлении одного и того же объема и массы жидкости вдвое более мелкими или крупными частицами.

4.5.1. Определение фактической вязкости моделируемой жидкости

Анализ литературы по вопросу вычисления вязкости жидкости при её моделировании методами гидродинамики сглаженных частиц (SPH, PCISPH или другими из данного класса методов) не дал результатов – задача упоминается как актуальная, но решения не представлено. Поскольку готового решения по определению вязкости для SPH моделей жидкости обнаружить не удалось, был предложен и использован подход, который практически «лежит на поверхности» и не требует значительных усилий для реализации при наличии готового симулятора динамики жидкости. Согласно закону Стокса, шар, падающий в

вязкой жидкости под действием собственного веса, вскоре приобретает постоянную скорость, которая достигается благодаря тому, что сила вязкого трения совместно с силой Архимеда полностью компенсируется силой притяжения, а величина этой установившейся скорости задается следующей формулой:

$$v = \frac{2}{9} \cdot \frac{(\rho_{\text{ш}} - \rho_{\text{ж}})}{\mu} \cdot g \cdot R^2,$$

где $\rho_{\text{ш}}$ - плотность шара, $\rho_{\text{ж}}$ - плотность жидкости, μ - динамическая вязкость жидкости [Па·с], g - ускорение свободного падения и R - радиус шара. Вычислив посредством проведения численного эксперимента установившуюся скорость падения шара, получим динамическую вязкость жидкости.

Для измерения скорости была использована следующая тестовая сцена, представленная на Рис. 4.13. Шар падает вертикально вниз в глубоком стакане, начиная движение на небольшом расстоянии над поверхностью жидкости, затем погружается в неё и начинает тонуть.

Для предварительных расчетов был взят шар радиусом $R = 0.05$ мм (того же порядка величины, что и диаметр тела *C. elegans*), имеющий плотность $\rho_{\text{ш}} = 2000$ кг/м³; плотность жидкости $\rho_{\text{ж}} = 1000$ кг/м³, $g = 9.8$ м/с², шаг интегрирования по времени $dt = 1.25 \cdot 10^{-6}$ с. Траектория движения во время свободного падения до столкновения с жидкостью является параболической, затем следует столкновение и соответствующий переходный процесс, который вскоре действительно переходит в движение с постоянной скоростью (см. Рис. 4.14).

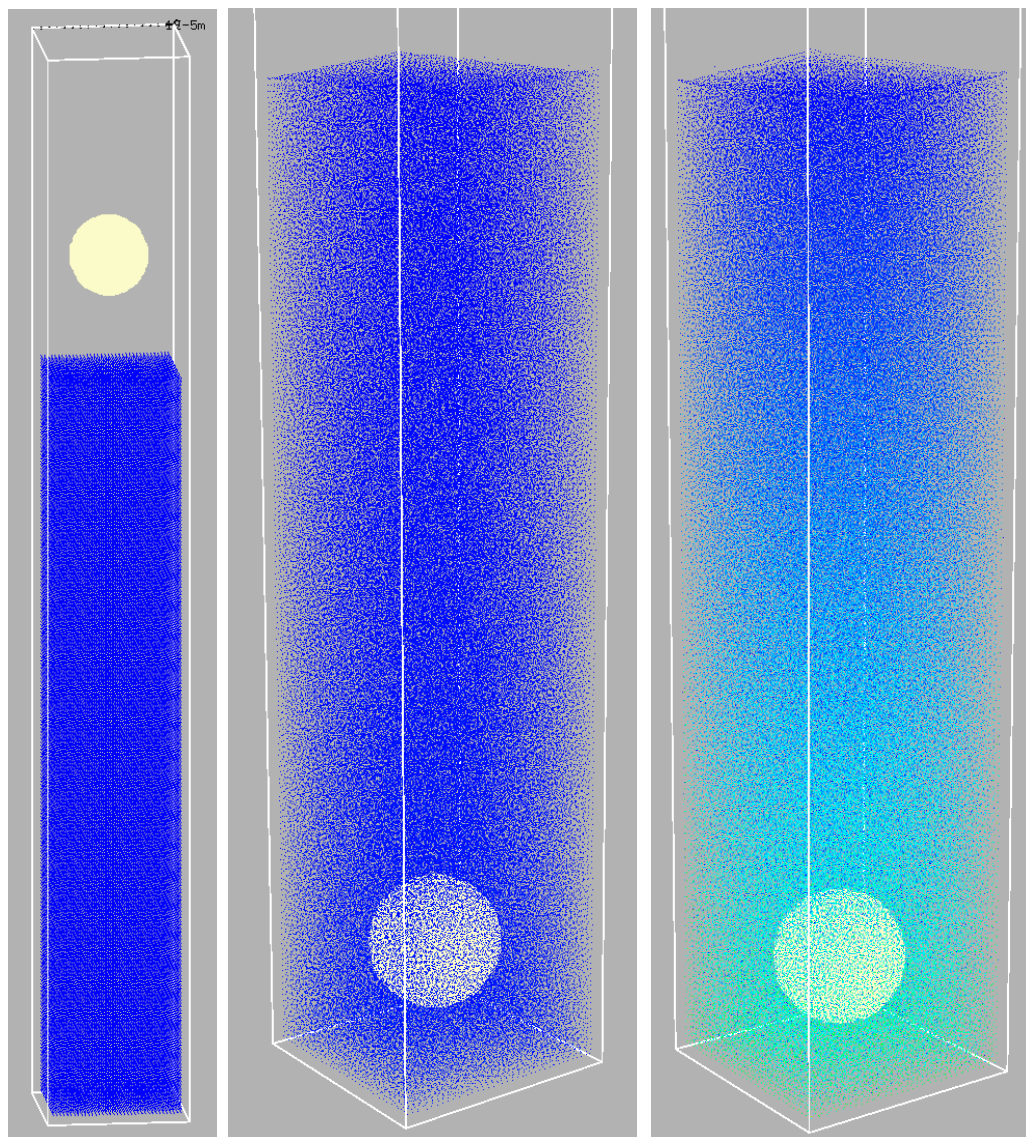


Рис. 4.13. Тестовая сцена для вычисления вязкости жидкости на основе закона Стокса. Слева – общий вид, по центру – результат симуляции при $dt = 1.25 \cdot 10^{-6}$ с, справа – при $dt = 5.0 \cdot 10^{-6}$ с. В последнем случае виден градиент плотности жидкости в интервале от заданного значения 1000 кг/м^3 до $1000 \text{ кг/м}^3 + 1 \dots 2\%$, что является индикатором того, что при данном dt алгоритм уже не может обеспечивать полную несжимаемость жидкости, особенно на большой глубине.

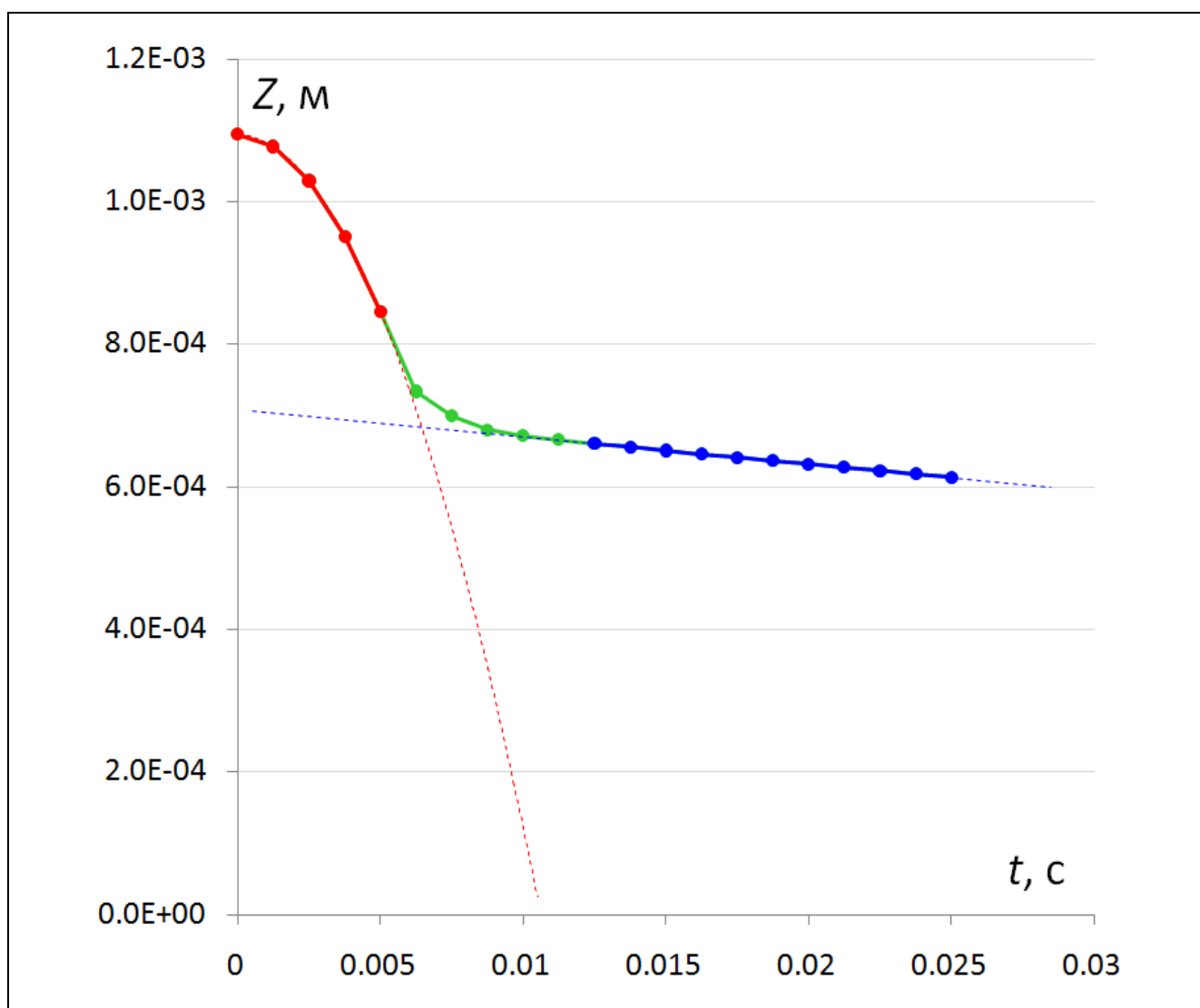


Рис. 4.14. Траектория движения центра масс шара, падающего в жидкости, включая начальный участок свободного падения до контакта с поверхностью жидкости (красная кривая), переходный процесс (зеленая кривая) и падение в жидкости с установившейся скоростью (синяя кривая).

Наклон прямой, аппроксимирующей участок зависимости $Z(t)$ в области движения с установившейся скоростью падения в жидкости определяет эту самую скорость. Измеренная установившаяся скорость падения шара составила $v = 3.8$ мм/с, а вычисленная на её основе динамическая вязкость μ составила ≈ 1.4 мПа·с (для сравнения – динамическая вязкость воды при $20\text{ }^\circ\text{C}$ равна 1 мПа·с). При этом значение числа Рейнольдса $Re = \rho \cdot v \cdot L / \mu$ составило 0.27 , что соответствует ламинарному течению, поскольку для подобных систем оно считается таковым при $Re \leq 2$ [Комарова, Кормина, 2000, с. 34]. При расчетах использовались следующие значения: плотность жидкости $\rho = 1000$ кг/м³, скорость движения

шара $v = 0.015$ м/с, характерный размер $L = 0.1$ мм (диаметр шара), динамическая вязкость $\mu = 1.4$ мПа·с.

Если следовать вышеупомянутому критерию ламинарного процесса, оказалось, что граничное значение достигается для шара радиусом $R = 0.12$ мм, при неизменных прочих параметрах – плотность $\rho_{ш} = 2000$ кг/м², плотность жидкости $\rho_{ж} = 1000$ кг/м², $g = 9.8$ м/с², шаг интегрирования по времени $dt = 1.25 \cdot 10^{-6}$ с. Измеренная установившаяся скорость падения шара составила 17 мм/с, а вычисленная на её основе динамическая вязкость μ составила ≈ 1.74 мПа·с, а значение числа Рейнольдса – 2.48. При использовании более массивных частиц, имеющих при этом больший радиус и расстояние между соседями (чтобы сохранить плотность жидкости прежней), возможно использование значений шага интегрирования по времени вплоть до $dt = 2.0 \cdot 10^{-5}$ с.

В интервале значений вязкости, при которых обычно рассматривают движение *C. elegans* (1-28000 мПа·с), полученная величина значения динамической вязкости, $\mu = 1.4$ мПа·с, очень близка к его началу. Плаванию в жидкости с такой вязкостью соответствует длина волны синусоиды, аппроксимирующей форму тела (нормализованная, отнесенная к длине тела), равная 1.5...1.7 и частота изменения фазы этой синусоиды $\approx 1.75...1.79$ Гц. Есть и третья величина, которая связана с этими двумя и является одним из критериев корректности симуляции, а именно - результирующая скорость поступательного движения тела в процессе плавания с определенной частотой и длиной волны в жидкости с определенной вязкостью. При этом скорость движения хвостового конца, движущегося с наибольшей амплитудой, составляет около 1.2 мм/с (за 0.25 с хвостовой конец проходит расстояние около 0.3 мм). Значение числа Рейнольдса в этом случае составляет 0.038, что также соответствует ламинарному течению (плотность жидкости $\rho = 1000$ кг/м³, скорость движения хвостового конца $u = 0.0012$ м/с, характерный размер $L = 6 \cdot 10^{-5}$ м (диаметр тела), динамическая вязкость $\mu = 1.4$ мПа·с). Характерный размер тела нематоды не меняется, а противоположный конец интервала вязкости, при котором происходит

плавание, соответствует еще меньшим числам Рейнольдса, так что процесс плавания *C. elegans* можно считать ламинарным для всех возможных ситуаций.

4.5.2. Моделирование плавания в жидкостях с низкой вязкостью

Для моделирования плавания в жидкости тело нематоды помещалось в резервуар с плоским дном, заполненный жидкостью, высота уровня которой составляла 100...200 μm (напомним, что диаметр тела *C. elegans* в самой широкой, центральной части составляет 50...80 μm). В начальный момент тело помещалось над уровнем жидкости, а затем под действием силы тяжести погружалось в неё. Интересно, что оно не оставалось у поверхности воды и не погружалось на дно, а сохраняло в процессе плавания постоянную глубину погружения (плотность жидкости и плотность тела нематоды практически равны) (см. Рис. 4.15). По-видимому, причина состоит в том, что в процессе движения ни одна из частей тела не остается неподвижной относительно окружающей жидкости, перемещаясь относительно неё, поэтому и для жидкости, непосредственно контактирующей с телом необходимо пространство для движения. Если же нематода поднимется к поверхности или опустится на дно, один из путей обтекания тела жидкостью (нижний или верхний, соответственно) закроется и ей придется приводить в движение существенно больший эффективный объем жидкости, что энергетически менее выгодно, чем плавание в толще жидкости.

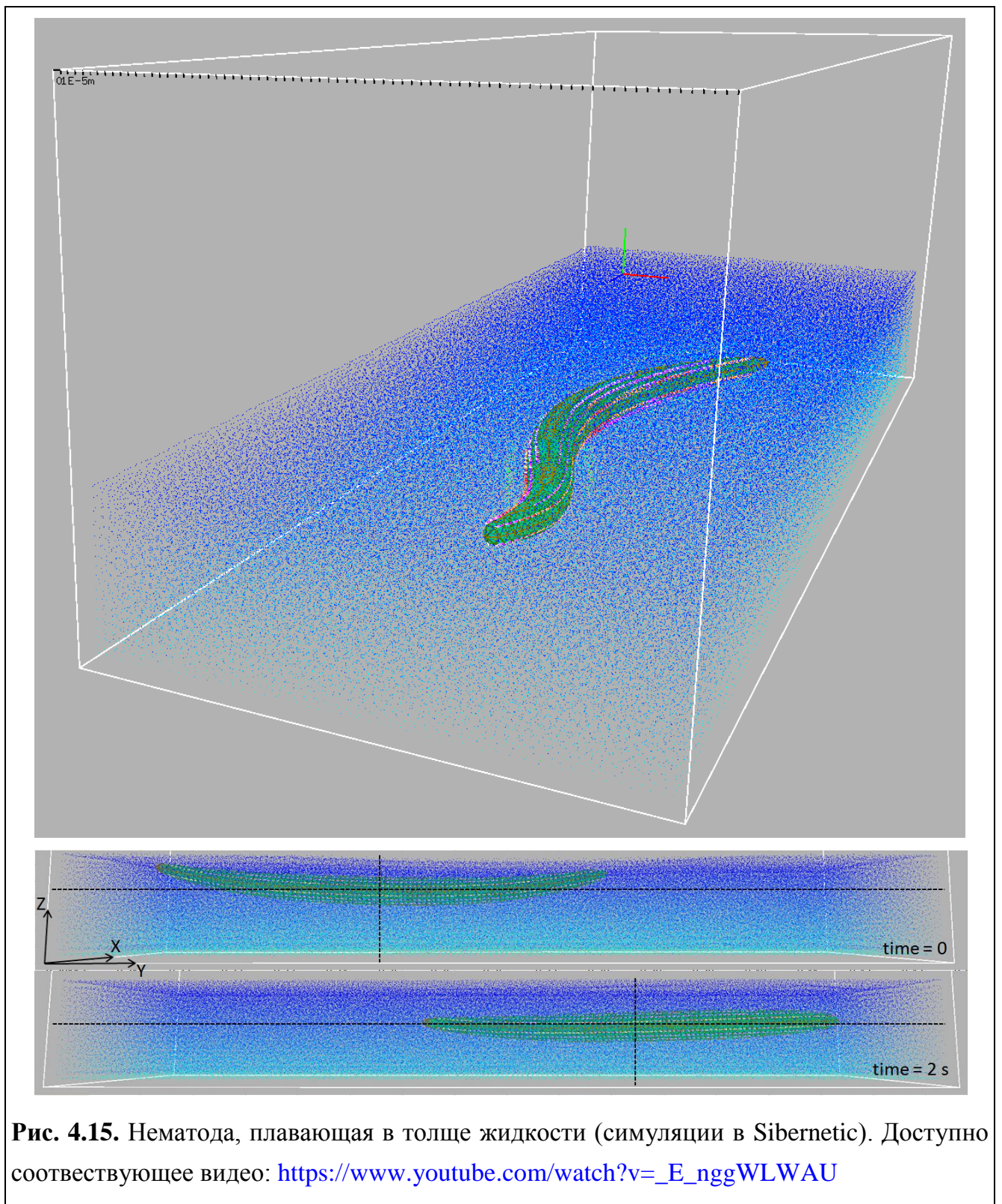


Рис. 4.15. Нематода, плавающая в толще жидкости (симуляции в Sibernetic). Доступно соответствующее видео: https://www.youtube.com/watch?v=_E_nggWLWAU

При плавании в жидкостях с низкой вязкостью типичная траектория хвостового конца тела реального *C. elegans* выглядит следующим образом (Рис. 4.16):

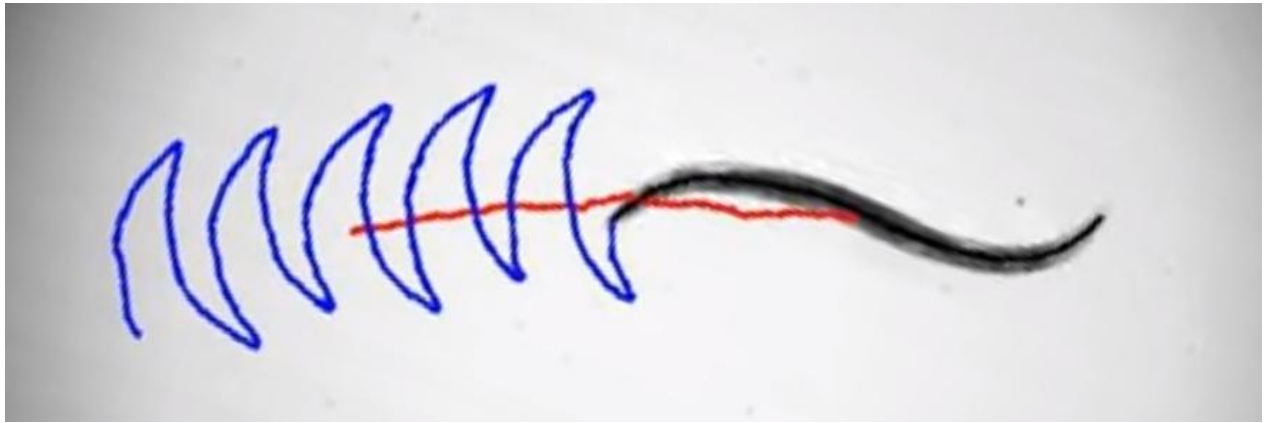


Рис. 4.16. Плавание реального *C. elegans* в жидкости с низкой вязкостью (1-2 мПа·с). Синяя кривая – траектория хвостового конца, красная – траектория центра масс. Имеется видеозапись процесса плавания:

<https://www.youtube.com/watch?v=qDvSYxNGSNg>

(источник: Technion Biofluids Laboratory, 2011)

А так выглядит результат первого запуска симуляции процесса плавания модели тела *C. elegans* в Sibernetic с приблизительно подобранными параметрами (видно, что длина волны близка к реальной, а амплитуду колебаний тела необходимо увеличить) (Рис. 4.17):

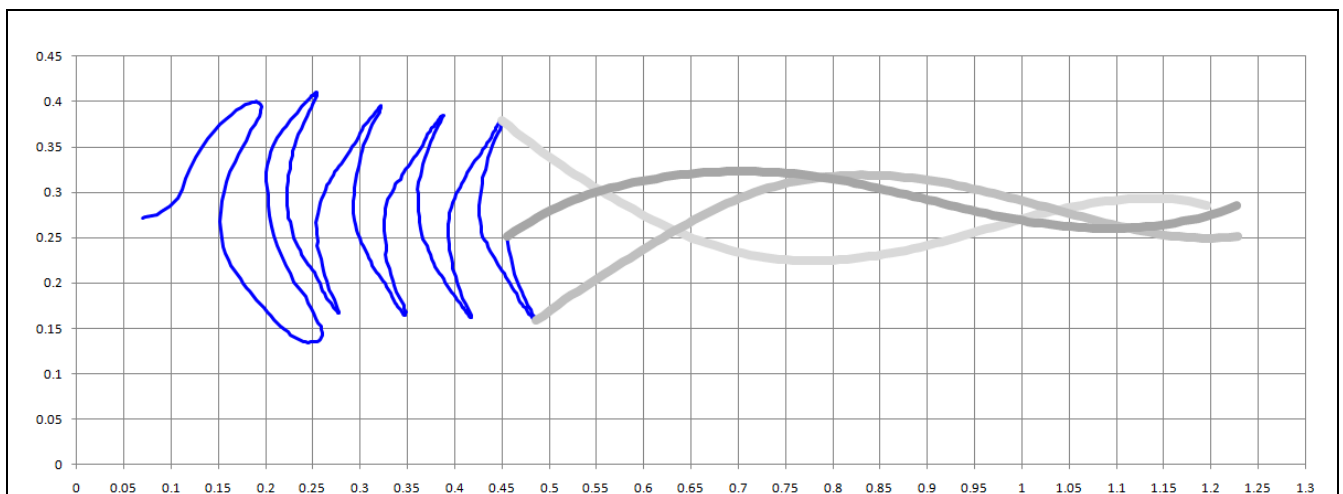


Рис. 4.17. Плавание модели *C. elegans* в жидкости с низкой вязкостью (1.4 мПа·с), рассчитанное с помощью симулятора Sibernetic (первый запуск, до настройки параметров). Синяя кривая – траектория хвостового конца. Серые кривые – изображение центральной линии тела в разные моменты времени. Размер ячейки координатной сетки – 0.05 мм по обеим осям.

4.5.3. О влиянии шага интегрирования по времени на результаты вычислений

Поскольку алгоритмы гидродинамики сглаженных частиц весьма требовательны к вычислительным ресурсам, особенно при большом количестве моделируемых частиц, 100 тыс. – 1 млн. и более, то важное значение играет выбор шага интегрирования по времени. Вдвое больший шаг даст вдвое большую производительность. Слишком большие значения использовать не удастся – начиная с определенного значения алгоритм становится оказывается неспособен компенсировать накапливающуюся на каждом шаге ошибку. Однако вопрос о том, как обоснованно выбрать шаг интегрирования, при котором расчеты действительно точны, а не просто кажутся визуальными нормальными и естественными, оказывается, не так прост. На Рис. 4.18 приведен пример того, как меняется z -координата (по вертикали) центра масс тела *C. elegans* при плавании в толще жидкости в зависимости от величины шага интегрирования по времени. Видно, что в районе $dt = 1.0e-5$ с происходит «переключение» из одного режима в другой, с бóльшими осцилляциями.

На Рис. 4.19 показано, как при тех же значениях dt выглядят траектории хвостового конца. Для всех представленных кривых все параметры, кроме dt , идентичны. Видно, что начальный участок траектории довольно устойчив к изменению dt , но уже после первой смены направления движения хвоста на противоположное траектории расходятся. В зависимости от dt меняется даже форма траектории, особенно в областях смены направления, от скругленной до заостренной, как на рисунке и видеозаписи движения реального *C. elegans* в процессе плавания, а также меняется наклон направления результирующего движения. И, наконец, от выбора dt заметно зависит и такая величина, как скорость поступательного движения центра масс при плавании – максимальное и минимальное значения, полученные в серии рассмотренных значений dt , как оказалось, отличаются более чем в 1.4 раза (см. Рис. 4.20).

Видно, что движение *C. elegans* при плавании – довольно сложный процесс, зависящий от множества параметров и факторов. Попробуем обратиться к более

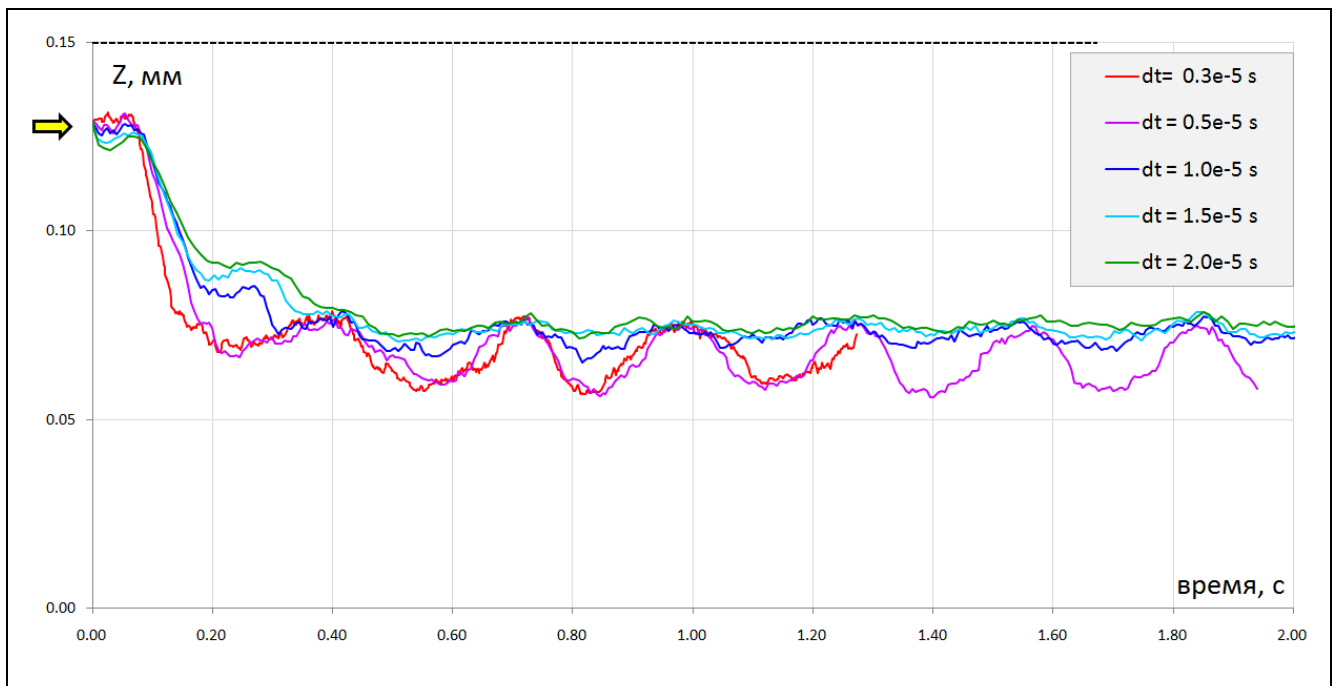


Рис. 4.18. Изменение z -координаты (по вертикали) центра масс тела *C. elegans* при плавании в толще жидкости в зависимости от величины шага интегрирования dt .

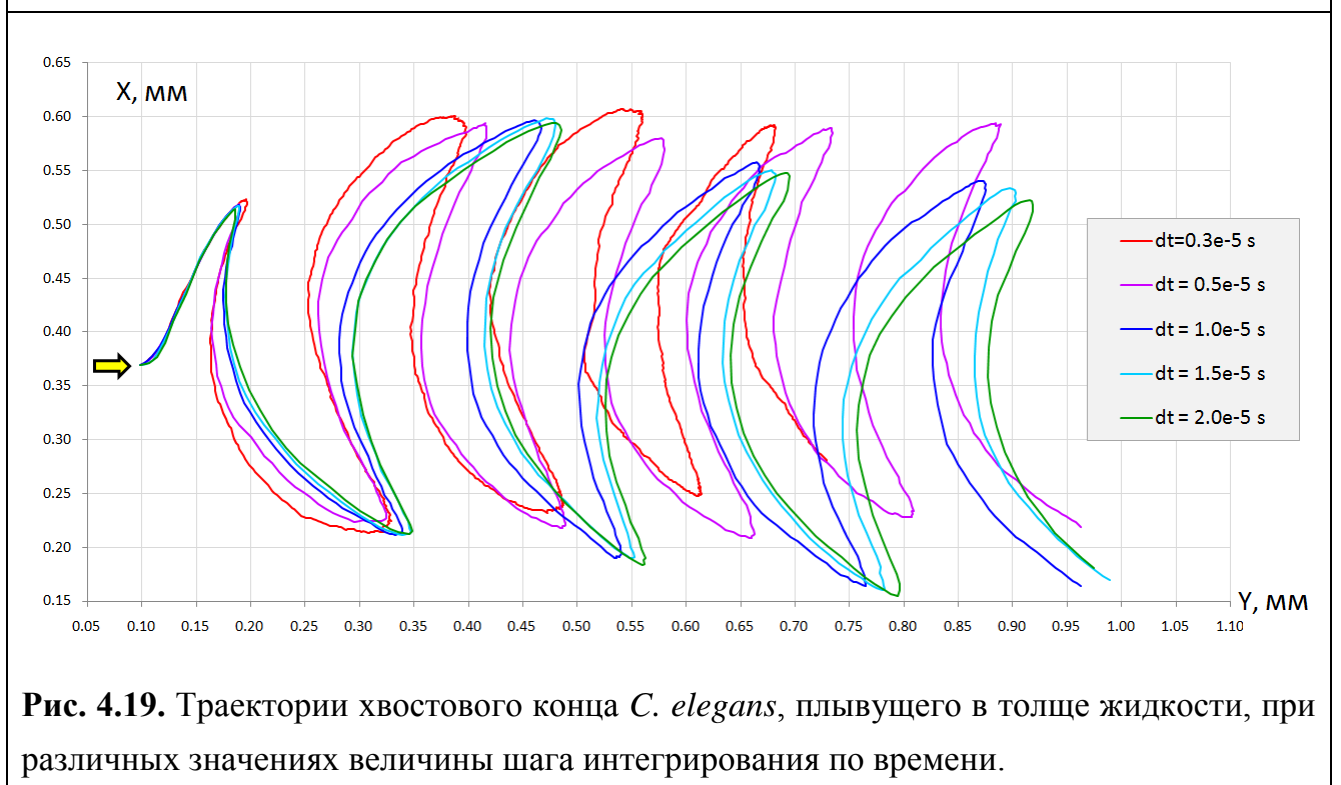


Рис. 4.19. Траектории хвостового конца *C. elegans*, плывущего в толще жидкости, при различных значениях величины шага интегрирования по времени.

простой системе (без активных элементов наподобие мышечных клеток), закон движения в жидкости для которой известен, а именно – рассмотрим снова падение шарика в жидкости, но на этот раз при различных величинах шага интегрирования по времени, dt , используя значения $1.25 \cdot 10^{-6}$, $2.5 \cdot 10^{-6}$, $5.0 \cdot 10^{-6}$ и $1.0 \cdot 10^{-5}$ с (см. Рис. 4.21).

скорость, мм/с

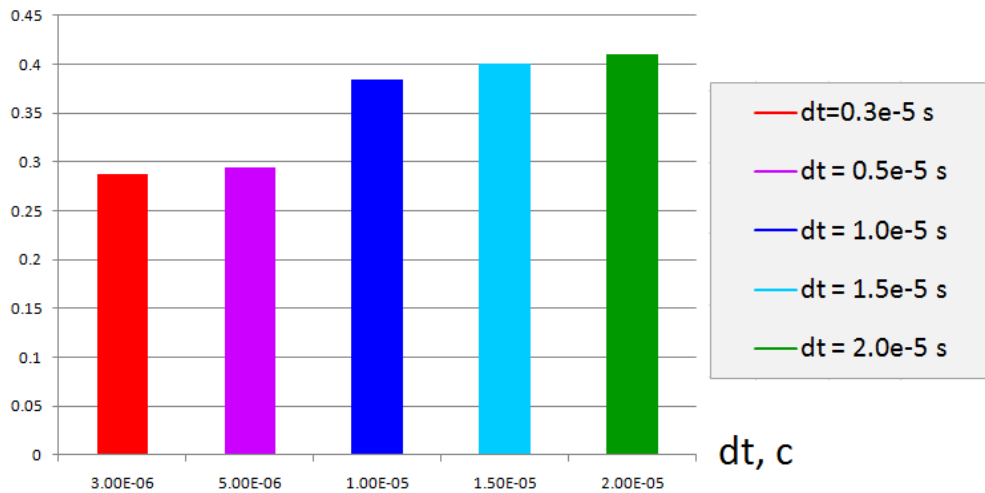


Рис. 4.20. Скорость поступательного движения центра масс (скорость плавания) при различных значениях величины шага интегрирования по времени.

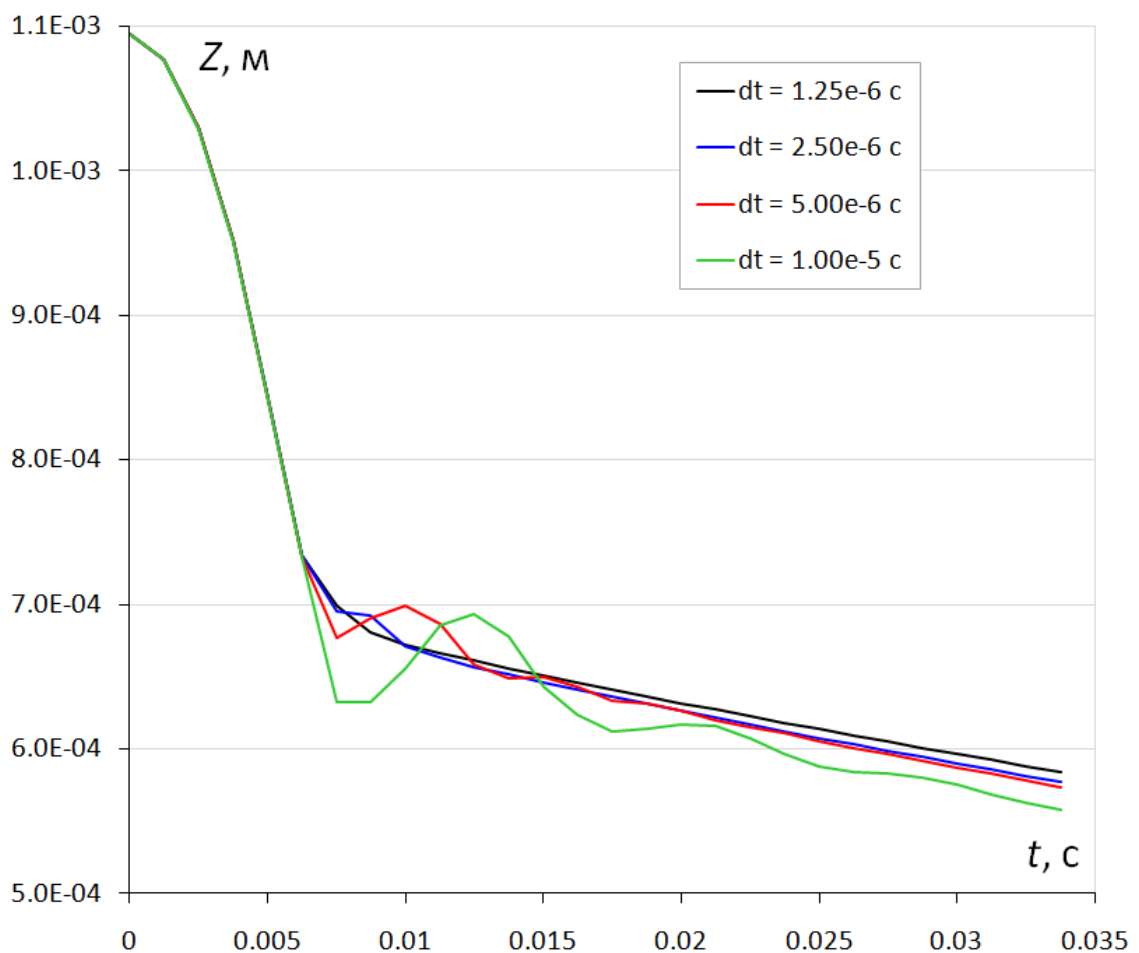
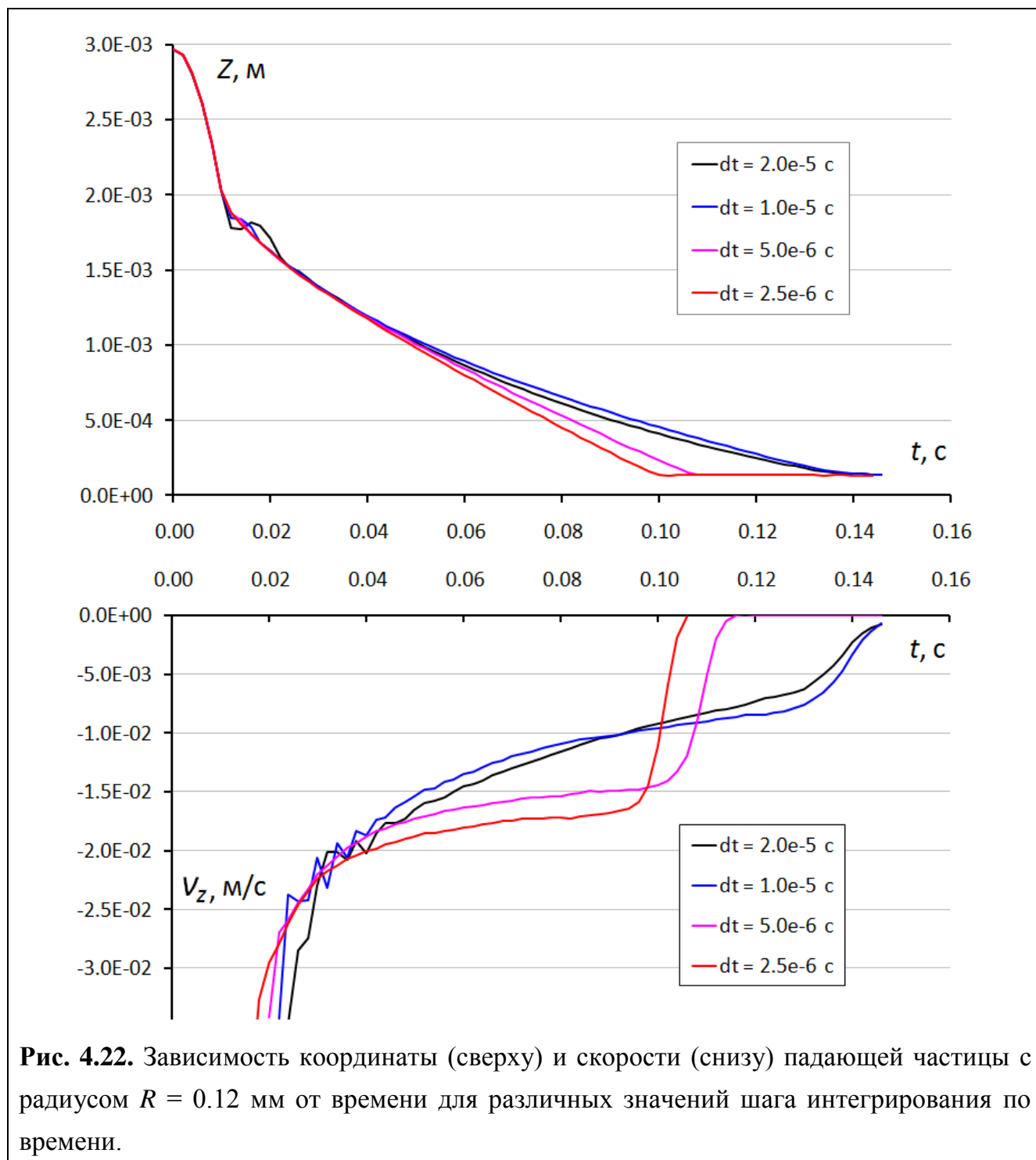


Рис. 4.21. Зависимость координаты падающей частицы с радиусом $R = 0.05$ мм от времени для различных значений шага интегрирования по времени.

Для шара радиусом $R = 0.05$ мм ($Re = 0.27$, ламинарный процесс) первые три значения обеспечивают довольно быстрый переход к режиму падения в жидкости с постоянной скоростью и практически одинаковую величину этой самой скорости, а дальше начинается существенный рост ошибок из-за большого шага интегрирования. Для шара радиусом $R = 0.12$ мм ($Re = 2.48$) скорость и вовсе не устанавливается постоянной (см. Рис. 4.22), но такие условия и не требуются для моделирования движения *C. elegans*.



Наиболее простым применимым на практике критерием выбора шага интегрирования по времени, который удалось обнаружить при изучении описанных систем, оказался следующий: установление постоянной скорости падения в жидкости (при приемлемых числах Рейнольдса) оказывается довольно близко связано с несжимаемостью этой жидкости, налитой в высокий стакан, обеспечиваемом достаточно малым значением dt . При таких dt , обеспечивающих несжимаемость жидкости, стоит проводить и расчеты для моделирования движения *C. elegans*.

При соблюдении вышеупомянутых условий скорость поступательного движения центра масс тела *C. elegans* при плавании в жидкости с низкой вязкостью $\mu = 1.4$ мПа·с наблюдалась в пределах 0.26...0.41. В экспериментах с плаванием *C. elegans* в жидкостях с низкой вязкостью наблюдались скорости плавания, равные 0.29 ± 0.03 [Lüersen et al., 2014], 0.38 ± 0.02 [Shen et al., 2012] и промежуточные значения. Таким образом, получившиеся в результате симуляции скорости поступательного движения центра масс тела *C. elegans* оказались в хорошем согласии с величинами, известными из экспериментов, что свидетельствует об адекватности созданной модели и её хорошей предсказательной способности.

