# Министерство науки и высшего образования Российской Федерации Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

### ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

### КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.03.02 – Физика

# ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА СИГНАЛЬНАЯ СИСТЕМА, УПРАВЛЯЮЩАЯ КОНУСОМ РОСТА АКСОНОВ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ЭЛЕКТРИЧЕСКИМ ПОЛЕМ

Студент 4 курса группы <u>0</u>	<u>6-511</u>	
«»2019 г.		(Рамазанова И.Ф.
Научный руководитель		
д.фм.н., профессор кафед	<u>дры мед. физики</u>	
«»2019 г.	<del></del>	(Котов Н.В.)
Заведующий кафедрой ме,	дицинской физики	
д.х.н., профессор		
« <u></u> »2019 г.		(Аганов А.В.)

## ОГЛАВЛЕНИЕ

				Стр.	
Pe	еферат	Γ		. 4	
Bı	ведени	те		. 8	
1.	Обзо	р литеј	ратуры	. 10	
	1.1	Актин	овые филаменты в конусах роста	. 10	
	1.2	Микро	отрубочки в конусах роста	. 11	
	1.3	Межк	леточные сигналы	. 12	
		1.3.1	Фосфорилирование	. 12	
		1.3.2	Ионы кальция и клеточные сигналы	. 13	
		1.3.3	Кальмодулин	. 16	
	1.4	NO-cC	GMP, контролирующий направление конуса роста при		
		помош	ци модуляуции цитозольного кальция	. 18	
	1.5	Перек	лючатель CaMKII/CaN, контролирующий направление		
		кальци	ий зависимого конуса роста	. 21	
	1.6	Роль б	белков Homer1 и EPAC	. 24	
	1.7	MAPK	Спротеинкиназы	. 24	
	1.8	Фосфо	орилирование CRN2 с помощью CK2	. 24	
	1.9	Роль Р	PDE в управлении конусом роста аксона	. 25	
	1.10	Э Влияние белка VASP и гельзолина			
	1.11	Взаимосвязь сАМР и сGMР в управлении конусом роста .			
	1.12	12 Различия между аденилатциклазами			
	1.13	Влиян	ие электрического поля	. 29	
		1.13.1	Способы воздействия внеклеточного ЭП на нейрон .	. 30	
		1.13.2	Роль нейротрофинов в направлении конуса роста при		
			воздействии электрическим полем	. 31	
		1.13.3	Роль ГТФаз в направлении конуса роста при		
			воздействии электрическим полем	. 34	
		1.13.4	Изменение концентрации Ca <sup>2+</sup> каналов при		
			воздействии электрическим полем	. 36	
		1.13.5	Применение электрического поля в медицине	. 37	

2.	Математическая модель			40		
	2.1	Модел	пирование	40		
	2.2	Схема	тическое пояснение образования областей			
		депол	яризации и гиперполяризации	41		
	2.3	Схема сигнальной системы, управляющей конусом роста				
		аксона	a	43		
	2.4	Описание динамики кальция в микровыростах конуса роста				
	аксона нервной клетки					
	2.5	Моделирование динамики кальция в отростке аксона				
		нервн	ой клетки	47		
		2.5.1	Ток активного транспорта	47		
		2.5.2	Ток пассивного транспорта	48		
		2.5.3	Численное решение дифференциального уравнения	51		
3.	Анал	лиз мат	тематической модели	54		
3a	КЛЮЧ	іение .		56		
Cı	тисок	: литер:	атуры	57		

#### РЕФЕРАТ

Ключевые слова: математическое моделирование, системная биология, конус роста аксона.

Объект исследования – сигнальная система, управляющая конусом роста аксонов.

Цели работы — изучение механизма управления конуса роста при помощи различных сигналов наведения, построение математической модели, описывающей динамику кальция в микровыростах конуса роста аксона.

Результатами работы являются создание собственной схемы, показывающей механизм управления конусом роста аксона, а также доказательство автономности филоподий и микровыростов относительно ламеллиподий при помощи построенной математической модели.

Полученные результаты позволяют лучше понять механизм изменения направления конуса роста аксона, а также могут быть применены при дальнейших исследованиях влияния различных управляющих сигналов на нервную клетку.

Данная тема является актуальной в наши дни, так как понимание механизма управления конусом роста важно для предотвращения последствий заболеваний, связанных с поражением нервной системы и ее дальнейшей дисфункцией.

Новизна работы состоит в принципиально новой схеме, показывающей механизм реакции конуса роста аксона на различные управляющие сигналы, а также в доказательстве автономности филоподий относительно ламеллиподий конуса роста аксона, что также позволяет объяснить механизм изменения направления.

### СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

 $\alpha$ -actinin —  $\alpha$ -актинин

А23187 – кальциевый ионофор

**АС** – аденилатциклаза

ACh — ацетилхолин

**AChR** – ацетилхолиновый рецептор

**ADP** (**A** $\mathbf{\Pi}\Phi$ ) – аденозиндифосфат

АКАР – анкерные белки А-киназы

АМРК – аденазинмонофосфат зависимая протеинкиназа

ARP 2/3 – семисубъединичный белковый комплекс

 $ATP (AT\Phi)$  – аденозинтрифосфат

**BDNF** – мозговой нейротрофический фактор

 ${\bf Ca}^{2+}$  – ион кальция

**cADPR** – циклическая аденозиндифосфатная рибоза

СаМ – кальмодулин

**СаМКІІ** – кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа II

сАМР (цАМФ) – циклический аденозинмонофосфат

**CaN** – кальцинеурин

сGMР – циклический гуанозинмонофосфат

Citron-K – цитрон-К

СК2 – креатин-киназа 2

 ${\bf C}{f o}^{2+}$  – ион кобальта

cofilin – кофилин

**CRAC** – селективные кальций-зависимые каналы

**CRN2** – то же, что и коронин 1С

Cyt – цитозоль

**DEA** – диэтиламин

**DCC** – рецептор, пропускающий нетрин-1

Ерас – обменный белок, активируемый сАМР

Е (ЭР, ЭПР) – эндоплазматический ретикулум

**FcR** – Fc-рецептор

**GDP** – фосфодиэстераза

**Hsp27** – шок-протеин 27 (heat shock protein 27)

I – ингибитор

 $\mathbf{I}_{Ca}^{A}$  – канал активного транспорта

 $\mathbf{I}_{K}^{CaM}$  – кальмодулин-зависимый калиевый канал

 $\mathbf{I}_{Ca}^{P}$  – потенциал-зависимый кальциевый канал

**IP3** – инозитолтрифосфат

 $\mathbf{L}\mathbf{a}^{3+}$  – ион лантана

LIMK – LIM-киназа

МАРК – митоген-активированная протеинкиназа

MLCK – MLC-киназа

Myosin II – миозин II

N – целевой белок

**Netrin-1** — нетрин-1

NGF - семейство нейротрофинов

**nNOS** – нейрональная синтаза оксида азота

**NO** – оксид азота(II)

**NT-3** – нейротрофин-3

**NT-4** – нейротрофин-4

**NTF3** – ген, кодирующий NT-3

**N-WASP** – нейронный белок синдрома Вискотта-Олдрича

Orai – белки, активируемые с помощью STIM-1

РАК-1 – серин/треониновая протеинкиназа

**PDE** – фосфодиэстераза

**PIP2** – фосфатидилинозитолдифосфат

РІ-3К – фосфоинозитид-3-киназа

РК – протеинкиназа

РКА – протеинкиназа А

РКС – протеинкиназа С

**РК**G – протеинкиназа G

**РК**N – протеинкиназа N

**PLC** – субстрат фосфолипазы С

РР1 - фосфатаза-1

RG50864 – тирфостин(тирозинкиназный ингибитор)

**RyR** – рианодиновые рецепторы

**SIN-1** – хлорид (3-морфолиносиднонимин)

**sGC** – растворимая гуанилилциклаза

**SNP** – нитропруссид натрия

**STIM-1** – стромная взаимодействующая молекула-1

**TrkA** – рецептор тирозинкиназа А

**TrkB** – рецептор тирозинкиназа В

**Trk**C – рецептор тирозинкиназа С

ЦНС – центральная нервная система

ЭП – электрическое поле

### **ВВЕДЕНИЕ**

Конус роста аксона — утолщение неправильной формы, которое прокладывает путь через окружающую ткать и находится на конце развивающегося аксона нервной клетки. Он заполнен мелкими, иногда соединёнными друг с другом, мембранными пузырьками неправильной формы, также митохондриями, микротрубочками и нейрофиламентами. Непосредственно под складчатыми участками мембраны и в шипиках на конусе роста находится плотная масса перепутанных актиновых филаментов. Конус роста удлиняется и сокращается за счет широких пластинок, называемых ламеллиподиями, и тонких, остроконечных выпячиваний, называемых филоподиями. Филоподии достигают размеров в несколько десятков микрометров и могут удлиняться и сокращаться, как бы ощупывая субстрат во всех направлениях. Они адгезируют к определенному субстрату и тянут конус роста в этом направлении.

Актин играет ключевую роль в подвижности конуса роста. Как ламеллиподии, так и филоподии богаты филаментным актином и веществами, ингибирующими полимеризацию актина. Выпячивание и ретракция ламеллиподий и филоподий, а также движение вперед самого конуса роста управляется двумя процессами: (1) полимеризацией и разборкой актиновых филаментов и (2) зависимой от миозина транслокацией актиновых филаментов прочь от ведущего края конуса роста.

Оба процесса используют энергию гидролиза АТФ и могут управляться белками, связывающими актин. Кальций, протеинкиназы и другие внутриклеточные вторичные посредники управляют активностью связывающих актин белков.

Итак, рост аксона, его движение вдоль клеток определяется различными ростовыми и ингибирующими факторами, которые синтезируются клетками и встраиваются в их мембраны, но каким же образом регулируется направление роста аксонов? Актуальным является вопрос выявления этого механизма.

Цель данной работы: Провести модельные исследования сигнальной системы, управляющей конусом роста аксонов.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- 1. На основе данных, представленных в литературе, составить схему сигнальной системы, которая управляет конусом роста аксона.
- 2. Построить математическую модель системы, описывающей динамику кальция в микровыростах конуса роста аксона филоподиях.
- 3. Используя построенную модель, провести анализ нашей сигнальной системы.

### ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Актиновые филаменты в конусах роста

Конусы роста имеют два домена: периферийный (Р) и центральный (С) домены (рисунок 1). В Р-домене осуществляется динамическая подвижность ламеллиподий и филоподий. С-домен не проявляет активности в продвижении и содержит в основном органеллы и концы аксонных микротрубочек. Расширение аксонов состоит из трех фаз: выпячивание, наполнение и уплотнение. Фаза выпячивания включает образование ламеллиподий и филоподий, опосредуемых полимеризацией и реорганизацией F-актина. Во время фазы наполнения происходит продвижение микротрубочек и органелл из С-домена в Р-домен. Уплотнение происходит в областях конуса роста, в которых ранее произошло наполнение. После уплотнения область конуса роста, которая была основой С-области, разрушается вокруг микротрубочек. Таким образом, направляющие сигналы могут управлять расширением аксона путем модуляции фазы выпячивания или наполнения.

На конусах роста находятся рецепторы, посылающие сигналы на актиновые нити для ориентирования аксона в местной среде. Следует отметить, что поведение конуса роста отражает сложную интеграцию множественных действий сигнализации [1].