Помимо скоростей, частот и длин волн движение нематоды часто также наглядно представляют в виде зависимости кривизны тела от времени (Рис. 4.23):

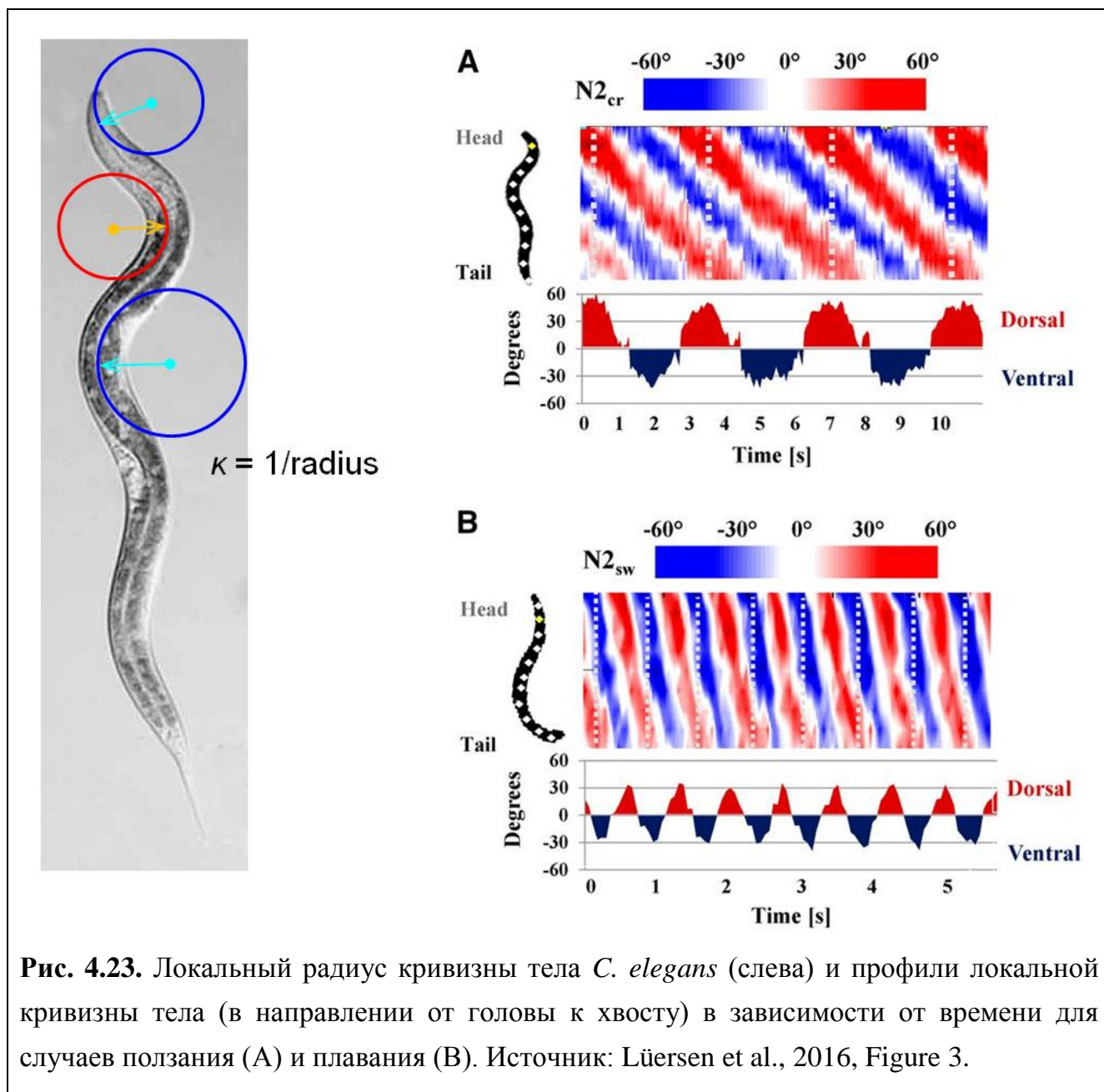
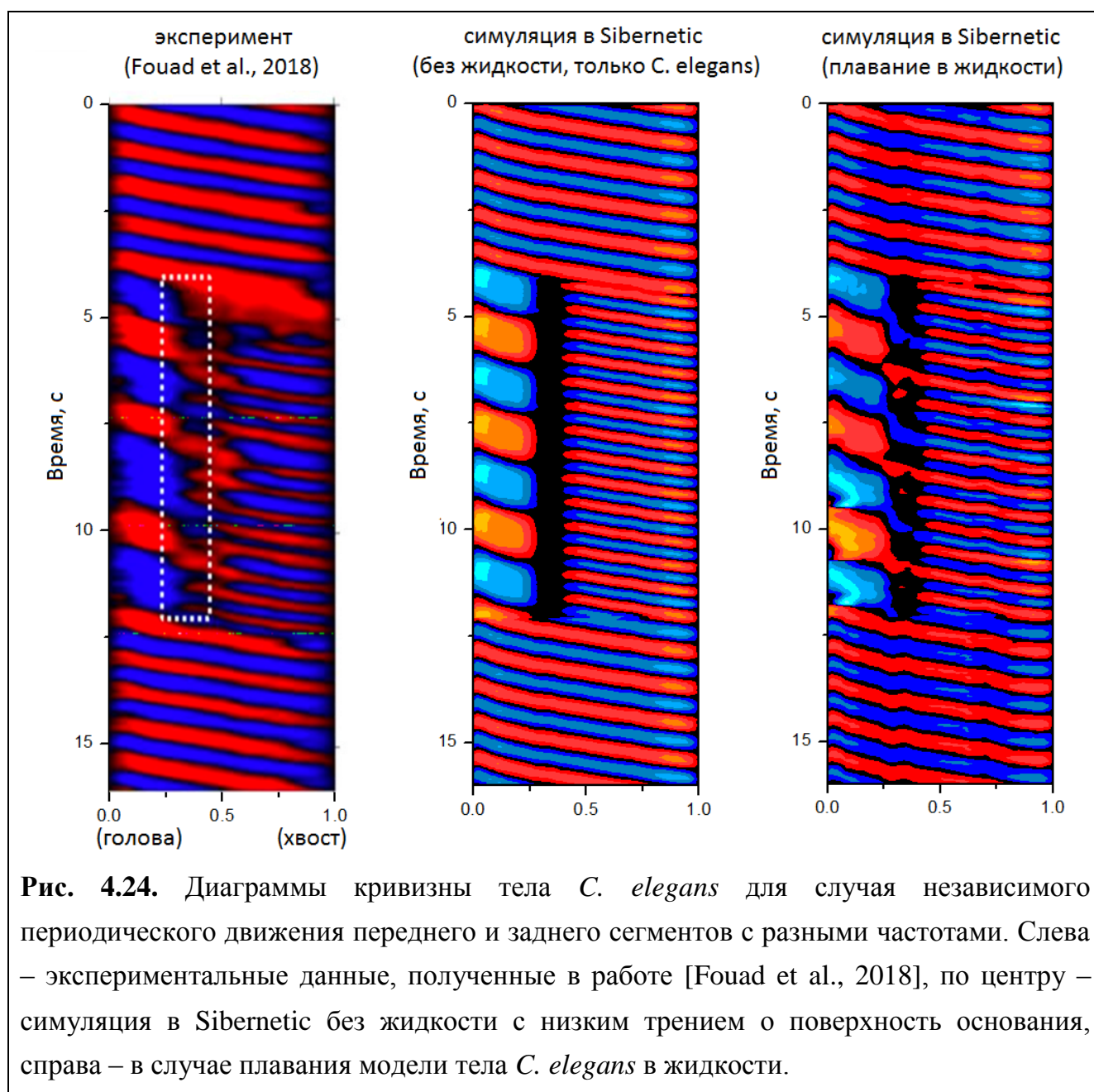


Рис. 4.23. Локальный радиус кривизны тела *C. elegans* (слева) и профили локальной кривизны тела (в направлении от головы к хвосту) в зависимости от времени для случаев ползания (A) и плавания (B). Источник: Lüersen et al., 2016, Figure 3.

4.5.4. Плавание в двухчастотном режиме. Воспроизведение результатов эксперимента в симуляции.

Помимо обычного режима плавания, в котором изменение формы тела задается периодическим сигналом только с одной частотой, в одной из работ по изучению механизмов генерации периодического сигнала в организме *C. elegans* была заблокирована передача нервных сигналов на участке в области первой трети между головой и хвостом [Fouad et al., 2018]. В результате оказалось, что в такой ситуации передняя часть тела производит осцилляции с одной частотой, а задняя – с другой (гипотеза о распределенных генераторах). Этот эксперимент

также удалось воспроизвести в *Sibernetic* с помощью уже описанной модели тела *C. elegans*, используя два различных источника периодических колебаний – один для передней части тела, другой – для задней (Рис. 4.24):



Таким образом, в рамках описанных численных экспериментов удалось установить соотношения между численным экспериментом и реальным процессом и пронаблюдать хорошее соответствие между ними на основе соотношений между рядом взаимосвязанных физических величин, характеризующих движение *C. elegans* в процессе плавания.

4.5.5. Зависимость фактической вязкости жидкости от значения коэффициента вязкости в симуляции.

Остается вопрос с моделированием значительно более вязких жидкостей. Максимально вязкая жидкость, смоделированная методом SPH, упоминание о которой удалось найти в литературе, имеет коэффициент динамической вязкости $\mu = 1.0$ Па·с [Pereira et al., 2011]. Также довольно сложно предсказать соотношение между максимальными значениями вязкости, которые можно получить при использовании SPH и PCISPH. Помимо этого, в литературе по SPH упоминается, что необходимо аккуратно подбирать коэффициент вязкости для моделируемых жидкостей, поскольку если вклад силы вязкости слишком велик, то результирующий эффект от него может привести к искусственной накачке энергии в систему вместо её потерь, затрачиваемых на вязкое трение [Kelager, 2006]. Таким образом, наиболее практичным способом получения предельно высокого значения вязкости жидкости, которое можно использовать в алгоритме PCISPH при нужных нам условиях, по-видимому, представляется численный эксперимент.

Расчеты в *Sibernetis* с использованием той же самой тестовой сцены с падением шарика в глубокий стакан с жидкостью показали, что увеличение коэффициента вязкости в симуляции в 100 раз увеличивает фактическую измеренную в результате вышеописанного численного эксперимента (с помощью закона Стокса) с 1.4 мПа·с до 5.44 Па·с. Помимо 100-кратного измерения были также проведены при использовании 50-кратного и 10-кратного увеличения коэффициента вязкости относительно исходного значения. Для стабильной работы симулятора при 50-кратном коэффициенте вязкости необходимо использовать шаг интегрирования $dt = 10^{-6}$ с или менее, при 100-кратном – $dt = 0.5 \cdot 10^{-6}$ с. Получившаяся зависимость коэффициента вязкости, задаваемого среди параметров симуляции и фактически измеренной вязкости приведена на Рис. 4.25.

Можно было бы ожидать, что зависимость будет линейной, однако вычисления показали, что это вовсе не так (вертикальная ось – степени числа 10).

Как измерение вязкости на основе закона Стокса в симуляции жидкости, так и данная зависимость, насколько автору известно, были произведены впервые для алгоритма из семейства SPH. В причинах такой зависимости еще предстоит разобраться, а также рассчитать аналогичные кривые для других модификаций алгоритма гидродинамики сглаженных частиц.

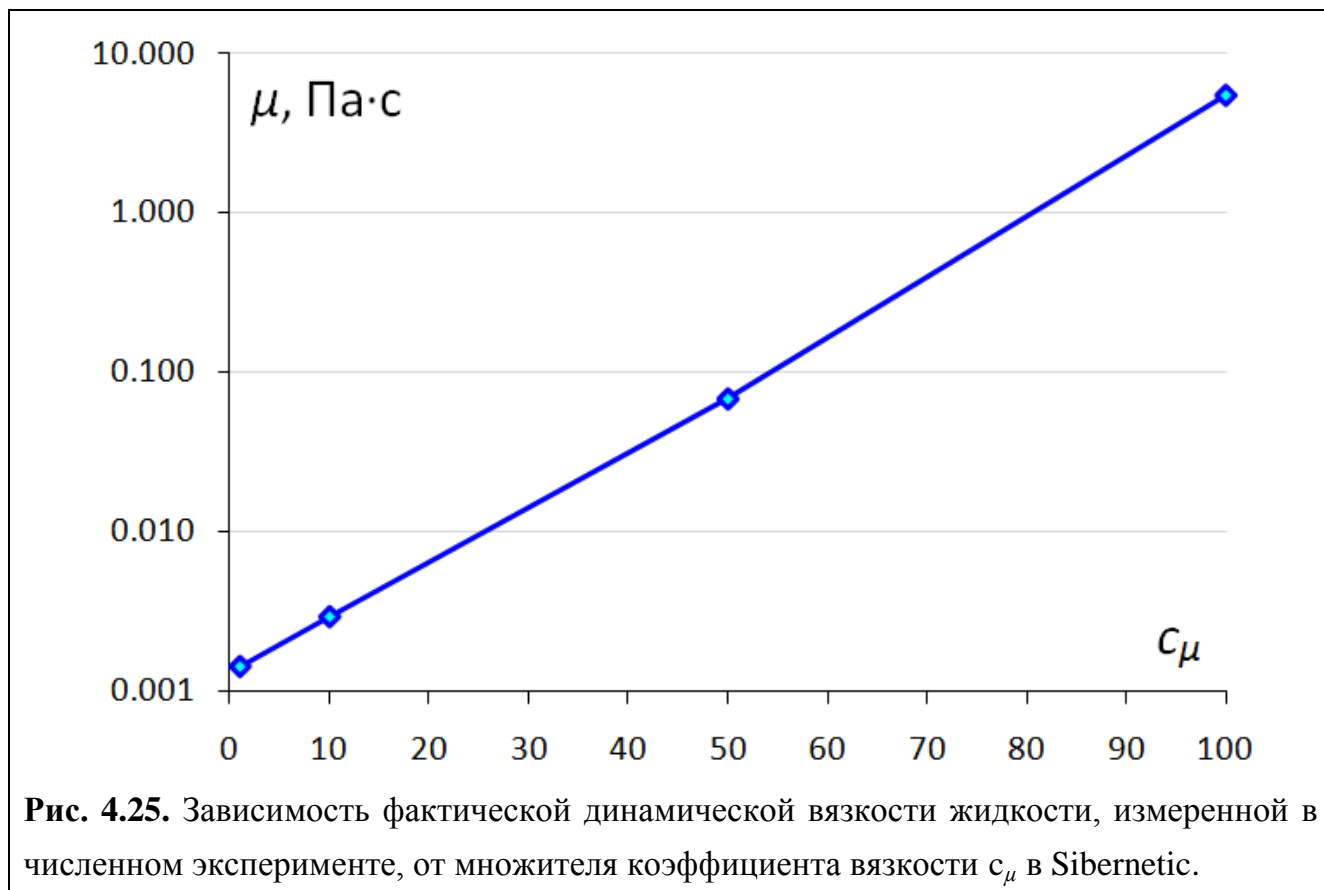
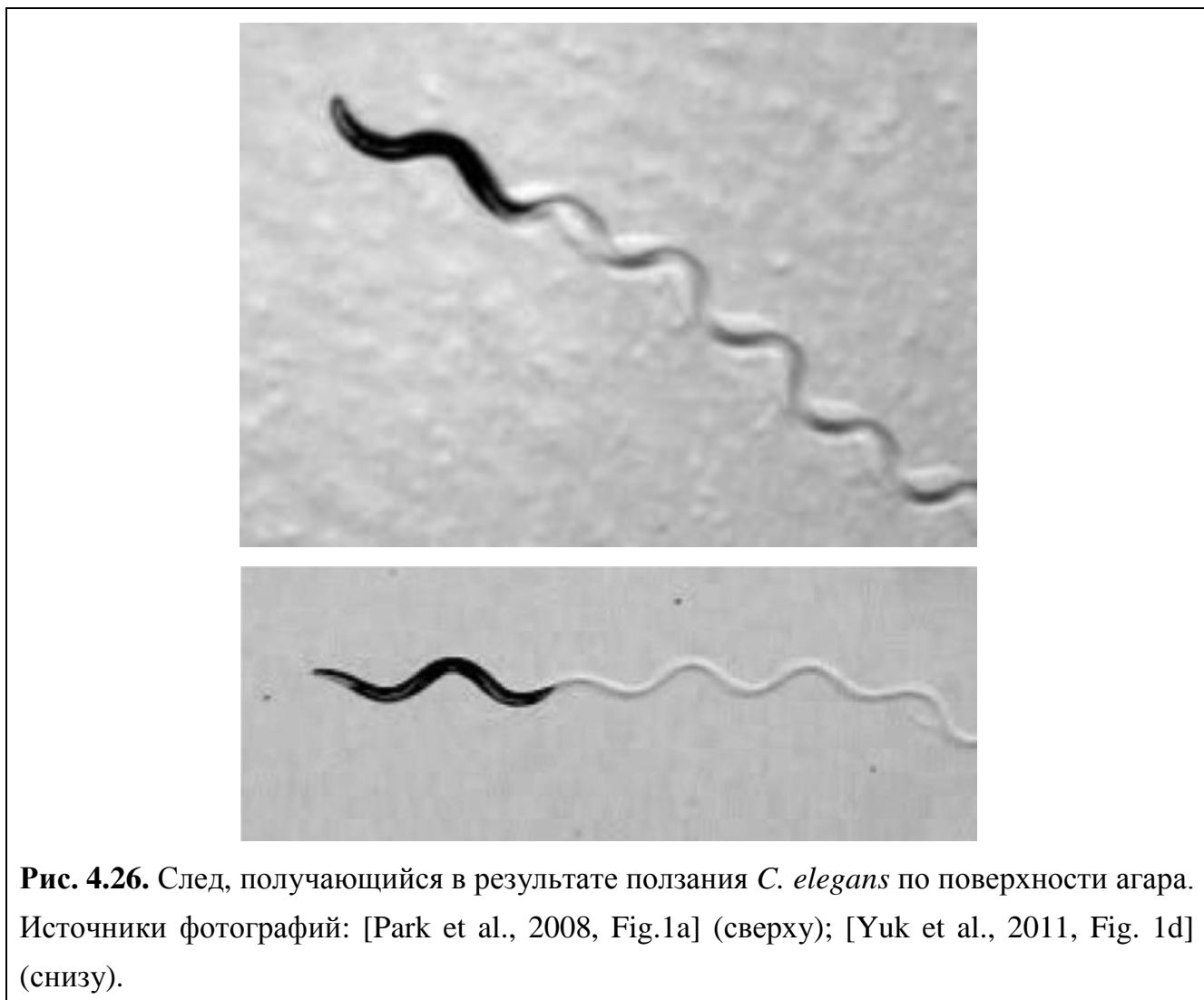


Рис. 4.25. Зависимость фактической динамической вязкости жидкости, измеренной в численном эксперименте, от множителя коэффициента вязкости c_μ в Sibernetic.

4.5.6. Биомеханика ползания по поверхности агара

Итак, плавание *C. elegans* в жидкости удалось успешно воспроизвести. Следующий шаг – ползание по поверхности агара, гелеобразного вещества, на поверхности которого нематоды содержатся в лабораторных условиях. Чашки Петри с тонким слоем агара подготавливаются следующим образом: капля нагретого 2-5% раствора агара в буферном растворе M9 или NGM при температуре около 60 °C наносится на центр чашки, растекается, формируя гладкую горизонтальную поверхность, остывает и полимеризуется (температура плавления агара – 85...95°C, температура застывания (полимеризации) –

32...45°C). При движении по поверхности агара *C. elegans* оставляет на ней след, который отчетливо виден в оптический микроскоп (см. Рис. 4.26).



Согласно современным представлениям, *C. elegans* отталкивается от краев бороздки, которую сам и формирует в процессе движения, и тем самым проталкивает свое тело вдоль неё [Yuk et al., 2011; Shen et al., 2012].

При детальном рассмотрении было обнаружено, что между поверхностью агара и телом нематоды в месте их контакта имеется тонкая пленка жидкости. В процессе движения поверхностное натяжение прижимает тело нематоды к поверхности агара [Wallace, 1968]. При движении вперед головной конец *C. elegans* преодолевает предел текучести полимеризованного 2-5% раствора агара (геля), по большей части состоящего из жидкости, стабилизированной водородными связями между молекулами агара. По-видимому, в результате

механического воздействия, разрушающего связи между молекулами агара в области, непосредственно контактирующей с нематодой, высвобождается связанная жидкость и образуется бороздка. Это позволяет остальному телу, следующему за головным концом, двигаться вдоль бороздки значительно легче. И наоборот, попытка движения поперек бороздки встречает значительное сопротивление, т.к. сила прикладывается к значительно большей площади (пропорциональной не поперечному, а продольному сечению тела) и уже недостаточна для разрушения агара и дальнейшего расширения бороздки, зато вполне обеспечивает отталкивание тела от её краев. Для существенно более твердого геля с большим процентным содержанием агара процесс ползания практически эквивалентен движению в твердом канале (синусоидальной формы) [Fang-Yen et al., 2010; Berri et al., 2009].

Имеется ряд общедоступных видеозаписей процесса ползания *C. elegans* по поверхности агара, в том числе полученные с довольно значительным увеличением, например эта⁴⁴ (источник – Hashimoto-Kagami Lab., Tohoku University, 2012), при внимательном изучении которой оказывается, что всё совсем не так просто и однозначно, как кажется на первый взгляд. Так, при определенных условиях (определяемых, вероятно, концентрацией агара в растворе и, возможно, какими-то еще параметрами) за нематодой наблюдается не один, а два следа, вложенные друг в друга (см. Рис. 4.27). Один из них – углубление (бороздка), а второй – наоборот? Или оба – бороздки, одна в другой? Это еще предстоит выяснить.

⁴⁴ https://www.youtube.com/watch?v=atb1AUtu_ww

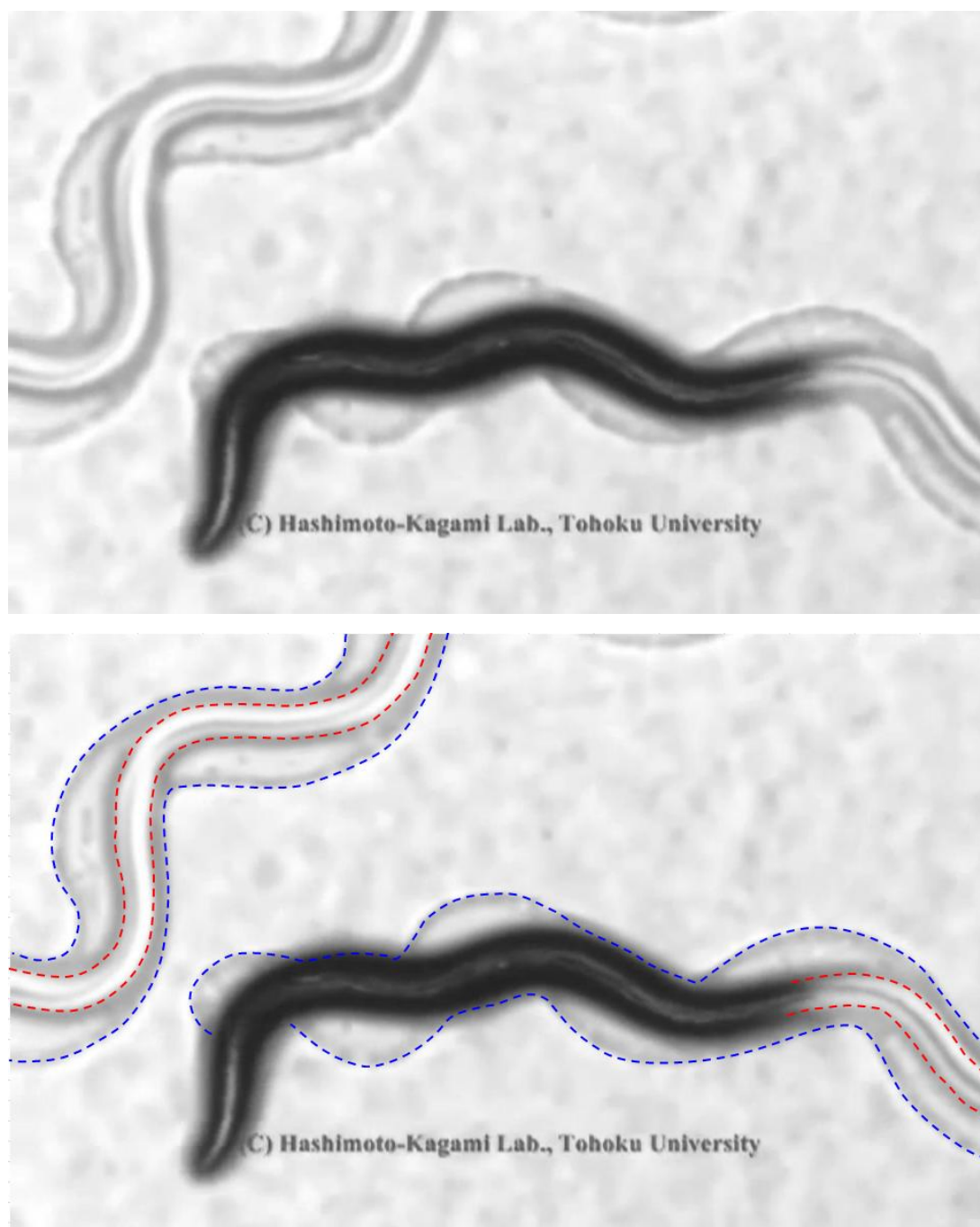


Рис. 4.27. Кадр из видеозаписи ползания *C. elegans* по поверхности агара (Hashimoto-Kagami Lab., Tohoku University, 2012). Сверху – оригинальное изображение, снизу – дополненное наложением контуров двух вложенных следов, оставляемых нематодой (выполнено автором данной диссертации).

Дальнейший анализ данной видеозаписи отчасти позволяет ответить на этот вопрос. Несколькими секундами позже *C. elegans* покидает область, покрытую слоем агара (см. Рис. 43), и выползает на предметное стекло или дно чашки Петри (гладкую, ничем не покрытую прозрачную поверхность), затем в течение

нескольких секунд ползет по нему, визуально не снижая скорости, а затем вползает на еще одну область, покрытую слоем агара, так же не испытывая при этом видимых затруднений. Последнее наблюдение говорит в пользу того, что слой агара весьма тонок, по-видимому, в несколько раз меньше диаметра тела нематоды.



Рис. 4.28. Нематода *C. elegans* покидает область, покрытую агаром (справа) и выползает на гладкую, ничем не покрытую поверхность стекла (слева). Источник данных – находящаяся в свободном доступе видеозапись, произведенная в Hashimoto-Kagami Lab., Tohoku University, 2012.

(https://www.youtube.com/watch?v=atb1AUtu_ww).

На основе произведенных наблюдений можно сделать ряд полезных выводов:

- Поскольку *C. elegans* не может в результате проползания по стеклу оставить на их поверхности бороздку (углубление), а след за нематодой на Рис. 4.28 все-таки отчетливо виден, значит он является выпуклостью, образованной

агаром над поверхностью стекла (поскольку помимо *C. elegans*, стекла и агара в данной системе больше ничего нет).

- Поскольку «внутренний» след нематоды на поверхности агара не прерываясь и не изменяясь переходит в единственный след на стекле, значит «внутренний» след на агаре также является выпуклостью, а не бороздкой.
- След на стекле по мере продвижения нематоды по нему становится тоньше, но это не приводит к заметному снижению скорости движения – по крайней мере в пределах нескольких длин тела *C. elegans*.
- «Внешний», более широкий след на агаре, по-видимому, все-таки является бороздкой и одновременно источником деполимеризованного (жидкого) раствора агара, образующегося в результате механического воздействия, из которого затем формируется более тонкий «внутренний» выпуклый след.

Образование выпуклого следа из агара дополнительно подтверждается еще одной видеозаписью, кадр из которой приведен ниже (см. Рис. 4.29).

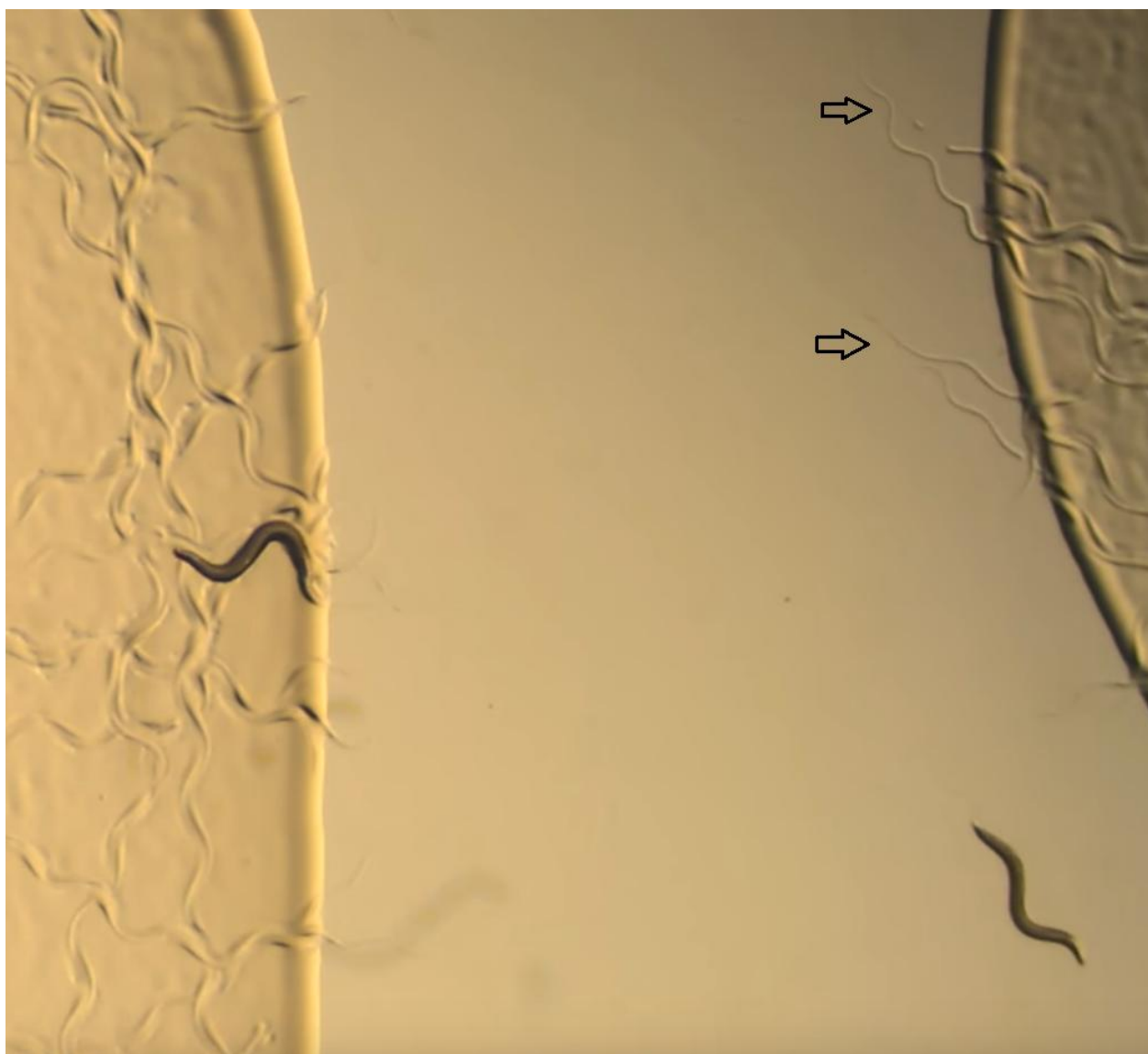


Рис. 4.29. Две плоские капли агара на стекле (слева и справа). Отчетливо видны следы, оставленные на стекле нематодами, сползшими на него из покрытых агаром областей (показаны стрелками). Также в правом нижнем углу видна нематода, выползшая из правой области и проделавшая путь более чем в 10 своих длин, за которой следа уже не остается или он настолько тонкий, что не виден при данном разрешении. Источник: https://www.youtube.com/watch?v=Cz_oyUBHjNc [J. Chang, 2015]

В литературе подробно исследован механизм движения по поверхности агара с образованием бороздки [Yuk et al., 2011; Rabets et al., 2014], однако упоминания о формировании второго следа и механизме движения по стеклу найти не удалось. Физические механизмы взаимодействия тела нематоды с поверхностью агара рассматривались в литературе и описываются следующим образом (см. Рис. 4.30).

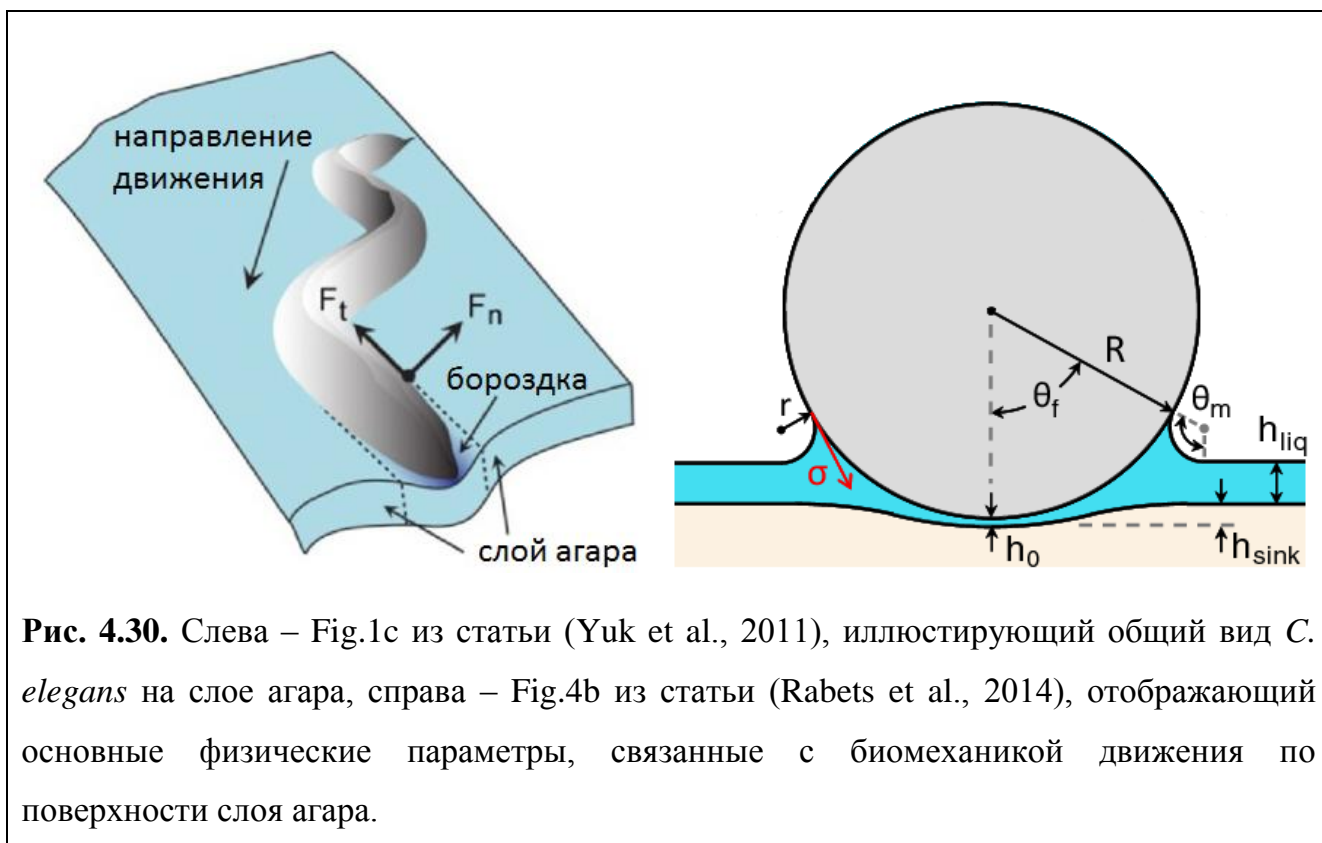


Рис. 4.30. Слева – Fig.1c из статьи (Yuk et al., 2011), иллюстрирующий общий вид *C. elegans* на слое агара, справа – Fig.4b из статьи (Rabets et al., 2014), отображающий основные физические параметры, связанные с биомеханикой движения по поверхности слоя агара.

В работе [Rabets et al., 2014] утверждается, что на первый взгляд простая система, представленная горизонтальным слоем насыщенного жидкостью вязкоэластичного полисахаридного геля (агара), на деле оказывается достаточно сложной в плане механики движения *C. elegans* по его поверхности, в которую вносят вклад как толщина жидкого слоя, так и способность агара к локальным деформациям в результате механического воздействия.

Динамика формирования бороздки определяется силами адгезии, прижимающими тело *C. elegans* к поверхности, геометрией области контакта нематоды с поверхностью и вязкостью субстрата. Сила адгезии, включающая поверхностное натяжение и капиллярное давление [Orr et al., 1975], как было показано в эксперименте [Rabets et al., 2014], возрастает с концентрацией агара; также было определено, что силы адгезии примерно на порядок превышают по величине силы, производимые телом червя для продвижения вдоль бороздки. Также утверждается, что если поместить нематоду *C. elegans* на жесткую поверхность с низкой анизотропией сил трения, то она не сможет осуществлять поступательное движение посредством генерации синусоидальных волн

сокращения мышц, распространяющихся вдоль тела [White et al., 1986]. Вопрос о том, может ли *C. elegans* ползти по сухому гладкому стеклу также обсуждался со специалистами по экспериментальному изучению *C. elegans* – было высказано мнение, что не может. Этот же результат получился при запуске симуляции движения тела *C. elegans* в системе *Sibernetic* на ровной горизонтальной поверхности с одинаковым во всех направлениях трением и характерным для процесса ползания паттерном активации мышечных клеток. Возможно, что *C. elegans* имеет достаточный резерв смачивающей жидкости для преодоления по гладкому стеклу расстояний порядка тех, что наблюдались на Рис. 4.29 и соответствующей видеозаписи. Также стоит проверить гипотезу о том, что, начиная с некоторого остаточного количества жидкости, её потеря при дальнейшем движении практически прекращается, если смачиваемость нематоды заметно превышает смачиваемость поверхности, по которой она движется.

Стоит также отметить, что в лабораторных условиях в стандартных чашках Петри, покрытых слоем агара, *C. elegans* обычно движется со скоростью, составляющей 80-300 $\mu\text{m}/\text{c}$, зависящей от ряда факторов – таких, как присутствие пищи [Sawin et al., 2000], флуктуации температуры [Martin et al., 2013], состояние голода [Omura et al., 2012] или допаминовый баланс [Sawin et al., 2000]. В случае избегания опасности *C. elegans* может существенно ускоряться, развивая скорость до 800 $\mu\text{m}/\text{c}$ [Mohammadi et al., 2013].

4.5.7. Моделирование ползания по поверхности агара в *Sibernetic*

Познакомившись с результатами экспериментального исследования движения *C. elegans* по поверхности агара, приступим к размышлениям о том, каким образом можно его смоделировать средствами *Sibernetic*. Моделировать подобное состояние вещества жидкостью с высокой вязкостью было бы не вполне корректно, поскольку это скорее деформируемое (пластичное) тело с некоторым порогом прочности. Попытки смоделировать этот механизм с помощью вязкой жидкости предпринимались на начальном этапе моделирования процесса ползания, но они не дали удовлетворительного результата. В рамках алгоритма

PCISPH, помимо описанных ранее типов данных, возможно реализовать поддержку расчетов динамики пластичного тела, которое под воздействием нагрузки, превышающей пороговую, будет деформироваться [Solenthaler 2010], что реализуется посредством разрыва задействованных связей между частицами или модификацией длины равновесного расстояния между ними. Среди возможных вариантов – сплошное пластичное тело или регулярная решетка с вкраплениями частиц жидкости, которые будут высвобождаться при её разрушении или значительной деформации. Однако, в первую очередь было важно убедиться, что механизм формирования бороздки и ползания с отталкиванием от её краев в принципе работает в модели, т.к. до этого подобного моделирования, насколько автору известно, никем не производилось, а процесс ползания моделировался лишь в неявном виде и в 2D представлении.

В качестве подходящей тестовой системы для моделирования процесса ползания в явном виде, в трехмерной модели, автором было предложено использовать в качестве «агара» составные частицы некруглой формы, для простоты – кубы, состоящие из 8 обычных эластичных частиц, соединенных пружинными связями. Предполагалось, что покрытие горизонтального основания такими частицами в несколько слоев обеспечит их укладку, достаточно устойчивую при воздействии боковых поверхностей тела. Одновременно при значительно большем давлении, оказываемом движущимся вперед головным концом модели тела червя, непосредственно контактирующие с ним частицы должны расходиться в стороны, в том числе благодаря возможности деформации геометрии эластичных кубов. Предположение оказалось верным, и в результате подбора коэффициента жесткости пружин ожидаемый механизм движения действительно удалось воспроизвести. Общий вид модели тела *C. elegans* на подложке из «агара» представлен на Рис. 4.31.

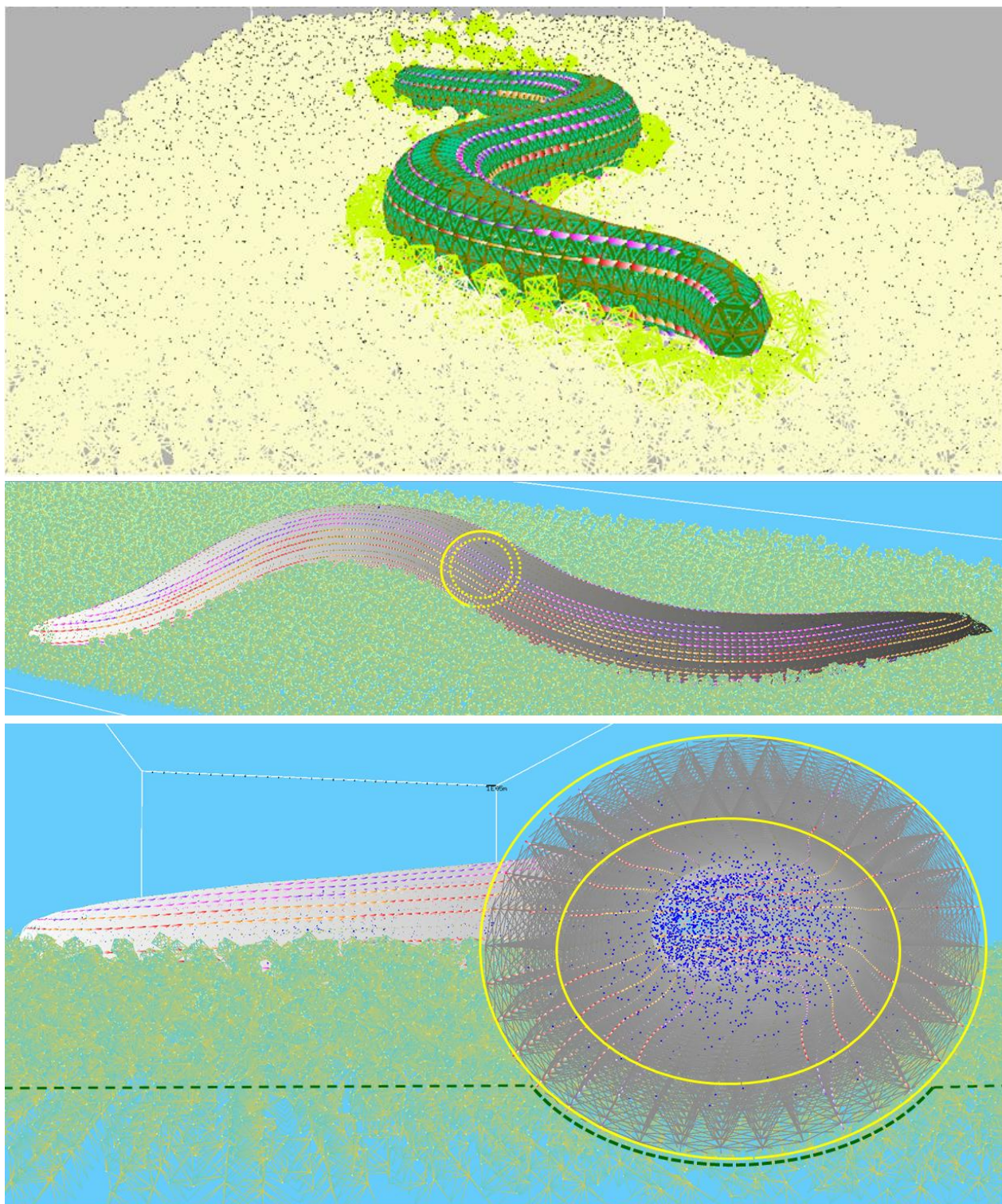


Рис. 4.31. Сверху - общий вид модели тела *C. elegans* при движении по поверхности геля (агара) в симуляторе *Sibernetic* при половинном разрешении модели тела нематоды (100 слоев в продольном направлении), посередине – при полном разрешении (200 слоев), снизу – поперечное сечение, иллюстрирующее эластичную оболочку и жидкость внутри.

Расчеты скорости поступательного движения в процессе ползания, при заданных значениях частоты и длины волны, равных характерным значениям для реального *C. elegans*, показали хорошее согласие с известными экспериментальными данными. Основные результаты для плавания и ползания приведены в Таблице 7:

Таблица 7. Сравнение результатов симуляции в *Sibernetic* и значений, известных из экспериментов

Физическая величина	Эксперимент	Симуляция в <i>Sibernetic</i>
Скорость (мм/с)		
Ползание по поверхности геля (10-100 мПа·с)	0.1-0.3 [Lüersen et al., 2014] 0.19 (вперед) / 0.3 (назад) (анализ видео ползания вперед + реверса)	0.13...0.15
Плавание в жидкости с низкой вязкостью (≈ 1 мПа·с)	0.29 ± 0.03 [Lüersen et al., 2014] 0.38 ± 0.02 [Shen et al., 2012] 0.29...0.38 (анализ видео плавания)	0.26...0.41
Нормализованная длина волны, λ/L , где L – длина тела нематоды		
Ползание по поверхности геля (10-100 мПа·с)	0.65 ± 0.03 [Fang-Yen et al., 2010], 0.48 (анализ видео ползания)	0.57...0.85
Плавание в жидкости с низкой вязкостью (≈ 1 мПа·с)	1.54 ± 0.04 [Fang-Yen et al., 2010] 2.15 ± 0.07 [Shen et al., 2012] 1.54 (анализ видео плавания)	1.49...1.66
Частота, Гц		
Ползание по поверхности геля (10-100 мПа·с)	0.3 ± 0.02 [Fang-Yen et al., 2010] 0.30...0.49 (анализ видео плавания)	0.27...0.41
Плавание в жидкости с низкой вязкостью (≈ 1 мПа·с)	1.76 ± 0.07 [Fang-Yen et al., 2010] 1.99 ± 0.05 [Shen et al., 2012] 1.76 (анализ видео плавания)	1.75...1.79

Также в результате численного эксперимента в *Sibernetic* была продемонстрирована способность модели тела *C. elegans* в процессе ползания

производить реверс, т.е. смену направления движения с прямого на обратное (см. Рис. 4.32):

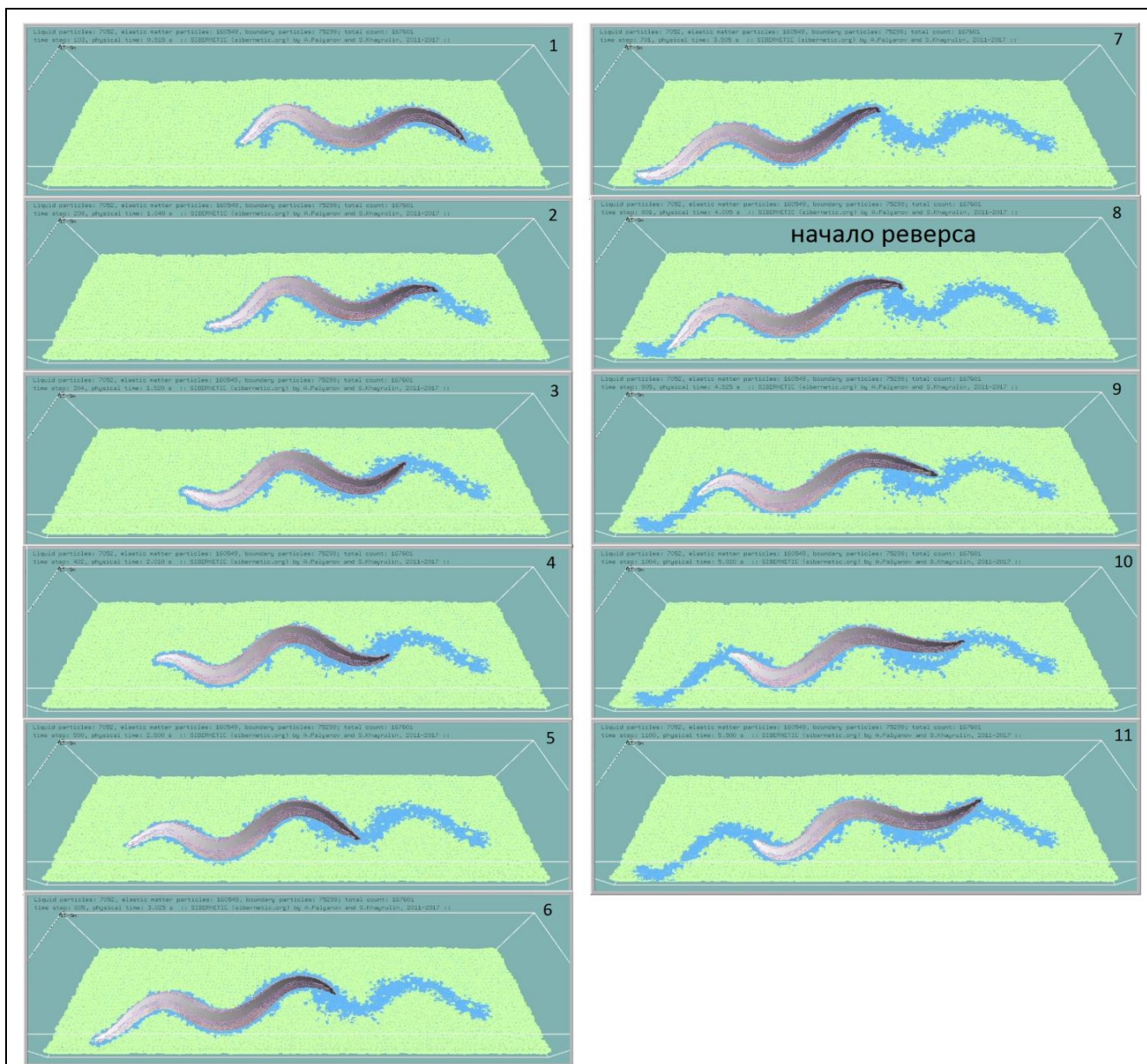


Рис. 4.32. Кадры видеозаписи смены направления движения (реверса) в процессе ползания. Интервал между любыми двумя последующими кадрами – 0.5 с. Голубым цветом помечены частицы геля, которых *C. elegans* касался в процессе движения – для удобства отслеживания траектории движения.

Имеются две видеозаписи, демонстрирующие этот процесс:

https://www.youtube.com/watch?v=1oDUMWQQ_p0

https://www.youtube.com/watch?v=J_wG5PfDIoU

Первая соответствует кадрам, представленным на Рис. 4.32, а на второй помимо реверса также демонстрируется динамика взаимодействия тела *C. elegans* с твердыми стенками, ограничивающими область симуляции.

Помимо этого модель также демонстрирует другие возможности, характерные для реального *C. elegans* – способность принимать форму тела, характерную для *C. elegans* при осуществлении разворота (так называемый «Omega-turn») и осуществлять сокращение всего тела при одновременной активации всех мышц (см. Рис. 4.33).

И, наконец, в рамках данной работы впервые в мире было продемонстрировано как ползание, так и плавание модели тела *C. elegans* в единой симуляции (смена режима движения происходит при пересечении границы двух различных сред)⁴⁵ (см. Рис. 4.34).

Таким образом, созданная трехмерная модель тела и мышечной системы *C. elegans*, а также его физического окружения, позволила воспроизвести при симуляции в *Sibernetic* все основные паттерны движения и формы тела, характерные для реального *C. elegans*, а также значения величин, характеризующих эти движения – для режимов плавания и ползания.

Представленные выше результаты были получены без использования симулятора нервной системы – для генерации паттернов движения применялись простые периодические сигналы нужной частоты или, в некоторых случаях, их комбинации. Помимо этого в конце данной главы, в Разделе 4.7, приведены результаты ряда симуляций, в которых в качестве входных данных для работы мышечной системы использовались паттерны мышечной активности реального свободнодвижущегося *C. elegans*.

⁴⁵ <https://www.youtube.com/watch?v=5767l3MveFY>

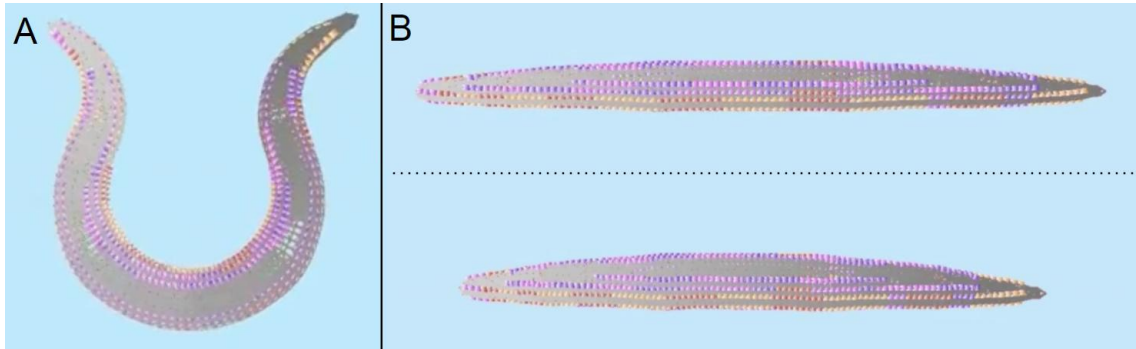


Рис. 4.33. Общий вид модели тела *C. elegans* в симуляторе Sibernetic (A) при осуществлении движения « Ω -turn» и (B) при сокращении всех мышц одновременно. Также доступны соответствующие видеозаписи:

A: <https://www.youtube.com/watch?v=zTL0Ozntfb4>

B: <https://www.youtube.com/watch?v=tGzWQ1b7WFg>

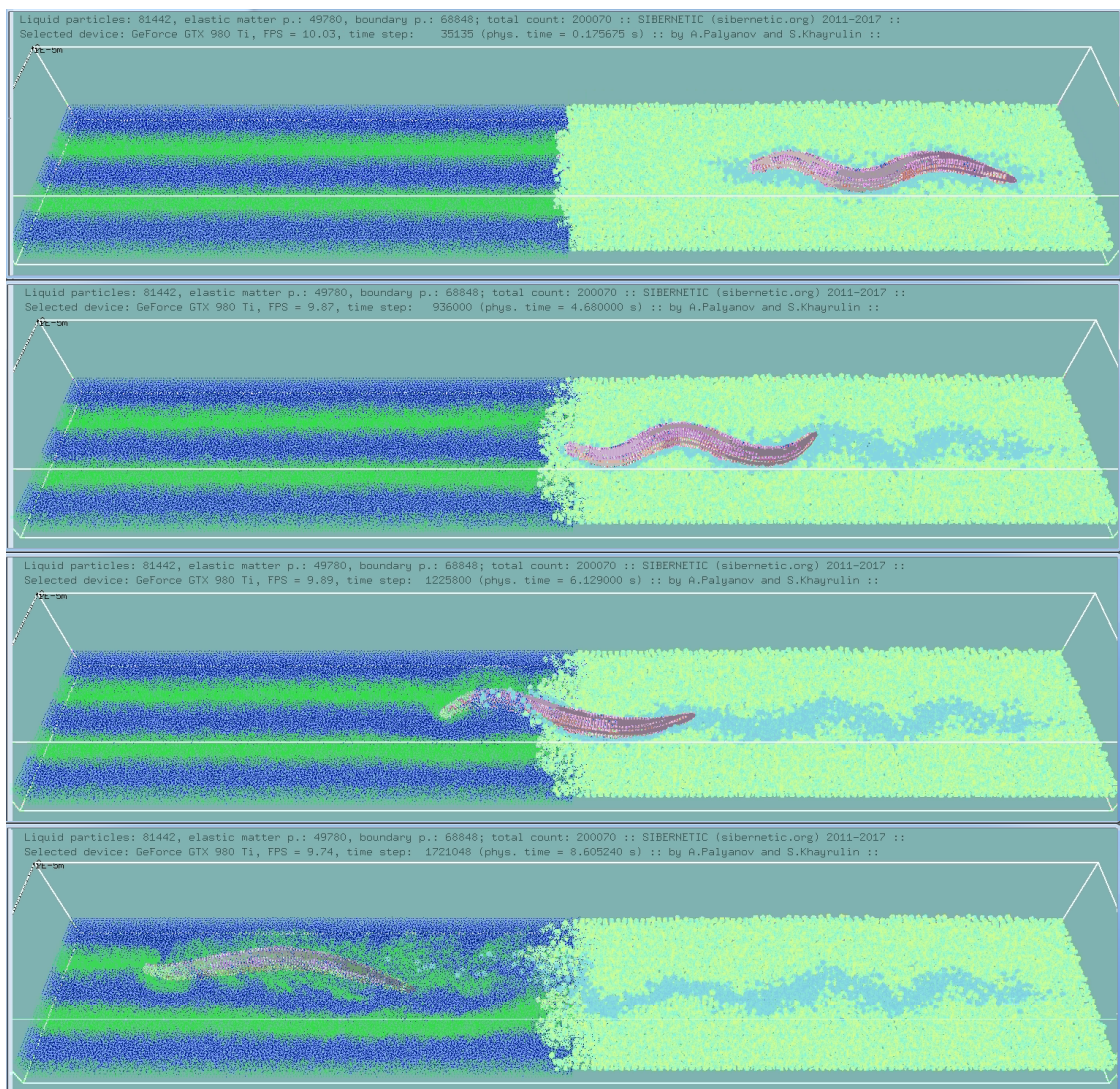


Рис. 4.34. Несколько кадров симуляции, в которой ползание переходит в плавание при пересечении границы между гелем и жидкостью. В жидкости две полосы подкрашены зеленым цветом для визуализации движения частиц.

4.6. Об особенностях параллельной реализации и вычислительной производительности Sibernetic

При моделировании динамики жидкости в трехмерном пространстве как эйлеровыми, так и лагранжевыми методами, вычислительная производительность является важной характеристикой алгоритма и его программной реализации. Для работы с параллельными вычислениями была выбрана платформа OpenCL, предназначенная для создания приложений, связанных с вычислениями на гетерогенных вычислительных системах [Munshi et al., 2011]. Основными преимуществами OpenCL являются открытость стандарта и поддержка большинством основных производителей как комплектующих, так и программного обеспечения, например Intel, AMD, NVIDIA (более подробный список на сайте OpenCL⁴⁶), позволяющими выполнять код на различных устройствах - GPU, CPU, FPGA. OpenCL обеспечивает параллелизм на уровне инструкций и на уровне данных и является реализацией техники GPGPU [Munshi et al., 2011]. В качестве архитектурного каркаса был выбран паттерн проектирования MVC [Рогачев, 2008], предполагающий разделение данных приложения, пользовательского интерфейса и управляющей логики на три отдельных компонента: модель, представление и контроллер – таким образом, что модификация каждого компонента может осуществляться независимо. Управляющая программа, выполняющая функции диспетчера данных и вычислений, релизована на C++, а несущие основную вычислительную нагрузку функции для расчета всех физических взаимодействий между частицами – на OpenCL. Поскольку входными данными для вычисления всех действующих на рассматриваемую частицу сил (на основе которых затем вычисляются новые координаты и скорость), служат координаты и скорости, полученные на предыдущей итерации, и все эти действия для каждой частицы проходят независимо, алгоритм должен хорошо распараллеливаться по данным, что и подтверждается на практике. Также имеется возможность графической 3D

⁴⁶ <http://www.khronos.org/opencv/>

визуализации и взаимодействия пользователя с симулятором во время его работы. Если же этого не требуется, то для ускорения вычислений визуализация может быть отключена. Возможности Sibernetiс и опции командной строки подробно описаны в документации⁴⁷.

В случае использования OpenCL дополнительным преимуществом является возможность рассчитать и сравнить производительность для доступных в системе CPU и GPU, а затем пользоваться наиболее мощным вычислительным устройством. При работе с Sibernetiс тестирование и расчеты производились на CPU Intel Core i5-2500K (4 ядра, 0.48 TFLOPS⁴⁸) и GPU AMD Radeon R9 290X (2816 потоковых процессоров, 5.6 TFLOPS, частота памяти – 1250 МГц, объем памяти - 4096 Мб). Результаты измерения среднего времени выполнения различных этапов алгоритма (в расчете на 1 шаг численного интегрирования по времени для всей моделируемой системы частиц) при использовании конфигураций с различным числом частиц, от 250 тысяч до 1.5 миллиона, представлены в Таблице 8. Для большей наглядности зависимость числа кадров в секунду (FPS) от времени также представлена в графическом виде (см. Рис. 4.35):

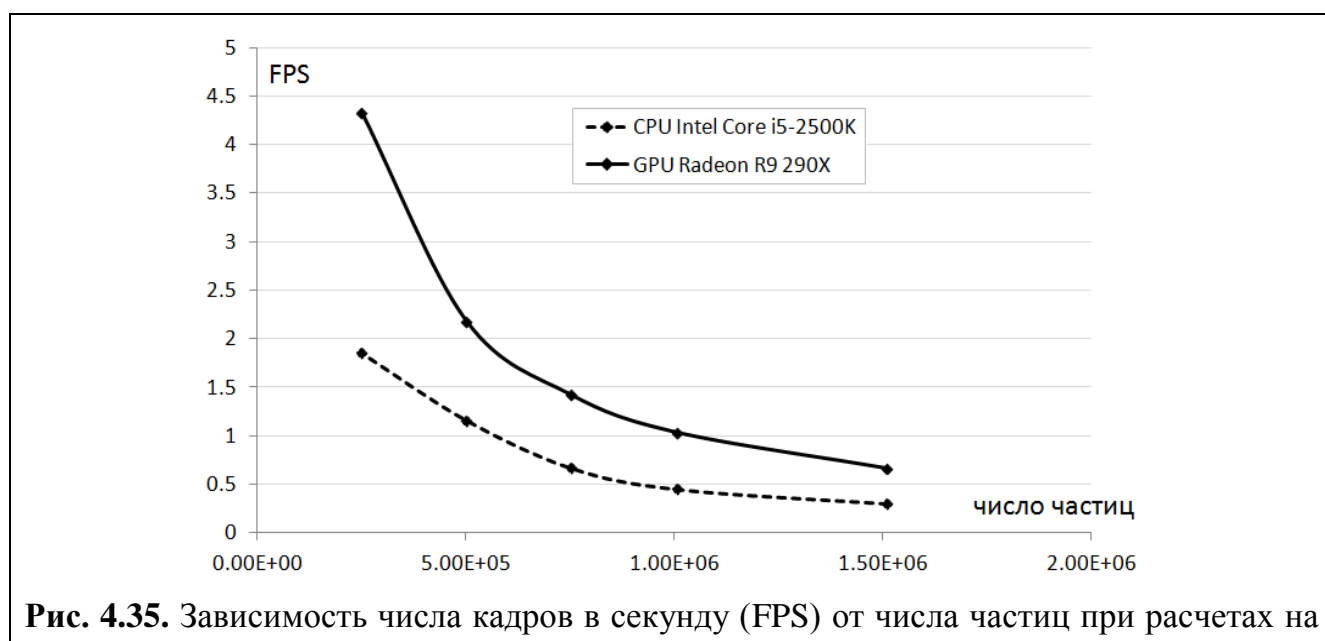




Рис. 4.35. Зависимость числа кадров в секунду (FPS) от числа частиц при расчетах на

⁴⁷ <https://github.com/openworm/sibernetiс/blob/development/README.md>

⁴⁸ TFLOPS (от англ. FLoating-point Operations Per Second) – число триллионов операций с плавающей запятой в секунду, выполняемых вычислительной системой

CPU и GPU в системе Sibernetic.

Таблица 8. Результаты измерения среднего времени выполнения различных этапов алгоритма на CPU и GPU. FPS – Frames Per Second – число кадров в секунду. Данные приведены в расчете на 1 шаг численного интегрирования по времени для всей моделируемой системы частиц

		Intel Core i5 2500K, 3.3 GHz				
Число частиц	FPS	Сортировка, мс	Поиск соседей, мс	Расчет физики, численное интегрирование, мс	Общее время работы алгоритма, мс	Визуализация, мс
1510425	0.30	154	1078	1661	2931	484
1006425	0.45	103	635	1163	1930	317
750683	0.67	72	475	690	1259	238
500225	1.16	47	298	241	700	158
250305	1.85	23	194	154	381	87
		GPU AMD Radeon R9 290X				
Число частиц	FPS	Сортировка, мс	Поиск соседей, мс	Расчет физики, численное интегрирование, мс	Общее время работы алгоритма, мс	Визуализация, мс
1510425	0.67	158	190	636	1033	470
1006425	1.04	102	118	423	651	317
750683	1.43	74	88	294	462	240
500225	2.19	48	58	190	300	156
250305	4.33	24	30	91	148	81

Как видно из Таблицы 8, производительность при расчетах на GPU оказалась примерно в 2 – 2.5 раза выше чем, на CPU (для указанных устройств). Довольно неожиданным оказалось последующее тестирование на графической карте NVidia GTX 980 Ti с практически идентичными характеристиками (2816 потоковых процессоров, 5.6 TFLOPS, частота памяти – 1753 МГц, объем памяти - 6144 Мб), но иной архитектурой, показавшее приращение производительности почти в 2 раза относительно R9 290X.

Также было произведено тестирование производительности Sibernetic в сравнении с другими алгоритмами симуляции динамики жидкости:

Таблица 9. Результаты сравнения производительности различных реализаций SPH и PCISPH. Значения, отмеченные «*», получены в результате линейной аппроксимации, поскольку именно такой характер зависимости времени работы алгоритма на протяжении одного шага численного интегрирования системы от времени получился в Sibernetic при использовании CPU (величина достоверности аппроксимации $R^2 = 0.997$).

Название	Алгоритм	Устройство, платформа	Среднее время на 1 шаг, мс	Количество частиц
Bullet-Fluid	SPH	GPU NVIDIA Tesla C1060, OpenCL	70	65536
Goswami et al., 2010	SPH	GPU NVIDIA GeForce GTX280, CUDA	89	75200
Solenthaler et al., 2009	PCISPH	Intel Core2 Quad, 2.66 ГГц (1 поток)	722 473*	100000 65536
Solenthaler et al., 2009	PCISPH	Intel Core2 Quad, 2.66 ГГц (4 потока, OpenMP)	218 143*	100000 65536
Sibernetic	PCISPH, эластичное тело, мембраны	GPU NVIDIA Tesla C1060, OpenCL	125	65536
Sibernetic	PCISPH, эластичное тело, мембраны	CPU Intel Core i7-2700K (3.5 ГГц), OpenCL	139	65536
Sibernetic	PCISPH, эластичное тело, мембраны	GPU AMD Radeon R9 290X, OpenCL	82.8	65536

Таким образом, несмотря на то, что по сравнению с симуляторами динамики жидкости *Sibernetic* дополнительно «нагружен» механизмами поддержки типов данных, необходимых для моделирования биологических объектов, его быстродействие не уступает имеющимся реализациям SPH/PCISPH.

4.7. О связи между активностью кальция в мышечных клетках *C. elegans* в процессе ползания, их сокращением и формой тела.

Данный раздел, завершающий **Главу 4**, посвящен «наведению мостов» между экспериментом и моделированием на уровне «мышечная система – биомеханика движения». Отметим, что к настоящему времени благодаря исследованиям, выполненным в рамках данной диссертационной работы, уже были получены следующие результаты:

- Впервые осуществлена трехмерная симуляция движения *C. elegans* в режиме ползания и в режиме плавания, в которой тело нематоды и внешняя среда (жидкость и агар) были представлены в явном виде;
- Впервые оба типа движения и переход между ними были продемонстрированы в составе единой симуляции;
- Показано, что использование типичных (для ползания и плавания) значений частоты и длины волны синусоидальных сигналов, управляющих мышечной системой, приводит к движению в соответствующей среде со скоростями, наблюдавшимися в экспериментах;
- Продемонстрирована возможность осуществления реверса в режиме ползания;
- Показано, что модель тела *C. elegans* способна посредством соответствующего паттерна сокращения мышц принимать формы, характерные для реальной нематоды;
- Показано, что при использовании данной модели тела *C. elegans* и симулятора *Sibernetic* возможно воспроизвести режим движения тела, продемонстрированный в эксперименте [Fouad et al., 2018], в котором

передняя часть осуществляет синусоидальные движения на одной частоте, а задняя – на другой в результате искусственного выключения взаимодействия между ними.

В 2016 г. были впервые получены экспериментальные данные об активности мышечных клеток *C. elegans* в процессе движения организма: была осуществлена видеозапись⁴⁹, на которой у свободно движущейся по поверхности агара нематоды визуализирована концентрация ионов Ca^{2+} в её мышечных клетках [Lefebvre et al., 2016] в течение 20 секунд с интервалом в 0.1 с. Пример такой визуализации представлен на Рис. 4.36.

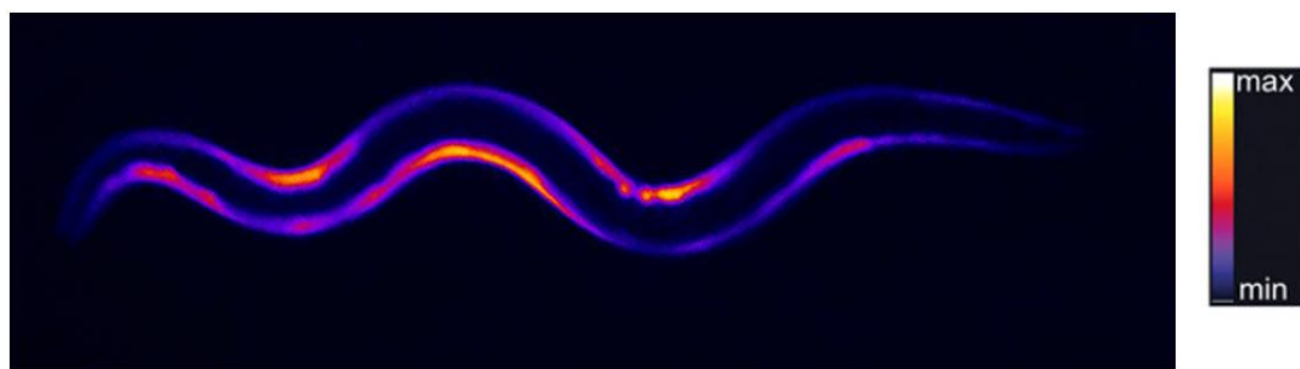


Рис. 4.36. Визуализация активности мышечных клеток *C. elegans* на основе концентрации ионов Ca^{2+} в них (кадр из видеозаписи²⁰ [Lefebvre et al., 2016]).

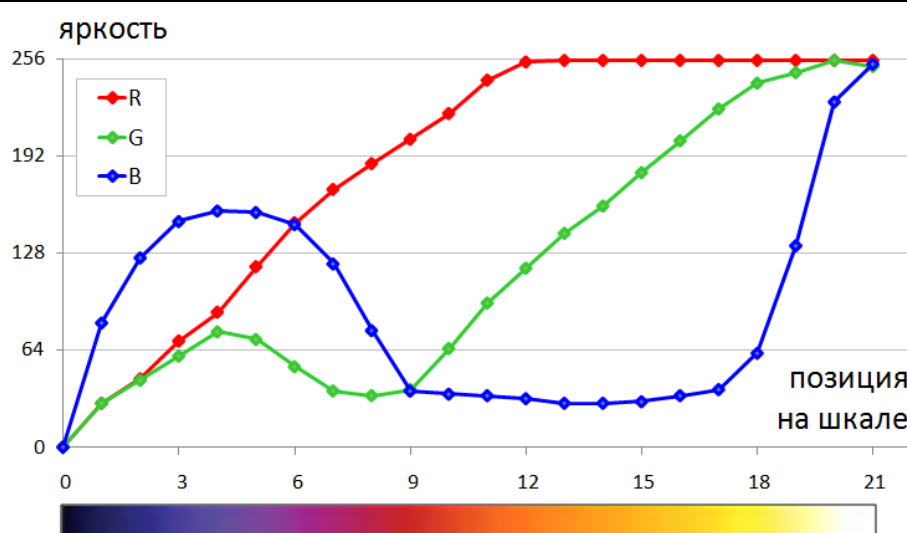


Рис. 4.37. Кривые интенсивности цветовых компонент (красного, зеленого и синего) для шкалы, определяющей интенсивность флуоресценции на Рис. 4.36. Эти данные необходимы для последующей оцифровки активности мышечных клеток.

⁴⁹ <https://www.youtube.com/watch?v=x861P1ijpR8>

Приведенная на нем и кажущаяся линейной шкала интенсивности флуоресценции на самом деле включает в себя следующие зависимости цветовых компонент (см. Рис. 4.37), которые в дальнейшем будут использованы для анализа кадров видеозаписи. Видеозапись флуоресценции как индикатора мышечной активности открывает потенциальную возможность проверить нашу модель в еще более реалистичных условиях и при необходимости осуществить её настройку или доработку. Такой подход позволит разделить настройку параметров и проверку достоверности и без того сложной многоуровневой модели на два независимых этапа – на уровне тела, управляемого мышечными клетками, и отдельно на уровне нервной системы.

В рамках данной работы вышеупомянутая видеозапись была использована в качестве исходных данных. Для их обработки автором была осуществлена следующая последовательность действий:

- С помощью программы VirtualDub⁵⁰ осуществлено разделение видеозаписи на отдельные кадры (с разрешением 1392x1040 пикселей);
- Разработана специальная программа, анализирующая каждый кадр видеозаписи, определяющая контур тела *C. elegans*, извлекающая из него ряд необходимых характеристик и осуществляющая их запись в файл для последующего анализа и использования;
- Созданная программа также осуществляет визуализацию считанных значений мышечной активности (полученных при разбиении тела нематоды на 100 сегментов в продольном направлении), порождая последовательность модифицированных кадров, которые затем с помощью VirtualDub снова собираются в видеофайл.

⁵⁰ <http://www.virtualdub.org/>

Программа для анализа кадров видеозаписи [Palyanov, 2018] создавалась таким образом, чтобы обеспечивать стабильную работу на всей их последовательности без участия человека. При этом был применен и оказался полезен прежний опыт автора в области разработки приложений для распознавания образов [Пальянов, Ратушняк, 2014; Guzhavina et al., 2009].

Первая проблема, которую пришлось решить для достижения поставленной цели – определение контура тела нематоды. Она заметно сложнее, чем аналогичная задача для обычного (не в режиме флюоресценции) изображения или видеозаписи *C. elegans*, полученных с помощью микроскопа, которая ранее уже успешно решалась [Yemini et al., 2011; Likitlersuang et al., 2012; Wang and Wang, 2013; Пальянов, Ратушняк, 2014 и др.]. При обычной съемке разность между яркостью фона и тела нематоды является более чем достаточной для их однозначного разделения, а в режиме флуоресценции этой разницы практически нет (за исключением областей, соответствующих мышечным клеткам). Фоновое изображение, хотя и кажется черным, однако в численном представлении на нем присутствуют флуктуации и артефакты, характеристики которых зачастую совпадают с таковыми для некоторых областей внутри контура тела *C. elegans*, которые иногда сообщаются с фоновой областью, поэтому просто задать пороговое значение яркости или иным простым способом отделить нематоду от фона не получается.

В общем, типичная задача из области компьютерного зрения – не представляет сложности для человека, но довольно затруднительна для автоматического анализа с помощью компьютера. Различные попытки решения данной проблемы, предпринятые автором, привели к обнаружению следующего успешно справляющегося с ней подхода:

- 1) На основе исходного цветного изображения создается копия, которая преобразуется в «градации серого», где значение 0 соответствует черному цвету, а 255 - белому. В получившемся изображении наиболее яркие пиксели соответствуют максимальным значениям концентрации ионов кальция, а близкие

к нулю – фону или внутренней области *C. elegans* в области продольной средней линии (их значения находятся в пределах 0-35); при этом боковые области тела нематоды соответствуют небольшим (при отсутствии мышечной активности) значениям, которые, однако, заметно превосходят таковые для фона;

2) Определяем все пиксели изображения, яркость которых превышает порог = 35. В результате, как правило, получается целая или, реже, раздвоенная область (пример – Рис. 4.39 В).

3) Осуществляем расширение полученной области, преобразуя каждый её пиксел в окружность с радиусом в 20 пикселей (пример – Рис. 4.39 С); в случае раздвоенной области это обеспечивает перекрытие сигналов от левого и правого мышечных тяжей, и в итоге - цельный, не раздваивающийся на некоторых кадрах на две продольные компоненты контур тела. На упомянутом примере ветвление видно в области хвостовой части.

4) Следующий шаг – получение средней линии, проходящей вдоль тела нематоды от головы к хвосту. Для этого был выбран один из возможных подходов – применение алгоритма скелетизации объектов Зонга-Суня [Zhang and Suen, 1984], который посредством многократного последовательного утоньшения области, занимаемой объектом, вычисляет «скелет изображения» толщиной в 1 пиксел (что и является критерием остановки алгоритма). Примеры применения данного алгоритма показаны на Рис. 4.38:

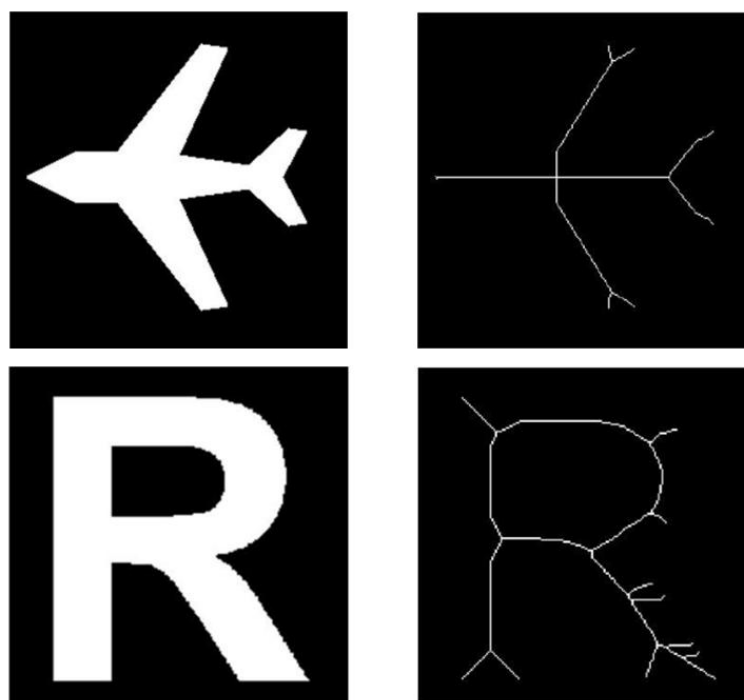


Рис. 4.38. Примеры применения алгоритма Зонга-Суня. Слева – исходные изображения, справа – полученные «скелеты изображений». Источник: <http://www.myshared.ru/slide/685703/>, с. 21,24.

Для создания программы анализа кадров видеозаписи данный алгоритм был реализован на C++. Видно, что острые и прямые углы порождают ветвление там, где интуитивно ожидается одиночная линия. Разбор подобных «деревьев» в общем случае может быть достаточно затруднительным, однако в случае работы с изображениями нематоды этой проблемы удалось избежать посредством осуществления сжатия и сглаживания области, занимаемой на изображении телом *C. elegans*, предварительно определенной на предыдущем шаге алгоритма.

5) Сжатие (сужение) и сглаживание было реализовано следующим образом: для всякой окружности с радиусом 30 пикселей, касающейся обрабатываемой области на стадии, соответствующей Рис. 4.39,С, вычисляется угол между центром окружности и крайними точками области, попавшей внутрь круга. Если он составляет менее 36 градусов, то пиксели внутри круга исключаются из области. Параметры радиуса и угла подобраны эмпирически и обеспечивают корректную работу алгоритма на всех кадрах видеозаписи. Пример результата выполнения данного шага алгоритма приведен на Рис. 4.39 D).

б) К полученной ранее области тела нематоды применяется упомянутый выше алгоритм Зонга-Суня для получения средней линии, идущей вдоль тела. Результат показан на Рис. 4.39 Е.

7) Ввиду особенности применяемого алгоритма полученная средняя линия не достигает головного и хвостового концов, однако, их координаты необходимы для дальнейшей работы. Для их получения на основе имеющихся точек, составляющих среднюю линию, в её начальной и конечной точках строятся касательные, которые продолжают до пересечения границы области тела с фоном. Средняя линия дополняется достроенными участками. Определяется, какой из двух концов является головным, а какой – хвостовым (в головном отделе яркость флуоресценции заметно выше). При анализе последующих кадров дополнительно осуществляется сравнение расстояния между текущей и предыдущей позицией головного конца с расстоянием между текущей позицией головного конца и предыдущей позицией хвостового конца, чтобы исключить для них возможность поменяться местами в случае, если на каком-либо кадре будет нарушено характерное соотношение между яркостями головного и хвостового концов.

8) Средняя линия делится на 100 равных сегментов, разделяемых 101-й точкой. Для всех точек, кроме первой и последней, строятся отрезки, ортогональные к средней линии, которые продолжают в обе стороны на расстояние, соответствующее максимальной ширине тела нематоды.

9) Определение максимального уровня флуоресценции на правой и левой сторонах каждого сегмента тела. Для каждого отрезка, исходящего из средней линии на границе между двумя соседними сегментами и ортогонального ей, определяется цвет каждого пиксела (вдоль рассматриваемого отрезка) в исходном цветном изображении и используется для вычисления расстояния в трехмерном цветовом пространстве RGB (между данным цветом и каждым из цветов шкалы интенсивности флуоресценции, представленной на Рис. 4.37). То положение на шкале, для которого это расстояние минимально, и будет искомым. В итоге полу-

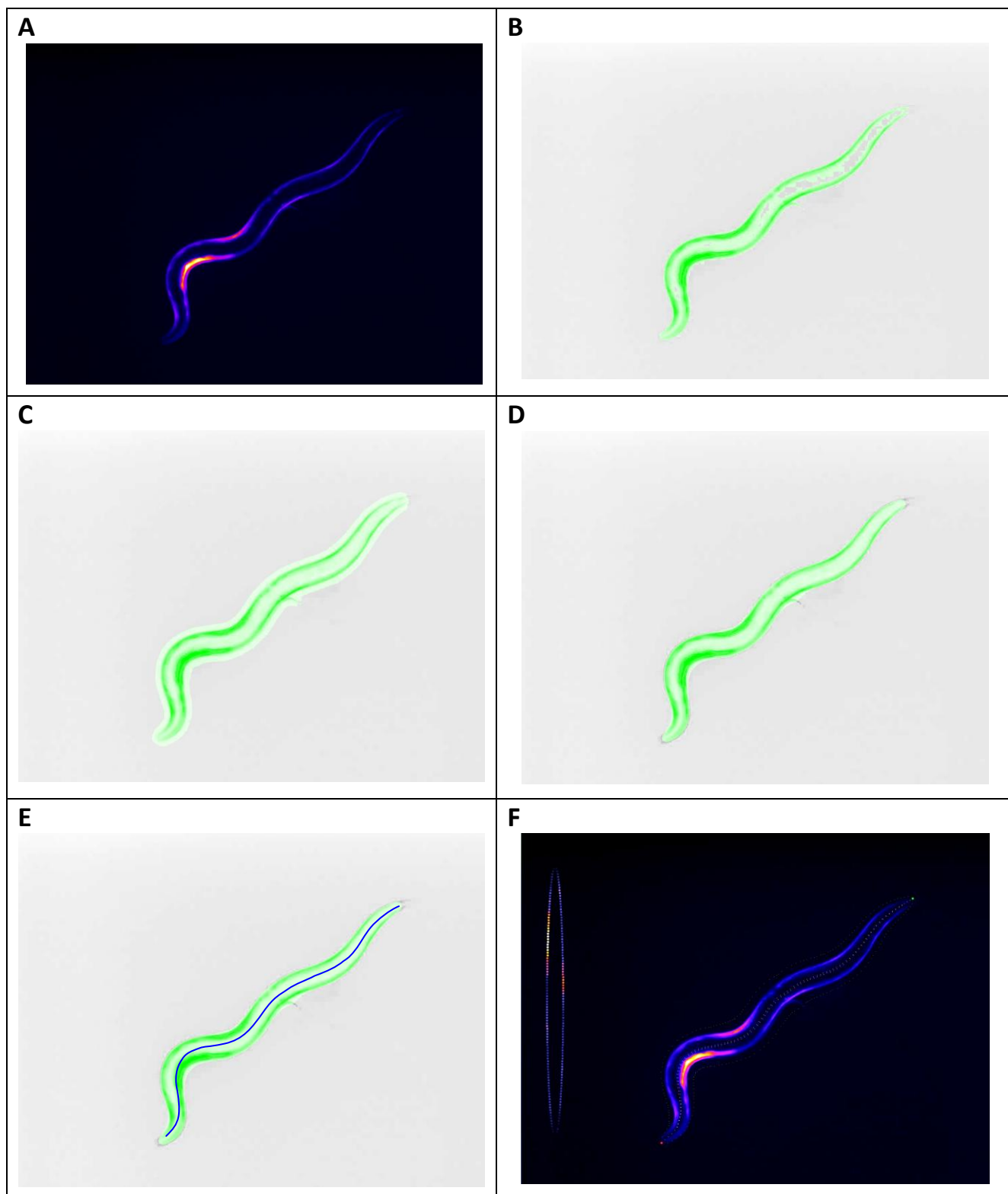


Рис. 4.39. А) исходный кадр; В) зеленым цветом подсвечены пиксели изображения, яркость которых превышает величину 35 (для улучшения отображения рисунков в печатном виде изображения D-E представлены в инвертированном виде); С) результат расширения найденной ранее области; D) результат сжатия и сглаживания области; E) результат вычисления средней линии нематоды; F) финальный результат обработки кадра.

чаем два одномерных массива значений (для левой и правой сторон), каждый из 100 элементов.

10) Для проверки корректности определения значений интенсивности флуоресценции на каждом кадре осуществляется визуализация – значения элементов обоих массивов, соответствующим левой и правой сторонам тела, добавляются к имеющемуся кадру в форме статичного прямого контура тела, расположенного в верхнем левом углу кадра (голова – вверху, хвост – внизу).

11) Исходный кадр также дополняется следующими графическими элементами: красная точка, обозначающая головной конец; зеленая точка, обозначающая хвостовой конец; белые точки, обозначающие ход средней линии; зеленый пунктир вокруг тела, обозначающий края области тела с некоторым запасом, чтобы избежать наложения на исходное изображение.