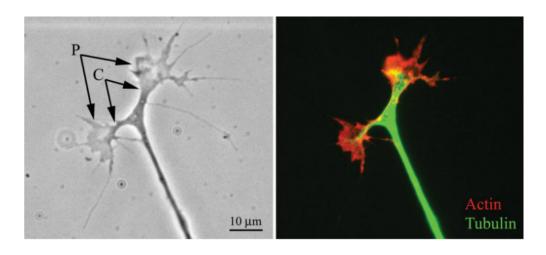


Рисунок 1 — Конус роста нервной клетки, взятой из спинного мозга эмбриона цыпленка. На рисунке видно, что конус роста подвергся разветвлению, каждое из которых имеет центральный (С) и периферийный (Р) домен. Справа показан тот же конус роста, где красным цветом проиллюстрированы филаменты, содержащие актиновые волокна, зеленым — микротрубочки [1]

Было идентифицировано множество белков, которые регулируют F-актин в конусах роста, к их числу относятся ГТФаза (RhoA, Rac1 и Cdc-42) и миозин II. В нейронах Rho ГТФаза повышает активность миозина II и способствует коллапсу конуса роста и ретракции аксонов. Было обнаружено, что в конусах роста Rac1 и Cdc-42 регулируют как филоподии, так и ламеллиподии, и участвуют в росте аксона.

Распространение микротрубочек в филоподиях является первым шагом в руководстве движением внутриклеточных органелл и цитоплазмы при повороте конуса роста. Было показано, что асимметричное расположение пучков F-актина в конусах роста приводит к перераспределению микротрубочек к той области, в которой содержится наибольшее количество актиновых филаментов.

### 1.2. Микротрубочки в конусах роста

Во время управления конусом роста микротрубочки получают сигнал из сети актиновых филаментов, находящихся в Р-домене [2]. Впоследствии микротрубочки захватываются стабилизированными актиновыми филамен-

тами внутри филоподий и также стабилизируются в направлении поворота конуса роста. Удаление пучков актиновых филаментов внутри филоподий уменьшает удлинение концов микротрубочек в эту область, в то время как в других местах микротрубочки продолжают получать сигнал из Р-домена. Это приводит к тому, что конус роста разрушается в области с отсутствующими актиновыми филаментами (рисунок 2).

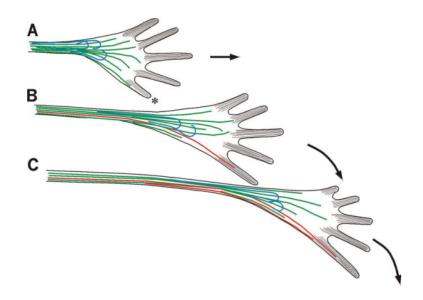


Рисунок 2 — Диаграммы, показывающие реорганизацию микротрубочек (зеленые и красные линии), черными линиями указаны актиновые нити в конусе роста. Предполагается, что нижняя филоподия (указана звездочкой в (А)) встречает положительный наводящий управляющий сигнал, который стабилизирует филоподии против ретракции. Как следствие, микротрубочки захватываются актиновыми микрофиламентами и, в свою очередь, также стабилизируются против разрушения (красные линии). Синие, скрученные микротрубочки представляют собой небольшую популяцию стабильных микротрубочек [2]

#### 1.3. Межклеточные сигналы

### 1.3.1. Фосфорилирование

Фосфорилирование — это процесс присоединения остатка фосфорной кислоты ( $PO_4$ ) к молекуле органического вещества. Места фосфорилирования — специфические области молекул, которые подвергаются добавлению

или удалению фосфорнокислой группы [3]. Фосфорилирование может активизировать или дезактивировать белок и является одним из важнейших способов регулирования активности белковых молекул в клетке. Фосфорилирование любого белка в клетке всегда происходит АТФ-зависимым образом и катализируется определёнными ферментами. В процессе фосфорилирования белка молекула АТФ является донором фосфатной группы. Общее уравнение реакции фосфорилирования белка выглядит так:

$$AT\Phi + R - OH \rightarrow A\mathcal{I}\Phi + R - OPO_3H_2 \tag{1}$$

Фосфорилирование белков обычно происходит по специфическим аминокислотным остаткам: чаще всего это серин, треонин или тиразин. Но в редких случаях возможно фосфорилирование и других аминокислотных остатков (например, гистидин, аргинин, аспартат).

Здесь же следует упомянуть и обратный процесс дефосфорилирования белков, который, в свою очередь, также катализируется специальными биологическими молекулами. Фосфорилирующие ферменты называют киназами (фосфотрансферазами), а дефосфорилирующие – протеинфосфатазами (или просто фосфатазами). Фосфорилирование и дефосфорилирование белков являются важными регулирующими механизмоми, которые присутствуют во всех видах клеток (причём как в прокариотических, так и в эукариотических). Оба этих процесса – широко используемый клетками приём для изменения свойств самых разнообразных белков путём их ковалентной модификации.

#### 1.3.2. Ионы кальция и клеточные сигналы

Ионы  $Ca^{2+}$  играют важнейшую роль в передаче клеточных сигналов: изменение их концентрации воспринимается специальными системами клетки и таким образом может регулировать множество различных процессов. Ионы кальция в сигнальных системах клеток играют роль вторичного посредника (англ. second messenger), реже — роль третичного посредника.

Мишени для ионов  $Ca^{2+}$  — широкий диапазон белков, которые обладают способностью, воспринимая колебания концентрации  $Ca^{2+}$  в цитозоле, либо менять свои свойства и, следовательно, активность в клеточных процес-

сах, либо опосредовать эффект самого катиона  $Ca^{2+}$  на другие соединения (таким механизмом действия обладает, например, белок кальмодулин).

Связывание ионов кальция способно изменять свойства различных белковых молекул. Фосфорилирование также может изменять заряд белка (путём присоединения отрицательной группы  $PO_4$ ) и его конформацию. Таким образом, положительно заряженные ионы  $Ca^{2+}$  и отрицательно заряженные фосфатные группировки используются в качестве одних из главных сигнальных инструментов в клетках.