12) На Рис. 4.10 С представлена схема расположения мышечных волокон в модели тела, разработанной автором для использования в симуляторе *Sibernetic*, которая также содержит 100 сегментов в длину. На каждую мышечную клетку в модели или в теле реальной нематоды, в зависимости от её положения в теле и её размера, приходится от нескольких до десятка различных значений интенсивности флуоресценции, полученных при описанном выше анализе изображения. Чтобы сопоставить активности мышечной клетки одно значение в момент времени, соответствующий рассматриваемому кадру видеозаписи, все значения, интенсивности флуоресценции, попавшие в область, соответствующую рассматриваемой мышечной клетке, усредняются.

Одним из результатов проделанной работы является видеозапись⁵¹, составленная из обработанных кадров с тем же временным интервалом между ними, на которой помимо оригинального изображения показаны результаты распознавания и оцифрованной мышечной активности. Визуализация профилей мышечной активности вдоль тела (для левой и правой групп мышц) и в зависимости от времени выглядит следующим образом (см. Рис. 4.40):

⁵¹ <https://www.youtube.com/watch?v=Bs72aNroKx0>

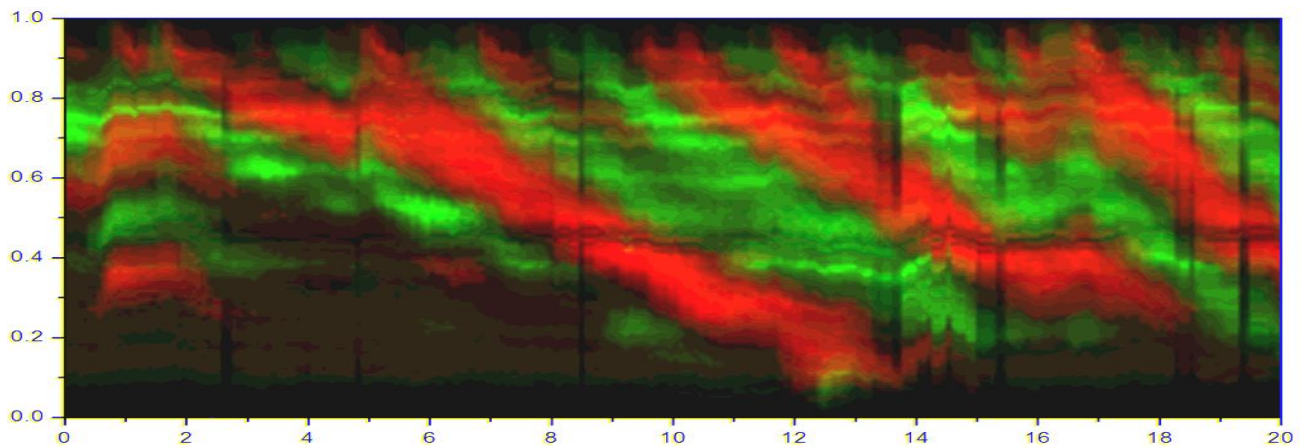


Рис. 4.40. Мышечная активность в зависимости от положения вдоль тела (1 – голова, 0 – хвост), от времени (в секундах) для левой и правой групп мышц: зеленый цвет – для левой стороны, красный – для правой.

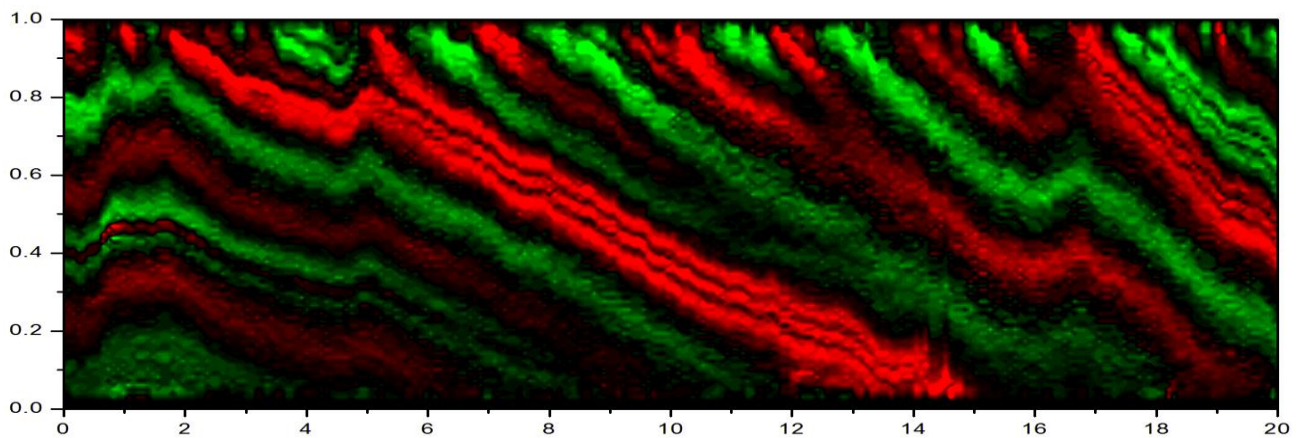


Рис. 4.41. Зависимость профиля кривизны тела *C. elegans* от времени (в секундах), основанная на результатах анализа видеозаписи. Красный цвет – локальный изгиб вправо, зеленый – влево.

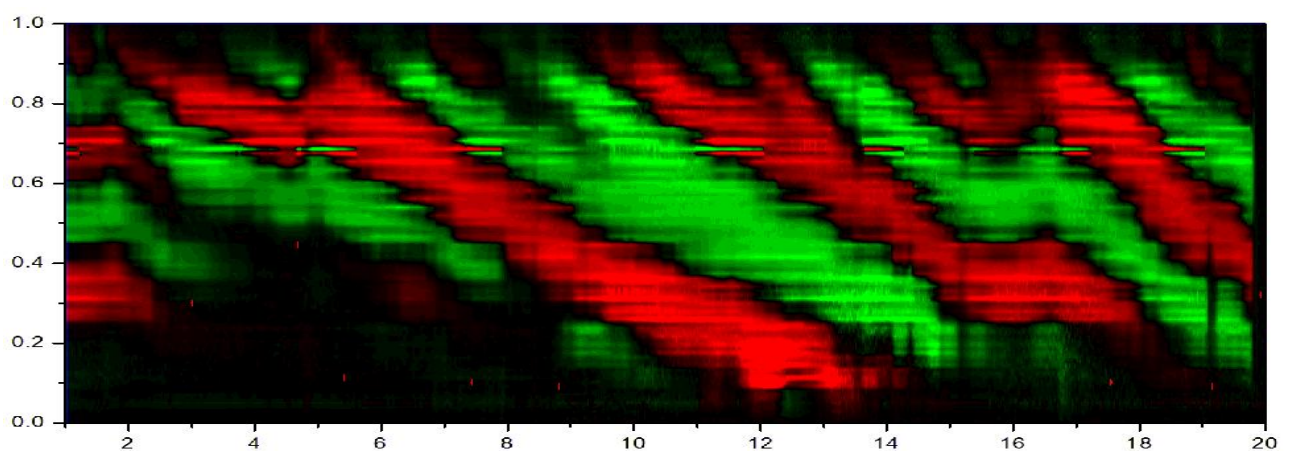


Рис. 4.42. Зависимость профиля кривизны тела *C. elegans* от времени (в секундах), основанная на результатах анализа симуляции в Sibernetica. Красный цвет – локальный изгиб вправо, зеленый – влево.

На Рис. 4.40 преобладают длинные узкие области, как красные, так и зеленые, направленные диагонально из верхнего левого угла ниже и правее – они соответствуют движению нематоды вперед. Более редкие и короткие участки, направленные вверх-вправо, соответствуют движению назад (оно действительно отчетливо заметно при просмотре видеозаписи).

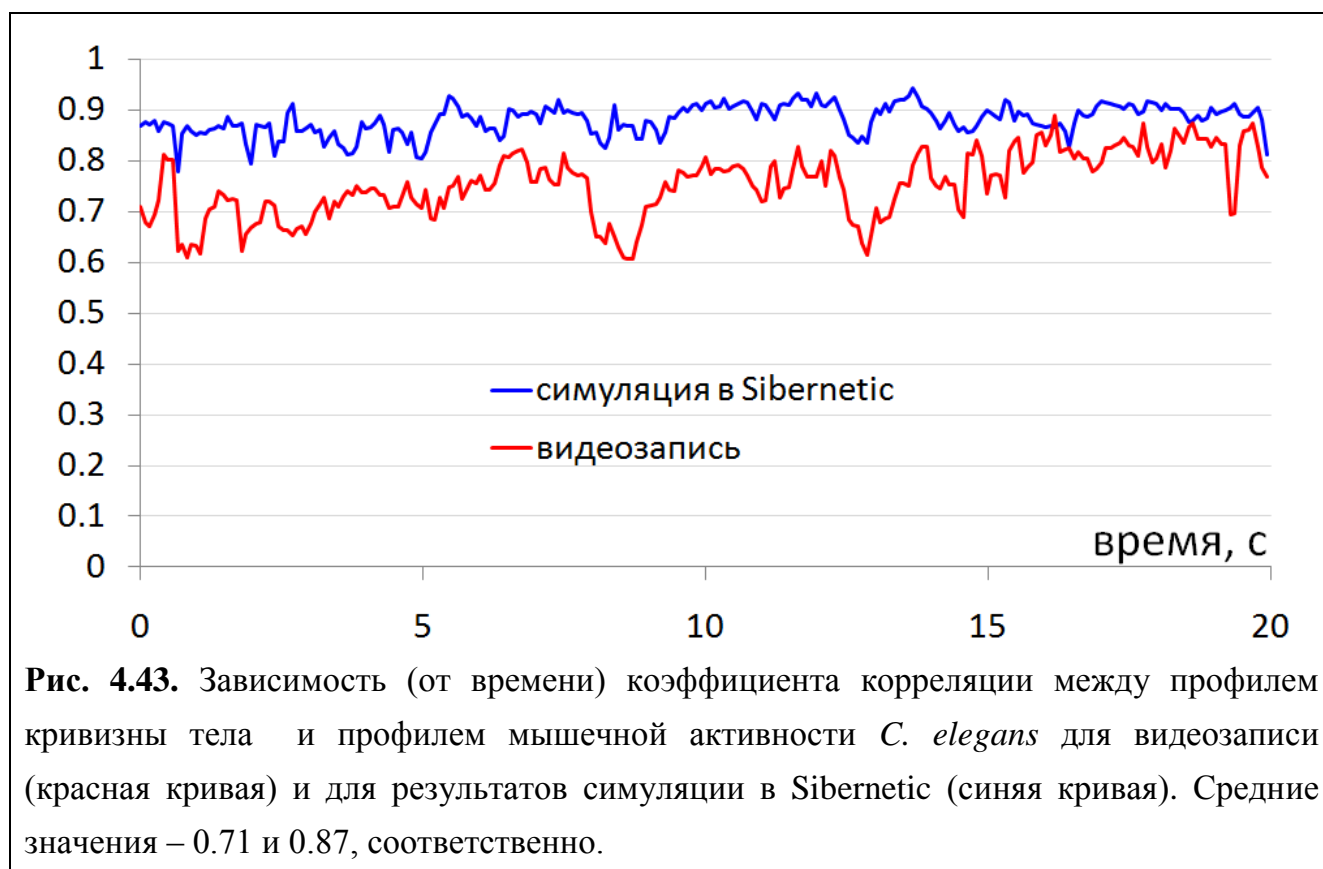
Координаты точек вдоль средней линии тела *C. elegans*, также полученные в результате анализа видеозаписи для каждого её кадра, позволили рассчитать профиль кривизны тела в зависимости от времени, аналогично тому, как это ранее было описано в разделе 4.2. Результаты представлены на Рис. 4.41.

Полученные в результате оцифровки данные были использованы для управления активностью мышечных клеток модели тела *C. elegans* в *Sibernetis*. В ходе симуляции была рассчитана траектория движения по поверхности агара, на основе которой также была построена зависимость профиля кривизны тела от времени (см. Рис. 4.42).

Данная зависимость профиля кривизны от времени визуально значительно более похожа на зависимость профилей мышечной активности (коэффициент корреляции между ними составил 0.87), чем на профиль кривизны, извлеченный из видеозаписи. Впрочем, и для него некоторая корреляция имеется. Расчеты показывают, что среднее значение коэффициента корреляции между профилем мышечной активности и профилем кривизны тела (полученным посредством анализа видеозаписи), после усреднения по времени, составляет 0.71. Обе упомянутые зависимости коэффициентов корреляции от времени показаны на Рис. 4.43.

Разница между реальной траекторией и результатом симуляции движения, осуществляемого под действием такого же пространственно-временного паттерна активации мышечных клеток *C. elegans*, оказалась при первом запуске весьма значительной. Оптимизация параметров, определяющих свойства мышечных клеток, тела нематоды и внешней среды несколько улучшила ситуацию, однако

приемлемого сходства реальной траектории и траектории из симуляции добиться не удалось.



Попытки разобраться в причинах такого положения дел привели к выяснению следующих фактов:

- На некоторых кадрах видеозаписи активность мышечных клеток (исходя из интенсивности флюоресценции) для каждого из участков тела имеется либо на левой, либо на правой его стороне, и в этом случае форма тела в реальности в симуляции оказываются практически одинаковыми;
- Встречаются кадры, на которых мышечные клетки являются активными одновременно на левой и правой сторонах одного и того же участка (участков) тела (см. Рис. 4.44);
- Преимущественно на участках видео, относящихся ко второму типу (с перекрыванием мышечной активности на левой и правой сторонах) наблюдается наибольшее расхождение между видеозаписью и результатом симуляции.

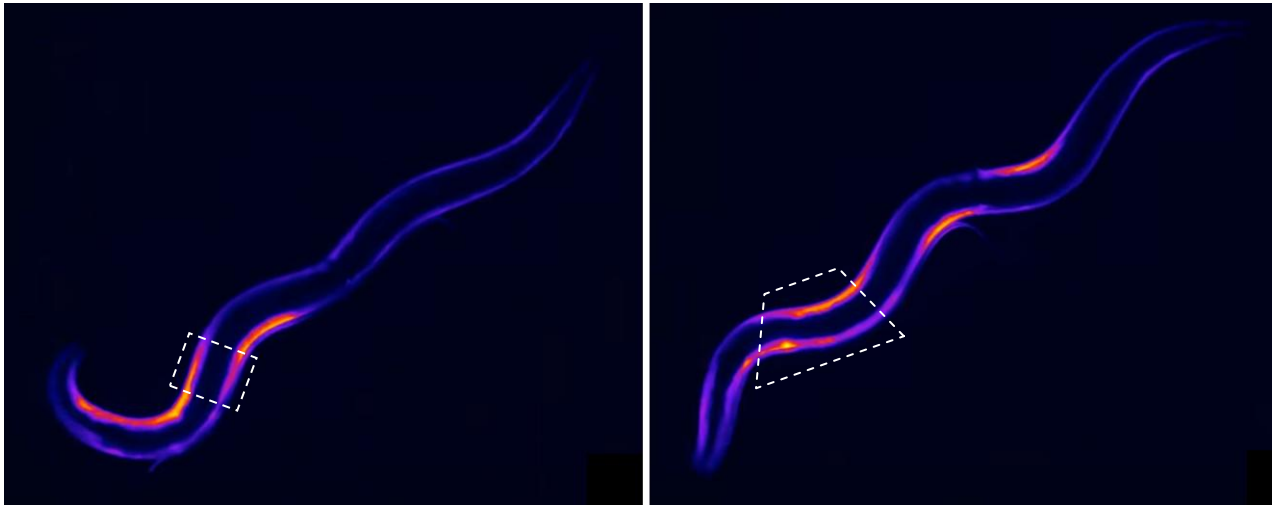


Рис. 4.44. Примеры одновременной мышечной активности на левой и правой сторонах тела. Источник: [Lefebvre et al., 2016, Supplementary materials]

Однако, согласно данным об устройстве нервно-мышечной системы *C. elegans* [Schuske et al., 2004], существует механизм, благодаря которому активация мышечной клетки с одной стороны тела незамедлительно приводит к подавлению активности мышечной клетки на противоположной стороне тела (см. Рис. 4.45).

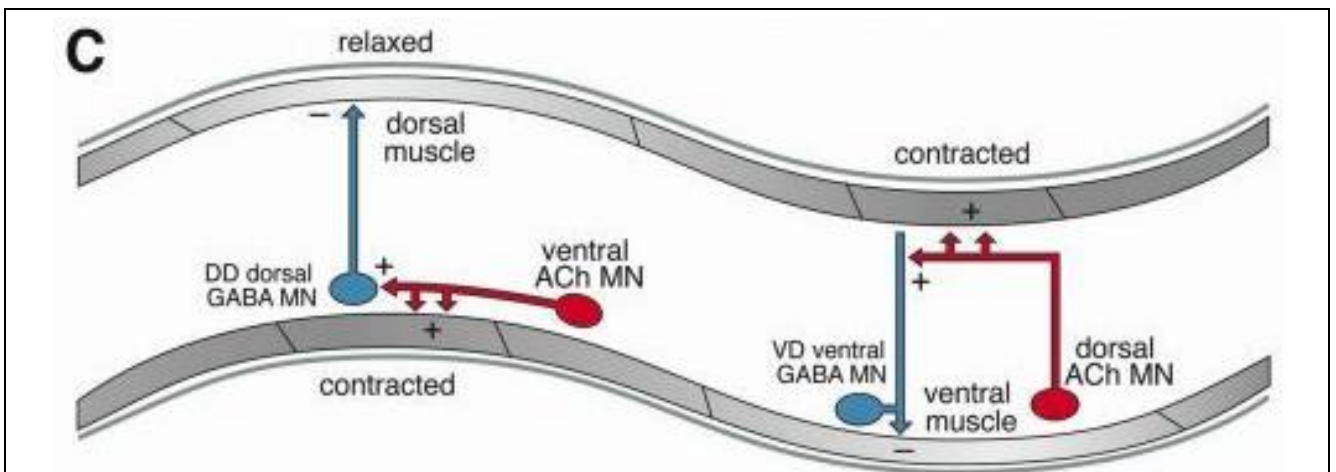


Рис. 4.45. Связи между мышечными клетками и нейронами, ответственные за подавление мышечной активности на противоположных сторонах тела. При активации ацетилхолинового моторного нейрона (показаны красным) на одной из сторон тела происходит активация мышечной клетки на этой же стороне тела и активация ГАМК-эргического моторного нейрона D-типа (показаны синим), подавляющего мышечную активность на противоположной стороне тела. Источник: [Schuske et al., 2004, Fig. 2].

Нейромышечные структуры, показанные на Рис. 4.45, расположены на всей протяженности брюшной нервной цепочки. Этот механизм может быть нарушен только в некоторых мутантных формах *C. elegans*, у которых нарушена передача нейромедиатора ГАМК, однако относительно анализируемой видеозаписи известно, что это исходная, немутантная генетическая линия нематоды (т.н. WT, wild type, «дикий тип»). Получается, что уровни активности ионов кальция, основанные на интенсивности флуоресценции, не в полной мере отражают реальную мышечную активность. Реализовав механизм кросс-подавления сигналов мышечной активности, подобный представленному на Рис. 4.45, в *Sibernetica*, удалось получить значительно более приемлемое сходство между траекторией движения нематоды на видеозаписи и в симуляции. Однако еще более удачные результаты были получены при использовании профиля кривизны тела (представленного на Рис. 4.41), преобразованного в мышечные сигналы для левой и правой половин тела (красный и зеленый цвет на рисунке, соответственно).

Таким образом, анализ видеозаписи и использование извлеченных из неё паттернов мышечной активности при симуляции движения *C. elegans* показали, что хотя между ними имеется корреляция с коэффициентом $= 0.71$, однако однозначного соответствия между интенсивностью флуоресценции ионов кальция и мышечной активностью (силой сокращения мышечных клеток) не наблюдается. Поскольку в последние годы этот же метод, основанный на флуоресценции ионов кальция, активно используется для регистрации активности нейронов *C. elegans* [Schrödel et al., 2013; Nguyen et al., 2016; Nguyen et al., 2017], исследователям необходимо обратить особое внимание на проверку корректности получаемых при этом результатов – например, посредством сравнения с данными записей электрофизиологической активности нервных клеток при прямом подключении к ним.

Глава 5. На пути к биологически обоснованному моделированию динамики нейронной активности в нервной системе *C. elegans*

Данная глава посвящена исследованию перспектив биологически обоснованного моделирования динамики нейронной активности в нервной системе *C. elegans*. Рассматриваются объекты от структурной организации нервной системы в целом до отдельных нейронов, ионных каналов и ионных токов [Пальянов, Ратушняк, 2014; Palyanov, Samoilova et al., 2016; Palyanov, Samoilova et al., 2017].

5.1. Об архитектуре нервной системы *C. elegans*

Нервная система *C. elegans* благодаря своему небольшому размеру (уже у простейших насекомых и моллюсков нервная система насчитывает до десятков тысяч нейронов) является беспрецедентно детально изученной, но несмотря на это значительная доля механизмов её функционирования по-прежнему остаются непонятыми. В наиболее поздней работе, посвященной реконструкции нервной системы *C. elegans* [Varshney et al., 2011] утверждается, что 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. Авторам данной публикации удалось на основе уже имеющихся и новых серий микрофотографий создать, по их мнению, полную самосогласованную диаграмму связности нейронной сети, включающую 6393 химических синапса, 890 электрических контактов и 1410 нейромышечных соединений (синапсы – области контакта

между парой нейронов или нейроном и мышцей, осуществляющие передачу электрического сигнала от одной клетки к другой). По словам авторов, несмотря на значительный прогресс, диаграмма связности нейронной сети *C. elegans* завершена приблизительно на 90% из-за недостающих данных и технических трудностей. Более подробно этот вопрос уже был рассмотрен в Главе 1 (раздел 1.2). Работа в данном направлении продолжается, в частности, в рамках проекта WormWiring⁵².

Из 302 нейронов значительная часть находится в окологлоточном нервном кольце, окружающем глоточную систему. 20 нейронов входят в состав глоточной нервно-мышечной системы. Еще около 5 десятков нейронов формируют брюшную нервную цепочку, управляющую движением мышц тела, а также имеется небольшой нервный ганглий в хвостовом отделе.

5.2. Об электрофизиологии нейронов *C. elegans*

Нервная система *C. elegans* использует 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, зависящие 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, осуществляет градуальная деполяризация и электротоническое проведение. Предположительно, ионные каналы *C. elegans* адаптированы для этого необычного режима функционирования [Nickell et al., 2002].

⁵² <http://wormwiring.org/series/>

Ключевая роль в электротоническом проведении принадлежит ионам Ca^{2+} , участвующими в генерации тока через возбудимую мембрану нейрона – исключительно важная деталь в свете того, что нейроны *C. elegans* неспособны генерировать ПД [Goodman et al., 1998]. Также кальций выполняет в нервной системе 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-х 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 из 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...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, сами нейроны чрезвычайно малы – всего 2-3 $\mu\text{м}$ [Schafer, 2006]; для сравнения, размеры тела нейрона человека варьируют от 5 до 120 $\mu\text{м}$. Несмотря на описанные сложности, в недавней работе [Piggott et al., 2011] методом фиксации тока (current clamp) удалось провести измерения для сенсорного нейрона ASH и интернейронов AVA, AIB и RIM. Показано, что потенциал покоя RIM 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 [Davis, Stretton, 1989].

Электротоническое проведение сигналов имеет существенные отличия по сравнению с потенциалами действия. Амплитуда и длительность ПД фиксирована 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 длины волокна λ (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·см²), удельного сопротивления аксоплазмы R_i (Ом·см) и диаметра нервного волокна d :

$$\lambda = \sqrt{\frac{d \cdot R_m}{4 \cdot R_i}}, \text{ [Rall, 1989]}$$

Диаметр нервного волокна у нейронов *C. elegans* варьирует в пределах от 0.1 до 0.5 $\mu\text{м}$, 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-х мотонейронах нематоды *Ascaris suum*: R_m лежало в пределах 61-251 кОм·см² (среднее значение 150 кОм·см²), 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·см² (R_m) и от 30 до 250 Ом·см (R_i) [Николлс и др., 2003]. 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 λ (с учетом различных d в пределах от 0.2 до 0.3 $\mu\text{м}$) 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*. Схематическое изображение базовой модели нейрона представлено на Рис. 5.1:

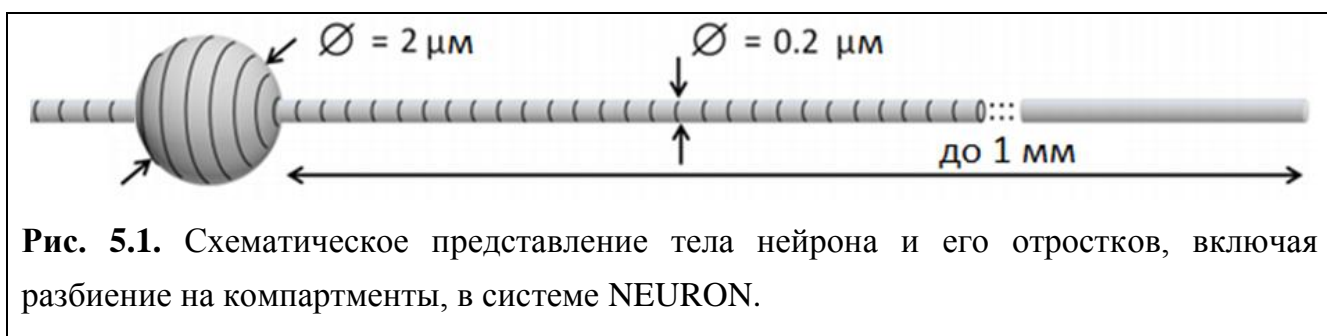


Рис. 5.1. Схематическое представление тела нейрона и его отростков, включая разбиение на компартменты, в системе NEURON.

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 (Эккерт и др.,

1991, Глава 6). 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, Глава 6].

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

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

где C_m – удельная емкость единицы площади мембраны нейрона, составляющая около 1 мкФ/см^2 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 λ и θ зависят одновременно от R_m и R_i , причем различным образом, то максимум и минимум λ вовсе не совпадают с максимумом или минимумом θ . Так, для минимального $\lambda = 0.3 \text{ мм}$ $\theta = 14.4 \text{ мм/с}$, для максимального $\lambda = 1.5 \text{ мм}$ $\theta = 17.4 \text{ мм/с}$; минимальному $\theta = 7.1 \text{ мм/с}$ соответствует $\lambda = 0.63$ и максимальному $\theta = 1.54 \text{ мм/с}$ соответствует $\lambda = 0.76 \text{ мм}$. При этом в результате затухания сигнала на участке нейрита длиной 1 мм его амплитуда составит, предположительно, от 3% (для $\lambda = 0.3 \text{ мм}$) до 51% (для $\lambda = 1.5 \text{ мм}$) относительно исходного значения. Видно, что степень затухания может изменяться достаточно существенно в зависимости от λ , поэтому весьма желательно знать как можно более точное ее значение.

Экспериментальные данные о распространении сигнала вдоль нейрита *C. elegans* длиной 0.35 мм, полученные в работе [Suzuki et al., 2003] позволили рассчитать интервал возможных значений скорости распространения сигнала – от 10 до 25 мм/с, что находится в хорошем согласии с представленной выше оценкой для θ . Для проверки этих расчетов «на практике» описанный в работе [Suzuki et al., 2003] эксперимент был воспроизведен с помощью симулятора NEURON: осуществлена инъекция тока в один конец нейрита и произведено измерение электрической активности на другом его конце. Ток, порождающий исследуемый сигнал, был сгенерирован в результате активности механосенсорного натриевого ионного канала MEC-4, сработавшего при прикосновении к *C. elegans*. Известно, что ионный ток через одиночный ионный канал был равен 1.6 пА и одновременно были открыты примерно 14...25 таких каналов (в течение примерно 10 мс) [O’Hagan, Goodman, 2005]. Сигнал, зарегистрированный на другом конце нейрита, после преодоления дистанции в 1 мм, пришел с задержкой в 0.1 с (что соответствует скорости распространения сигнала, равное 10 мм/с) и с пиковым значением мембранного потенциала, равным -28 мВ (половина пикового значения была достигнута за 0.04 с). В некоторых случаях этого достаточно для активации постсинаптической нервной клетки. Таким образом, предложенная модель довольно хорошо воспроизводит основные свойства нейрона, связанные с передачей сигнала, и может в дальнейшем использоваться как начальная точка для разработки сети взаимодействующих нейронов, воспроизводящих те или иные фрагменты нервной системы *C. elegans*.

5.3. О генерации периодических сигналов в нервно-мышечной системе *C. elegans*

В данном разделе исследуется еще один ключевой вопрос, имеющий прямое отношение к фундаментальным механизмам функционирования нервной системы, а именно – генерация периодических сигналов в ней. У *C. elegans* наблюдается по меньшей мере 3 различных типа периодической мышечной активности, происходящей с различными частотами:

- 1) Синусоидальные движения тела при ползании и плавании в частотном интервале от 0.3 до 2 Гц [Fang-Yen et al., 2010; Shen et al., 2012];
- 2) Сканирующие движения сектора пространства, осуществляемые головным концом для навигации с учетом градиентов концентраций веществ, сигнализирующих о присутствии пищи или об опасности [Croll, 1975];
- 3) Периодические сокращения глоточной мускулатуры, осуществляемые на частоте от 0.5 до 5 Гц (по другим данным – от 0.7 до 4.4 Гц) в зависимости от сытости организма и концентрации пищи [Scholz et al., 2016];

Что является источником осцилляций - во всех случаях неизвестно. Непонятно даже, вызваны они определенной нейронной активностью или же нет. Глоточная нервно-мышечная система состоит всего из 20 мышечных клеток и 20 нейронов и практически полностью изолирована от остального организма, что делает её значительно более простым объектом для изучения. Для периодических сокращений глоточной мускулатуры было показано, что они продолжают (со сниженной менее чем до 1 Гц частотой и потерей скоординированности) даже если уничтожить все нейроны глоточной нервной системы посредством применения лазерной микрохирургии [Avery and Horvitz, 1989]. Также известно, что при определенных обстоятельствах эта активность может быть остановлена самим организмом - в состоянии "сна" в периоды линьки и стресса в ответ на неблагоприятные условия окружающей среды.

С учетом изложенных фактов напрашивается вывод о том, что генерация периодических мышечных сокращений порождается самими мышечными клетками (фоновая активность на низкой частоте), а дополнительное воздействие сигналов от некоторых нейронов (в особенности МС и М4) ее усиливает и регулирует (а в случае состояния «сна», наоборот, подавляет). Как показал анализ литературы по данной теме, в некоторых гладких мышцах потенциалы действия действительно генерируются спонтанно, при отсутствии внешних стимулов, включая клетки глоточной мышечной системы [Rogers et al., 2001] и мышцы,

управляющие движением тела [Liu et al., 2011], однако упоминаний о моделировании подобного механизма для *C. elegans* обнаружить не удалось.

5.4. Генерация периодических сигналов мышечной клеткой глоточной системы *C. elegans*

Для воспроизведения описанных свойств мышечной системы нами был изучен и смоделирован механизм генерации периодических сигналов мышечной клеткой глоточной системы с учетом её геометрических и электрофизиологических параметров, а также основных ионных каналов (Ca^{2+} EGL-19 L-типа и K^+ EXP-2 Kv-типа) и ионных токов (Ca^{2+} , K^+) [Palyanov et al., 2016; Palyanov et al., 2017] с использованием специализированного программного пакета NEURON [Carnevale and Hines, 2006]. NEURON имеет встроенный язык программирования для создания как моделей одиночных нейронов, так и взаимодействующих комплексов и сетей из них, включая трехмерную структуру отростков нейронов и возможность задавать электрические и химические синаптические контакты между ними. В NEURON также имеется Neuron Model Description Language (NMODL) [Hines and Carnevale, 2000; Gleeson et al., 2010] – язык описания модели нейрона, включающий такие структурные уровни модели, как ионные токи, ионные каналы, кальциевые насосы и кальциевые депо, а также иные вне- и внутриклеточные механизмы. Он позволяет значительно расширять стандартный репертуар моделей и механизмов дополнительными, пользовательскими. Имеются репозитории, содержащие загружаемые пользователями модели с их описанием и назначением, например, ModelDB⁵³.

Типичная модель нейрона задается телом нейрона (собственно клеткой) и совокупностью её отростков, которые могут ветвиться. Каждый неветвящийся сегмент (компармент) модели задается цилиндром, определяемым тремя координатами и диаметром в его начальной и конечной точках. Каждый компармент может иметь индивидуальные электрохимические и морфологические параметры, ионные каналы и другие механизмы и как правило

⁵³ <https://senselab.med.yale.edu/modeldb/>

соединен с предшествующим и последующим компартментами, в случае ветвления – сразу с несколькими. Любые две точки, принадлежащие двум различным нейронам, могут быть соединены химическим или электрическим синапсом. Химический синапс проводит сигнал только в одном направлении – от пре-синаптического к пост-синаптическому нейрону, тогда как электрические синапсы (электрические щелевые контакты), в зависимости от их типа, могут проводить сигнал как в одном, так и в обоих направлениях. Типичная временная задержка при прохождении сигнала через химический синапс составляет около 2 мс, через электрический – около 0.2 мс. Оба механизма поддерживаются в NEURON.

NEURON и Sibernetic могут работать в паре и обмениваться данными в ходе симуляции благодаря интерфейсу обмена данными, реализованному на Python – это открывает возможность одновременной симуляции движения тела, вызываемого мышечной активностью, и работы симулятора нервной системы, которая этой активностью управляет [Lung, Larson, Palyanov et al., 2017].

5.4.1. Электрофизиология и ионные каналы мышечной клетки *rm3*

Как уже было упомянуто ранее, классические быстрые натриевые потенциалы действия в нейронах *C. elegans* не были обнаружены, поскольку необходимые для этого потенциал-зависимые натриевые ионные каналы отсутствуют в геноме *C. elegans*. Однако, в случае мышечных клеток (по крайней мере для мышц стенок тела и мышц глоточной системы), которым потенциалы действия необходимы для сокращения (градуальный сигнал от моторных нейронов преобразуется в потенциал действия при превышении порогового значения) у *C. elegans* имеется альтернативное решение – используются так называемые медленные кальциевые потенциалы действия. Белки для сборки соответствующих ионных каналов в геноме *C. elegans* имеются. Основным каналом, формирующим данный тип потенциала действия, является кальциевый канал L-типа EGL-19; определенный вклад также вносит кальциевый канал T-типа CCA-1. Последний активируется уже при небольшой деполяризации (≈ -30

мВ) относительно потенциала покоя (-40...-50 мВ) и поднимает потенциал на мембране до значения, при котором активируется EGL-19, а сам вскоре деактивируется [Steger et al., 2005].

Таким образом, кальциевые каналы Т- и L- типов являются ответственными за деполяризацию (до значений $\approx +30...+40$ мВ) и длинное плато, соответственно. Плато прерывается реполяризацией, обеспечиваемой работой потенциал-зависимого калиевого канала, который отличается у глоточных мышц и мышц стенок тела.

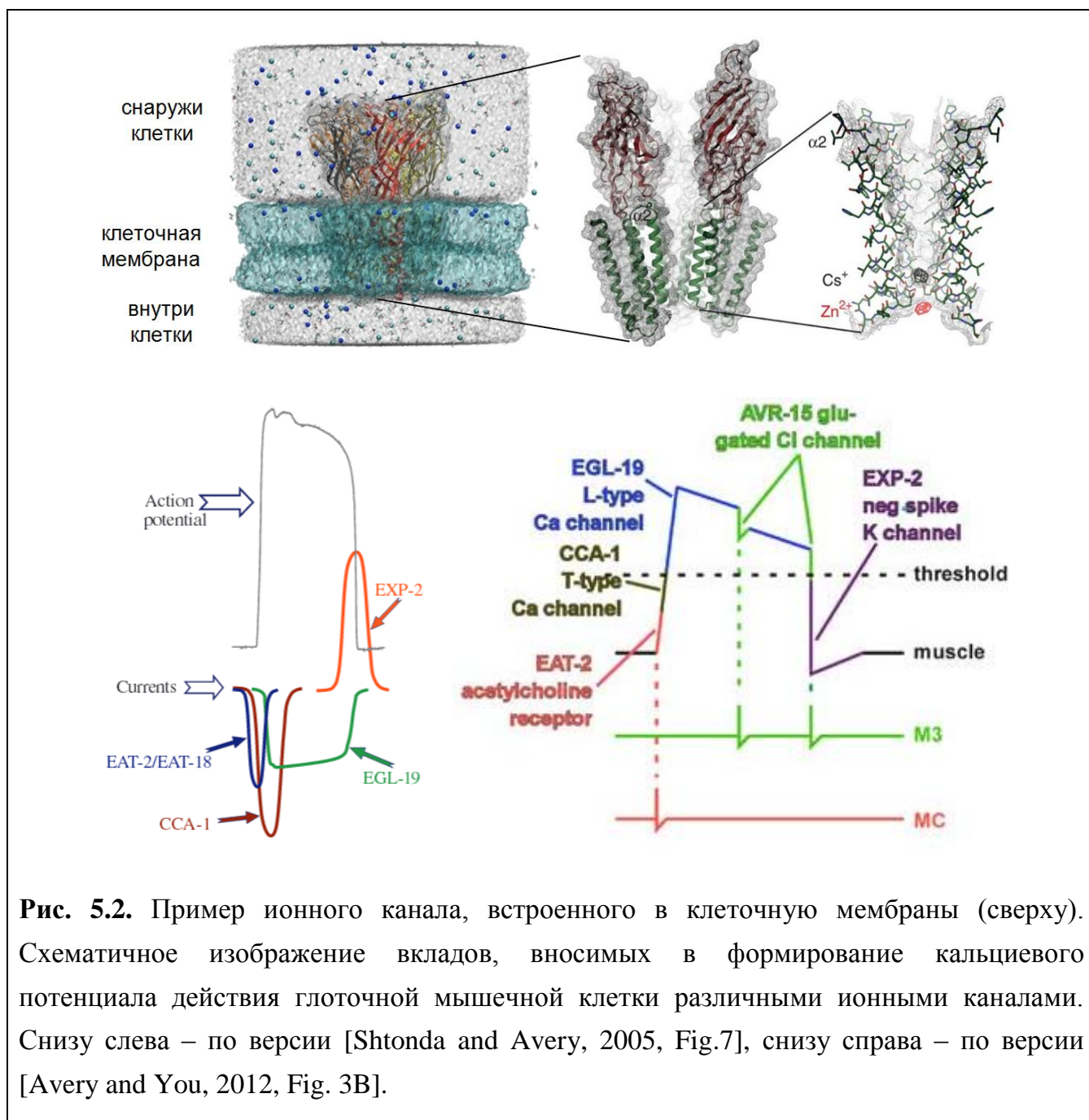


Рис. 5.2. Пример ионного канала, встроенного в клеточную мембраны (сверху). Схематичное изображение вкладов, вносимых в формирование кальциевого потенциала действия глоточной мышечной клетки различными ионными каналами. Снизу слева – по версии [Shtonda and Avery, 2005, Fig.7], снизу справа – по версии [Avery and You, 2012, Fig. 3B].

Длительность потенциала действия в мышцах стенок тела и в мышцах глоточной системы составляет 20 мс и 150 мс, соответственно [Shtonda and Avery, 2005; Liu et al., 2011], что существенно дольше, чем в скелетных мышцах позвоночных животных (менее 2 мс). Для глоточных мышечных клеток были предложены качественные описания формирования потенциала действия и задействованных в этом процессе ионных каналов (Рис. 5.2).

В данном исследовании мы сфокусируемся именно на мышечных клетках глоточной системы, поскольку в этом случае имеется минимально необходимый набор опубликованных экспериментальных данных о них, позволяющий построить модель возникновения потенциала действия. Также отметим, что поиск в литературе не выявил наличия готовой модели, только представленное на Рис. 5.2 качественное представление. При этом пределы применения такой модели не исчерпываются лишь исследованиями мышечной системы *C. elegans*, поскольку родственный механизм также лежит в основе сокращения мышечных клеток сердечной мышцы позвоночных, включая человека. В ней вместо калиевого канала EXP-2 семейства Kv задействован калиевый канал HERG с похожими свойствами – инвертированным пропусканием и инактивационной кинетикой [Strange, 2003]. Типичная инактивация следует за открытием канала, но происходит медленнее. Таким образом, канал проводит ионы когда мембранный потенциал меняется от отрицательного к положительному (пока канал уже открыт, но еще не инактивирован), но не когда мембрана реполяризуется, поскольку в данном направлении канал закрывается быстрее, чем деинактивируется. EXP-2, однако, инвертирует эту логику: он активируется относительно медленно, а инактивируется очень быстро [Fleischhauer et al., 2002]. Таким образом, он проводит ионы только когда мембранный потенциал меняется с положительного на отрицательный. Поскольку открытие каналов EXP-2 позволяет ионам калия выходить из клетки, понижая величину мембранного потенциала, что приводит к открытию большего числа каналов, EXP-2 обеспечивает быстрый регенеративный отрицательный импульс ионного тока, аналогичный положительному импульсу ионного тока натрия, который лежит в

основе роста потенциала на мембране в случае типичного натриевого потенциала действия [Byerly and Masuda, 1979].

5.4.2. Подготовка к моделированию электрофизиологической активности мышечной клетки *rm3*

При разработке модели мышечной клетки глоточной нервной системы *C. elegans* в системе NEURON был выбран следующий набор параметров:

Таблица 10. Список основных параметров, задействованных в электрофизиологической модели мышечной клетки *rm3* глоточной системы *C. elegans*. См – Сименс (проводимость, величина, обратная электрическому сопротивлению), см – сантиметр.

имя переменной в NEURON	Физический смысл	единица измерения
<i>gmax_KvEXP2</i>	максимальная проводимость EXP-2	См/см ²
<i>gmax_CaL</i>	максимальная проводимость EGL-19	См/см ²
<i>gmax_pas</i>	максимальная пассивная проводимость (проводимость тока утечки через мембрану)	См/см ²
<i>ek</i>	калиевый равновесный потенциал	мВ
<i>eca</i>	кальциевый равновесный потенциал	мВ
<i>e_pas</i>	равновесный потенциал тока утечки	мВ

В рамках экспериментального исследования, проведенного в работе (Davis et al., 1995), была получена запись мембранного потенциала глоточной мышечной клетки, включающая несколько последовательных кальциевых потенциалов действия. В рамках данной работы она была оцифрована и использована при оптимизации параметров модели (показана на Рис. 5.9 А). Согласно мнению авторов *C. ELEGANS II book* [C. ELEGANS II, 1997], такая форма потенциала действия весьма похожа на полученную аналогичным образом запись, полученную при записи потенциала действия с глоточной мышечной клетки нематоды *A. suum* [Raizen and Avery, 1994] и напоминает потенциалы действия мышечных клеток сердца позвоночных организмов [Rogers et al., 2001].

Также для создания модели необходимо геометрическое представление моделируемой клетки (см. Рис. 5.3), с учетом ограничения системы NEURON, в которой компартменты могут представляться только цилиндрическими сегментами (см. Рис. 5.4).