Протеинкиназа С (РКС) может оказывать как стимулирующее, так и ингибирующее действие на передачу сигнала, осуществляемую за счёт повышения концентрации ионов кальция. С одной стороны, стимуляция высвобождения кальция во внутриклеточное пространство достигается следующим образом: РКС повышает активность ферментов, ответственных за образование фосфатидилинозитолдифосфата ( $PIP_2$ ) — субстрата фосфолипазы С (PLC). В результате образуется больше инозитолтрифосфата ( $IP_3$ ), что, в свою очередь, усиливает высвобождение ионов кальция во внутриклеточное пространство (за счет взаимодействия  $IP_3$  с особыми рецепторами ЭПР). С другой стороны, РКС может участвовать в ингибировании гидролиза  $PIP_2$  фосфолипазой С, что приводит к падению концентрации  $IP_3$  и снижению внутриклеточной концентрации ионов кальция [4]. Существует огромное количество молекул и клеточных структур [5], представляющих собой инструментарий для передачи и расшифровки  $Ca^{2+}$  сигналов внутри клетки (рисунок 3).

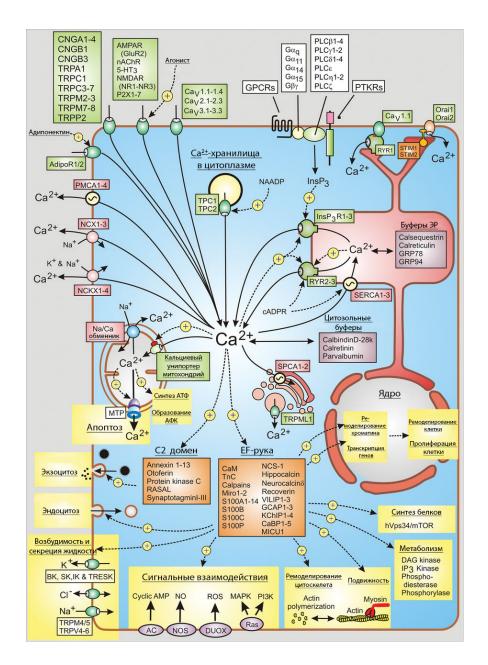


Рисунок 3 — Схематичное изображение сигнальной системы, функционирование которой основано на кальциевых сигналах [4]

В число таких структур входят различные рецепторы клеточной поверхности, связанные с различными изоформами фосфолипазы C, которые генерируют инозитолтрифосфат, вызывающий выход кальция из ЭПР,  $Ca^{2+}$  каналы,  $Ca^{2+}$  помпы и обменники,  $Ca^{2+}$  буферы. И, наконец, к их числу принадлежат и  $Ca^{2+}$  сенсоры, реагирующие на изменение концентрации  $Ca^{2+}$  в цитоплазме и генерирующие дальнейший каскад клеточных ответов. Как видно из иллюстрации, обычно такие сигналы воспринимаются «EF-рукой», либо C2-кальций связывающим доменом, а эти два центра, в свою очередь,

присутствуют в составе многих сложных белковых молекул (в их числе и классические изоформы РКС, молекулы PLC, и множество других).

### 1.3.3. Кальмодулин

Кальмодулин — высоко устойчивый белок, присутствующий в существенных количествах во всех эукариотических клетках (рисунок 4). В мозге млекопитающих кальмодулин составляет приблизительно 1 процент полного содержания белка.

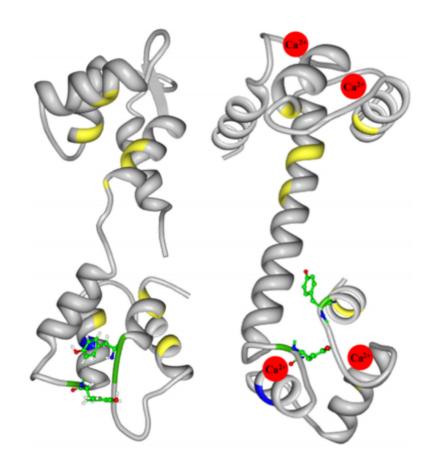


Рисунок 4 — Кальмодулин свободный от кальция (слева) и кальмодулин с присоединенными к нему 4 ионами кальция (справа) [6]

В то время как действие циклического аденазинмонофосфата (сАМР) главным образом осуществляется через регулирование субединиц протеин киназы A (PKA),  $Ca^{2+}$  через его взаимодействие с кальмодулином, может активировать более чем 100 различных ферментов.

Ионизированный кальций поступает в клетку после образования гормон-рецепторного комплекса либо из внеклеточной среды за счет акти-

вирования медленных кальциевых каналов мембраны (как это происходит, например, в миокарде), либо из внутриклеточных депо под влиянием IP<sub>3</sub>. В цитоплазме немышечных клеток кальций связывается со специальным белком – кальмодулином, а в мышечных клетках роль кальмодулина выполняет тропонин С. Связанный с кальцием кальмодулин изменяет свою пространственную организацию и активирует многочисленные протеинкиназы, обеспечивающие фосфорилирование, а следовательно изменение структуры и свойств белков [6]. Вызываемое гормональным стимулом кратковременное увеличение в клетке кальция и его связывание с кальмодулином (рисунок 5) является пусковым стимулом для многочисленных физиологических процессов — сокращения мышц, секреции гормонов и выделения медиаторов, синтеза ДНК, изменения подвижности клеток, транспорта веществ через мембраны, изменения активности ферментов.

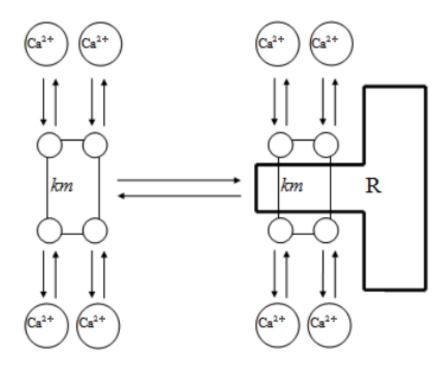


Рисунок 5 — Схема взаимодействия кальмодулина km с четырьмя ионами кальция и клеточного элемента R

# 1.4. NO-cGMP, контролирующий направление конуса роста при помощи модуляуции цитозольного кальция

Оксид азота (NO) представляет собой газообразный межклеточный мессенджер, который участвует во многих процессах во время развития, включая также построение нервной системы. Увеличение Са<sup>2+</sup> является результатом локального применения NO. Было показано, что NO доноры увеличивают рост нейритов в нейронах мыши. Однако внеклеточно применяемое NO ингибировало подвижность конуса роста и вызывало коллапс конуса роста в нейронах сетчатки лягушки [7, 8, 9]. Поэтому важно отметить, что увеличение роста нейритов происходит при увеличении относительно низких концентраций NO. Однако при более высоких концентрациях NO приводит к коллапсу конуса роста. Концентрационно-зависимый эффект NO был также описан в исследовании нейронов спинного мозга крысы, в котором низкие концентрации NO способствовали росту нейритов, тогда как чрезмерно высокие концентрации NO ингибировали их рост. Таким образом, некоторые из противоречивых данных в литературе могут быть объяснены сильно варьирующимися концентрациями доноров SIN-1, SNP и DEA для NO. Получение NO требует стимуляции нейронного NOS (nNOS), который может быть активирован в ответ на сигналы кальция или кальмодулина, увеличенная концентрация которых обеспечивается путем деполяризации нейронов (рисунок 6).

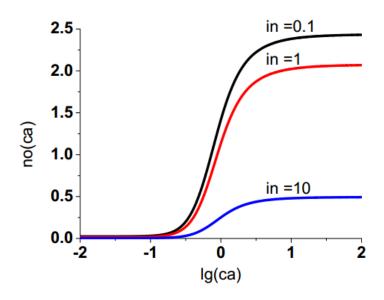


Рисунок 6 — График зависимости концентрации NO от концентрации кальция. in – концентрация ингибитора NO. По оси абсцисс за единицу берется концентрация кальция  $10^{-6}$  [14]

Известно, что NO влияет на различные молекулярные мишени. С одной стороны, активация циклической гуанилилциклазы (sGC) приводит к получению циклического гуанизинмонофосфата (сGMP), который, в свою очередь, может инициировать ионные каналы или активировать протеинкиназы. С другой стороны, NO может модифицировать непосредственно определенные тиолсодержащие целевые белки путем нитрозилирования. NO может также действовать на циклооксигеназы и митохондриальные ферменты и может регулировать собственное воспроизведение путем связывания с NOS.

При контакте с различными адгезивными средами конусы роста могут изменить свое направление в ответ на различные управляющие сигналы путем модуляции концентрации кальция с помощью NO и сGMP. Впоследствии сGMP активирует протеинкиназу G (PKG), которая фосфорилирует многие белки-мишени, включая рианодиновые рецепторы (RyR) (рисунок 7). Ассиметричное распространение кальция  $Ca^{2+}$  через рианодиновые рецепторы в аксоне опосредует его притяжение или отталкивание.

Также исследования показывают, что увеличение в аксоне циклической аденозиндифосфатной рибозы (cADPR) с помощью микроинъекции имитирует эффекты NO, обеспечивая дополнительное увеличение кальция. Приток кальция через плазматическую мембрану является необходимым компонен-

том увеличения кальция, вызываемого с помощью NO; однако этот приток кальция является вторичным по отношению к индуцированному RyR высвобождению кальция из внутриклеточных хранилищ.

Таким образом, NO вызывает изменения в морфологии конуса роста через внутриклеточный каскад, включающий sGC, cGMP, PKG и cADPR [10, 11].

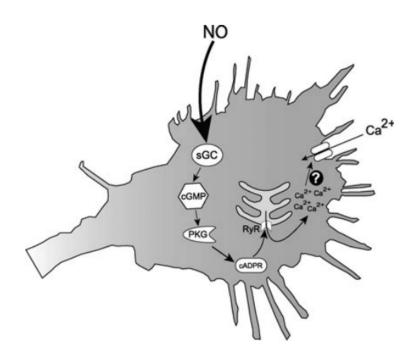


Рисунок 7 — Путь с помощью которого NO вызывает увеличение концентрации кальция  ${\rm Ca}^{2+}$ , что приводит к изменениям морфологии конуса роста. NO, продуцируемый в окрестности меняющего направление конуса роста, вызывает филоподиальное удлинение, стимулируя фермент sGC, что, в свою очередь, увеличивает наличие cGMP. cGMP активирует

PKG, что, в свою очередь, приводит к производству cADPR. cADPR вызывает высвобождение кальция из внутриклеточных запасов через RyR. Выделение кальция из внутриклеточных хранилищ усиливается притоком кальция через плазматическую мембрану [10]

Асимметричного расположения  $Ca^{2+}$  в конусе роста достаточно, чтобы вызвать поворот аксона в сторону с более высокой концентрацией  $Ca^{2+}$  (притяжение), а также вызвать отталкивание со стороны с более низкой концентрацией  $Ca^{2+}$ .

# 1.5. Переключатель CaMKII/CaN, контролирующий направление кальций зависимого конуса роста

Кальций-кальмодулин зависимая протеинкиназа II (CaMKII) и кальцинеурин зависимые фосфатазы (CaN) являются неким механизмом переключения, позволяющим контролировать направление конуса роста, зависящего от концентрации  $Ca^{2+}$  [12]. Относительно большое повышение  $Ca^{2+}$  активирует CaMKII. А CaMKII, в свою очередь, фосфорилирует белки, которые в дальнейшем способствуют полимеризации F-актина. В то же время как умеренное количество ионов кальция  $Ca^{2+}$  преимущественно действует через CaN и фосфатазу-1 (PP1), вызывая отталкивание. Уровень внутриклеточной концентрации  $Ca^{2+}$  также влияет на работу CaMKII/CaN: высокая концентрация кальция позволяет получить положительную реакцию конуса роста на управляющие сигналы, в то время как низкая концентрация способствует активации CaN-PP1 для отталкивающей ответной реакции (рисунок 8). Однако, когда уровень  $Ca^{2+}$  нейтрален, локальные сигналы  $Ca^{2+}$  в основном активируют CaN для индуцирования отталкивающей реакции.