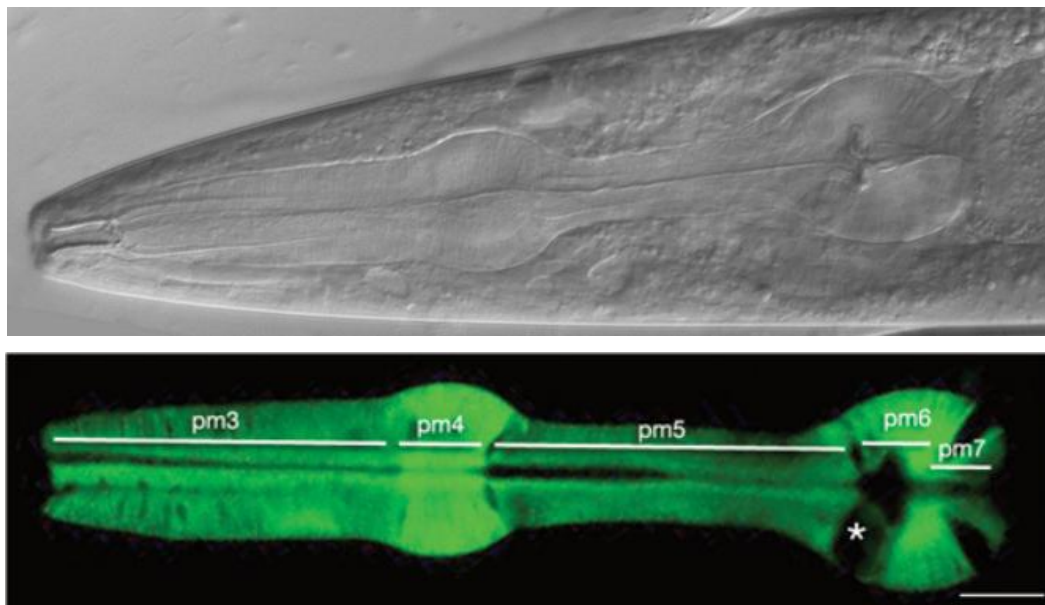


Рис. 5.3. Микрофотография головного отдела и глоточной мышечной системы *C. elegans* (сверху) и глоточной мышечной системы (флюоресценция) (снизу; подписаны названия мышечных клеток). Источники:

<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/pharynx/Images/phafig2leg.htm>,

<http://www.wormatlas.org/hermaphrodite/pharynx/Images/phafig6leg.htm>,

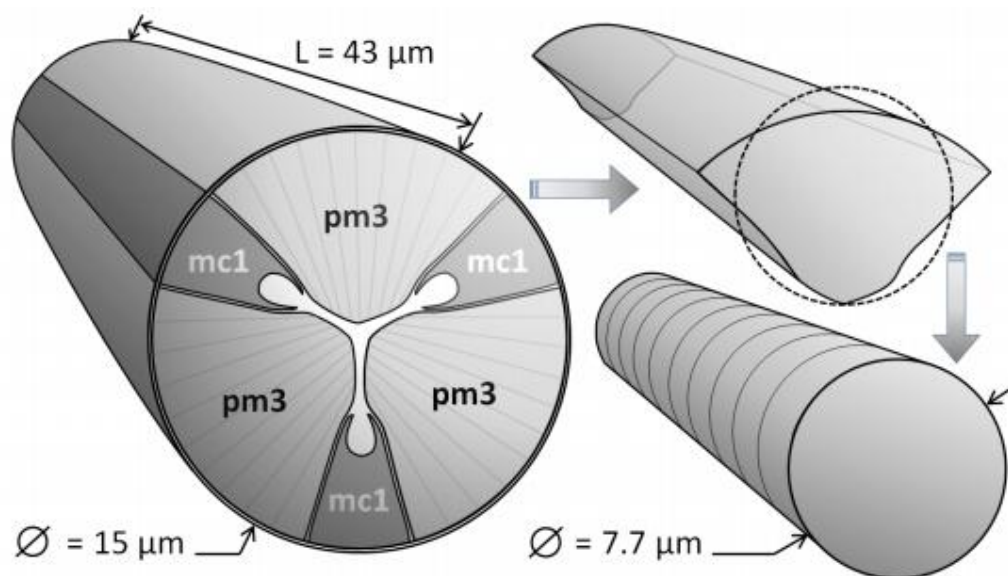


Рис. 5.4. Схематичное 3D-представление передней части глоточной системы, одной из трех мышечных клеток pm3 и её цилиндрическая аппроксимация для моделирования.

5.4.3. Потенциал покоя глоточной мышечной клетки

Помимо перечисленных выше параметров для моделирования также необходимо знать потенциал покоя мышечных клеток рассматриваемого типа. Имеются следующие экспериментальные данные о результатах его измерения: -69 ± 1 мВ согласно данным [Rogers et al., 2001], ≈ -74 мВ по данным [Steger et al., 2005] и значения в пределах интервала $-40 \dots -50$ мВ согласно результатам работ [Davis et al., 1995; Strange, 2003]. Наиболее вероятными причинами разброса полученных значений могут быть различия в постановке эксперимента, а также запись сигнала с различных мышечных клеток разными авторами. В рамках данной работы было принято решение использовать по умолчанию значение потенциала покоя, равное -50 мВ, поскольку оно наблюдалось при записи зависимости потенциалов действия с высоким временным разрешением [Davis et al., 1995], которая была оцифрована и использована для сравнения результатов симуляции с экспериментальными данными.

5.4.4. Проводимость утечки через мембрану и потенциал покоя

Пассивный ток через мембрану клетки (ток утечки) оказывает заметное влияние на форму потенциала действия и зависит от проводимости мембраны и равновесного потенциала для тока утечки. Эти значения были измерены в работе [Shtonda and Avery, 2005] и составили, соответственно 22.8 ± 5.2 МΩ и -53.6 ± 4.1 мВ, соответственно. Также имеются данные об электрической емкости глоточной системы, 362.6 ± 36.8 пФ. Для моделирования в NEURON необходимо задать удельную проводимость мембраны. Известно, что удельная электрическая емкость мембраны подавляющего большинства нейронов различных организмов составляет около $1 \mu\text{Ф}/\text{см}^2$. С учетом этого площадь поверхности глоточной системы может быть рассчитана как $(362.6 \text{ пФ}) / (1 \mu\text{Ф}/\text{см}^2) = 0.363 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2$. И, наконец, удельная проводимость утечки будет равна $(1 / 22.8 \text{ М}\Omega) / (0.363 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2) = 1.24 \cdot 10^{-4} \text{ См}/\text{см}^2$. Для сравнения, проводимость утечки мышечных клеток тела, упомянутая в работе [Boyle, 2009], равна $-22 \text{ См}/\text{Ф}$, что эквивалентно

удельной проводимости $2.2 \cdot 10^{-5}$ См/см² (или удельному сопротивлению 45 кΩ·см²).

5.4.5. Ионные каналы: кальциевый канал L-типа EGL-19

Среди кальциевых ионных каналов, для которых были построены модели их функционирования, наиболее близким по свойствам к каналу EGL-19 L-типа является кальциевый канал сердечной мышцы (также принадлежащий к L-типу), которая относится к типу гладких мышц, как и глоточные мышечные клетки *C. elegans*. Поэтому в качестве отправной точки мы воспроизвели соответствующую Марковскую модель, основанную на диаграмме состояний и переходов, а также используя дифференциальные уравнения и присутствующие в них параметры, представленные в работе [Bondarenko et al., 2004] (см. Рис. 5.5).

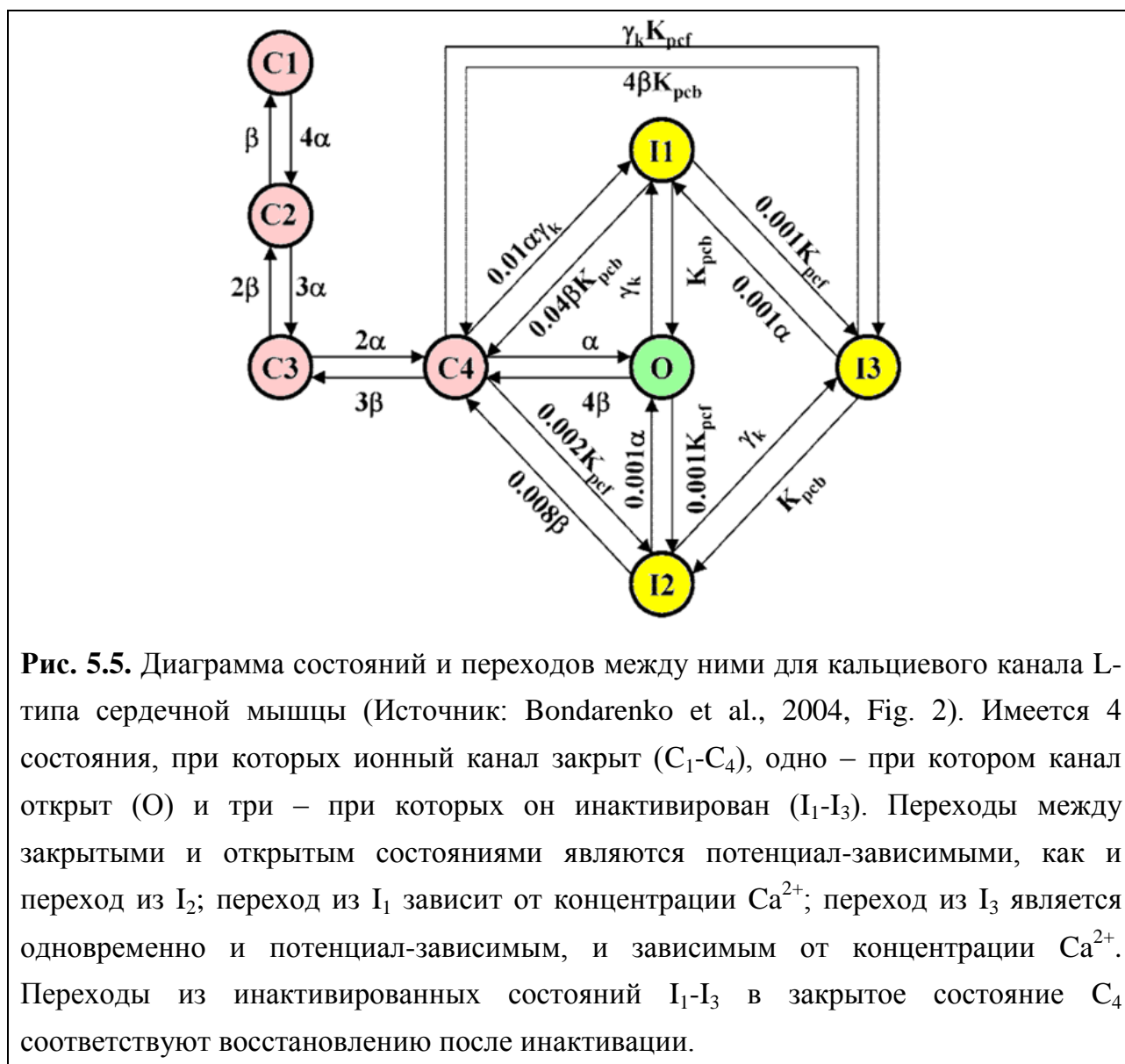


Рис. 5.5. Диаграмма состояний и переходов между ними для кальциевого канала L-типа сердечной мышцы (Источник: Bondarenko et al., 2004, Fig. 2). Имеется 4 состояния, при которых ионный канал закрыт (C₁-C₄), одно – при котором канал открыт (O) и три – при которых он инактивирован (I₁-I₃). Переходы между закрытыми и открытым состояниями являются потенциал-зависимыми, как и переход из I₂; переход из I₁ зависит от концентрации Ca²⁺; переход из I₃ является одновременно и потенциал-зависимым, и зависимым от концентрации Ca²⁺. Переходы из инактивированных состояний I₁-I₃ в закрытое состояние C₄ соответствуют восстановлению после инактивации.

Поскольку вся работа по моделированию электрофизиологических механизмов нейронов и мышечных клеток запланирована в программной среде NEURON, модель EGL-19 была реализована в форме MOD-файла (на языке Neuron Model Description Language), который может быть скомпилирован, интегрирован в NEURON и доступен при его использовании – например, для встраивания в ту или иную моделируемую клетку. Для проверки корректности воспроизведения модели был осуществлен тот же *in silico* эксперимент, определяющий зависимость кальциевого тока через канал в зависимости от разности потенциалов на мембране. Сравнение показало, что полученная вольт-амперная кривая воспроизводит оригинальную с точностью до масштаба по оси ординат и имеет тот же порядок величины. Различие в масштабе, вероятнее всего, обусловлено немного отличающейся геометрией моделируемой клетки. Поскольку ионный канал EGL-19 имеет похожую вольт-амперную характеристику, но достигает максимального (по модулю) значения тока не при нулевом потенциале (Рис. 5.6А), а при его значении ≈ 20 мВ (см. Fig. 3D в работе [V. Lainé et al., 2014]), то воспроизведенная модель ионного канала, показанная на Рис. 5.6В, была модифицирована посредством замены всего двух параметров:

$$\alpha = 0.4 \cdot \exp((V + 12.0)/10.0) \rightarrow \alpha = 0.4 \cdot \exp((V + 20.0 + 12.0)/10.0),$$

$$\beta = 0.05 \cdot \exp(-(V + 12.0)/13.0) \rightarrow \beta = 0.05 \cdot \exp(-(V - 20.0 + 12.0)/13.0)$$

Вольт-амперная кривая получившейся модели представлена на Рис. 5.6 С.

5.4.6. Калиевый ионный канал Kv-типа EXP-2

Для потенциал-зависимого калиевого ионного канала Kv-типа EXP-2 нематоды *C. elegans* также нет готовой модели. Поиск по имеющимся моделям, наиболее близких к нему по свойствам, выявил калиевый ионный канал HERG, также принадлежащий к типу Kv, подтипу Kv 11.1, для которого построено несколько различных моделей [Bett et al., 2011].

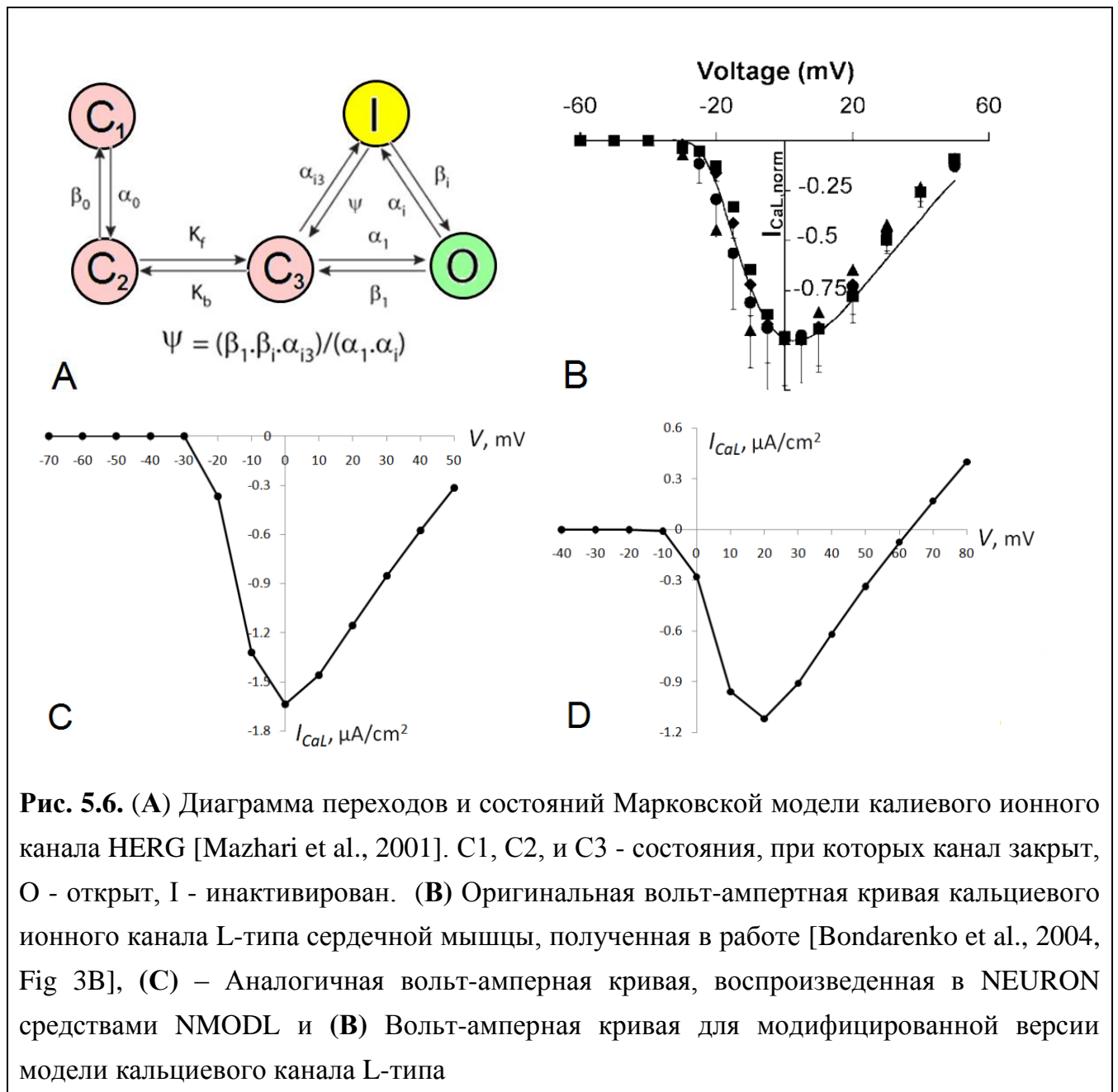


Рис. 5.6. (А) Диаграмма переходов и состояний Марковской модели калиевого ионного канала HERG [Mazhari et al., 2001]. C1, C2, и C3 - состояния, при которых канал закрыт, O - открыт, I - инактивирован. (В) Оригинальная вольт-ампертная кривая кальциевого ионного канала L-типа сердечной мышцы, полученная в работе [Bondarenko et al., 2004, Fig 3B], (С) – Аналогичная вольт-амперная кривая, воспроизведенная в NEURON средствами NMODL и (D) Вольт-амперная кривая для модифицированной версии модели кальциевого канала L-типа

Хотя структурная организация EXP-2 и HERG значительно различается, их функциональное сходство весьма велико – оба медленно активируются и быстро инактивируются в ответ на деполяризацию, т.е. их кинетические свойства, определяющие Марковскую модель, являются весьма схожими, хотя и не эквивалентными [Fleischhauer et al., 2002]. Например, проводимость одиночного ионного канала EXP-2 в 5-10 раз превышает таковую для канала HERG и большинства калиевых каналов Kv-типа [Fleischhauer et al., 2002]. Поэтому было принято решение взять кинетическую схему состояний и переходов между ними для HERG из имеющейся модели, реализовать средствами NEURON + NMODL и

затем оптимизировать параметры модели, основываясь на известных экспериментальных данных о функционировании EXP-2. Ниже представлен список параметров, описывающих переходы между состояниями канала (одно открытое, три закрытых и одно инактивированное) из работы [Mazhari et al., 2001] в их оригинальном виде (слева) и с внесенными модификациями, заключающимися в добавлении множителей, изначально имеющих единичные значения, к имеющимся параметрам (Таблица 11, справа):

Таблица 11. Список параметров, описывающих переходы между состояниями ионного канала EXP-2

$\alpha_0 = 0.0069 \cdot \exp(0.0272 \cdot V)$	$\alpha_0 = 0.0069 \cdot p_1 \cdot \exp(0.0272 \cdot p_2 \cdot V)$
$\beta_0 = 0.0227 \cdot \exp(-0.0431 \cdot V)$	$\beta_0 = 0.0227 \cdot p_3 \cdot \exp(-0.0431 \cdot p_4 \cdot V)$
$K_f = 0.0266$	$K_f = 0.0266 \cdot p_5$
$K_b = 0.1348$	$K_b = 0.1348 \cdot p_6$
$\alpha_1 = 0.0218 \cdot \exp(0.0262 \cdot V)$	$\alpha_1 = 0.0218 \cdot p_7 \cdot \exp(0.0262 \cdot p_8 \cdot V)$
$\beta_1 = 0.0009 \cdot \exp(-0.0269 \cdot V)$	$\beta_1 = 0.0009 \cdot p_9 \cdot \exp(-0.0269 \cdot p_{10} \cdot V)$
$\alpha_i = 0.0622 \cdot \exp(0.0120 \cdot V)$	$\alpha_i = 0.0622 \cdot p_{11} \cdot \exp(0.0120 \cdot p_{12} \cdot V)$
$\beta_i = 0.0059 \cdot \exp(-0.0443 \cdot V)$	$\beta_i = 0.0059 \cdot p_{13} \cdot \exp(-0.0443 \cdot p_{14} \cdot V)$
$\alpha_{i3} = 1.29 \cdot 10^{-5} \cdot \exp(2.71 \cdot 10^{-6} \cdot V)$	$\alpha_{i3} = 1.29 \cdot 10^{-5} \cdot p_{15} \cdot \exp(2.71 \cdot 10^{-6} \cdot p_{16} \cdot V)$

В литературе удалось обнаружить, что электрофизиологические свойства EXP-2 изучались с использованием ооцитов (яйцеклеток) *Xenopus*, в мембрану которых встраивались изучаемые ионные каналы [Fleischhauer et al., 2002]. На рисунке 5.7 представлена серия записей зависимости тока от времени, полученных с использованием двухэлектродной техники «voltage clamp»⁵⁴, оцифрованная на основе данных [Fleischhauer et al., 2002, Fig. 3A]. При записи каждой кривой на мембрану клетки в начале подавался импульс длительностью 1 с, поддерживающий мембранный потенциал на уровне +20 мВ, затем следовал период восстановления после инактивации при потенциале -80 мВ в течении 40 мс, а завершалась запись после подачи еще одного импульса длительностью 1 с, устанавливающего потенциал на мембране равным одному из значений в

⁵⁴ https://en.wikipedia.org/wiki/Voltage_clamp

пределах от -120 до 60 мВ с интервалом в 10 мВ. При оптимизации использовались две из этих кривых – для -120, -80 мВ.

Алгоритм оптимизации, представляющий собой стохастический направленный поиск в пространстве параметров, был реализован средствами встроенного в NEURON языка программирования. На каждом шаге оптимизации значение каждого из случайно выбранных параметров из числа p_1 - p_{16} немного изменяется. Ток через электрод, подключенный к клеточной мембране методом «voltage clamp», рассчитывается посредством компьютерной симуляции в NEURON, а затем полученная кривая сравнивается с соответствующей экспериментальной кривой. Вычисляется разница между кривыми, как сумма различий между парами точек экспериментальной и расчетной кривой, соответствующих одному и тому же значению времени, на интервале времени продолжительностью 140 мс (см. Рис. 5.7). Новый набор значений измененных параметров, выбранных на данном шаге из числа p_1 - p_{16} принимается или отвергается с вероятностью, зависящей от соотношения между старым и новым значениями функции приспособленности. Процесс продолжается до достижения сходимости, что обычно требует около 100000 шагов и занимает несколько часов вычислений на современном ПК.

Первые эксперименты по оптимизации показали, что вышеупомянутые кривые, оптимизируемые отдельно, достигают минимума различия между симуляцией и экспериментом, не превышающего 2.8%. Однако, при этом для каждой из кривых получаются различные наборы параметров, тогда как все кривые соответствуют одной и той же системе, описываемой одними и теми же параметрами, а отличается лишь один параметр эксперимента. Если же производить оптимизацию одновременно по нескольким кривым, используя общую функцию приспособленности, то это может стать дополнительным условием, которое ограничит спектр получаемых решений для каждой из кривых в отдельности. Используя пару кривых, соответствующих -120 мВ и -80 мВ, для одновременной оптимизации, наилучший результат оптимизации, который удалось получить, составил 11.4% различия между двумя парами кривых (см.

Рис 5.7). Полученные значения параметров p_1 - p_{16} представлены в Таблице 12 (Симуляция 1, p_1 - p_{16}). Полученный в результате данной оптимизации набор параметров был использован для вычисления вольт-амперной кривой ионного канала EXP-2. Результат её сопоставления с экспериментальной вольт-амперной кривой для этого же канала представлен на Рис. 5.8. Все расчеты, связанные с использованием модели ооцита, производились при значении калиевого равновесного потенциала $E_K = -2$ мВ, который был вычислен на основе уравнения Нернста:

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_o}{C_i},$$

где E – равновесный потенциал (в данном случае калиевый - E_K), R – универсальная газовая постоянная, T – температура в Кельвинах, F – число Фарадея, n – валентность иона (у калия $n = 1$), C_o и C_i – концентрации иона (в нашем случае – калия) вне и внутри клетки, соответственно.

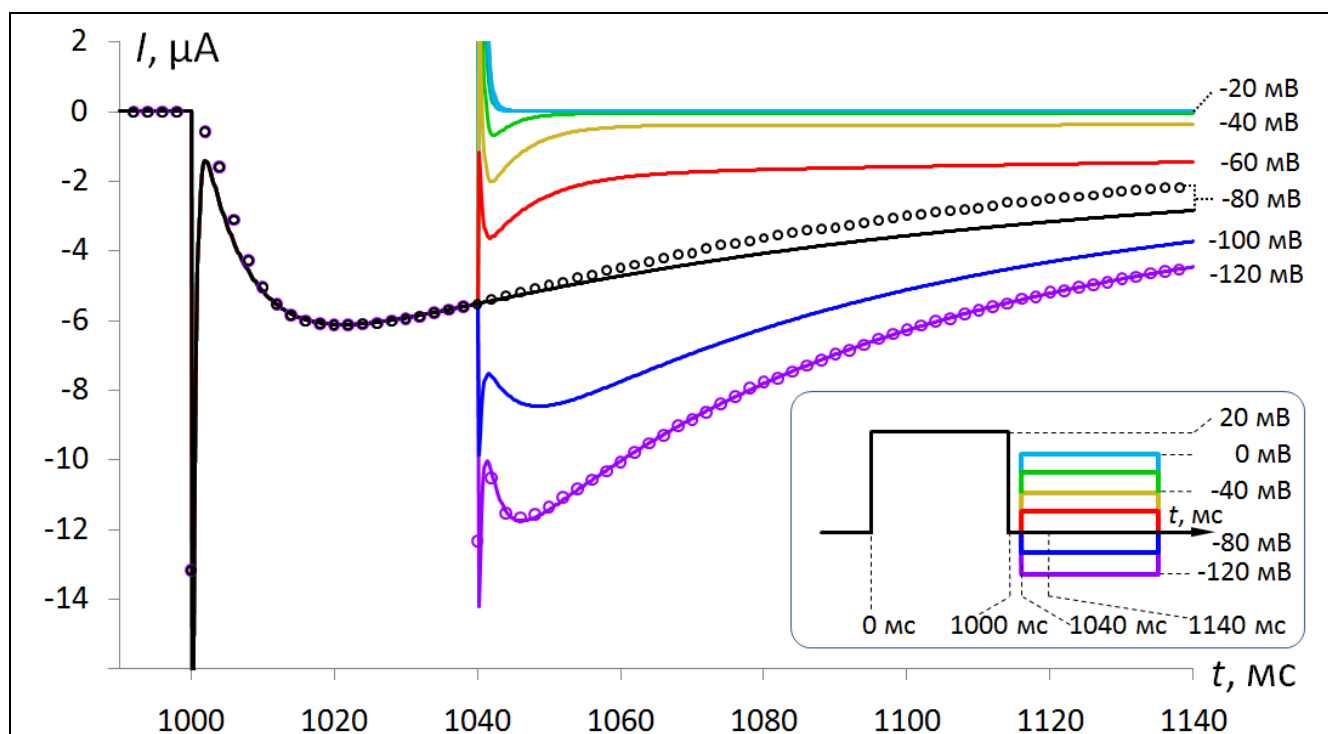
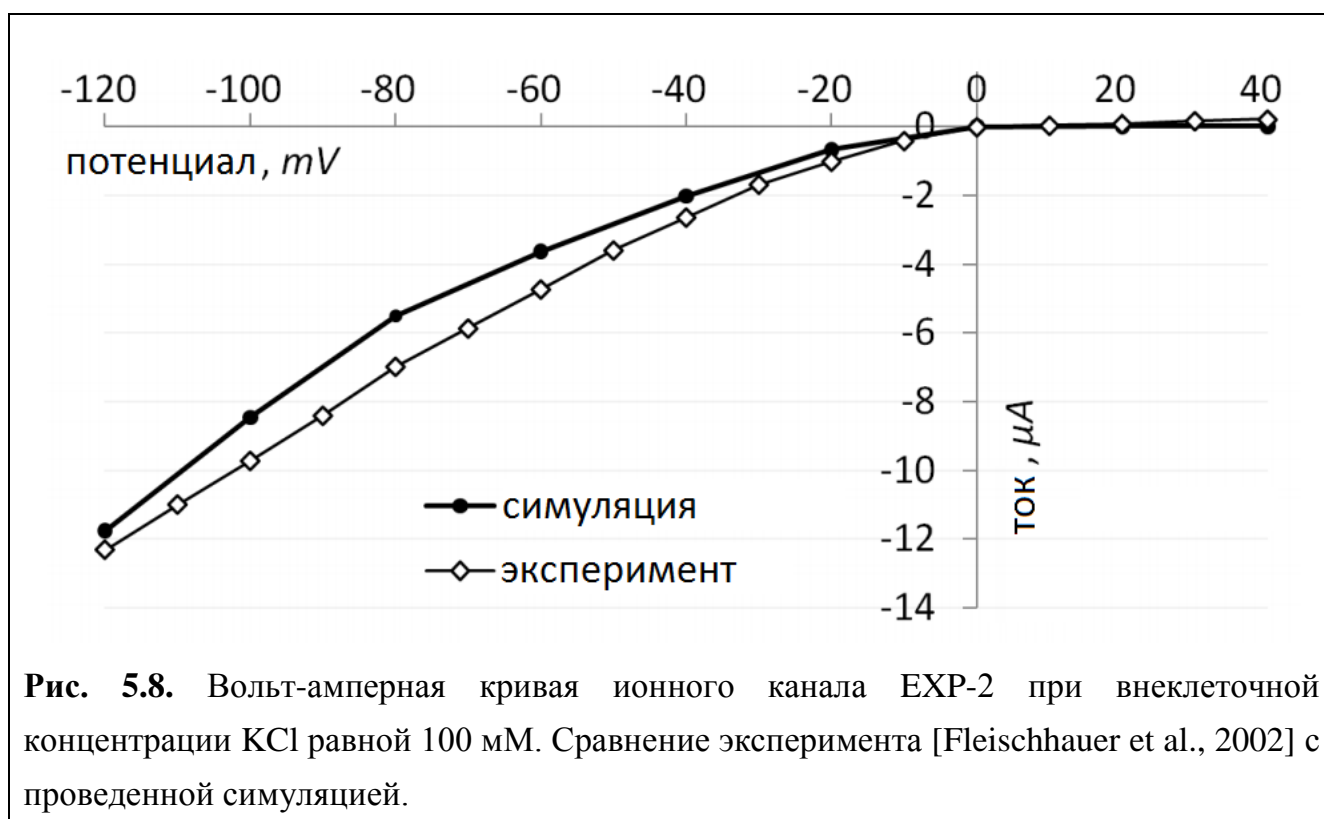


Рис. 5.7. Результат совместной оптимизации разницы между двумя соответствующими экспериментальными и расчетными кривыми (для -120 и -80 мВ). Сплошные кривые – эксперимент (данные [Flaischauer et al., 2002]), черные и фиолетовые круги – результаты симуляции того же процесса в той же системе (ооците *Xenopus* с ионными каналами EXP-2) в NEURON.



Для вычислений были использованы следующие значения: $T = 293.15 \text{ K}$ (20°C), $C_o^{\text{K}} = 100 \text{ mM}$ (по данным Fleischhauer et al., 2002), $C_i^{\text{K}} = 108.6 \text{ mM}$ (см. таблицы 2 и 3 из работы [Weber, 1997]). Для осуществления симуляции также была воспроизведена геометрия и основные электрофизиологические характеристики мембраны ооцита *Xenopus*.

Когда модели ионных каналов EGL-19 и EXP-2 были реализованы, дополнительно была произведена оптимизация значений равновесных потенциалов и проводимостей для ионов калия и кальция. Минимизация различия между реальным и смоделированным потенциалом действия глоточной мышцы привела к получению кривой, больше всего напоминающей запись, полученную в работе [Shtonda and Avery, 2005]. Однако, она не воспроизводила фазу гиперполяризации, следующую за резкой реполяризацией после завершения плато (см. Рис. 5.9, симуляция 1). Полученные результаты оптимизации представлены в Таблице 12 (симуляция 1); для данной симуляции указанные значения p_1 - p_{16} использовались, но не подвергались оптимизации.

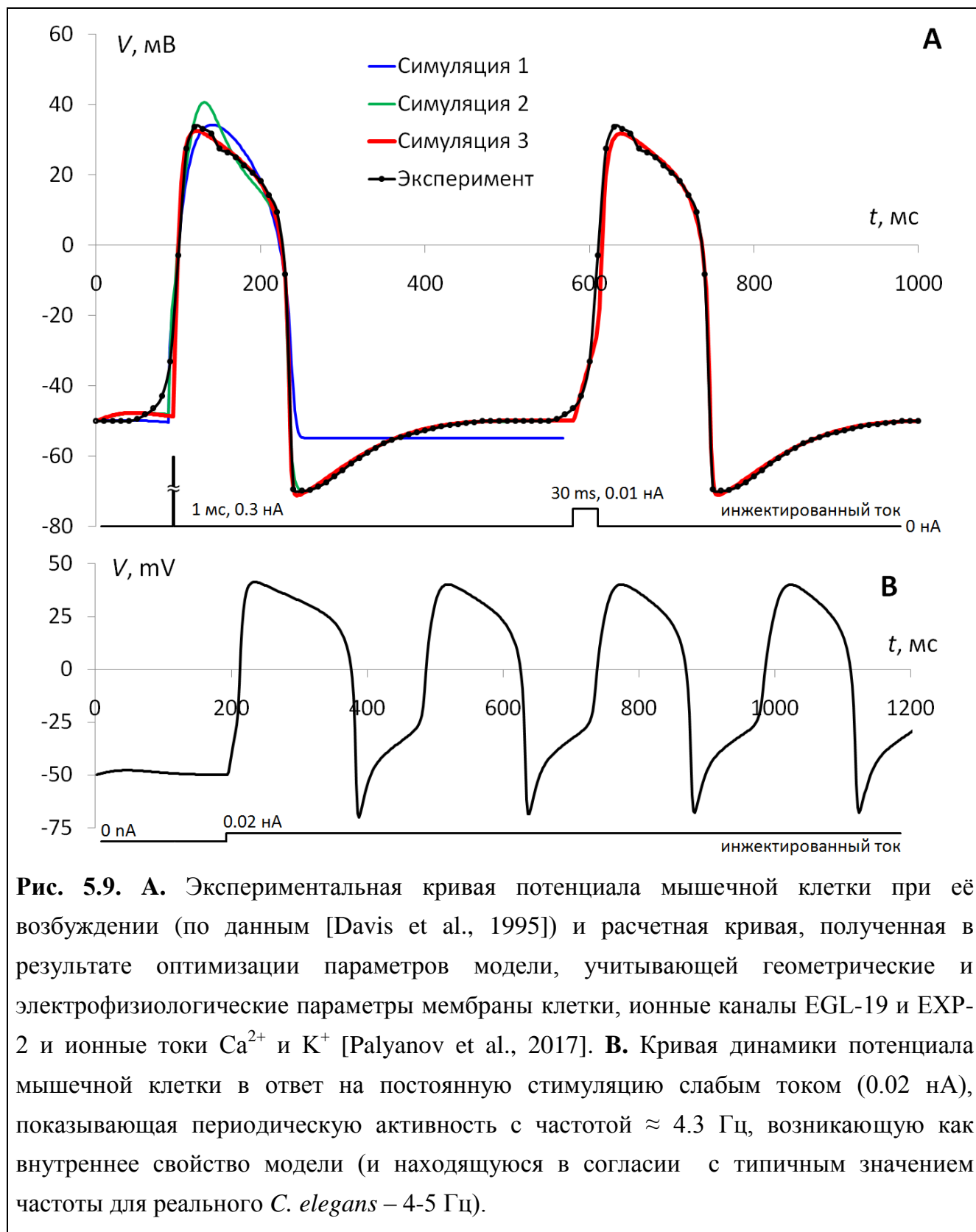
Таблица 12. Значения параметров модели мышечной клетки $rm3$, полученные при различных вариантах оптимизации.

параметр, размерность	Симуляция 1	Симуляция 2	Симуляция 3
p_1	1.459	0.867	0.653
p_2	0.058	0.463	0.655
p_3	0.475	0.994	0.972
p_4	2.262	0.690	0.667
p_5	0.542	1.494	0.140
p_6	0.021	0.981	0.518
p_7	0.176	0.726	1.115
p_8	0.021	0.814	0.112
p_9	18.86	0.515	0.740
p_{10}	0.004	2.614	3.587
p_{11}	9.442	1.211	1.652
p_{12}	2.716	0.470	1.350
p_{13}	0.491	7.552	9.910
p_{14}	0.974	4.155	1.645
p_{15}	0.445	0.676	0.853
p_{16}	0.234	0.517	0.144
g_{max_KvEXP2} , C/cm ² (проводимость EXP-2)	0.0245	0.0013	0.0077
g_{max_CaL} , C/cm ² (проводимость EGL-19)	0.00009	0.000038	0.000236
g_{pas} , C/cm ² (пассивная проводимость мембраны клетки)	0.000005	0.000014	0.000007
e_k , мВ (потенциал покоя для K ⁺)	-54.9	-73.7	-93.05
e_{ca} , мВ (потенциал покоя для Ca ²⁺)	+47.3	+127.8	+37.17
e_{pas} , мВ (потенциал покоя пассивного тока через мембрану)	-48.2	-44.1	-37.24

Для исследования вопроса о том, какие параметры могут повлиять на фазу гиперполяризации, на следующем этапе в список оптимизируемых параметров были также включены уже упоминавшиеся p_1 - p_{16} . В этом случае сходимость значительно ухудшилась по сравнению с предыдущим случаем, что, впрочем, неудивительно, учитывая, что число оптимизируемых параметров увеличилось почти втрое. Даже после 0.5 млн. итераций еще наблюдались незначительные улучшения. Однако, этот вариант привел к значительно более низкому различию между экспериментальным и расчетным профилями кальциевого потенциала действия – см. Рис. 5.9 и Таблицу 12 (симуляция 2). При этом наибольшее отличие между профилями наблюдается на стадии инициации – в момент, когда должен действовать кальциевый ионный канал Т-типа ССА-1, который пока не реализован в нашей модели – его роль играет импульс тока, инициирующий начало потенциала действия. Интересно, что использование прямоугольного импульса с другими параметрами – тока величиной 0.01 нА в течении 30 мс вместо изначального варианта (тока 0.3 нА в течении 1 мс; см. Рис. 5.9 А, инжектированный ток) – несколько меняет профиль потенциала действия (также полученный в результате оптимизации), делая его еще более похожим на реальный (см. Рис. 5.9 А, симуляция 3, второй импульс; Таблица 12, симуляция 3). Для данного профиля разница с «эталоном», полученным в эксперименте, составила 3.2%. Результаты, полученные при нескольких запусках процесса оптимизации показали, что получаемые значения равновесного потенциала для K^+ и пассивного тока через мембрану попадают в значительно более узкий интервал, чем для Ca^{2+} .

На следующем этапе построенная модель глоточной мышечной клетки pm3 с набором параметров, представленных в Таблице 12 (симуляция 3) была использована для проверки её реакции на слабый постоянный ток. Оказалось, что ток величиной 0.02 нА и более вызывает последовательность кальциевых потенциалов действия, следующих с частотой ≈ 4.3 Гц, которая не растет при увеличении тока (Рис. 5.9 В). При этом известно, что в реальном *C. elegans* глоточные мышцы имеют частоту сокращений от 0.5 до 5 Гц (по другим данным –

от 0.7 до 4.4 Гц) в зависимости от сытости организма и количества пищи вокруг него [Scholz et al., 2016].



Таким образом, хотя в модель глоточной мышечной клетки частота следования потенциалов действия не закладывалась явным образом, но, во-первых, периодические потенциалы действия в рамках неё оказались возможными, а во-вторых, их максимальная частота оказалась весьма близка к реальной. Меньшие частоты могут быть получены, когда инициация потенциала действия вызывается не постоянным, а случайным флуктуирующим током, который вполне может иметь место в нервной или мышечной клетке (механизмы спонтанной генерации потенциалов действия в настоящее время не настолько хорошо изучены, чтобы утверждать наверняка).

Таким образом, были созданы базовые модели нейрона и мышечной клетки с учетом их особенностей в организме *C. elegans*, вплоть до специфических ионных каналов и способности к генерации периодических потенциалов действия. Они могут быть использованы для конструирования сетей из нейронов и мышечных клеток, воспроизводящих архитектуру нервной системы реального *C. elegans*. Данная работа запланирована в рамках гранта РФФИ 18-07-00903 «Компьютерное моделирование и валидация механизмов генерации периодических сигналов и управления мышцами тела в нервной системе *C. elegans*» и находится в стадии выполнения. Полученные модели имеют значительный потенциал для дальнейшего улучшения, в том числе за счет оптимизации схем переходов между состояниями ионных каналов, которые, в принципе, могут отличаться даже между каналами одного типа со значительной степенью сходства в пространственном строении. Периодическая электрическая активность мышечных клеток, таким образом, может быть объяснена в рамках предложенной модели, тогда как для нейронов *C. elegans* попытку построить подобную модель и найти объяснение периодической нейронной активности еще только предстоит предпринять.

Глава 6. Развитие «гидродинамического» подхода к анализу процесса формирования белковой структуры.

Финальная глава посвящена моделированию динамики значительно более маленьких по размеру, но не менее важных и интересных биологических объектов, чем нематода *C. elegans*, а именно белковых молекул, из которых состоят все живые организмы. Белковая молекула, как известно, представляет собой линейный полимер, образованный последовательностью аминокислотных остатков (иногда могут также встречаться дисульфидные мостики и другие модификации, образующие ковалентные связи). Насчитывается 20 различных аминокислотных остатков, каждый из которых обладает собственной уникальной пространственной структурой и физико-химическими свойствами, что и определяет такое многообразие различных белков. Белки - это «молекулярные машины», которые трудятся в живом организме. Они катализируют химические реакции, переносят молекулы, обеспечивают движение клетки и вовлечены практически во все важные биологические процессы. Белковые последовательности закодированы в генах организма – при необходимости они считываются с них в форме матричной РНК, с которой затем происходит синтез белка. За синтезом, как правило, следует самосборка, называемая также укладкой или фолдингом (англ. *folding*), изначально развернутого белка в определенную пространственную структуру, называемую нативной. Именно формирование нативной структуры обеспечивает возможность функционирования белка правильным с точки зрения биологии образом. Поскольку каждый аминокислотный остаток в белковой цепи может быть представлен одним из 20 различных вариантов, количество возможных вариантов белков, насчитывающих

от десятков до сотен аминокислотных остатков, огромно. Так, в геноме человека насчитывается порядка 20-25 тысяч генов [Abdellah et al., 2004], а в геноме *C. elegans* – около 20 тысяч [The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998]. По аналогии с геномом, совокупность всех белков организма называют протеомом. Ряд актуальных проблем компьютерной протеомики рассмотрен в работе [Иванисенко и др., 2005].

В соответствии с постулатом Анфинсена, белки способны самопроизвольно принимать форму, соответствующую минимуму их свободной энергии. В своем эксперименте по денатурации и последующей самопроизвольной ренатурации белка он показал [Anfinsen, 1973], что по крайней мере для небольших глобулярных белков нативная структура определяется их аминокислотной последовательностью и соответствует минимуму свободной энергии системы «белок + растворитель». Это делает потенциально возможным предсказание пространственной структуры белка на основе его аминокислотной последовательности. Свободная энергия включает в себя как потенциальную энергию связей, образуемых аминокислотами белка друг с другом и растворителем, так и конфигурационную энтропию.