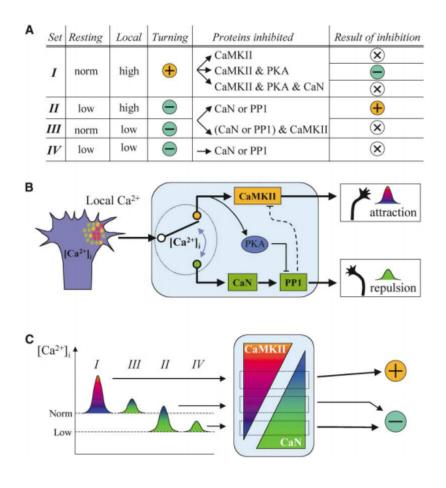


Рисунок 8 — Схематические диаграммы, иллюстрирующие модель переключателя CaMKII/CaN-PP1. (A) Суммарный результат экспериментальных данных, состоящий из различных комбинаций локального уровня Ca<sup>2+</sup> и покоящегося Ca<sup>2+</sup> (четыре набора: I-IV). "+", "-", и "х" представляют собой притяжение, отталкивание и отсутствие ответной реакции соответственно. (В) Локальное повышение Ca<sup>2+</sup> активирует СаМКІІ и CaN-PP1 для притяжения и отталкивания соответственно. Связь этих двух реакций осуществляется путем активации РКА, ингибирующей CaN-PP1, где PP1 ингибирует CaMKII. (С) Различные локальные сигналы Ca<sup>2+</sup> активируют CaMKII и CaN-PP1 для управления направлением конуса роста [12]

CaN, PKA и PP1 связаны ингибитором-1 (I1), который является ингибитором PP1 при фосфорилировании с помощью PKA, но неактивен при дефосфорилировании с помощью CaN [13].

Помимо данных исследований существует удивительный результат,

показывающий, что при высоких уровнях кальция, снижение сАМР может восстановить притяжение. Как известно, сАМР активируется аденилатциклазами (АС), концентрация которых, как видно на рисунке 9, тем меньше, чем больше концентрация кальция. Следовательно, рост микровыростов конуса роста аксона будет в той области, где концентрация кальция выше, а число сАМР ниже. Имеется модель, иллюстрирующая то, что уровни кальция, сАМР и фосфодиэстеразы (РDE) взаимодействуют нелинейным образом [14, 15]. Как видно на графике В, концентрация РDE растет с ростом концентрации кальция, а PDE уменьшают число сАМР в активном состоянии.

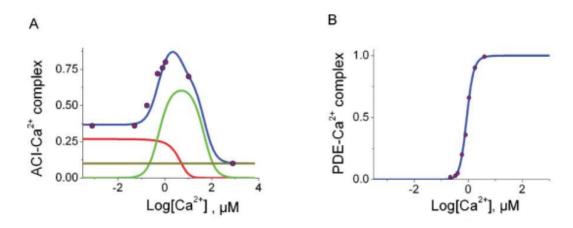


Рисунок 9 — Графики зависимостей комплекса ACI-Ca (A) и PDE-Ca (B) от кальция. Точки на графиках – результаты экспериментов. Синяя сплошная линия в каждом случае показывает модельные прогнозы. (A) Красная и зеленая линии показывают зависимость разных видов кальмодулина (CaM) с 0 и 2 ионами Ca<sup>2+</sup> соответственно, тогда как коричневая линия указывает на устойчивую базальную активность ACI. По оси абсцисс за единицу берется концентрация кальция 2 · 10<sup>-6</sup> [14]

Активация CaMKII зависит от фосфорилирования на центре T286, что делает фермент автономным от Ca<sup>2+</sup>/кальмодулина [16]. Фосфорилирование центров T305/T306 также способствует активации CaMKII, в то время как дефосфорилирование центров с помощью протеинфосфатаз приводит к его дезактивации.

#### 1.6. Роль белков Homer1 и EPAC

Ключевой молекулой в выходе из хранилища  $Ca^{2+}$  является Homer1 [17], каркасный белок, который, как известно, взаимодействует с RyR. Действительно, услабление Homer1 устраняло повышение цитоплазматического  $Ca^{2+}$  и приводило к разрушению цитоскелета конуса роста аксона. Следовательно, Homer1 модулирует предложенный молекулярный переключатель, который контролирует поворот конуса роста в ответ на сигналы, зависимые от кальция.

Роль в управлении аксоном в том числе играет обменный белок, активируемый сАМР (Ерас). Хотя основным эффектором сАМР, как считается, является РКА, недавнее исследование показало, что Ерас может на самом деле быть ответственным за многие из воздействий сАМР, связанных с наведением аксонов. Градиенты проницаемого для мембраны аналога сАМР, который селективно активирует Ерас, а не РКА, были достаточными для индукции поворота конуса роста. Это говорит о том, что Ерас играет важную роль в управлении аксоном и может отвечать за некоторые ответы, ранее приписанные РКА [18].

### 1.7. МАРК протеинкиназы

Митоген активированные протеинкиназы (МАРК) также играют роль в динамике актиновых филоментов. В частности, МАРК активированная протеинкиназа 2 (МК2)/шок-протеин 27 (heat shock protein – Hsp27) участвуют в перегруппировке F-актина [19]. Нефосфорилированный Hsp27 действует как мощный ингибитор полимеризации F-актина.

В свою очередь, МК5 (МАРК активированная протеинкиназа 5) опосредованное фосфорилирование Hsp27 способствует динамике F-актина.

### 1.8. Фосфорилирование CRN2 с помощью CK2

CRN2 – белок, ингибирующий актин, также взаимодействует с микротрубочками. Он участвует в реорганизации нитей актина и в клеточных процессах. СК2 фосфорилирует CRN2 и связывается с ним в С-домене. СК2 так-

же контролирует широкий спектр клеточных функций, включая транскрипцию, трансляцию, клеточный цикл, метаболизм. Предполагается, что СК2 зависимое фосфорилирование CRN2 приводит к потере опосредованного с помощью CRN2 ингибирования полимеризации актина, а также к потере активности по отношениюк нему, что вызывает дальнейший рост филоподий конуса роста аксона и самого аксона в целом [20].

### 1.9. Роль PDE в управлении конусом роста аксона

Долгое время считалось, что усиление передачи сигналов циклических нуклеотидов посредством ингибирования активности фосфодиэстераз PDE улучшает память. Усилия в этой области были сосредоточены преимущественно на зависящей от сАМР фосфодиэстеразе 4 (PDE4). Но меньше известно о функции других PDE, экспрессируемых в нейроанатомических областях, критических для памяти. Изоформы PDE1 являются единственными PDE, которые регулируют нейрональные уровни сАМР и сGMP зависимым от Ca<sup>2+</sup>/CaM образом. В исследованиях показано, что игибирование, к примеру, PDE1B в гиппокампе взрослых мышей усиливает контекстную и пространственную память. В том числе ингибирование PDE1B является многообещающим терапевтическим механизмом лечения нарушений памяти [21].

В то же время фосфодиэстераза 2 (PDE2) является основной фосфодиэстеразой, зависящей от активации сGMP и гидролизующей сAMP в нейронах и в миокарде. В высоких концентрациях сGMP активирует PDE2 с последующим уменьшением уровня сAMP [22].

#### 1.10. Влияние белка VASP и гельзолина

Стимулируемые вазодилататором фосфопротеиновые белки (VASP) локализуются в областях динамического ремоделирования актина и, вообще говоря, способствуют полимеризации актиновых филаментов. Белки VASP млекопитающих являются известными субстратами серин/треонин киназы и человеческий VASP, в частности, имеет три центра фосфорилирования серин 157 (S157), серин 239 (S239) и треонин 278 (Т278). В клетках первый и второй центр в VASP фосфорилированы по порядку с помощью

сАМР зависимой РКА. Однако, сGMР зависимая РКG, наоборот, сначала фосфорилирует второй центр, а затем первый. Т278 фосфорилируется при помощи аденазинмонофосфат зависимой протеинкиназы (АМРК). Важно учесть, что VASP дефосфорилируется протеинфосфатазой РР1 и РР2, что приводит к сложным и динамическим паттернам фосфорилирования. Фосфорилирование влияет на взаимодействие VASP с актином. Например, фосфорилирование S157 отменяет взаимодействие VASP с SH3-доменами всех спектринов, мешает комплексообразованию, тогда как фосфорилирование на S239 и T278 ухудшает накопление F-актина [23].

В то же время имеется белок гельзолин, способствующий образованию ядер актина. Комплекс гельзолин-кальций связывается с предпочтительным концом ранее существовавших филаментов, и, как следствие, концентрация равновесного мономера возрастает. Это облегчает самопроизвольное зародышеобразование актина. Такие ядра имеют более высокое сродство к актину, чем исходные нити, которые блокируются на предпочтительном конце гельзолином, и поэтому могут эффективно способствовать перераспределению актина. Этот комплекс также увеличивает количество актиновых филаментов [24].

### 1.11. Взаимосвязь сАМР и сGMP в управлении конусом роста

сАМР – это циклический нуклеотид, приводящий к стабилизации и росту аксона [25]. Следует отметить, что локальное повышение сАМР на кончике нейрита приводит к локальному снижению концентрации сGMP и наоборот (рисунок 11).

Синтез сАМР зависит от АС, тогда как гидролиз циклических нуклеотидов зависят от PDE. Причем, так как концентрация АС обратно пропорциональна концентрации кальция, то и активация сАМР будет тем больше, чем больше АС и чем меньше кальция (рисунок 10) [22]. В то же время PDE2 и PDE1, гидролизирующие сАМР и сGMP, противодействуют последующим внутриклеточным сигнальным реакциям. Из этого следует, что взаимодействие между АС и PDE имеет решающее значение для контроля повышения сАМР или его уменьшения.

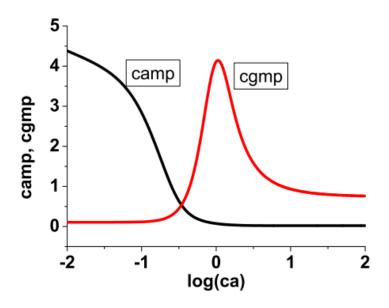


Рисунок 10 — График зависимотси числа активных сАМР и сGMP от концентрации кальция. По оси абсцисс за единицу берется концентрация кальция  $10^{-6}$  [14]

Различные изоформы АС нацелены на отдельные клеточные микродомены, обеспечивая основу локально генерируемых сигналов сАМР. АС10, к примеру, связаны с внутриклеточными компартментами, включая митохондрии, центросому и ядро. Трансмембранные АС связанные с кальцием (АС1, 3, 5, 6 и 8) привязаны к липидным слоям, обогащенным холестеринами и сфинголипидами отделенными плазматической мембраной. Напротив, независимые от кальция АС (АС2, 4, 7 и 9) привязаны к плазматической мембране, но отсутствуют в липидных слоях. Наличие или отсутствие конкретных изоформ АС на липидных слоях может быть решающим молекулярным коррелятором различных концентраций сАМР. Взаимодействие АС8 и кальциевых каналов обеспечивает динамическую и скоординированную связь между сАМР и кальцием.