Ионные каналы, представляющие собой сложные трехмерные структуры, образованные одной или несколькими белковыми молекулами, способны перестраивать свою структуру при изменении физико-химических параметров локального окружения (например, потенциала на мембране клетки) и тем самым открывать или закрывать канал для прохождения ионов. Эти механизмы обеспечивают электрофизиологическую активность нервных клеток и возможность обмениваться друг с другом электрохимическими сигналами. У *C. elegans* насчитывается несколько сотен различных ионных каналов, и не исключено, что для совпадения работы реальной и виртуальной нервной системы рано или поздно придется включить в модель каналы каждого типа. При этом для большинства из них модели пока не созданы, поэтому необходим эффективный подход, позволяющий облегчить и, по-возможности, автоматизировать эту работу. В проекте OpenWorm для этого существует отдельное направление

исследований – подпроект ChannelWorm⁵⁵. К сожалению, на данном уровне развития вычислительных технологий моделирование работы ионных каналов методом молекулярной динамики на протяжении необходимых для этого достаточно длительных интервалов времени (внутреннего времени симуляции) не представляется возможным ввиду колоссальной вычислительной сложности данной задачи. Перспективы рассматривались, в том числе, в дипломной работе Малышевой А. Д. «Программные средства и структуры данных для моделирования работы ионного канала методом молекулярной динамики», выполненной в 2015-2016 гг. под руководством А.Ю. Пальянова. Однако, уже в ближайшем будущем методы анализа структурных перестроек в процессе работы белка (моделируемых, например, методом полноатомной или дискретной молекулярной динамики) могут оказаться актуальными в контексте решения данной проблемы. В работе [Palyanov et al., 2007] подробно изложен подход, позволяющий на основе поверхности свободной энергии белка и данных о траекториях его движения по ней в процессе укладки или перестройки пространственной структуры (полученных методом компьютерного моделирования) построить кинетическую схему переходов между состояниями, аналогичную тем, что рассматривались для ионных каналов в предыдущей главе, в частности, на Рис. 5.5 и Рис. 5.6А.

В связи с вышеизложенным данная глава посвящена развитию методов моделирования и анализа процессов структурной динамики белковых молекул, в частности, нового «гидродинамического» подхода к анализу процесса формирования белковой структуры [Chekmarev, Palyanov, Karplus, 2008; Chekmarev and Karplus, 2013; Andryushchenko and Chekmarev, 2016]. Основным его преимуществом является возможность выявлять скрытые процессы, не видимые в рамках стандартного анализа на основе рассмотрения поверхности свободной энергии [Palyanov, Chekmarev, 2016], что, в частности, может существенно помочь в построении кинетической схемы переходов белка между его различными состояниями. Для моделирования структурных перестроек

⁵⁵ <https://github.com/openworm/ChannelWorm>

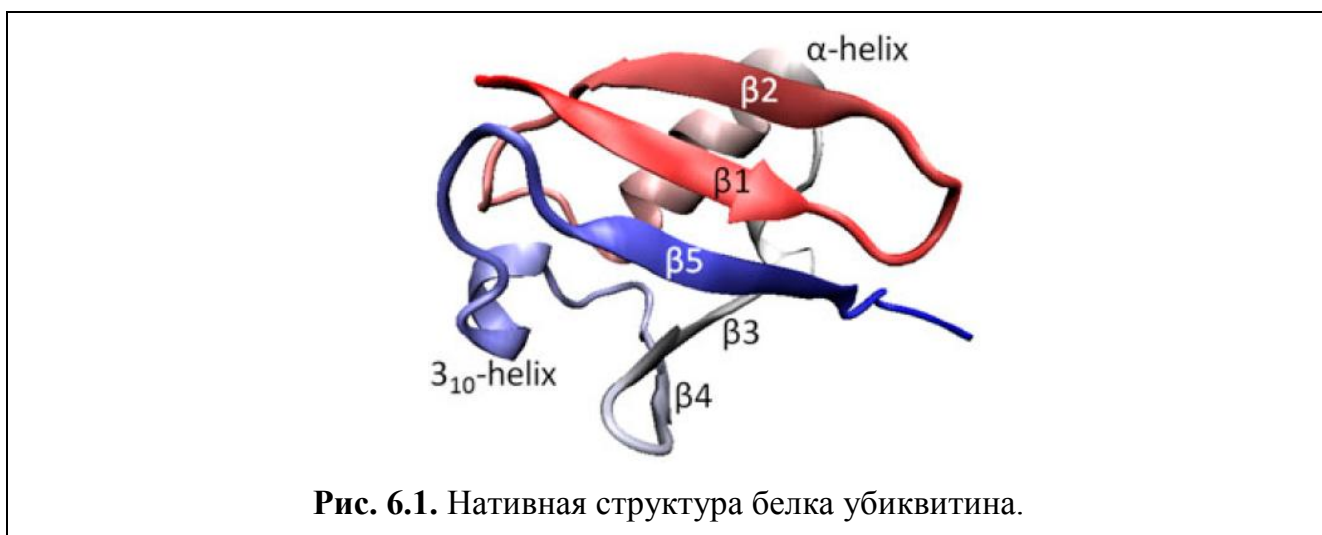
белковых молекул в процессе их самосборки и функционирования могут быть использованы, хотя и в ущерб точности, упрощенные методы, в том числе дискретная молекулярная динамика (ДМД). Однако, недостаточно просто получить набор траекторий, представляющих динамику структуры белка – необходим также эффективный анализ полученных данных. В работе использовалась собственная программная реализация ДМД на C++, основанная на алгоритме, описанном в работе [Zhou, Karplus, 1999]. Дополнительно в ней реализован функционал, связанный с гидродинамическим подходом.

Общепринятые поверхности свободной энергии (ПСЭ) определяют только вероятность белка находиться в том или ином состоянии, тогда как «гидродинамический» подход показывает, в каком направлении система преимущественно движется из каждой рассматриваемой точки. Иными словами, процесс формирования белковой структуры представляется в виде «течения» от начального развернутого состояния до стабильного нативного состояния, в котором белок в дальнейшем функционирует в организме. Гидродинамический подход успешно применялся для исследования динамики укладки ряда систем: « α -helical hairpin» (Chekmarev et al., 2008), «SH3 domain» [Kalgin, Karplus and Chekmarev, 2009; Kalgin and Chekmarev, 2011], «beta3s miniprotein» [Kalgin et al., 2013; Kalgin et al., 2014; Kalgin and Chekmarev, 2015], « β -hairpin» [Chekmarev, 2013] и «Trp-cage miniprotein» [Andryushchenko and Chekmarev, 2016]. Было показано, что линии тока не в полной мере следуют ландшафту, определяемому ПСЭ, а зачастую выявляют невидимые на ней процессы – например, в ряде случаев на картине линий тока наблюдались вихри [Andryushchenko and Chekmarev, 2016; Chekmarev et al., 2008; Kalgin and Chekmarev, 2011, 2015; Kalgin et al., 2013; Kalgin et al., 2014], имеющие много общего с теми, что возникают при гидродинамической турбулентности [Kalgin and Chekmarev, 2011]. Один из важных вопросов, который прежде не поднимался в рамках исследований с применением гидродинамического подхода, касается поведения линий тока в области переходных состояний, соответствующей барьеру между областями

полукомпактных структур и структур, близких к нативной (целевой) пространственной конфигурации белка.

6.1. Объект и методы исследования

Исследование в рамках данной работы проведено на примере известного белка убиквитина, более крупного, чем все рассмотренные ранее, состоящего из 76 аминокислотных остатков, который состоит из пяти бета-складчатых фрагментов, альфа-спирали из четырех витков и еще одного короткого альфа-спирального фрагмента (см. Рис. 6.1).



Исследованию процесса укладки убиквитина посвящено множество экспериментальных работ [Alonso and Daggett, 1998; Babu, Hilser and Wand, 2004; Briggs and Roder, 1992; Brutscher, Brüschweiler and Ernst, 1997; Chung et al., 2005; Chung et al., 2008; Cordier and Grzesiek, 2002; Gladwin and Evans, 1996; Jackson, 2006; Khorasanizadeh, Peters and Roder, 1996; Kitahara and Akasaka, 2003; Krantz et al., 2004; Krantz and Sosnick, 2000; Sabelko, Ervin and Gruebele, 1999; Schanda, Forge and Brutscher, 2007; Shandiz, Baxa and Sosnick, 2012; Sivaraman, Arrington and Robertson, 2001; Sosnick, Dothager and Krantz, 2004; Valleé-Bélisle and Michnick, 2007, 2012; Várnai, Dobson and Vendruscolo, 2008; Went and Jackson, 2005], а также ряд исследований, основанных на компьютерном моделировании этого процесса [Titov, Palyanov, 2003; Chekmarev et al., 2006; Ding, Jha and Dokholyan, 2005; Gräter and Grubmüller, 2007; Kony, Hünenberger and Van

Gunsteren, 2007; Marianayagam and Jackson, 2004; Piana, Lindorff-Larsen and Shaw, 2013; Reddy and Thirumalai, 2015; Sorenson and Head-Gordon, 2002; Zhang, Qin and Wang, 2005].

Исследование ансамбля переходных состояний выявило наличие структур, в которых сформированы основная альфа-спираль и два первых бета-складчатых участка [Sosnick et al., 2004; Went and Jackson, 2005]. Оставшаяся часть белка в основном была бесструктурной [Sorenson and Head-Gordon, 2002; Sosnick et al., 2004; Went and Jackson, 2005], хотя и не обязательно – в частности, бета-складчатые участки $\beta 3$ и $\beta 4$ также могли формировать структуры, близкие к тем, которыми они обладают в нативном состоянии [Várnai et al., 2008].

Работы, основанные на компьютерном моделировании, основывались на различных подходах, от относительно простых, в которых аминокислотные остатки представляются одиночными узлами, объединенными в цепочку [Ding et al., 2005; Reddy and Thirumalai, 2015; Sorenson and Head-Gordon, 2002; Zhang et al., 2005] до полноатомного моделирования методом молекулярной динамики [Alonso and Daggett, 1998; Gräter and Grubmüller, 2007; Kony et al., 2007; Marianayagam and Jackson, 2004; Piana et al., 2013]. Поскольку в нашем случае для получения более точных контуров линий тока требовалось значительное число траекторий, недостижимых при полноатомном молекулярно-динамическом моделировании, была использована Го-подобное представление белка и дискретная молекулярная динамика. В качестве нативной структуры использовалась кристаллическая структура убиквитина из базы данных Protein Data Bank (1ubq.pdb [Vijay-Kumar et al., 1987]), на основе которой была рассчитана матрица нативных контактов. Каждая пара аминокислотных остатков, расстояние между C-альфа атомами которых в нативной структуре не превышало $\sigma_d = 6.4\text{\AA}$ считалась образующей нативный контакт (всего их оказалось 153 шт.). Дополнительно, чтобы обеспечить большую стабильность нативной структуры и исключить её зеркальные изомеры, были также добавлены контакты между мономерами, для которых расстояния между C-бета атомами не превышало 8.5\AA (14 шт.). Параметризация потенциала взаимодействия между мономерами была аналогичной использованной в работе

[Kalgin et al., 2009]; в частности, глубина «колодца притяжения» ϵ полагалась равной 2.2 Ккал/моль в соответствии с потенциалом взаимодействия между аминокислотными остатками, предложенным в работе [Miyazawa and Jernigan, 1985]. В дальнейшем в данной главе символами σ_d, ϵ и $\tau = \sqrt{M \cdot \sigma_d^2 / \epsilon}$, где $M=110$ Да, обозначаются единицы длины, энергии и времени ($\tau \approx 2$ пс), соответственно. Температура T измеряется в единицах ϵ , полагая константу Больцмана равной 1.

Рассчитываемые ДМД траектории начинались со случайно сгенерированной полностью развернутой пространственной структуры белка (т.е. такой, в которой еще нет сформированных нативных контактов), а завершались при достижении нативного состояния, в котором реализованы все нативные контакты. Для выбора условий, при которых будет производиться симуляция, тысячи траекторий укладки белковых структур были сгенерированы при температурах в интервале от $T = 0.1$ до 0.45. Зависимость среднего времени достижения нативного состояния от температуры оказалась U-образной, т.е. характерной для белков, как известно из некоторых экспериментов и теоретических моделей [Karplus, 1997; Oliveberg, Tan and Fersht, 1995]. Полученная кривая имеет минимум при $T \approx 0.27$, что при выбранной параметризации потенциала взаимодействия соответствует температуре ≈ 300 К. Эта температура и была использована для дальнейшего анализа процесса укладки данного белка на основе данных, полученных при расчете 5000 траекторий укладки.

6.2. Гидродинамический подход

Гидродинамическое описание укладки белка [Chekmarev et al., 2008] основано на расчетах переходов в пространстве коллективных переменных (\mathbf{g}), которые выбраны для характеристики процесса укладки. В данном случае коллективные переменные (g_1, g_2) были получены в результате редуцирования конформационного пространства, заданного множеством расстояний между узлами модели белка, соответствующих нативным контактам, к двумерному пространству. Для этого был использован метод главных компонент (РСА, principal components analysis [Jolliffe, 2002]); спектр собственных чисел показан на

Рис. 6.2 [Palyanov, Chekmarev, 2016]. В качестве переменной g_1 был выбран собственный вектор, соответствующий максимальному собственному числу, которому соответствует около 91% вариации данных, а в качестве g_2 – линейная комбинация из всех остальных собственных векторов, взятых с весами, соответствующими их собственным числам [Chekmarev, 2013].

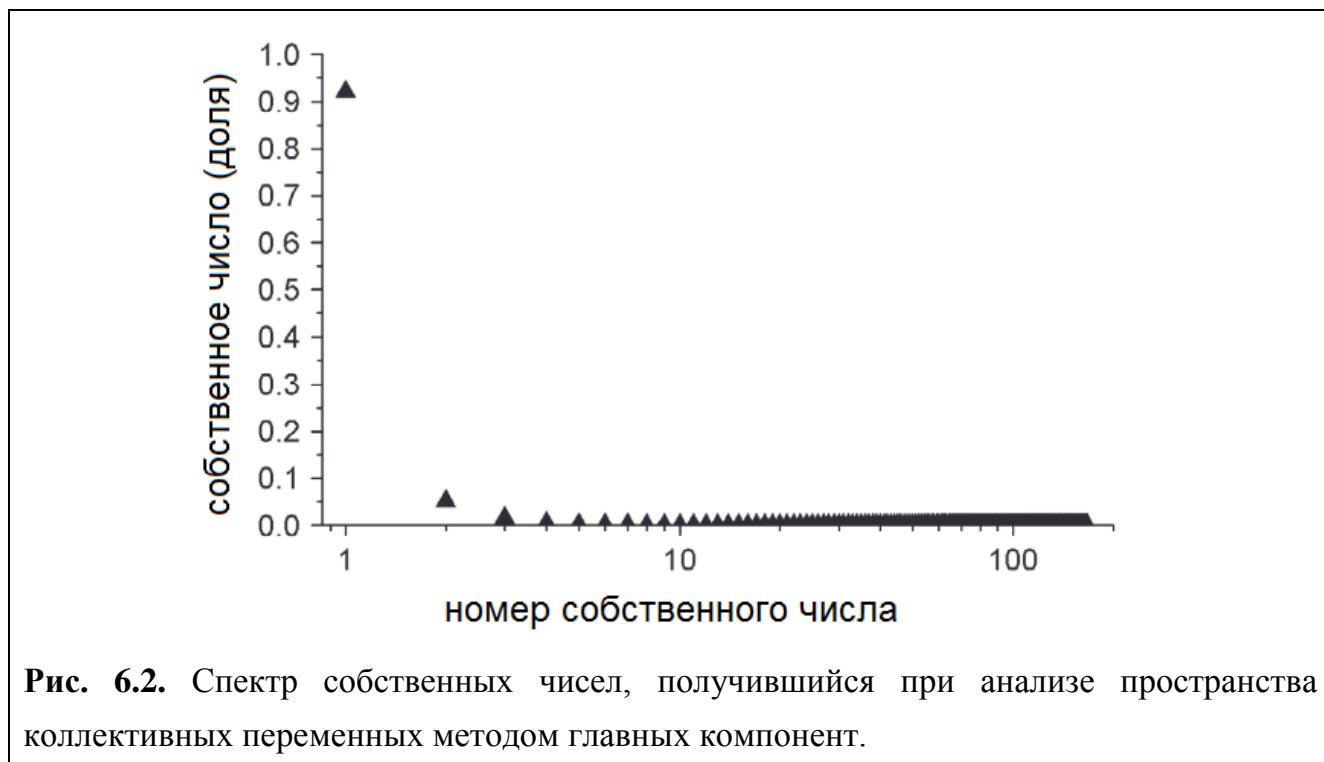


Рис. 6.2. Спектр собственных чисел, получившийся при анализе пространства коллективных переменных методом главных компонент.

Рассчитанные траектории динамики структуры белка использовались для вычисления потоков вероятности $\mathbf{j}(\mathbf{g})$. В точке \mathbf{g} g_1 -компонента потока определяется следующим образом:

$$j_{g_1}(\mathbf{g}) = \left[\sum_{\substack{g_1'' - g_1' > 0 \\ g_1', g_1''(\mathbf{g} \subset \mathbf{g}^*)}} n(\mathbf{g}'', \mathbf{g}') - \sum_{\substack{g_1'' - g_1' < 0 \\ g_1', g_1''(\mathbf{g} \subset \mathbf{g}^*)}} n(\mathbf{g}'', \mathbf{g}') \right] / (M \bar{t}_f \Delta g_2),$$

где M – число рассматриваемых смоделированных траекторий, \bar{t}_f – среднее время сворачивания белка в нативное состояние, $n(\mathbf{g}'', \mathbf{g}')$ – число переходов из состояния \mathbf{g}' в \mathbf{g}'' , и $\mathbf{g} \subset \mathbf{g}^*$ – символическое обозначение условия, что переходы, включенные в сумму, могут быть соединены прямой линией, соединяющей точки \mathbf{g}' и \mathbf{g}'' , которая пересекает линию $g_1 = \text{const}$ внутри интервала длиной Δg_2 с центром в точке \mathbf{g} . Похожим образом определяется g_2 компонента $\mathbf{j}(\mathbf{g})$, за исключением того, что в этом случае выбираются переходы, пересекающие

линию $g_2 = \text{const}$. Расчеты были произведены на решетке с дискретизацией $\Delta g_1 = \Delta g_2 = 1$.

Знание поля вероятностей переходов обеспечивает возможность ввести линии тока для потока состояний белка, идущего от области развернутых состояний к нативному, т.е. линий, перпендикулярных к локальным направлениям потоков $\mathbf{j}(\mathbf{g})$. Для этой цели использовалась функция потока, которая аналогична таковой в гидродинамике [Ландау и Лифшиц, 1987]. Для потока, направленного в основном вдоль оси g_1 (см. Рис. 6.6), функция потока $\Psi(g_1, g_2)$ вычисляется следующим образом:

$$\Psi(g_1, g_2) = \int_0^{y=g_2} j_{g_1}(g_1, y) dy$$

Тогда линия тока потока определяется уравнением $\Psi(g_1, g_2) = \text{const}$, а две линии тока - $\Psi(g_1, g_2) = C_1$ и $\Psi(g_1, g_2) = C_2$ ($C_1 > C_2$) – задают трубку тока, которая содержит долю $(C_2 - C_1)/G$ всего потока G .

6.3. Стандартный анализ на основе поверхности свободной энергии

На Рис. 6.3, для последующего сравнения с результатами анализа посредством гидродинамического подхода, показана поверхность свободной энергии убиквитина, иллюстрирующая рассмотрение проблемы в рамках традиционного подхода (получена на основе анализа тех же 5000 траекторий). Свободная энергия рассчитывалась как $F(g_1, g_2) = -T \ln p(g_1, g_2)$, где $p(g_1, g_2)$ – вероятность пребывания системы в точке (g_1, g_2) . На Рис. 6.3 она отсчитывается от свободной энергии нативного состояния F_{nat} , которая равна потенциальной энергии нативного состояния U_{nat} , поскольку нативное состояние является уникальным (представленным единственной структурой) и поэтому его энтропия $S_{\text{nat}} = (U_{\text{nat}} - F_{\text{nat}})/T$ равна нулю. Обзор ПСЭ выявляет бассейны притяжения, в которых белок последовательно компактизуется по мере преобразования из полностью развернутого состояния к нативному состоянию вдоль оси g_1 , которая может быть в какой-то мере проассоциирована с координатой реакции.

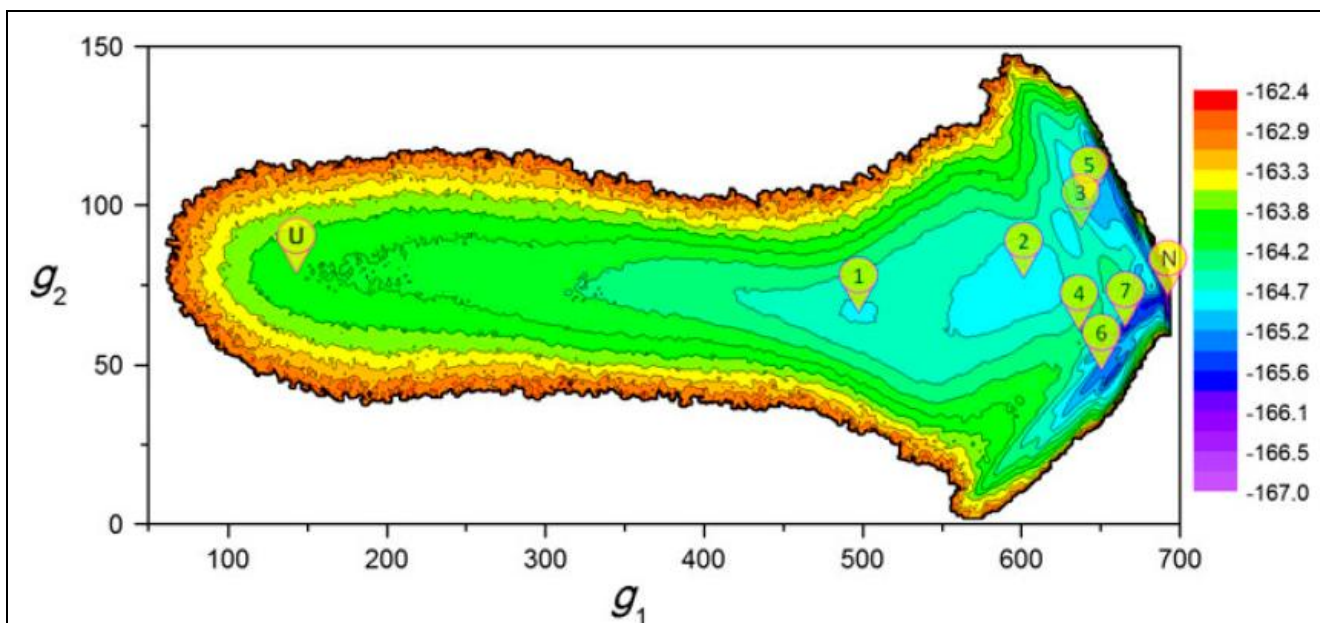


Рис. 6.3. Поверхность свободной энергии (ПСЭ) как функция коллективных переменных g_1 и g_2 . U (unfolded) - область развернутых состояний белка, N – нативное состояние, 1-7 – структуры, характерные для данных областей ПСЭ (показаны на Рис. 6.4).

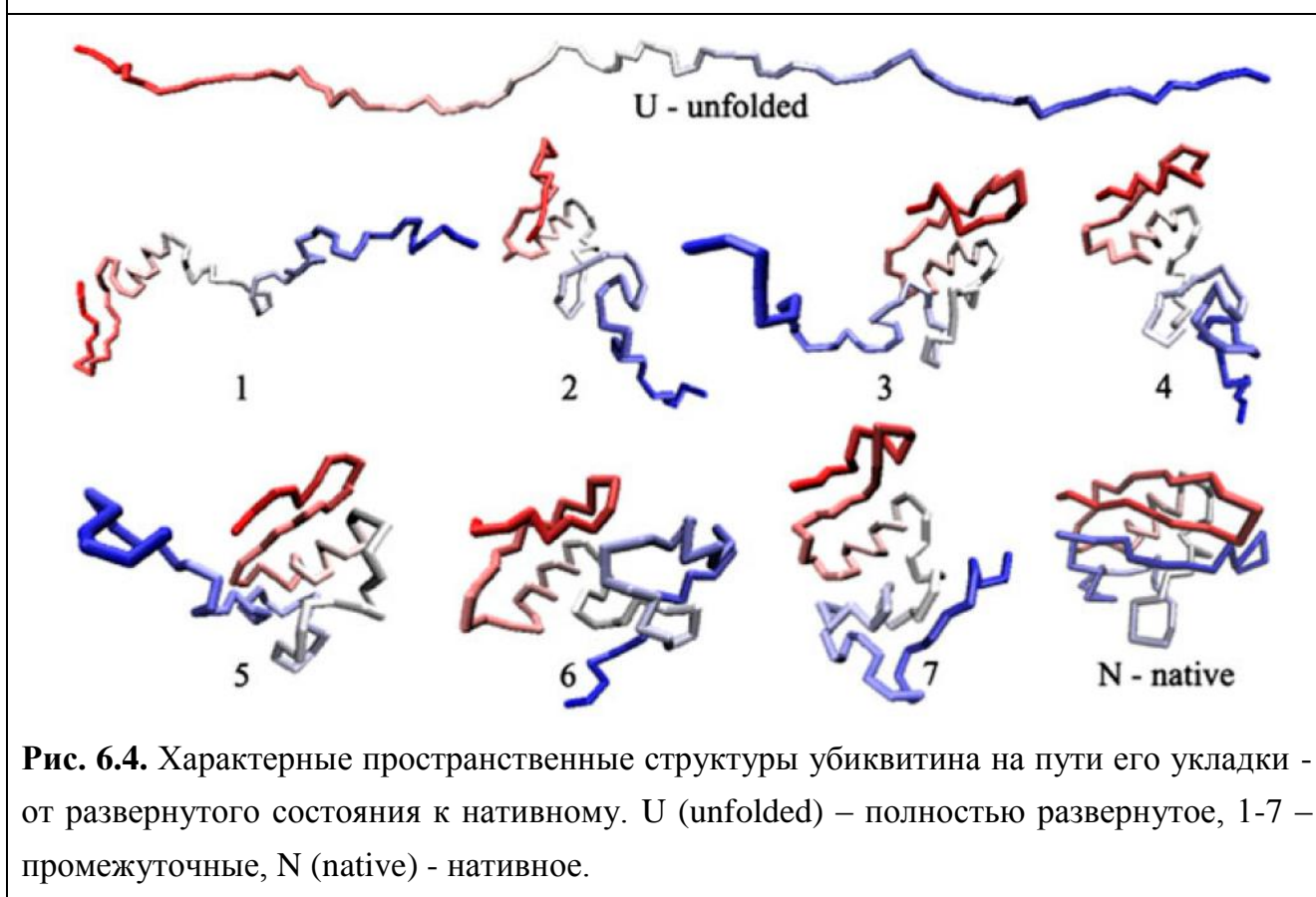


Рис. 6.4. Характерные пространственные структуры убиквитина на пути его укладки - от развернутого состояния к нативному. U (unfolded) – полностью развернутое, 1-7 – промежуточные, N (native) - нативное.

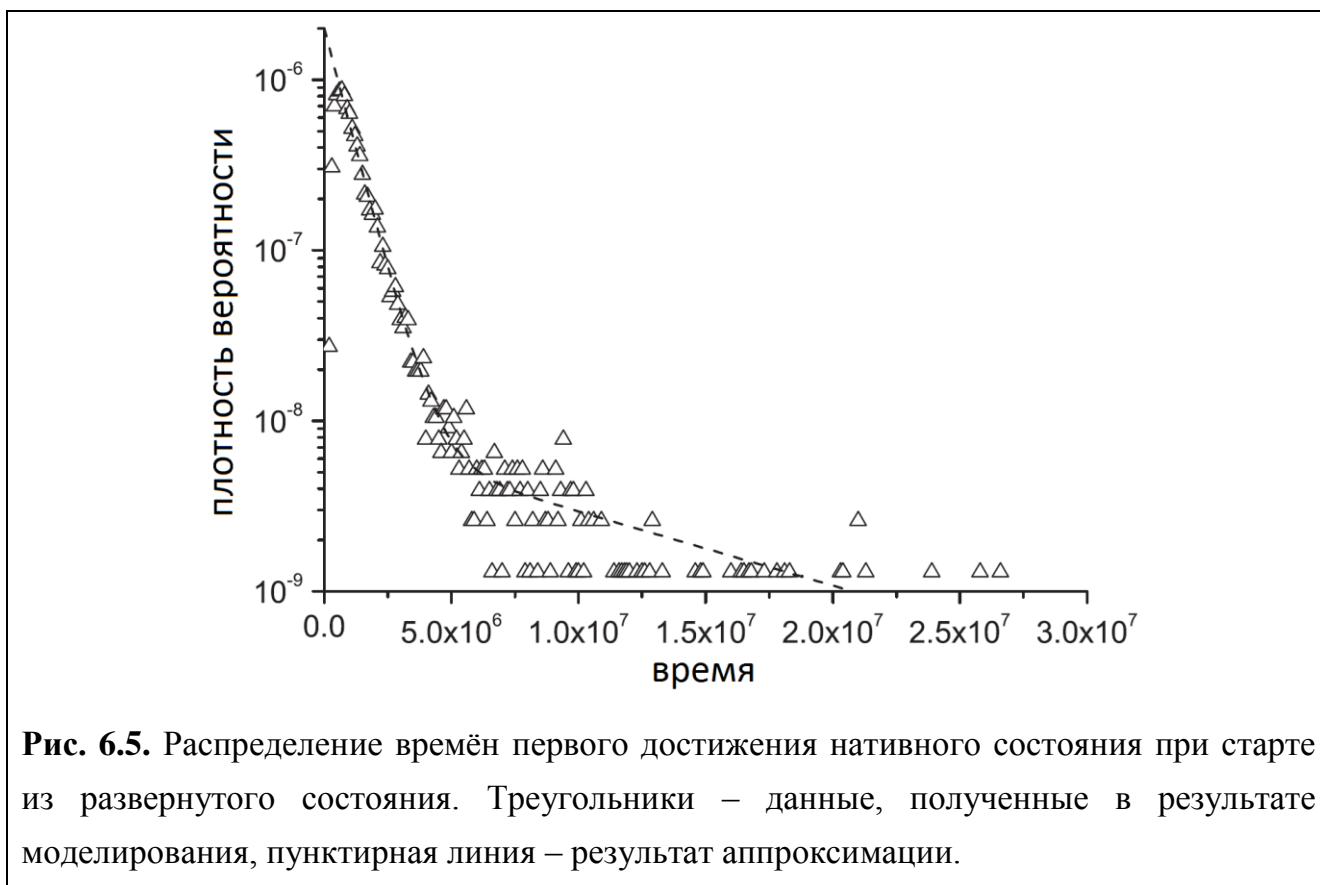
Более точно координата реакции может быть представлена как центральная линия тока в потоке укладки (см. Рис. 6.6).

Продолжая анализ Рис. 6.3, отметим, что бассейны 1 и 2, разделенные незначительным барьером, могут быть отнесены к частично-свернутым полукompактным структурам. В них уже сформированы некоторые элементы вторичной структуры белка, главным образом альфа-спираль и «шпилька», образованная участками $\beta 1$ и $\beta 2$, но контакты между этими элементами еще не сформированы должным образом. Бассейны 5, 6 и 7 соответствуют пространственным структурам белка, близким к нативному состоянию, в каждом бассейне по-своему. Области 3 и 4, лежащие между бассейнами полукompактных и околонативных структур, относятся к ансамблю переходных состояний. Характерной особенностью этих структур является то, что в них альфа-спираль и $\beta 1$ - $\beta 2$ шпилька формируют хорошо определенный фрагмент нативной структуры, что находится в согласии предыдущими исследованиями [Sosnick et al., 2004; Went and Jackson, 2005]. Также стоит отметить, что поведение усредненной потенциальной энергии и энтропии находится в соответствии с тем, что наиболее часто наблюдается при фолдинге белка [Karplus et al., 2011] – монотонное убывание по мере движения к нативному состоянию, но различным образом, что и приводит к наблюдаемому барьеру свободной энергии.

На Рис. 6.5 показано распределение времени первого достижения нативного состояния при температуре $T = 0.27$. Распределение хорошо аппроксимируется следующей функцией:

$$p(t) = A[\exp(-t/\tau_1) + B \exp(-t/\tau_2)],$$

где $\tau_1 = 7.6 \cdot 10^5$, $\tau_2 = 1.0 \cdot 10^7$, $A = 2 \cdot 10^{-6}$ и $B = 4 \cdot 10^{-2}$, т.е. хотя кинетика формально описывается как двустадийная, вклад второй компоненты является малым – порядка 1%, что находится в согласии с предыдущими исследованиями [Briggs and Roder, 1992; Gladwin and Evans, 1996; Krantz and Sosnick, 2000; Piana et al., 2013; Reddy and Thirumalai, 2015; Sivaraman et al., 2001].



Небольшое отклонение от одностадийной кинетики, наиболее вероятно, обусловлено наличием бассейнов 5, 6 и 7, которые отделены от нативного незначительными барьерами, т.е. белок может один из них перед тем, как достигнет нативного состояния.

5.4. Анализ на основе гидродинамического подхода

Продолжая анализ ПСЭ убиквитина, отдельно стоит отметить, что она имеет максимальную ширину в области переходных состояний. Похожее расширение ПСЭ наблюдалось также в случае укладки белка «beta3s miniprotein» в области между развернутыми и нативным состояниями [Kalgin and Chekmarev, 2015; Kalgin et al., 2014], а также в области переходных состояний некоторых белков [Best, Hummer and Eaton, 2013]. Поскольку при построении ПСЭ убиквитина, показанной на Рис. 6.3, каждая траектория укладки начиналась в развернутом, а заканчивалась в нативном состоянии, поток укладки через любое сечение ПСЭ $g_1 = \text{const}$ является постоянным. Вследствие этого пространственные

плотности потока $\mathbf{j}(\mathbf{g})$ принимают минимальные значения в области переходных состояний. Соответственно, линии тока потоков укладки, наложенные на ПСЭ показывают, что значения ширины трубок тока достигают в этой же области максимальных значений (Рис. 6.6).

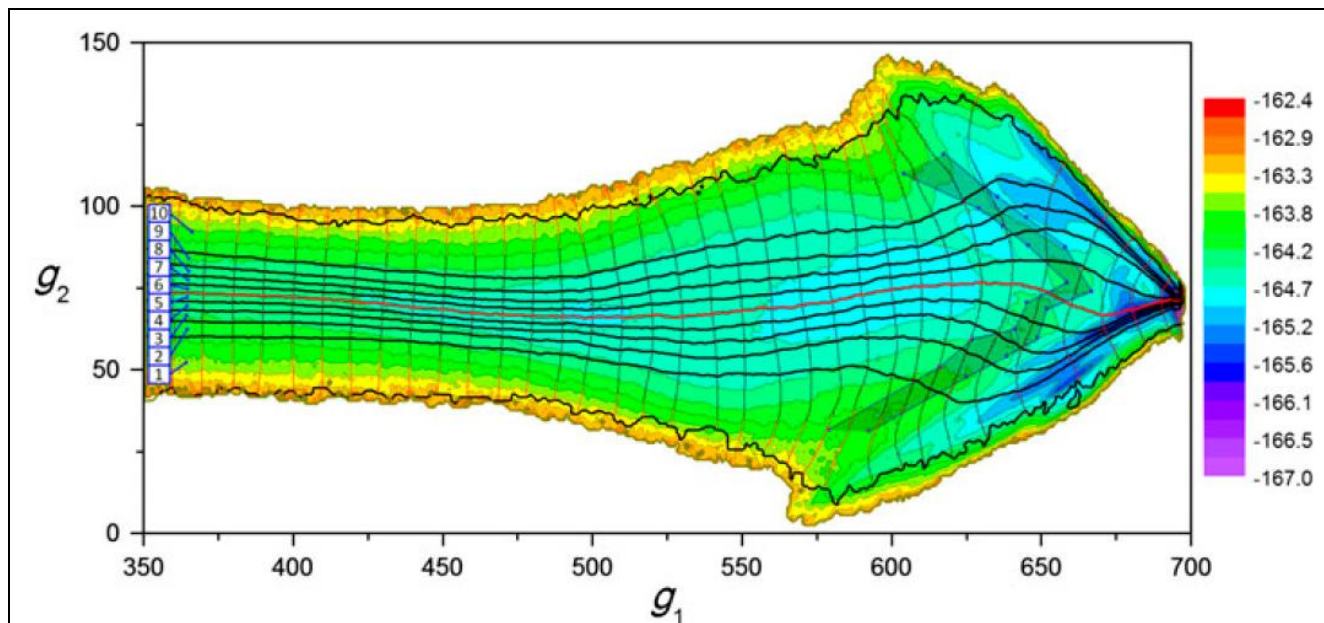


Рис. 6.6. Линии тока и ортогональные им линии, наложенные на фрагмент ПСЭ, представленной на Рис. 6.3. Полупрозрачная область ближе к правому краю (между областями полукомпактных и околонативных состояний) построена на основе интервалов, в пределах которых отклонение от максимальной ширины каждой из трубок тока не превышает 5%.

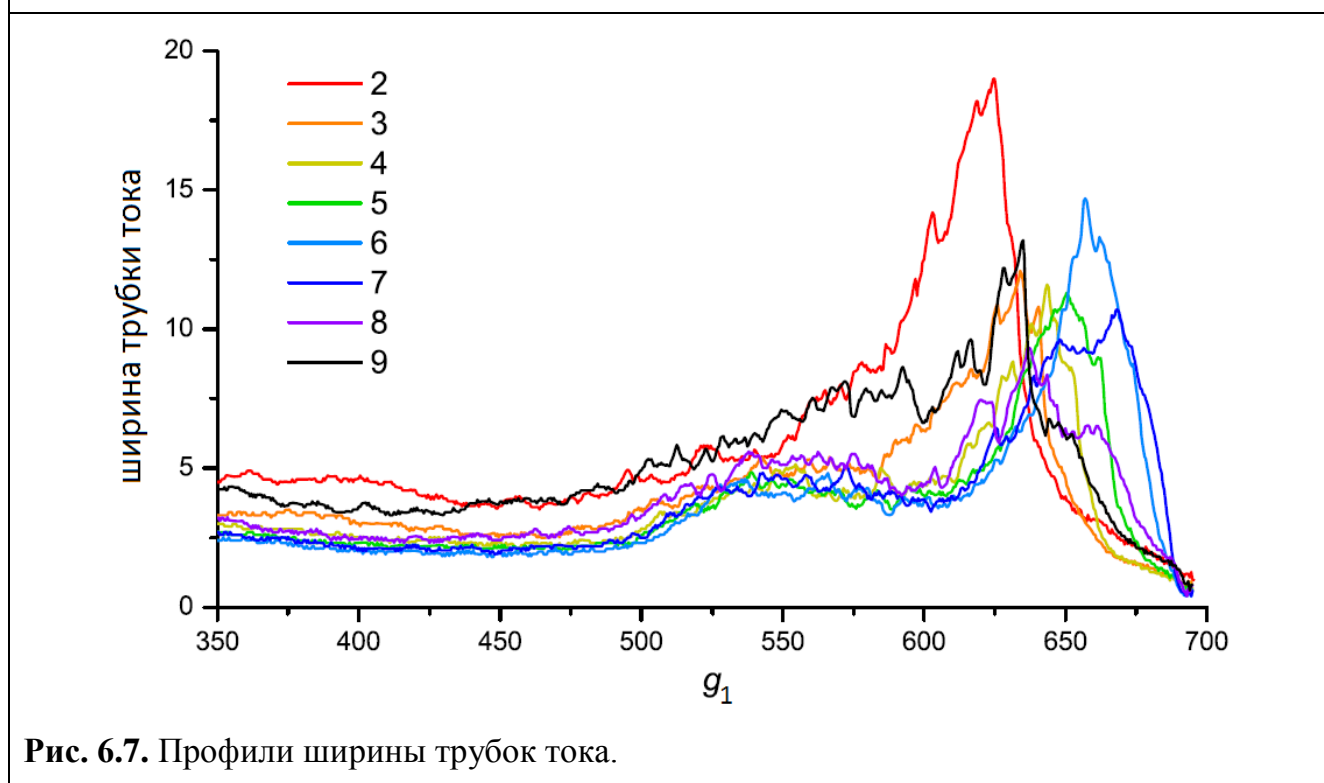


Рис. 6.7. Профили ширины трубок тока.

Информация о профилях ширины трубок тока представлена на Рис. 6.7. В каждой трубке тока плотность потока (\mathbf{j}) изменяется вдоль трубки тока (g) как $j(d) \sim 1/d(g)$, где $d(g)$ – текущее значение ширины трубки тока. Область минимальных значений плотности потока, построенная на основе интервалов (построенных для каждой из трубок тока), в пределах которых отклонение ширины трубки тока от максимального значения не превышает 5%, показана на Рис. 6.6 (полупрозрачная область, наложенная поверх ПСЭ и линий тока). Видно, что она проходит в точности по участкам, разделяющим области полукompактных и околонативных состояний. Сравнение Рис. 6.3 и Рис. 6.6 также позволяет заметить, что структуры 3 и 4, для которых сформирован фрагмент нативного состояния, включающий альфа-спираль и участки $\beta 1$ - $\beta 2$, характерный для ансамбля переходных состояний убиквитина [Sosnick et al., 2004; Went and Jackson, 2005], как раз таки принадлежат вышеупомянутой области.

Гидродинамическая картина процесса укладки, представленная на Рис. 6.6, подтверждает заключение о том, что кинетика укладки убиквитина при комнатной температуре является практически одностадийной. Картина линий тока не содержит вихревых областей, которые являются индикаторами интермедиатов, находящихся вне основного пути укладки [Andryushchenko and Chekmarev, 2016; Kalgin et al., 2009]. Конкретнее, наблюдается набор «параллельных» трубок тока, начинающихся в области развернутых состояний и заканчивается в нативном состоянии. Отметим, что разделение поля потока на трубки тока не обязательно обозначает, что каждая траектория укладки должна быть ограничена определенной трубкой тока, поскольку, согласно определению линии тока [Ландау и Лифшиц, 1987], только средний поток через линию тока обязан быть равным нулю. Элементарные события перехода через линию тока могут быть и происходят, подобно переходам отдельных молекул через линии тока в потоках газа [Chekmarev et al., 2008]. Если параллельные пути укладки начинаются в области, где конформации белка не разделены значительными барьерами, как в области развернутых состояний в нашем случае, они не

осложняют кинетику укладки, в частности, не приводят к отклонению от одностадийной кинетики [Deng, Dai and Levy, 2013].

В соответствии с определением g_1 и g_2 , они, по крайней мере формально, охватывают всю информацию о расстояниях между мономерами белковой цепи рассматриваемой пространственной структуры белка. Поэтому мы можем предположить, что переменные g_1 и g_2 удовлетворительно отражают многообразие белковых структур. Тогда расширение ПСЭ в области переходных состояний может интерпретироваться как увеличение числа различных структурных состояний белка в этой области, т.е. пространство состояний белка в области переходных состояний является более разреженным, чем в остальных областях. Эта интерпретация дополнительно подтверждается картиной уровня разброса RMSD (root mean square deviation, среднеквадратичного отклонения соответствующих позиций мономеров в паре рассматриваемых структур), построенной в зависимости от тех же переменных - g_1 и g_2 . Значение в каждой точке поверхности было получено посредством рассмотрения множества всех структур с (g_1, g_2) . Центральная структура определялась условием минимального суммарного RMSD между ней и всеми остальными структурами с (g_1, g_2) , а затем для неё рассчитывался разброс значений RMSD. Результат представлен на Рис. 6.8.

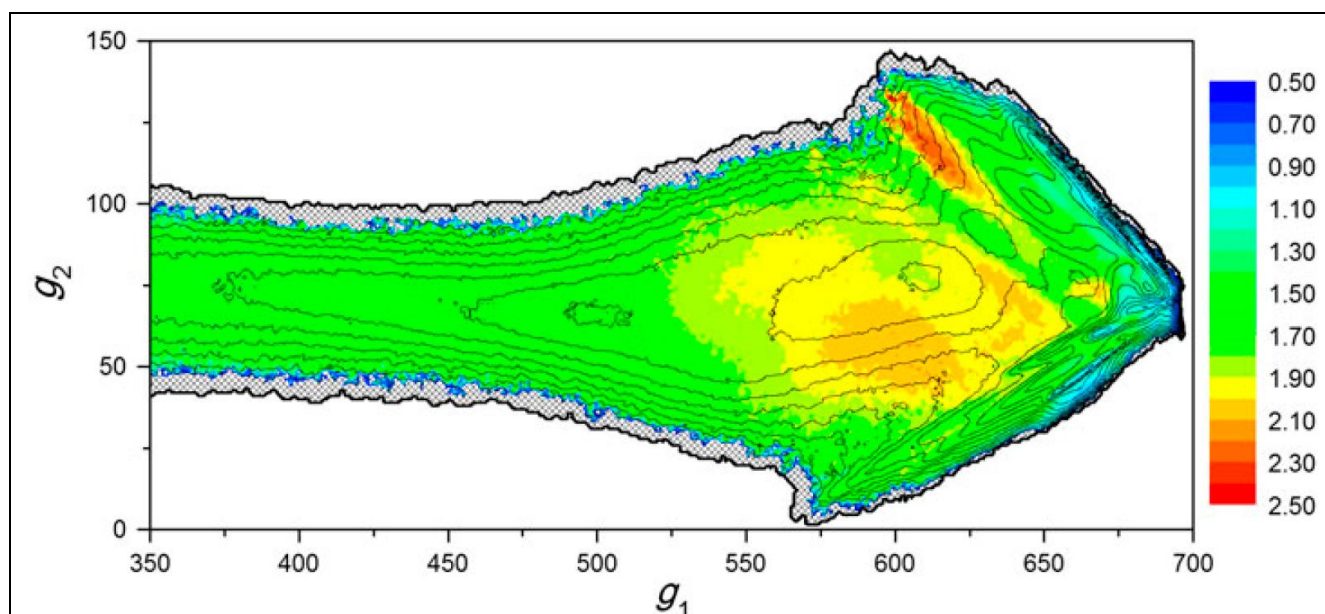


Рис. 6.8. Разброс RMSD в множествах белковых структур с (g_1, g_2) , совмещенный с линиями уровней ПСЭ.

Видно, что большие значения разброса в основном соответствуют области переходных состояний.

Одно существенное следствие увеличения числа различных состояний в области переходных состояний состоит в том, что барьер свободной энергии, присутствующий на ПСЭ, может уменьшаться или даже полностью исчезать, когда свободная энергия проецируется на одну координату реакции, поскольку низкая заселенность состояний белка в области переходных состояний компенсируется их значительным числом.

Чтобы проиллюстрировать это, одномерный профиль свободной энергии был рассчитан двумя различными методами. Первый: $F(g_1) = -T \ln P(g_1)$, где $P(g_1) = \int p(g_1, g_2) dg_2$, а $p(g_1, g_2)$ – вероятность пребывания системы в точке (g_1, g_2) (черная кривая на Рис. 6.9 А). При расчете вторым методом, чтобы учесть изменение числа различных белковых конформаций вдоль g_1 , $P(g_1)$ делится на суммарную ширину трубок тока $W(g_1)$, т.е. на ширину ПСЭ, при данном g_1 (см. Рис. 6.9 В). Соответственно, профиль свободной энергии рассчитывается как $F(g_1) = -T \ln [P(g_1)/W(g_1)]$ (красная кривая на Рис. 6.9 А).

В обоих случаях, чтобы избежать наложения участков, соответствующих бассейнам притяжения и участков области переходных состояний на ПСЭ, профили вероятностей $p(g_1, g_2)$ в разных трубках тока были предварительно выровнены вдоль оси g_1 таким образом, чтобы их минимальные значения соответствовали одному и тому же значению g_1 (переходному состоянию). Для удобства сравнения, профили выровнены таким образом, что они совпадают при малых g_1 . Видно, что в первом случае барьер в области переходных состояний ($g_1 \approx 650$) значительно ниже, чем во втором, т.е. деление на $W(g_1)$, которая имеет максимум в области переходных состояний (Рис. 6.9 В) практически нейтрализует влияние увеличения числа состояний в данной области, что приводит к появлению хорошо выраженного барьера свободной энергии. Дополнительно показан еще один профиль свободной энергии $F(g_1) = -T \ln P(g_1)$ (синяя кривая на Рис. 6.9 А), но в отличие от красной кривой здесь $P(g_1)$ была получена прямым

суммированием $p(g_1, g_2)$ вдоль координаты g_2 для каждой пересекающей ПСЭ линии $g_1 = \text{const}$, т.е. без выравнивания профилей вероятностей вдоль трубок тока. В этом случае барьер свободной энергии не выявляется.

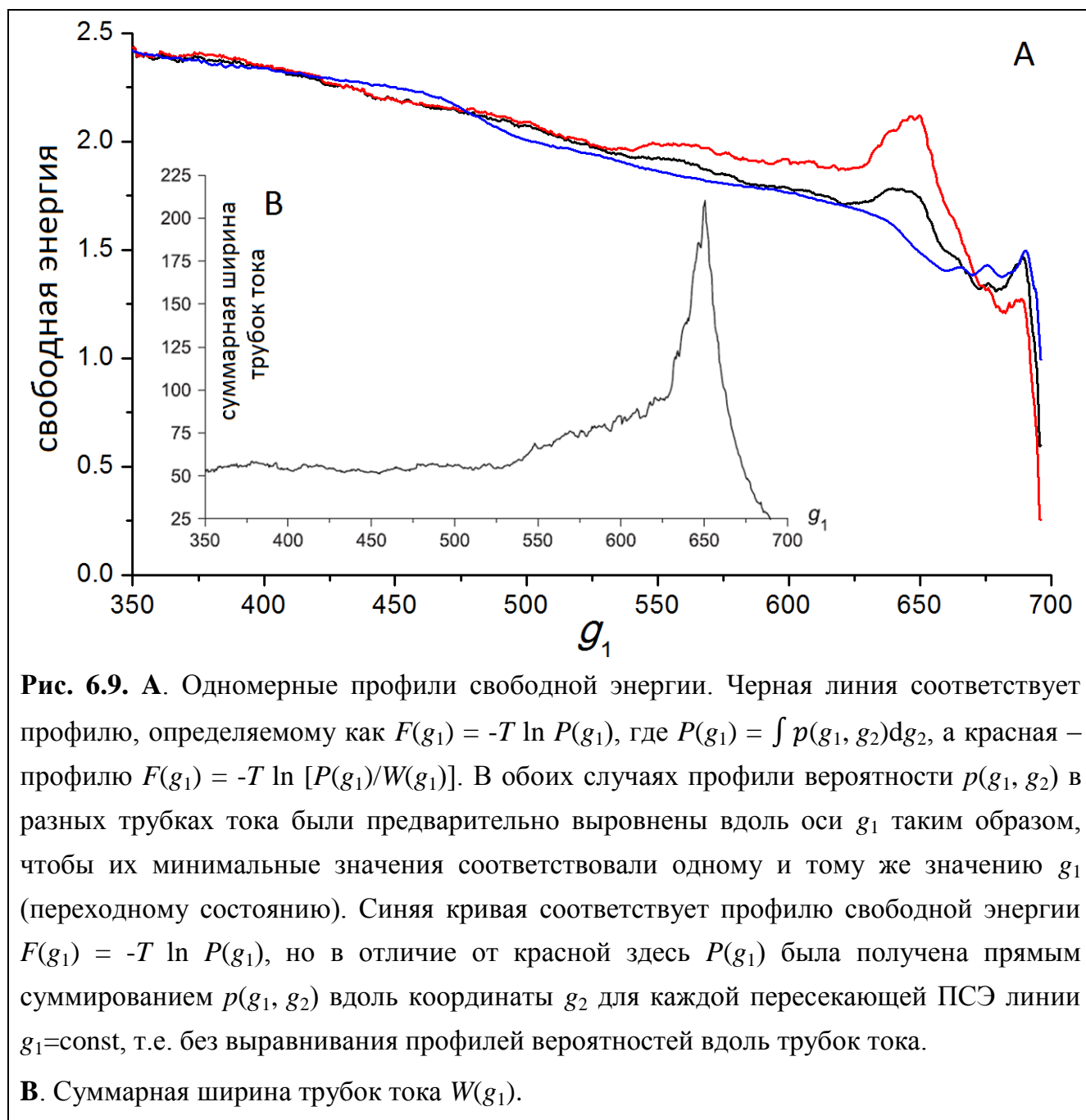


Рис. 6.9. А. Одномерные профили свободной энергии. Черная линия соответствует профилю, определяемому как $F(g_1) = -T \ln P(g_1)$, где $P(g_1) = \int p(g_1, g_2) dg_2$, а красная – профилю $F(g_1) = -T \ln [P(g_1)/W(g_1)]$. В обоих случаях профили вероятности $p(g_1, g_2)$ в разных трубках тока были предварительно выровнены вдоль оси g_1 таким образом, чтобы их минимальные значения соответствовали одному и тому же значению g_1 (переходному состоянию). Синяя кривая соответствует профилю свободной энергии $F(g_1) = -T \ln P(g_1)$, но в отличие от красной здесь $P(g_1)$ была получена прямым суммированием $p(g_1, g_2)$ вдоль координаты g_2 для каждой пересекающей ПСЭ линии $g_1 = \text{const}$, т.е. без выравнивания профилей вероятностей вдоль трубок тока.

В. Суммарная ширина трубок тока $W(g_1)$.

5.5. Итоги

Анализ результатов моделирования укладки убиквитина показал, что двумерная поверхность свободной энергии имеет максимальную ширину в области переходных состояний. Плотности тока вероятности, определенные с

помощью гидродинамического подхода [Chekmarev et al., 2008] уменьшаются до минимума, когда система проходит через эту область. В согласии с предыдущими исследованиями [Sosnick et al., 2004; Went and Jackson, 2005] характеристические конформации белка, принадлежащие к области переходных состояний, как выяснилось, содержат хорошо определенный фрагмент нативного состояния, состоящий из альфа-спирали и шпильки $\beta 1$ - $\beta 2$. Поскольку коллективные переменные, использованные при построении ПСЭ, содержат все компоненты, характеризующие белковые структуры, расширение ПСЭ в области переходных состояний может быть связано с увеличением числа различных состояний белка в данной области; т.е. пространство состояний в области ансамбля переходных состояний является значительно более разреженным, чем в предшествующих (полукомпактных) и последующих (околонативных) областях. Расчет распределения среднеквадратичного отклонения между текущей и нативной структурой в ходе рассмотренных траекторий дополнительно свидетельствует в пользу данного предположения. Эффект минимизации потоков вероятности в области переходных состояний, как ожидается, должен наиболее явно проявиться в случае одностадийной кинетики процесса формирования нативной структуры, когда область развернутых и полукомпактных состояний отделена от области околонативных состояний барьером свободной энергии, соответствующим ансамблю переходных состояний. Одно из существенных следствий из полученных результатов состоит в том, что барьер свободной энергии на поверхности свободной энергии может уменьшаться или даже полностью исчезать в случае, если свободная энергия проецируется на одну ось (координату реакции), потому что низкая заселенность переходных состояний может быть компенсирована большим числом различных состояний по сравнению с соседними областями. Поэтому для расчета более реалистичного профиля свободной энергии вдоль координаты реакции представляется целесообразным использовать именно гидродинамический подход.

Заключение

Работа основана на комплексном подходе к пониманию основных принципов устройства живых систем, управления движением и функционированием, и выполнена в русле кибернетического подхода (согласно формулировке, предложенной Н. Винером в 1948 году [Wiener, 1948]: «кибернетика в современном понимании – как наука об общих закономерностях процессов управления и передачи информации в машинах, живых организмах и обществе»). Исследование сформировало взаимоувязанную группу подходов, моделей и алгоритмов, в совокупности достаточную для изучения многих тонких эффектов, лежащих в основе функционирования относительно простого организма *C. elegans*. На их основе был создан уникальный программный комплекс с открытым исходным кодом, не имеющий аналогов в мире, который как никогда ранее приближает научное сообщество к созданию первого виртуального организма и обладает значительным потенциалом для дальнейшего развития. В будущем это позволит применить данный подход и программный комплекс для моделирования и изучения более сложных организмов, включая их механизмы мышления и памяти.

Среди самостоятельно разработанных программных средств моделирования, визуализации и анализа изучаемых объектов, а также полученных с их помощью оригинальных научных результатов в области вычислительной нейробиологии, биомеханики и молекулярной биологии наиболее важными представляются следующие:

1. Разработан алгоритм генерации 3D модели тела *C. elegans* и связанной с ним мышечной системы, построенной по анатомическим данным с высоким разрешением.
2. Впервые в мире реализован алгоритм PCISPH с открытым исходным кодом (до этого был опубликован лишь алгоритм, а реализация была закрытой). Дополнительно реализована поддержка высокопроизводительных параллельных вычислений на многоядерных CPU и GPU с применением технологии OpenCL.
3. Осуществлено проектирование и реализация уникальной среды моделирования *Sibernetic*, ориентированной на задачи в области биомеханики движения беспозвоночных в физическом окружении, которое может содержать жидкость, гель, эластичные объекты и статичные твердые тела, а также различные пространственные конфигурации на их основе.
4. Впервые в мире произведено моделирование основных типов движения *C. elegans* в явном физическом 3D окружении - плавание в объеме жидкости и ползание по поверхности геля. Также впервые удалось продемонстрировать в единой симуляции оба типа движения, каждый в соответствующей среде, и переход между ними.
5. Разработан алгоритм распознавания формы тела и извлечения данных об активности мышечных клеток из видеозаписи свободнодвижущегося *C. elegans* [Lefebvre et al., 2016]. В результате впервые в мире данные об активности реальных мышечных клеток *C. elegans* были использованы для управления моделью его тела.
6. Реализована возможность сравнения траекторий движения реального и виртуального организма, вызванных одной и той же последовательностью данных о мышечной активности, которая позволяет осуществлять настройку систем, связанных с биомеханикой тела, мышечной системы и внешней средой независимо от работы нервной системы.
7. Произведенный анализ современных экспериментальных данных об электрофизиологии, механизмах генерации и распространения сигналов в

нервных и мышечных клетках *C. elegans* позволил создать биологически достоверные модели этих клеток, включающие основные ионные каналы, с использованием специализированной системы моделирования NEURON.

8. Вклад в развитие методов моделирования и анализа структурных преобразований белковых молекул в процессе самосборки обеспечил возможность более точного определения профиля свободной энергии вдоль координаты реакции в рамках «гидродинамического подхода», улучшив, в том числе, перспективы применения дискретной молекулярной динамики для моделирования структурных изменений ионных каналов в процессе их функционирования в будущем.

Итогом данной работы, помимо совокупности представленных результатов, является то, что исследования в области компьютерного моделирования и разработки виртуального организма на основе *C. elegans*, ранее не проводившиеся в России, были успешно начаты, динамично развивались и к настоящему времени достигли мирового уровня, а также внесли заметный вклад в данное направление науки.

В будущем развитие и применение научных результатов, полученных в рамках диссертационной работы, планируется в следующих направлениях:

- Используя данные об архитектуре и нейрофизиологии связей между нейронами брюшной нервной цепочки, управляющей мышечной системой, а также применяя разработанные в диссертации модели генерации и распространения сигналов, смоделировать эту систему, провести её тестирование, настройку и сравнение с результатами, известными из экспериментов.
- Реализовать для 4-х групп нейронов брюшной нервной цепочки способность реагировать на растяжение вследствие локальных изгибов тела (для VB01...VB11 и DB01...DB07 это свойство установлено с высокой степенью достоверности, для VA01...VA12 и DA01...DA09 – предполагается и требует дополнительной проверки). Предположительно, это свойство существенно для

корректной работы механизма генерации периодических сигналов, управляющих движениями тела. Проверить с помощью моделирования влияние этого механизма на генерацию сигналов у каждой группы, подтвердить или опровергнуть гипотезу о чувствительности к растяжению у групп нейронов VA и DA.

- Подключить к брюшной нервной цепочке механосенсорную систему и пронаблюдать, насколько существенно её влияние на работу системы (ряд исследователей считают, что она необходима для генерации сигналов управления мышечной системой, другие - что её роль скорее второстепенна).
- Одну за другой реализовывать, тестировать и оптимизировать (основываясь на сравнении их работы в реальном и виртуальном организме) фрагменты нервной системы *C. elegans*, предположительно связанные с выполнением той или иной функции в управлении организмом.
- Оснащение виртуального организма *C. elegans* более широким спектром сенсорных модальностей (хемосенсоры, термосенсоры, фоторецепторы – как и у реального организма).
- Использовать созданный программный комплекс в образовательных целях – как наглядное пособие по механизмам работы нервной системы для студентов-нейробиологов
- В более дальней перспективе – использовать все представленные в диссертации разработки для моделирования более сложных организмов.

Литература

1. Abdellah Z., Ahmadi A., Ahmed S., ... (2643 authors – International Human Genome Sequencing Consortium). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 2004, 431 (7011): 931-945. [DOI: 10.1038/nature03001](https://doi.org/10.1038/nature03001)
2. Alonso D.O. and Daggett V. Molecular dynamics simulations of hydrophobic collapse of ubiquitin. *Protein Science*, 1998, 7: 860–874. [DOI: 10.1002/pro.5560070404](https://doi.org/10.1002/pro.5560070404)
3. Alder B.J. and Wainwright T.E. Studies in Molecular Dynamics. I. General Method. *J. Chem. Phys.* 1959, 31: 459. [DOI: 10.1063/1.1730376](https://doi.org/10.1063/1.1730376)
4. Altun Z.F. and Hall D.H. 2009. Muscle system, somatic muscle. In *WormAtlas*. [DOI: 10.3908/wormatlas.1.7](https://doi.org/10.3908/wormatlas.1.7)
5. Andryushchenko V.A. and Chekmarev S.F. A hydrodynamic view of the first-passage folding of Trp-cage miniprotein. *European Biophysics Journal*, 2016, 45: 229–243. [DOI: 10.1007/s00249-015-1089-7](https://doi.org/10.1007/s00249-015-1089-7)
6. Anfinsen C.B. Principles that govern the folding of protein chains. *Science*, 1973, 181: 223-230.
7. Ardiel E.L. and Rankin C.H. An elegant mind: learning and memory in *Caenorhabditis elegans*. *Learning and Memory*, 2010, 17(4): 191–201. [DOI: 10.1101/lm.960510](https://doi.org/10.1101/lm.960510)
8. Avery L., Horvitz H.R. Pharyngeal pumping continues after laser killing of the pharyngeal nervous system of *C. elegans*. *Neuron*, 1989, 3(4): 473-85.

9. Avery L. and You Y.J. *C.elegans* feeding. *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2012. [DOI: 10.1895/wormbook.1.150.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.150.1)
10. Azevedo F.A., Carvalho L.R., Grinberg L.T., Farfel J.M., Ferretti R.E., Leite R.E., Jacob F.W., Lent R., Herculano-Houzel S. Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J. Comp. Neurol.*, 2009, 513(5): 532-41. [DOI: 10.1002/cne.21974](https://doi.org/10.1002/cne.21974)
11. Babu C.R., Hilser V.J. and Wand A.J. Direct access to the cooperative substructure of proteins and the protein ensemble via cold denaturation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2004, 11: 352–357. [DOI: 10.1038/nsmb739](https://doi.org/10.1038/nsmb739)
12. Backholm M., Ryu W.S., Dalnoki-Veress K. Viscoelastic properties of the nematode *Caenorhabditis elegans*, a self-similar, shear-thinning worm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2013, 110: 4528–4533. [DOI: 10.1073/pnas.1219965110](https://doi.org/10.1073/pnas.1219965110)
13. Backholm M. Biomechanics of *C. elegans* as probed by micropipette deflection. PhD Thesis, McMaster University, 2015. <https://macsphere.mcmaster.ca/handle/11375/18317>
14. Bargmann C.I. Neurobiology of the *Caenorhabditis elegans* genome. *Science*, 1998, 282: 2028-2033.
15. Becker M., Teschner M. Weakly compressible SPH for free surface flows. *Proc. ACM SIGGRAPH/Eurographics SCA*, 2007, 63–72. ISBN: 978-1-59593-624-0
16. Berri S., Boyle J.H., Tassieri M., Hope I.A., Cohen N. Forward locomotion of the nematode *C. elegans* is achieved through modulation of a single gait. *HFSP Journal*, 2009, 3(3): 186–193. [DOI: 10.2976/1.3082260](https://doi.org/10.2976/1.3082260)
17. Best R.B., Hummer G. and Eaton W.A. Native contacts determine protein folding mechanisms in atomistic simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2013, 110: 17874–17879. [DOI: 10.1073/pnas.1311599110](https://doi.org/10.1073/pnas.1311599110)
18. Bett G.C.L., Zhou Q. and Rasmusson R.L. Models of HERG gating. *Biophys. Journal*, 2011, 101(3): 631–642. [DOI: 10.1016/j.bpj.2011.06.050](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2011.06.050)

19. Bilbao A., Patel A.K., Rahman M., Vanapalli S.A. and Blawdziewicz J. Roll maneuvers are essential for active reorientation of *Caenorhabditis elegans* in 3D media. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2018, 201706754.
[DOI: 10.1073/pnas.1706754115](https://doi.org/10.1073/pnas.1706754115)
20. Bird A.F. and Bird J. The structure of nematodes. 1991. USA, San Diego, CA, Academic Press. ISBN: 978-0-323-13839-0
21. Bondarenko V.E., Bett G.C.L. and Rasmusson R.L. A model of graded calcium release and L-type Ca²⁺ channel inactivation in cardiac muscle. Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol., 2004, 286: H1154–H1169.
[DOI: 10.1152/ajpheart.00168.2003](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00168.2003)
22. Boyle J.H., Bryden J., Cohen N. An Integrated Neuromechanical Model of *C. elegans* Forward Locomotion. Lecture Notes in Computer Science, 2007, 4984: 37–47. [DOI: 10.1007/978-3-540-69158-7_5](https://doi.org/10.1007/978-3-540-69158-7_5)
23. Boyle J.H., Berri S. and Cohen N. Gait modulation in *C. elegans*: an integrated neuromechanical model. Front. Comput. Neurosci., 2012, 6:10.
[DOI: 10.3389/fncom.2012.00010](https://doi.org/10.3389/fncom.2012.00010)
24. Boyle J.H. *C. elegans* locomotion: an integrated approach. Ph.D. thesis, University of Leeds, The University of Leeds School of Computing, 2009.
<https://core.ac.uk/download/files/139/43059.pdf>
25. Brenner S. The Genetics of *Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1974, 77(1): 71–94.
26. Briggs M.S. and Roder H. Early hydrogen-bonding events in the folding reaction of ubiquitin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1992, 89: 2017–2021.
27. Brutscher B., Brüschweiler R. and Ernst, R.R. Backbone dynamics and structural characterization of the partially folded A state of ubiquitin by 1H, 13C, and 15N nuclear magnetic resonance spectroscopy. Biochemistry, 1997, 36: 13043–13053.
[DOI: 10.1021/bi971538t](https://doi.org/10.1021/bi971538t)
28. Bryden J.A. and Cohen N.A. Simulation model of the locomotion controllers for the nematode *Caenorhabditis elegans*. Proceedings of the Eighth International

- Conference on the Simulation of Adaptive Behavior. SAB'04, Los Angeles, CA, USA. MIT Press, Cambridge, Mass. 2004, 183-192. ISBN 978-0-262-69341-7
29. Busbice T., Gleeson P., Khayrulin S., Cantarelli M., Dibert A., Idili G., Palyanov A., Larson S. The NeuroML *C. elegans* connectome. Front. Neuroinform. Conference Abstract: 5th INCF Congress of Neuroinformatics, 2013, 82-83. [DOI: 10.3389/conf.fninf.2013.08.00017](https://doi.org/10.3389/conf.fninf.2013.08.00017)
 30. Byerly L. and Masuda M.O. Voltage-clamp analysis of the potassium current that produces a negative-going action potential in *Ascaris* muscle. J. Physiol., 1979, 288: 263-284.
 31. Carnevale N.T. and Hines M.L. The Neuron Book. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 2006. [DOI: 10.1017/CBO9780511541612](https://doi.org/10.1017/CBO9780511541612)
 32. Chalfie M., Sulston J.E., White J.G., Southgate E., Thomson J.N. and Brenner S. The neural circuit for touch sensitivity in *Caenorhabditis elegans*. J. Neurosci. 1985, 5: 956-964.
 33. Chekmarev S.F., Krivov S.V. and Karplus, M. Folding of ubiquitin: A simple model describes the strange kinetics. Journal of Physical Chemistry B, 2006, 110: 8865–8869. [DOI: 10.1021/jp056799o](https://doi.org/10.1021/jp056799o)
 34. Chekmarev S.F. Information entropy as a measure of nonexponentiality of waiting-time distributions. Physical Review E, 2008, 78: 066113. [DOI: 10.1103/PhysRevE.78.066113](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.066113)
 35. Chekmarev S.F. Protein folding: Complex potential for the driving force in a two-dimensional space of collective variables. Journal of Chemical Physics, 2013, 139: 145103. [DOI: 10.1063/1.4824133](https://doi.org/10.1063/1.4824133)
 36. Chekmarev S.F., Palyanov A.Yu., Karplus M. Hydrodynamic description of protein folding. Physical Review Letters, 2008, 100(1): 018107. [DOI: 10.1103/PhysRevLett.100.018107](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.100.018107)
 37. Chen B.L., Hall D.H. and Chklovskii D.B. Wiring optimization can relate neuronal structure and function. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006, 103(12): 4723–4728. [DOI: 10.1073/pnas.0506806103](https://doi.org/10.1073/pnas.0506806103)

38. Chung H.S., Khalil M., Smith A.W., Ganim Z. and Tokmakoff A. Conformational changes during the nanosecond to-millisecond unfolding of ubiquitin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2005, 102: 612–617.
[DOI: 10.1073/pnas.0408646102](https://doi.org/10.1073/pnas.0408646102)
39. Chung H.S., Shandiz A., Sosnick T.R. and Tokmakoff A. Probing the folding transition state of ubiquitin mutants by temperature-jump-induced downhill unfolding. *Biochemistry*, 2008, 47: 13870–13877. [DOI: 10.1021/bi801603e](https://doi.org/10.1021/bi801603e)
40. Cofer D., Cymbalyuk G., Reid J., Zhu Y., Heitler W.J. and Edwards D.H. Animatlab: A 3D graphics environment for neuromechanical simulations. *Journal of Neuroscience Methods*, 2010, 187(2): 280 – 288.
[DOI: 10.1016/j.jneumeth.2010.01.005](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2010.01.005)
41. Cohen J.D., Lin M.C., Manocha D., Ponamgi M. I-collide: An interactive and exact collision detection system for large-scale environments. *Proceedings of the 1995 symposium on Interactive 3D graphics*, New York, 1995, 218: 189-196.
[DOI: 10.1145/199404.199437](https://doi.org/10.1145/199404.199437)
42. Cohen N., Sanders T. Nematode locomotion: dissecting the neuronal–environmental loop. *Current opinion in neurobiology*, 2014, 25: 99-106.
[DOI: 10.1016/j.conb.2013.12.003](https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.12.003)
43. Cohen N. and Ranner T. A new computational method for a model of *C. elegans* biomechanics: Insights into elasticity and locomotion performance. 2017.
<http://arxiv.org/abs/1702.04988>
44. Conradt B. and Xue D. Programmed cell death, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, 2005. [DOI: 10.1895/wormbook.1.32.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.32.1)
45. Conte D., MacNeil L.T., Walhout A.J.M. and Mello C.C. RNA Interference in *Caenorhabditis elegans*. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2015, 109: 26.3.1-26.3.30.
[DOI: 10.1002/0471142727.mb2603s109](https://doi.org/10.1002/0471142727.mb2603s109)
46. Cordier F. and Grzesiek S. Temperature-dependence of protein hydrogen bond properties as studied by highresolution NMR. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 317: 739–752. [DOI: 10.1006/jmbi.2002.5446](https://doi.org/10.1006/jmbi.2002.5446)

47. Corsi A.K., Wightman B., and Chalfie M. A Transparent window into biology: A primer on *Caenorhabditis elegans*, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2015. [DOI: 10.1895/wormbook.1.177.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.177.1)
48. Cox E.A., Hardin J. Sticky worms: adhesion coomplexes in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.*, 2004, 117: 1885–1897. [DOI: 10.1242/jcs.01176](https://doi.org/10.1242/jcs.01176)
49. Crank J. and Nicholson P. A practical method for numerical evaluation of solutions of partial differential equations of the heat-conduction type. *Proceedings of the Cambridge Philosophical Society*, 1947, 43:50-67.
50. Croll N.A. Behavioural Analysis of Nematode Movement. *Advances in Parasitology*, 1975, 13: 71-122. [DOI: 10.1016/S0065-308X\(08\)60319-X](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60319-X)
51. Davis M.W., Somerville D., Lee R.Y.N., Lockery S., Avery L. and Fambrough D.M. Mutations in the *Caenorhabditis elegans* Na,K-ATPase α -subunit gene, *eat-6*, disrupt excitable cell function. *Journal of Neuroscience*, 1995, 15(12): 8408–18.
52. Davis R.E., Stretton A.O. Passive membrane properties of motoneurons and their role in long-distance signaling in the nematode *Ascaris*. *J. Neurosci.*, 1989, 9(2): 403-414
53. Delingette H., Ayache N. Soft tissue modeling for surgery simulation. *Handbook of Numerical Analysis*, 12. Elsevier, Amsterdam, 2004, 453–550. [DOI: 10.1016/S1570-8659\(03\)12005-4](https://doi.org/10.1016/S1570-8659(03)12005-4)
54. Demin A.V., Vityaev E.E. Learning in a virtual model of the *C. elegans* nematode for locomotion and chemotaxis. *Biologically Inspired Cognitive Architectures*, 2014, 7: 9-14. [DOI: 10.1016/j.bica.2013.11.005](https://doi.org/10.1016/j.bica.2013.11.005)
55. Deng N.J., Dai W. and Levy R.M. How kinetics within the unfolded state affects protein folding: An analysis based on Markov state models and an ultra-long MD trajectory. *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117: 12787–12799. [DOI: 10.1021/jp401962k](https://doi.org/10.1021/jp401962k)
56. Ding F., Jha R.K. and Dokholyan N.V. Scaling behavior and structure of denatured proteins. *Structure*, 2005, 13: 1047–1054. [DOI: 10.1016/j.str.2005.04.009](https://doi.org/10.1016/j.str.2005.04.009)

57. Dong X., Liu O.W., Howell A.S. and Shen K. An extracellular adhesion molecule complex patterns dendritic branching and morphogenesis. *Cell*, 2013, 155: 296-307. [DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.059](https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.08.059)
58. Durier F. and Vecchia C.D. Implementation of feedback in smoothed particle hydrodynamics: towards concordance of methods. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 2012, 419(1): 465–478.
[DOI: 10.1111/j.1365-2966.2011.19712.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2966.2011.19712.x)
59. Eliasmith C., Stewart T.C., Choo X., Bekolay T., DeWolf T., Tang Y., Rasmussen D. A large-scale model of the functioning brain. *Science*, 2012, 338(6111): 1202-1205. [DOI: 10.1126/science.1225266](https://doi.org/10.1126/science.1225266)
60. Fang-Yen C., Avery L., and Samuel A.D.T. Two size-selective mechanisms specifically trap bacteria-sized food particles in *Caenorhabditis elegans*. *PNAS*, 2009, 106 (47): 20093-20096. [DOI: 10.1073/pnas.0904036106](https://doi.org/10.1073/pnas.0904036106)
61. Fang-Yen C., Wyart M., Xie J., Kawai R., Kodger T., Chen S., Wen Q., and Samuel A.D.T. Biomechanical analysis of gait adaptation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *PNAS*, 2010, 107(47): 20323-20328.
[DOI: 10.1073/pnas.1003016107](https://doi.org/10.1073/pnas.1003016107)
62. Faumont S., Rondeau G., Thiele T.R., Lawton K.J., McCormick K.E., Sottile M., and others. An image-free opto-mechanical system for creating virtual environments and imaging neuronal activity in freely moving *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*, 2011, 6(9): e24666. [DOI: 10.1371/journal.pone.0024666](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024666)
63. Fieseler C., Kunert-Graf J. and Kutz J.N. The control structure of the nematode *Caenorhabditis elegans*: Neuro-sensory integration and proprioceptive feedback. *Journal of biomechanics*, 2018, 74: 1-8.
[DOI: 10.1016/j.jbiomech.2018.03.046](https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2018.03.046)
64. Fleischhauer R., Davis M.W., Dzhura I., Neely A., Avery L. and Joho R.H. Ultrafast inactivation causes inward rectification in a voltage-gated K⁺ channel from *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of Neuroscience*, 2002, 20(2): 511-520.
[DOI: 10.1523/JNEUROSCI.20-02-00511.2000](https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.20-02-00511.2000)

65. Fouad A.D., Teng S., Mark J.R., Liu A., Alvarez-Illera P., Ji H., Du A., Bhirgoo P.D., Cornblath E., Guan S.A., Fang-Yen C. Distributed rhythm generators underlie *Caenorhabditis elegans* forward locomotion. *Elife*, 2018, 7:e29913.
[DOI: 10.7554/eLife.29913](https://doi.org/10.7554/eLife.29913)
66. Franks C.J., Pemberton D., Vinogradova I., Cook A., Walker R.J., Holden-Dye L. Ionic basis of the resting membrane potential and action potential in the pharyngeal muscle of *Caenorhabditis elegans*. *J Neurophysiol.*, 2002, 87: 954–961. [DOI: 10.1152/jn.00233.2001](https://doi.org/10.1152/jn.00233.2001)
67. Fuchs M., Zimmer M., Grosu R. and Hasani R.M. Searching for Biophysically Realistic Parameters for Dynamic Neuron Models by Genetic Algorithms from Calcium Imaging Recording. Workshop on Worm’s Neural Information Processing at the 31st Neural Information Processing Systems (NIPS) Conference, Long Beach, CA, USA, 2017. <https://arxiv.org/abs/1711.01436>
68. Gengyo-Ando K., Kagawa-Nagamura Y., Ohkura M., Chen X.F.M., Hashimoto K., Nakai J. *Journal of Neuroscience Methods*. A new platform for long-term tracking and recording of neural activity and simultaneous optogenetic control in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. 2017, 286: 56-68.
[DOI: 10.1016/j.jneumeth.2017.05.017](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2017.05.017)
69. Gilbert M., Busund R., Skagseth A., Nilsen P.Å., Solbø J.P. Resuscitation from accidental hypothermia of 13.7°C with circulatory arrest. *The Lancet*, 2000, 355(9201): P375-376. [DOI: 10.1016/S0140-6736\(00\)01021-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)01021-7)
70. Gilpin W., Uppaluri S., Brangwynne C.P. Worms under Pressure: Bulk Mechanical Properties of *C. elegans* Are Independent of the Cuticle. *Biophysical Journal*, 2015, 108(8): 1887-1898. [DIO: 10.1016/j.bpj.2015.03.020](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2015.03.020)
71. Gingold R.A., Monaghan J.J. Smoothed particle hydrodynamics: theory and application to non-spherical stars. *Monthly Notices of the Royal Astronomical Society*, 1977, 181(3): 375–389. [DOI: 10.1093/mnras/181.3.375](https://doi.org/10.1093/mnras/181.3.375)
72. Gjorgjieva J., Biron D. and Haspel G. Neurobiology of *Caenorhabditis elegans* Locomotion: Where Do We Stand? *Bioscience*, 2014, 64(6): 476–486.
[DOI: 10.1093/biosci/biu058](https://doi.org/10.1093/biosci/biu058)

73. Gladwin S.T. and Evans P.A. Structure of very early protein folding intermediates: New insights through a variant of hydrogen exchange labelling. *Folding and Design*, 1996, 1: 407–417. [DOI: 10.1016/S1359-0278\(96\)00057-0](https://doi.org/10.1016/S1359-0278(96)00057-0)
74. Gleeson P., Crook S., Cannon R.C., Hines M.L., Billings G.O., Farinella V., Morse T.M., Davison A.P., Ray S., Bhalla U.S., Barnes S.R., Dimitrova Y.D., Silver R.A. NeuroML: A Language for Describing Data Driven Models of Neurons and Networks with a High Degree of Biological Detail. *PLoS Comput. Biol.*, 2010, 6(6): e1000815. [DOI: 10.1371/journal.pcbi.1000815](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000815)
75. Gleeson P., Cantarelli M., Currie M., Hokanson J., Idili G., Khayrulin S., Palyanov A., Szigeti B., Larson S. The OpenWorm Project: currently available resources and future plans. *Proc. CNS-2015, BMC Neuroscience*, 2015, 16 (Suppl. 1): P141. [DOI: 10.1186/1471-2202-16-S1-P141](https://doi.org/10.1186/1471-2202-16-S1-P141)
76. Goodman M.B, Hall D.H., Avery L. and Lockery S.R. Active currents regulate sensitivity and dynamic range in *C. elegans* neurons. *Neuron*, 1998, 20(4): 763-772.
77. Goswami P., Schlegel P., Solenthaler B., Pajarola R. Interactive SPH simulation and rendering on the GPU. In: *Proceedings ACM SIGGRAPH/Eurographics symposium on computer animation*, 2010, 55–64. [DOI: 10.2312/SCA/SCA10/055-064](https://doi.org/10.2312/SCA/SCA10/055-064)
78. Gräter F. and Grubmüller H. Fluctuations of primary ubiquitin folding intermediates in a force clamp. *Journal of Structural Biology*, 2007, 157: 557–569. [DOI:10.1016/j.jsb.2006.11.005](https://doi.org/10.1016/j.jsb.2006.11.005)
79. Grishok A. Biology and Mechanisms of Short RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Adv. Genet.*, 2013, 83:1-69. [DOI: 10.1016/B978-0-12-407675-4.00001-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407675-4.00001-8)
80. Grzeszczuk R., Terzopoulos D. Automated learning of muscle-actuated locomotion through control abstraction. In *SIGGRAPH'95: Proc. of the 22-nd annual conference on Computer graphics and interactive techniques*. 1995, 63–70.
81. Guzhavina I.V., Denisyuk V.S., Murzin F.A., Palyanov A.Yu., Trelevich J. On recognition of low quality texts. *Bull. Nov. Comp. Center, Ser.: Comput. Sci.*, 2009, 29: 49-61.

82. Harris B.Y.J.E. and Crofton H.D. Structure and Function in the Nematodes : Internal Pressure and Cuticular Structure in *Ascaris*. *Journal of Experimental Biology*, 1957, 34: 116–130.
83. Haspel G., O'Donovan M.J. and Hart A.C. Motoneurons dedicated to either forward or backward locomotion in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J Neurosci*, 2010, 30(33): 11151–11156. [DOI: 10.1523/jneurosci.2244-10.2010](https://doi.org/10.1523/jneurosci.2244-10.2010)
84. Haspel G. and O'Donovan M.J. A perimotor framework reveals functional segmentation in the motoneuronal network controlling locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.*, 2011, 31(41): 14611–14623. [DOI: 10.1523/jneurosci.2186-11.2011](https://doi.org/10.1523/jneurosci.2186-11.2011)
85. Haykin S. *Neural Networks: A Comprehensive Foundation*, 2-nd edition. Prentice-Hall, Upper Saddle River, NJ, 1999. ISBN: 978-0132733502.
86. Hendricks M. and Zhang Y. Complex RIA calcium dynamics and its function in navigational behavior. *Worm*, 2013, 2(3): e25546.
87. Herculano-Houzel S. The Human Brain in Numbers: A Linearly Scaled-up Primate Brain. *Frontiers in Human Neuroscience*. 2009, 3:31. [DOI: 10.3389/neuro.09.031.2009](https://doi.org/10.3389/neuro.09.031.2009)
88. Hill A.V. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, 1938, 126: 136–195. [DOI: 10.1098/rspb.1938.0050](https://doi.org/10.1098/rspb.1938.0050)
89. Hines M.L., Carnevale N.T. Expanding NEURON's repertoire of mechanisms with NMODL. *Neural Comput.*, 2000, 12(5): 995-1007. [DOI: 10.1162/089976600300015475](https://doi.org/10.1162/089976600300015475)
90. Hobert O. Neurogenesis in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *WormBook*, 2010, ed. The *C. elegans* Research Community. [DOI: 10.1895/wormbook.1.12.2](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.12.2)
91. Hobert, O. The neuronal genome of *Caenorhabditis elegans*, *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, 2013. [DOI: 10.1895/wormbook.1.161.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.161.1)
92. Hughes T.J.R., Taylor C.A., Zarins C.K. Finite element modeling of blood flow in arteries. *Comput. Methods Appl. Mech. Eng.*, 1998, 158(1–2): 155–96. [DOI: 10.1016/S0045-7825\(98\)80008-X](https://doi.org/10.1016/S0045-7825(98)80008-X)

93. Huxley A.F. Muscle structure and theories of contraction. *Prog. Biophysics and Biophysical Chemistry*, 1957, 7: 255-318. [DOI: 10.1016/S0096-4174\(18\)30128-8](https://doi.org/10.1016/S0096-4174(18)30128-8)
94. Idili G., Cantarelli M., Buibas M., Busbice T., Coggan J., Grove C., Khayrulin S., Palyanov A. and Larson S. Managing Complexity in Multi-Algorithm, Multi-Scale Biological Simulations: An Integrated Software Engineering and Neuroinformatics Approach. 4th INCF Congress of Neuroinformatics, Boston, United States, 2011, 288-289. [DOI: 10.3389/conf.fninf.2011.08.00112](https://doi.org/10.3389/conf.fninf.2011.08.00112)
95. Ihmsen M., Akinci N., Gissler M., Teschner M. Boundary Handling and Adaptive Time-stepping for PCISPH. *Proc. VRIPHYS*, Copenhagen, Denmark, 2010, 79-88. [DOI: 10.2312/PE/vriphys/vriphys10/079-088](https://doi.org/10.2312/PE/vriphys/vriphys10/079-088)
96. Izhikevich E.M. and Edelman G.M. Large-scale model of mammalian thalamocortical systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(9): 3593-8. [DOI: 10.1073/pnas.0712231105](https://doi.org/10.1073/pnas.0712231105)
97. Jacklet J.W. Electrophysiological organization of the eye of *Aplysia*. *J. gen. Physiol.*, 1969, 53(1): 21–42. [DOI: 10.1085/jgp.53.1.21](https://doi.org/10.1085/jgp.53.1.21)
98. Jackson S.E. Ubiquitin: a small protein folding paradigm. *Organic and Biomolecular Chemistry*, 2006, 4: 1845–1853.
99. Johari S., Nock V., Alkaisi M.M. and Wang W. On-chip analysis of *C. elegans* muscular forces and locomotion patterns in microstructured environments. *Lab on a Chip*, 2013. [DOI: 10.1039/C3LC41403E](https://doi.org/10.1039/C3LC41403E)
100. Johnston D., Wu S.M.S. *Foundations of Cellular Neurophysiology*. MIT Press, Cambridge, MA, 1995, 750 p. ISBN: 978-0262100533.
101. Jolliffe I.T. *Principal component analysis* (2nd ed.). New York, NY: Springer, 2002. ISBN: 978-0-387-22440-4
102. Jospin M., Jacquemond V., Mariol M.C., Ségalat L., Allard B. The L-type voltage-dependent Ca^{2+} channel EGL-19 controls body wall muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell. Biol.*, 2002, 159: 337–348.
103. Jospin M., Allard B. An amiloride-sensitive H^{+} -gated Na^{+} channel in *Caenorhabditis elegans* body wall muscle cells. *J. Physiol.*, 2004, 559: 715–720.

104. Kalgin I.V., Caflisch A., Chekmarev S.F. and Karplus M. New insights into the folding of a β -sheet miniprotein in a reduced space of collective hydrogen bond variables: Application to a hydrodynamic analysis of the folding flow. *Journal of Physical Chemistry B*, 2013, 117: 6092–6105.
105. Kalgin I.V. and Chekmarev S.F. Turbulent phenomena in protein folding. *Physical Review E*, 2011, 83: 011920.
106. Kalgin I.V. and Chekmarev S.F. Folding of a β -Sheet miniprotein: Probability fluxes, streamlines, and the potential for the driving force. *Journal of Physical Chemistry B*, 2015, 119: 1380–1387.
107. Kalgin I.V., Chekmarev S.F. and Karplus M. First passage analysis of the folding of a β -sheet miniprotein: Is it more realistic than the standard equilibrium approach? *Journal of Physical Chemistry B*, 2014, 118: 4287–4299.
108. Kalgin I.V., Karplus M. and Chekmarev S.F. Folding of a SH3 domain: Standard and “hydrodynamic” analyses. *Journal of Physical Chemistry B*, 2009, 113: 12759–12772.
109. Kandel E.R. and Schwartz J.H. *Principles of Neural Science*, 2nd edition, Elsevier, 1985. ISBN: 978-0444009449.
110. Karbowski J., Schindelman G., Cronin C.J., Seah A., Sternberg P.W. Systems level circuit model of *C. elegans* undulatory locomotion: mathematical modeling and molecular genetics. *J. Comput. Neurosci.*, 2008, 24(3): 253-276.
111. Karplus M. The Levinthal paradox: Yesterday and today. *Folding and Design*, 1997, 2: S69–S75.
112. Karplus M. Behind the folding funnel diagram. *Nature Chemical Biology*, 2011, 7: 401–404.
113. Karr J.R., Sanghvi J.C., Macklin D.N., Gutschow M.V., Jacobs J.M., Bolival B., Assad-Garcia N., Glass J.I., Covert M.W. A Whole-Cell Computational Model Predicts Phenotype from Genotype. *Cell*, 2012, 150(2): 389-401.

114. Kato S., Kaplan H.S., Schrödel T., Skora S., Lindsay T.H., Yemini E., Lockery S., Zimmer M. Global brain dynamics embed the motor command sequence of *Caenorhabditis elegans*. *Cell*, 2015, 163(3): 656-69.
[DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.034](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.034)
115. Kawano T., Po M.D., Gao S., Leung G., Ryu W.S. and Zhen M. An imbalancing act: gap junctions reduce the backward motor circuit activity to bias *C. elegans* for forward locomotion. *Neuron*, 2011, 72(4): 572–586.
116. Keiser R., Adams B., Dutre P., Guibas L.J., Pauly M. Multiresolution particle-based fluids. ETH CS Technical Reports, 2006, #520.
[DOI: 10.3929/ethz-a-006780981](https://doi.org/10.3929/ethz-a-006780981)
117. Killmann R., Wach P., Dienstl F. Three-dimensional computer model of the entire human heart for simulation of reentry and tachycardia: gap phenomenon and Wolff-Parkinson-White syndrome. *Basic Res. Cardiol.*, 1991, 86(5): 485–501.
118. Kelager M. Lagrangian fluid dynamics using smoothed particle hydrodynamics. Department of Computer Science, University of Copenhagen, Denmark, 2006.
<http://image.diku.dk/projects/media/kelager.06.pdf>
119. Khayrulin S., Serdtseva N., Palyanov A. A software tool for visualization and control of biological neural networks activity based on the NEURON simulation environment. Proc. of the 2nd International Conference «Mathematical modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology», Novosibirsk, 2016, 56.
120. Khorasanizadeh S., Peters I.D. and Roder, H. Evidence for a three-state model of protein folding from kinetic analysis of ubiquitin variants with altered core residues. *Nature Structural and Molecular Biology*, 1996, 3: 193–205.
121. Kipfer P., Westermann R. Realistic and interactive simulation of rivers. *Proceedings of Graphics Interface*, 2006, 41-48.
122. Kitahara R. and Akasaka K. Close identity of a pressure stabilized intermediate with a kinetic intermediate in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2003, 100: 3167–3172.

123. Kochetov A.V., Palyanov A., Titov I.I., Grigorovich D., Kolchanov N.A., Sarai A. AUG-hairpin: prediction of a downstream secondary structure influencing the recognition of a translation start site. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8:318.1-318.7.
124. Kony D.B., Hünenberger P.H. and Van Gunsteren W.F. Molecular dynamics simulations of the native and partially folded states of ubiquitin: Influence of methanol cosolvent, pH, and temperature on the protein structure and dynamics. *Protein Science*, 2007, 16: 1101–1118.
125. Krantz B.A., Dothager R.S. and Sosnick T.R. Discerning the structure and energy of multiple transition states in protein folding using psi-analysis. *Journal of Molecular Biology*. 2004, 337: 463–475.
126. Krantz B.A. and Sosnick T.R. Distinguishing between two-state and three-state models for ubiquitin folding, *Biochemistry*, 2000, 39: 11696–11701.
127. Kunert-Graf J.M., Shlizerman E., Walker A. and Kutz J.N. Multistability and Long-Timescale Transients Encoded by Network Structure in a Model of *C. elegans* Connectome Dynamics. *Front. Comput. Neurosci.*, 2017, 11: 53.
[DOI: 10.3389/fncom.2017.00053](https://doi.org/10.3389/fncom.2017.00053)
128. Kuramochi M., Iwasaki Y. Quantitative Modeling of Neuronal Dynamics in *C. elegans*. In: Wong K.W., Mendis B.S.U., Bouzerdoum A. (eds) *Neural Information Processing. Theory and Algorithms. ICONIP 2010. Lecture Notes in Computer Science*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2010, 6443: 17-24.
[DOI: 10.1007/978-3-642-17537-4_3](https://doi.org/10.1007/978-3-642-17537-4_3)
129. Lainé V., Ségor J.R., Zhan H., Bessereau J.-L. and Jospin M. Hyperactivation of L-type voltage-gated Ca²⁺ channels in *Caenorhabditis elegans* striated muscle can result from point mutations in the IS6 or the IIS4 segment of the $\alpha 1$ subunit. *The Journal of Experimental Biology*, 2014, 217: 3805–3814.
130. Lau H.L., Timbers T.A., Mahmoud R. and Rankin C.H. Genetic dissection of memory for associative and non-associative learning in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Brain Behav.*, 2013, 12(2): 210-223.
[DOI: 10.1111/j.1601-183X.2012.00863.x](https://doi.org/10.1111/j.1601-183X.2012.00863.x)

131. Laurent P., Soltesz Z., Chen C., Nelson G., Arellano-Carbajal F., Levy E. and de Bono M. Decoding a neural circuit controlling global animal state in *C. elegans*. eLife, 2015. [DOI: 10.7554/eLife.04241](https://doi.org/10.7554/eLife.04241)
132. Lefebvre C., Largeau C., Michelet X., Fourrage C., Maniere X., Matic I., Legouis R., Culetto E. The ESCRT-II proteins are involved in shaping the sarcoplasmic reticulum in *C. elegans*. J. Cell. Sci., 2016, 129: 1490-1499.
133. Li C. and Kim K. Neuropeptides, WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2008. [DOI: 10.1895/wormbook.1.142.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.142.1)
134. Li Z., Liu J., Zheng M., Xu X.Z.S. Encoding of both analog- and digital-like behavioral outputs by one *C. elegans* interneuron. Cell, 2014, 159(4): 751-765. [DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.056](https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.056)
135. Likitlersuang J., Stephens G., Palanski K., Ryu W.S. *C. elegans* tracking and behavioral measurement. J. Vis. Exp., 2012, 69: e4094. [DOI: 10.3791/4094](https://doi.org/10.3791/4094)
136. Liewald J.F., Brauner M., Stephens G.J., Bouhours M., Schultheis C., Zhen M., Gottschalk A. Optogenetic analysis of synaptic function. Nature Methods, 2008, 5(10): 895-902.
137. Liu P., Ge Q., Chen B., Salkoff L., Kotlikoff M.I., Wang Z.W. Genetic dissection of ion currents underlying all-or-none action potentials in *C. elegans* body-wall muscle cells. Journal of Physiology, 2011, 589 (Pt 1): 101–117. [DOI: 10.1113/jphysiol.2010.200683](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2010.200683)
138. Lockery S.R. and Goodman M.B. The quest for action potentials in *C. elegans* neurons hits a plateau. Nature Neuroscience, 2009, 12(4): 377–378. [DOI: 10.1038/nn0409-377](https://doi.org/10.1038/nn0409-377)
139. Lockery S.R., Goodman M.B. and Faumont S. First report of action potentials in a *C. elegans* neuron is premature. Nature Neuroscience, 2009, 12(4): 365–366. [DOI: 10.1038/nn0409-365](https://doi.org/10.1038/nn0409-365)
140. Lung D., Larson S., Palyanov A., Khayrulin S., Gleeson P., Zimmer M., Grosu R. and Hasani R.M.. A Simplified Cell Network for the Simulation of *C. elegans*'

- Forward Crawling. Proc. 1st NIPS Workshop on Worm's Neural Information Processing (WNIP 2017), Long Beach, CA, USA, 2017.
141. 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, 217(Pt 14): 2480-8. [DOI: 10.1242/jeb.099382](https://doi.org/10.1242/jeb.099382)
 142. Lüersen K., Gottschling D.C., Döring F. Complex Locomotion Behavior Changes Are Induced in *Caenorhabditis elegans* by the Lack of the Regulatory Leak K⁺ Channel TWK-7. *Genetics*, 2016, 204(2): 683-701. [DOI: 10.1534/genetics.116.188896](https://doi.org/10.1534/genetics.116.188896)
 143. Macosko E.Z., Pokala N., Feinberg E.H., Chalasani S.H., Butcher R.A., Clardy J., and Bargmann C.I. A hub-and-spoke circuit drives pheromone attraction and social behavior in *C. elegans*. *Nature*, 2009, 458(7242): 1171.
 144. 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, 21(15): 1326-30. [DOI: 10.1016/j.cub.2011.06.063](https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.06.063)
 145. Mailler R., Avery J., Graves J. and Willy N. A Biologically Accurate 3D Model of the Locomotion of *Caenorhabditis elegans*. International Conference in Biosciences (BIOSCIENCESWORLD), 2010, 84-90.
 146. Majmudar T., Keaveny E.E., Zhang J., Shelley M.J. Experiments and theory of undulatory locomotion in a simple structured medium. *J. R. Soc. Interface*, 2012, 9(73): 1809-23.
 147. Marianayagam N.J. and Jackson S.E. The folding pathway of ubiquitin from all-atom molecular dynamics simulations. *Biophysical Chemistry*, 2004, 111: 159–171.
 148. Miyazawa S. and Jernigan R.L. Estimation of effective interresidue contact energies from protein crystal structures: Quasi-chemical approximation. *Macromolecules*, 1985, 18: 534–552.
 149. Markram H. The blue brain project. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2006, 7(2): 153-160.
 150. Markram H., Muller E., Ramaswamy S., et al. Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry. *Cell*, 2015, 163(2): 456-92.

[DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.029](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.029)

151. Martin V.M., Johnson J.R., Haynes L.P., Barclay J.W. and Burgoyne R.D. Identification of key structural elements for neuronal calcium sensor-1 function in the regulation of the temperature-dependency of locomotion in *C. elegans*. *Mol. Brain*, 2013, 6: 39. [DOI: 10.1186/F1756-6606-6-39](https://doi.org/10.1186/F1756-6606-6-39)
152. Maupas E. Modes et formes de reproduction des nematodes. *Archives de Zoologie Expérimentale et Générale*, 1900, 8: 463–624.
153. Mazhari R., Greenstein J.L., Winslow R.L., Marbán E. and Nuss H.B. Molecular interactions between two long-QT syndrome gene products, HERG and KCNE2, rationalized by in vitro and in silico analysis. *Circ. Res.*, 2001, 89(1): 33–38.
154. McCulloch W. and Pitts W. A logical calculus of the ideas immanent in nervous activity. *Bulletin of Mathematical Biophysics*, 1943, 7: 115–133.
155. McQueen D.M., Peskin C.S. A three-dimensional computer model of the human heart for studying cardiac fluid dynamics. *SIGGRAPH Comput Graph*, 2000, 34(1): 56–60.
156. Miller K., Chinzei K., Orssengo G., Bednarz P. Mechanical properties of brain tissue in-vivo: experiment and computer simulation. *J. Biomech.*, 2000, 33(11): 1369–76.
157. Mirzakhali E., Epureanu B., Gourgou E. A mathematical and computational model of the calcium dynamics in *Caenorhabditis elegans* ASH sensory neuron. *PLoS ONE*, 2018, 13(7): e0201302. [DOI: 10.1371/journal.pone.0201302](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201302)
158. Miyawaki A. and Tsien R.Y. Monitoring Protein Conformations and Interactions by Fluorescence Resonance Energy Transfer between Mutants of Green Fluorescent Protein. *Methods in Enzymology*, 2000, 327: 472-500.
159. Mohammadi A., Byrne Rodgers J., et al., Ryu W.S. Behavioral response of *Caenorhabditis elegans* to localized thermal stimuli. *BMC Neurosci.*, 2013, 14: 66.
160. Munshi A., Gaster B., Mattson T., Fung J. [OpenCL Programming Guide](#). 2011. ISBN: 978-0321749642.

161. Müller M., Charypar D., Gross M. Particle-based fluid simulation for interactive applications. In Proceedings of the ACM Siggraph/Eurographics Symposium on Computer Animation, 2003: 154-159.
162. Nguyen J.P., Linder A.N., Plummer G.S., Shaevitz J.W., Leifer A.M. Automatically tracking neurons in a moving and deforming brain. PLoS Comput. Biol., 2017, 13(5): e1005517. [DOI: 10.1371/journal.pcbi.1005517](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005517)
163. Nguyen J.P., Shipley F.B., Linder A.N., Plummer G.S., Liu M., Setru S.U., Shaevitz J.W. and Leifer A.M. Whole-brain calcium imaging with cellular resolution in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. PNAS, 2016, 113 (8): E1074-E1081. [DOI: 10.1073/pnas.1507110112](https://doi.org/10.1073/pnas.1507110112)
164. Nichols A.L.A., Eichler T., Latham R., and Zimmer M. A global brain state underlies *C. elegans* sleep behavior. Science, 2017, 356(6344): eaam6851.
165. Nickell W.T., Pun R.Y., Bargmann C.I., Kleene S.J. Single ionic channels of two *Caenorhabditis elegans* chemosensory neurons in native membrane. J. Membr. Biol., 2002, 189: 55–66.
166. Niebur E., Erdös P. Theory of the locomotion of nematodes. Biophysical Journal, 1991, 60: 1132–1146.
167. Niebur E, Erdös P. Theory of the locomotion of nematodes: control of the somatic motor neurons by interneurons. Math. Biosci., 1993, 118(1): 51-82.
168. Nigon V. Modalités de la reproduction et déterminisme du sexe chez quelques nématodes libres. Ann. des Sc. Nat., Zool., 1949, 11: 1-132.
169. Nigon V., Guerrier P. and Monin, H. L'architecture polaire de l'œuf et les mouvements des constituants cellulaires au cours des premières étapes du développement chez quelques Nématodes. Bull. biol. Fr. Belg., 1960, 93: 131-202.
170. O'Hagan R., Chalfie M., Goodman M.B. The MEC-4 DEG/ENaC channel of *Caenorhabditis elegans* touch receptor neurons transduces mechanical signals. Nat. Neurosci., 2005, 8(1): 43-50. [DOI: 10.1038/nn1362](https://doi.org/10.1038/nn1362)
171. Oikonomou G. and S. Shaham. The glia of *Caenorhabditis elegans*. Glia, 2011, 59(9): 1253-1263.

172. Olivares E.O., Izquierdo E.J. and Beer R.D. Potential role of a ventral nerve cord central pattern generator in forward and backward locomotion in *Caenorhabditis elegans*. *Network Neuroscience*, 2018, 2(3): 323-343.
[DOI: 10.1162/netn_a_00036](https://doi.org/10.1162/netn_a_00036)
173. Oliveberg M., Tan Y.J. and Fersht A.R. Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1995, 92: 8926–8929.
174. Omura D.T., Clark D.A., Samuel A.D., Horvitz H.R. Dopamine signaling is essential for precise rates of locomotion by *C. elegans*. *PLoS ONE*, 2012, 7(6):e38649. [DOI: 10.1371/journal.pone.0038649](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038649)
175. Orr F.M., Scriven L.E., Rivas A.P. Pendular rings between solids: meniscus properties and capillary force. *J. Fluid Mech.*, 1975, 67: 723-742.
176. Palyanov A.Yu. An algorithm for tracking *C. elegans* body movement and muscular activity in Ca^{2+} dynamics video for tuning and validation of its locomotion simulation. 3rd International Symposium «Mathematical Modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology», Novosibirsk, Russia, 2018, 54. [DOI: 10.18699/MM-HPC-BBB-2018-45](https://doi.org/10.18699/MM-HPC-BBB-2018-45)
177. Palyanov A.Yu., Samoilova Kh.V., Palyanova N.V. Towards a neurobiologically reasonable *C. elegans* nervous system simulation: neuron, muscle and signal propagation modeling. *Proc. of Symposium «Cognitive Sciences, Genomics and Bioinformatics» (CGSB-2016)*, Novosibirsk, Russia, 2016, 41.
178. Palyanov A., Khayrulin S. Realistic 3D simulation of *C. elegans* swimming and crawling with Sibernetic environment. *Proc. of the 2nd International Conference “Mathematical modeling and High-Performance Computing in Bioinformatics, Biomedicine and Biotechnology*, 2016, 79.
179. Palyanov A., Khayrulin S., Larson S. Application of smoothed particle hydrodynamics to modeling mechanisms of biological tissue, *Advances in Engineering Software*, 2016, 98: 1-11.

180. Palyanov A.Yu., Chekmarev S.F. Hydrodynamic description of protein folding: the decrease of the probability fluxes as an indicator of transition states in two-state folders. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 2016, 35 (14): 3152-60.
181. Palyanov A., Khayrulin S., Larson S.D. Three-dimensional realistic model of the *Caenorhabditis elegans* body and muscle cells in liquid and gel environments for behavioral analysis. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2018, 373: 20170376. [DOI: 10.1098/rstb.2017.0376](https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0376)
182. Palyanov A., Khayrulin S., Larson S.D., Dibert A. Towards a virtual *C. elegans*: a framework for simulation and visualization of the neuromuscular system in a 3D physical environment. *In Silico Biology*, 2011, 11(3): 137-147.
[DOI: 10.3233/ISB-2012-0445](https://doi.org/10.3233/ISB-2012-0445)
183. Palyanov A.Yu., Chekmarev S.F., Krivov S.V., Karplus M. A lattice protein with an amyloidogenic latent state: stability and folding kinetics. *Journal of Physical Chemistry B: Biophysical Chemistry, Biomaterials, Liquids, and Soft Matter*, 2007, 111(10): 2675-2687.
184. Palyanov A.Yu., Titov I.I., Chekmarev S.F., Karplus M. Simulation of protein misfolding using a lattice model. *Biophysics*, 2006, 51(Suppl. 1): 44-48.
185. Palyanov A.Yu., Samoilova Kh.V., Palyanova N.V. EGL-19 and EXP-2 Ion channels modelling within *C. elegans* pharyngeal muscle cell allows reproduction of Ca^{2+} driven action potentials, both single events and trains. *BioRxiv*, 2017.
[DOI: 10.1101/228650](https://doi.org/10.1101/228650)
186. Park S., Hwang H., Nam S.W., Martinez F., Austin R.H., Ryu W.S. Enhanced *Caenorhabditis elegans* locomotion in a structured microfluidic environment. *PLoS One*, 2008, 3(6): e2550. [DOI: 10.1371/journal.pone.0002550](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002550)
187. Park S.-J., Goodman M.B. and Pruitt B.L. Analysis of nematode mechanics by piezoresistive displacement clamp. *Proc. of the National Academy of Sciences of the USA*, 2007, 104(44): 17376–17381. [DOI: 10.1073/pnas.0702138104](https://doi.org/10.1073/pnas.0702138104)
188. Pereira G.G., Prakash M., Cleary P.W. SPH modelling of fluid at the grain level in a porous medium. *Applied Mathematical Modelling*, 2011, 35(4): 1666–1675.

189. Peterlik I., Duriez C., Cotin S. Modeling and real-time simulation of a vascularized liver tissue. In: Proceedings of the 15-th international conference on medical image computing and computer-assisted intervention—volume, Part I, MICCAI'12. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2012, 50–57. ISBN: 978-3-642-33414-6.
190. Peterlik I., Golembiovský T., Duriez C., Cotin S. Complete Real-Time Liver Model Including Glisson's Capsule, Vascularization and Parenchyma. *Medicine Meets Virtual Reality 21: NextMed/MMVR21*. Neuveden: IOS Press, 2014, 312-319. [DOI: 10.3233/978-1-61499-375-9-312](https://doi.org/10.3233/978-1-61499-375-9-312)
191. Petzold B.C., Park S.J., Ponce P., Roozeboom C., Powell C., Goodman M.B., Pruitt B.L. *Caenorhabditis elegans* body mechanics are regulated by body wall muscle tone. *Biophys J.*, 2011, 100(8): 1977-85.
192. Piana S., Lindorff-Larsen K. and Shaw D.E. Atomic-level description of ubiquitin folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2013, 110: 5915–5920.
193. Piggott B.J., Liu J, Feng Z, Wescott SA, Xu XZ. The neural circuits and synaptic mechanisms underlying motor initiation in *C. elegans*. *Cell*, 2011, 147(4): 922-33. [DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.053](https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.08.053)
194. Rabets Y., Backholm M., Dalnoki-Veress K., Ryu W.S. Direct measurements of drag forces in *C. elegans* crawling locomotion. *Biophys J.*, 2014, 107(8): 1980-1987. [DOI: 10.1016/j.bpj.2014.09.006](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2014.09.006)
195. Rall W. Core conductor theory and cable properties of neurons. In Kandel, E.R., J.M. Brookhardt, and V.M. Mountcastle eds. *Handbook of physiology, cellular biology of neurons*. Bethesda, MD: American Physiological Society, 1977, 39-97.
196. Raizen D.M. and Avery L. Electrical activity and behavior in the pharynx of *Caenorhabditis elegans*. *Neuron*, 1994, 12: 483–495.
197. Rall W. Cable theory for dendritic neurons. *Methods in Neuronal Modelling: From Synapses to Networks / Eds C. Koch, I. Segev*. MIT press, 1989, 9–62.
198. Rankin C.H. From gene to identified neuron to behaviour in *Caenorhabditis elegans*. *Nature Reviews. Genetics*, 2002, 3(8): 622-30. [DOI: 10.1038/nrg864](https://doi.org/10.1038/nrg864)

199. Rankin C.H. Invertebrate Learning: What Can't a Worm Learn? *Current Biology*, 2004, 14(15): R617-R618. [DOI: 10.1016/j.cub.2004.07.044](https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.07.044)
200. Ratushnyak A.S., Zapara T.A. Principles of cellular-molecular mechanisms underlying neuron functions. *J. Integr. Neurosci.*, 2009, 8(4): 453-469.
201. Reddy G. and Thirumalai D. Dissecting ubiquitin folding using the self-organized polymer model. *Journal of Physical Chemistry B*, 2015, 119: 11358–11370.
202. Reimann M.W., Anastassiou C.A., Perin R., Hill S.L., Markram H., Koch C.A. Biophysically detailed model of neocortical local field potentials predicts the critical role of active membrane currents. *Neuron*, 2013, 79(2): 375-390.
203. Riddle D.L., Blumenthal T., Meyer B.J., and Priess J.R., “*C. elegans* II”, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1998. [DOI: 10.1016/s0962-8924\(98\)80022-6](https://doi.org/10.1016/s0962-8924(98)80022-6)
204. 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.
205. Rogers C.M., Franks C.J., Walker R.J., Burke J.F., Holden-Dye L. Regulation of the Pharynx of *Caenorhabditis elegans* by 5-HT, Octopamine, and FMRFamide-like Neuropeptides. *Journal of Neurobiology*, 49(3): 235–244, 2001.
206. Rönkkö M., Wong G. Modeling the *C. elegans* nematode and its environment using a particle system. *J. Theor. Biol.*, 2008, 253(2): 316-22.
[DOI: 10.1016/j.jtbi.2008.03.028](https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2008.03.028)
207. Sabelko J., Ervin J. and Gruebele M. Observation of strange kinetics in protein folding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1999, 96: 6031–6036.
208. Salkoff L., Wei A.D., Baban B., Butler A., Fawcett G. et al. Potassium channels in *C. elegans*, *WormBook*, 2005, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*. [DOI: 10.1895/wormbook.1.42.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.42.1)
209. Sanbonmatsu K.Y., Joseph S., Tung C.S. Simulating movement of tRNA into the ribosome during decoding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, 102(44): 15854-9.
[DOI: 10.1073/pnas.0503456102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503456102)

210. Sarma G.P., Lee C.W., Portegys T., Ghayoomie V., Jacobs T., Alicea B., Cantarelli M., Currie M., Gerkin R.C., Gingell S., Gleeson P., Gordon R., Hasani R.M., Idili G., Khayrulin S., Lung D., Palyanov A., Watts M., Larson S.D. OpenWorm: overview and recent advances in integrative biological simulation of *Caenorhabditis elegans*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2018, 373: 20170382. [DOI: 10.1098/rstb.2017.0382](https://doi.org/10.1098/rstb.2017.0382)
211. Sasakura H., Mori I. Behavioral plasticity, learning, and memory in *C. elegans*. *Curr. Opin. Neurobiol.*, 2013, 23(1): 92-99. [DOI: 10.1016/j.conb.2012.09.005](https://doi.org/10.1016/j.conb.2012.09.005)
212. Sawin E.R., Ranganathan R., Horvitz H.R. *C. elegans* locomotory rate is modulated by the environment through a dopaminergic pathway and by experience through a serotonergic pathway. *Neuron*, 2000, 26: 619-631.
213. Schanda P., Forge V. and Brutscher B. Protein folding and unfolding studied at atomic resolution by fast two-dimensional NMR spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2007, 104: 11257-11262.
214. Schafer W.R. Deciphering the neural and molecular mechanisms of *C. elegans* behavior. *Curr. Biol.*, 2005, 15(17): R723-9.
215. Schafer W.R. Ed. Neurophysiological methods in *C. elegans*: an introduction. *WormBook / The C. elegans Research Community*, 2006, WormBook.org. [DOI: 10.1895/wormbook.1.111.1](https://doi.org/10.1895/wormbook.1.111.1)
216. Scholz M., Lynch D.J., Lee K.S., Levine E., Biron D.A. Scalable method for automatically measuring pharyngeal pumping in *C. elegans*. *J. Neurosci. Methods*, 2016, 274: 172-178. [DOI: 10.1016/j.jneumeth.2016.07.016](https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2016.07.016)
217. Schrödel T., Prevedel R., Aumayr K., Zimmer M. and Vaziri A. Brain-wide 3D imaging of neuronal activity *Caenorhabditis elegans* with sculpted light. *Nature Methods*, 2013, 10: 1013–1020.
218. Schuske K., Beg A.A., Jorgensen E.M. The GABA nervous system in *C. elegans*. *Trends Neurosci.*, 2004, 27: 407–414. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2004.05.005>

219. Shandiz A.T., Baxa M.C. and Sosnick T.R. A“Link-Psi” strategy using crosslinking indicates that the folding transition state of ubiquitin is not very malleable. *Protein Science*, 2012, 21: 819–827.
220. Shipley F.B., Clark C.M., Alkema M.J. and Leifer A.M. Simultaneous optogenetic manipulation and calcium imaging in freely moving *C. elegans*. *Front. Neural Circuits*, 2014, 8: 28.
221. Shen X.N., Sznitman J., Krajacic P., Lamitina T., Arratia P.E. Undulatory locomotion of *Caenorhabditis elegans* on wet surfaces. *Biophys J.*, 2012, 102(12): 2772-81.
222. Shtonda B. and Avery L. CCA-1, EGL-19 and EXP-2 currents shape action potentials in the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *The Journal of Experimental Biology*, 2005, 208: 2177– 2190.
223. Sivaraman T., Arrington C.B. and Robertson A.D. Kinetics of unfolding and folding from amide hydrogen exchange in native ubiquitin. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2001, 8: 331–333.
224. Sorenson J.M. and Head-Gordon T. Toward minimalist models of larger proteins: A ubiquitin-like protein. *Proteins*, 2002, 46: 368–379.
225. Sosnick T.R., Dothager R.S. and Krantz B.A. Differences in the folding transition state of ubiquitin indicated by Phi and Psi analyses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2004, 101: 17377–17382.
226. Solenthaler B. and Pajarola R. Predictive-corrective incompressible SPH. *ACM Trans. Graph.*, 2009, 28(3): 40.
227. Solenthaler B. Incompressible fluid simulation and advanced surface handling with SPH. Dissertation for the degree of Doctor of Science, ETH Zurich. 2010.
[DOI: 10.5167/uzh-29724](https://doi.org/10.5167/uzh-29724)
228. St. Laurent III G., Shtokalo D., Heydarian M., Palyanov A., Babiy D., Zhou J., Kumar A., Urcuqui-Inchima S. Insights from the HuR-interacting transcriptome: ncRNAs, ubiquitin pathways, and patterns of secondary structure dependent RNA interactions. *Molecular Genetics and Genomics*, 2012, 287(11-12): 867-79.

229. Starich T., Sheehan M., Jadrlich J., Shaw J. Innexins in *C. elegans*. *Cell Commun. Adhes.*, 2001, 8: 311-314.
230. Steger K.A., Shtonda B.B., Thacker C., Snutch T.P. and Avery L. The *C. elegans* T-type calcium channel CCA-1 boosts neuromuscular transmission. *J. Exp. Biol.*, 2005, 208(Pt 11): 2191–2203.
231. Stein G.M., Murphy C.T. *C. elegans* positive olfactory associative memory is a molecularly conserved behavioral paradigm. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 2014, 115: 86-94. [DOI: 10.1016/j.nlm.2014.07.011](https://doi.org/10.1016/j.nlm.2014.07.011)
232. Stephens G.J., Johnson-Kerner B., Ryu W.S. Dimensionality and dynamics in the behavior of *C. elegans*. *PLOS Comput. Biol.*, 2008, 4:e1000028.
233. Stirman J.N., Crane M.M., Husson S.J., Wabnig S., Schultheis C., Gottschalk A., Lu H. Real-time multimodal optical control of neurons and muscles in freely behaving *Caenorhabditis elegans*. *Nature Methods*, 2011, 8(2): 153-158.
234. Strange K. From Genes to Integrative Physiology: Ion Channel and Transporter Biology in *Caenorhabditis elegans*. *Physiol. Rev.*, 2003, 83(2): 377-415. [DOI: 10.1152/physrev.00025.2002](https://doi.org/10.1152/physrev.00025.2002)
235. Suzuki H., Kerr R., Bianchi L., Frokjaer-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, 39: 1005–1017.
236. Suzuki M., Tsuji T., Ohtake H. A model of motor control of the nematode *C. elegans* with neuronal circuits. *Artif. Intell. in Medicine*, 2005, 35(1-2): 75-86.
237. Szigeti B., Gleeson P., Vella M., Khayrulin S., Palyanov A., Hokanson J., Currie M., Cantarelli M., Idili G., Larson S. OpenWorm: an open-science approach to modeling *C. elegans*. *Frontiers in Computational Neuroscience*, 2014, 8: 1-7.
238. Teschner M., Heidelberg B., Muller M., Pomerantes D., Gross M.H. Optimized spatial hashing for collision detection of deformable objects. *Proceedings of Vision, Modelling and Visualization*, 2003, 47–54.

239. Terzopoulos D., Fleischer K.W. Deformable Models. *The Visual Computer*, 1988, 4(6): 306-331. [DOI: 10.1007/BF01908877](https://doi.org/10.1007/BF01908877)
240. Tetzlaff K., Thorsen E. Breathing at depth: physiologic and clinical aspects of diving while breathing compressed gas. *Clin. Chest. Med.*, 2005, 26(3): 355-80.
241. The *C. elegans* Sequencing Consortium. Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology, *Science*, 1998, 282: 2012–2018.
242. Titov I.I., Palyanov A.Yu. How a protein knots: folding simulation of lattice proteins. *Biophysics*, 2003, 48(Suppl. 1): 133-140.
243. Troemel E.R., Chou J.H., Dwyer N.D., Colbert H.A. and Bargmann C.I. Divergent seven transmembrane receptors are candidate chemosensory receptors in *C. elegans*. *Cell*, 1995, 83: 207-218.
244. Tyson R., Jourdan C.E., Hebert J. Modelling anguilliform swimming at intermediate Reynolds number: A review and a novel extension of immersed boundary method applications. *Comput. Methods Appl. Mech. Engineering*, 2008, 197: 2105-2118.
245. Vallée-Bélisle A. and Michnick S.W. Multiple tryptophan probes reveal that ubiquitin folds via a late misfolded intermediate. *Journal of Molecular Biology*, 2007, 374: 791–805.
246. Vallée-Bélisle A. and Michnick S.W. Visualizing transient protein-folding intermediates by tryptophan-scanning mutagenesis. *Nature Structural and Molecular Biology*, 2012, 19: 731–736.
247. VanBuren P., Guilford W.H., Kennedy G., Wu J., Warshaw D.M. Smooth muscle myosin: a high force-generating molecular motor. *Biophys J.*, 1995, 68 (Suppl. 4): 256S-258S; 258S-259S.
248. 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, 7(2): e1001066.

249. Várnai P., Dobson C.M. and Vendruscolo M. Determination of the transition state ensemble for the folding of ubiquitin from a combination of Phi and Psi analyses. *Journal of Molecular Biology*, 2008, 377: 575–588.
250. Vella M., Palyanov A., Gleeson P., Khayrulin S. Integration of predictive-corrective incompressible SPH and Hodgkin-Huxley based models in the OpenWorm *in silico* model of *C. elegans*. Proc. 22-nd Annual Meeting for Computational Neuroscience CNS 2013, BMC Neuroscience, 2013, 14(Suppl. 1): P209.
251. Vijay-Kumar S., Bugg C.E. and Cook W.J. Structure of ubiquitin refined at 1.8 Å resolution. *Journal of Molecular Biology*, 1987, 194: 531–544.
252. Wallace H.H. The Dynamics of Nematode Movement. *Annual Review of Phytopathology*, 1968, 6: 91-114. [DOI: 10.1146/annurev.py.06.090168.000515](https://doi.org/10.1146/annurev.py.06.090168.000515)
253. Wang B., Ke W., Guang J., Chen G., ... and Shu Y. Firing Frequency Maxima of Fast-Spiking Neurons in Human, Monkey, and Mouse Neocortex. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2016, 10: 239. [DOI: 10.3389/fncel.2016.00239](https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00239)
254. Wang S.J., Wang Z.W. Track-A-Worm, An Open-Source System for Quantitative Assessment of *C. elegans* Locomotory and Bending Behavior. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69653. [DOI: 10.1371/journal.pone.0069653](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069653)
255. Weber W.-M. Ion currents of *Xenopus laevis* oocytes: state of the art. *Biochimica et Biophysica Acta. Biomembranes*, 1999, 1421(2): 213–233.
256. Wei A., Jegla T., Salkoff L. Eight potassium channel families revealed by the *C. elegans* genome project. *Neuropharmacology*, 1996, 35(7): 805-829.
257. Went H.M. and Jackson S.E. Ubiquitin folds through a highly polarized transition state. *Protein Engineering, Design and Selection*, 2005: 18, 229–237.
258. Wes P.D. and Bargmann C.I. *C. elegans* odour discrimination requires asymmetric diversity in olfactory neurons. *Nature*, 2001, 410: 698-701.
259. Wiener N. *Cybernetics or Control and Communication in the Animal and the Machine*. Hermann and Cie Editeurs, Paris, The Technology Press, Cambridge, Mass., John Wiley and Sons Inc., New York, 1948.

260. Williams P.D.E., Zahratka J.A., Rodenbeck M., Wanamaker J., Linzie H. and Bamber B.A. Serotonin disinhibits a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron by suppressing Ca⁺⁺-dependent negative feedback. *Journal of Neuroscience*, 2018, 1908-17. [DOI: 10.1523/jneurosci.1908-17.2018](https://doi.org/10.1523/jneurosci.1908-17.2018)
261. Williamson D.R. Modelling the locomotion nervous system in the nematode *C. elegans*: a developmental perspective. Thesis for: Master of Science by Research, University of Leeds, 2012. Advisor: Netta Cohen.
262. White J.G., Southgate E., Thomson J.N. and Brenner S. The structure of the nervous system of the nematode *C. elegans*. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Series B. Biol. Sci.*, 1986, 314: 1-340.
263. Whitford P.C., Blanchard S.C., Cate J.H.D., Sanbonmatsu K.Y. Connecting the Kinetics and Energy Landscape of tRNA Translocation on the Ribosome. *PLoS Computational Biology*, 2013, 9(3): e1003003. [DOI: 10.1371/journal.pcbi.1003003](https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003003)
264. Xiao N., Xiong G., Figueroa C.A., Taylor C.A. Simulation of blood flow in deformable vessels using subject-specific geometry and spatially varying wall properties. *Int. J. Numer. Methods Biomed. Eng.*, 2011, 27(7): 1000–16.
265. Yemini E., Kerr R.A. and Schafer W.R. Tracking Movement Behavior of Multiple Worms on Food. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2011, 12: 1483–1487. [DOI: 10.1101/pdb.prot067025](https://doi.org/10.1101/pdb.prot067025)
266. Yuk H., Kim D., Lee H., Jo S. & Shin J.H. Shape memory alloy-based small crawling robots inspired by *C. elegans*. *Bioinspiration and biomimetics*, 2001, 6(4): 046002.
267. Zhang J., Qin M. & Wang, W. Multiple folding mechanisms of protein ubiquitin. *Proteins*, 2005, 59: 565–579.
268. Zhang J.Z.J., Yin G.Y.G., Li Y.L.Y., Ni J.N.J. Soft tissue modeling using tetrahedron finite element method in surgery simulation. *Inf. Sci. Eng.*, 2009, 3705–3708.
269. Zhang T.Y. and Suen C.Y. A Fast Parallel Algorithm for Thinning Digital Patterns. *Communications of the ACM*, 1984, 27(3): 236-239.

270. Zhen M., Samuel A.D. *C. elegans* locomotion: small circuits, complex functions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 2015, 33:117-26. [DOI: 10.1016/j.conb.2015.03.009](https://doi.org/10.1016/j.conb.2015.03.009)
271. Zhou Y. and Karplus M. Folding of a model three-helix bundle protein: A thermodynamic and kinetic analysis. *Journal of Molecular Biology*, 1999, 293: 917–951.
272. Гутман А. Дендриты нервных клеток. Теория, электрофизиология, функция. Вильнюс: Мокслас, 1984. 144 с.
273. Дёмин А.В. Обучающаяся модель нейронных контуров управления локомоцией и хемотаксисом нематоды *C. elegans*. Труды конференции «Математическое и компьютерное моделирование в биологии и химии. Перспективы развития», Казань, 2013, 59-66.
274. Дёмин А.В., Пальянов А.Ю. Обучающаяся система управления локомоцией для 3D модели нематоды *C. elegans*. *Нейроинформатика*, 2012, 6(1): 42-49.
275. Иванисенко В.А., Афонников Д.А., Николаев С.В., Пинтус С.С., Крестьянова М.А., Пальянов А.Ю., Титов И.И. Актуальные проблемы компьютерной протеомики. *Информационный вестник ВОГиС*. 2005, 9(2): 162-178.
276. Комарова Л.Ф., Кормина Л.А. Инженерные методы защиты окружающей среды. Техника защиты атмосферы и гидросферы от промышленных загрязнений: Учебное пособие. - Барнаул: Изд-во "Алтай", 2000. - 395 с.
277. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Теоретическая физика. Гидродинамика, 3-е изд., испр. - М.: Наука. Гл. ред. физ.-мат. лит., 1986. - 736 с. (т. VI).
278. Нечкин С., Пальянов А., Черемушкин Е., Штокало Д., Альберт П., Лоренс Дж. Разработка объединенной среды для анализа и поиска микроРНК. Программные продукты и системы. 2008, 4: 151-153.
279. Николлс Дж.Г., Мартин А.Р., Валлас Б.Дж., Фукс П.А. От нейрона к мозгу. пер. с 4-го англ. изд. под ред. П. М. Балабана, Р. А. Гиниатуллина. М.: УРСС, 2003, 672 стр.
280. Пальянов А.Ю., Черемушкин Е.С., Штокало Д.Н., Нечкин С.С., Хейдариан М., Лоренс Дж. Структурный анализ состава РНК-последовательностей,

- связывающихся с белком HuR. Программные продукты и системы. 2010, 3: 144–146.
281. Пальянов А.Ю., Пальянова Н.В., Хайрулин С.С. О проблемах моделирования нейронных сетей живых организмов. Вестник НГУ, 2012, 10(3): 46-57.
282. Пальянов А.Ю., Ратушняк А.С. Об особенностях распространения сигналов в нервной системе *C. elegans*. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014, 18(4/3): 1248-1258.
- Статья также опубликована в переводе на английский:
- Palyanov A.Yu., Ratushnyak A.S. Some Details of Signal Propagation in the Nervous System of *C. elegans*. Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2015, 5(6): 642–649.
283. Пальянов А.Ю., Хайрулин С.С. Sibernetiс: программный комплекс на базе алгоритма PCISPH, ориентированный на задачи моделирования в области биомеханики живых систем. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2014, 18 (4/3): 1239-1247. Статья также опубликована в переводе на английский:
- Palyanov A.Yu., Khayrulin S.S. Sibernetiс: A Software Complex Based on the PCISPH Algorithm Aimed at Simulation Problems in Biomechanics. Russian Journal of Genetics: Applied Research, 2015, 5(6): 635–641.
284. Рогачев С. Обобщенный Model-View-Controller. RSDN Magazine, 2008, 4: 37-66.
285. Самойлов М.О. "Мозг и адаптация: молекулярно-клеточные механизмы". – СПб.: Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН.: 272 стр. 1999.
286. Шрёдингер Э. Разум и материя. Ижевск: РХД, 2000. - Пер. с англ.: Schrödinger E. Mind and Matter. Cambridge University Press, 1958.
287. Эккерт Р., Рэндалл Д., Огастин Д. Физиология животных. Механизмы и адаптации: Учебник в двух томах. М.: Мир, 1991. Т. 1.