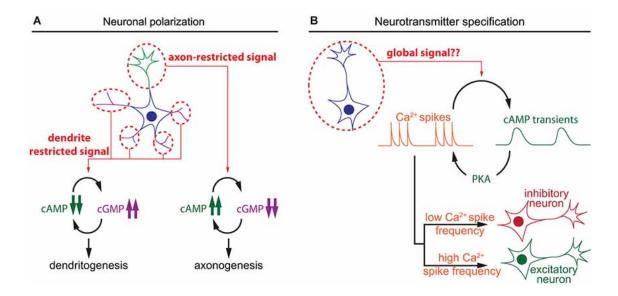


Рисунок 11 — Динамика сАМР и сGMP во время поляризации нейронов и спецификация нейротрансмиттера. (А) Локальные взаимодействия между сАМР и сGMP определяют созревание нейритов в качестве аксона или дендрита. Высокие концентрации сАМР и низкие концентрации сGMP способствуют аксоногенезу, тогда как низкий уровень сАМР и высокий сGMP приводят к дендритогенезу. (В) При развитии нейронов переходные процессы сАМР и пики кальция взаимозависимы. Выбор активации возбуждающего или ингибирующего нейротрансмиттера модулируется частотой пиков кальция, которая регулируется активностью набора киназ, включая сАМР-зависимую РКА [25]

1.12. Различия между аденилатциклазами

На сегодняшний день было идентифицировано и клонировано 10 различных видов AC. Среди них пять видов AC чувствительны к  $Ca^{2+}$ , это аденилатциклазы 1, 3, 5, 6 и 8. AC5 и AC6 ингибируются  $Ca^{2+}$ , и это ингибирование не зависит от CaM. AC3 стимулируется  $Ca^{2+}$ /CaM in vitro, только когда присутствуют другие активаторы, такие как форсколин или 5-гуанилилимдодифосфат. Биохимические и генетические исследования показали, что AC1 и AC8 непосредственно стимулируются  $Ca2^{2+}$ /CaM. Однако существуют явные регуляторные различия между AC1 и AC8: AC1 активно ингибируется G связанными белками, это также способствует активации  $Ca^{2+}$  и увеличению активности AC1 (AC1 более чувствителен к

Ca<sup>2+</sup>).

Аденилатциклазы, играющие ключевую роль в развитии нервной системы, – специфичны: AC1 и sAC (AC10), к примеру, выполняют важные функции для развития коры головного мозга, AC3 – в обонятельной системе, AC1 – также в периферической нервной системе и спинном мозге [26].

 ${
m Ca^{2+}}$  стимулированные аденалилциклазы типа 1 и типа 8 (AC1 и AC8) представляют собой уникальные ферменты, которые являются связующими звеньями между притоком кальция и активацией сигнализации сAMP. Сигналы сAMP, активированные  ${
m Ca^{2+}}$ , как уже известно, регулируют адаптацию нейронов к различным управляющим сигналам [27].

### 1.13. Влияние электрического поля

Благоприятное влияние электрического поля (ЭП) на нервную систему уже является доказанным фактом. Стимуляция, к примеру, головного мозга электрическим полем позволяет проводить эффективное лечение расстройств движения, таких как болезнь Паркинсона, тремор и дистония. Применение ЭП также с очевидным успехом использовалось для лечения поверхностных злокачественных опухолей [28] и неизлечимых язв кожи [29]. Чтобы максимизировать терапевтические преимущества, избегая нежелательных побочных эффектов, необходим точный контроль над полем стимуляции. Однако активация аксонов во время внеклеточной стимуляции довольно сложна. Прежде всего, порог активации широко варьируется для разных размеров аксонов, и неизвестно, какие размеры аксонов отвечают за терапевтические, а какие — за побочные эффекты [30].

В целом считается, что физические и химические факторы во внеклеточной среде играют важную роль в определении направления роста нейритов. Одним из видов физического фактора является наличие слабых внеклеточных электрических полей в ткани. Причем исследования показывают, что рост нейритов в экспериментах был направлен преимущественно к катоду внеклеточного электрического поля [31].

Эксперименты, проводимые на эмбриональных нейронах Xenopus при значени ЭП порядка 0,1-10 В/см, показали три интересные зависимости: (1) ускорение роста нейритов по направлению к катоду, соответственно, рост к

аноду – уменьшался; (2) на катодной стороне сомы появилось больше нейритов; (3) увеличилась средняя длина нейритов (рисунок 12).

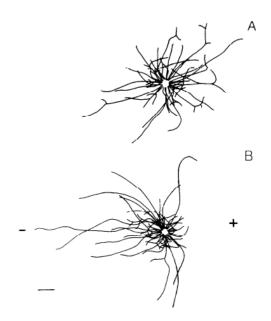


Рисунок 12 — Рост нейритов культуры клеток Хепория. Рисунок A — нервная клетка без влияния электрического поля. Рисунок В — нервная клетка, которая подвергалась воздействию поля напряженностью 2,5 В/см в течение 6 часов. «-» означает катод; «+» означает анод [31]

### 1.13.1. Способы воздействия внеклеточного ЭП на нейрон

Существует три возможных способа воздействия внеклеточного электрического поля на нейрон. Во-первых, электрическое поле может действовать внутриклеточно, создавая падение цитоплазматического потенциала, которое может вызвать электрофоретическое перераспределение цитоплазматических материалов, вовлеченных в рост нейритов. Во-вторых, он может асимметрично изменять мембранный потенциал клетки и, следовательно, предпочтительно активировать/дезактивировать контролирующие рост процессы. В-третьих, он также может действовать вдоль плазматической мембраны, вызывая электрофоретическое накопление поверхностных молекул, ответственных за контроль роста нейритов или адгезию клеточного субстрата.

Для напряженности поля от 1 до 10 В/см, приложенного к телу клетки или конусу роста шириной 10 мкм, мембранный потенциал на катодной стороне будет деполяризован примерно на 0,5-5 мВ; часть нервной клетки, которая обращена к аноду, будет гиперполяризована на ту же величину. Это устойчивое асимметричное изменение мембранного потенциала может привести к смещению ионных проводимостей или активации ферментов, участвующих в регуляции роста нейритов с двух сторон клетки. В частности может осуществиться преимущественный приток  $Ca^{2+}$  или активация аденилатциклаз на катодной (деполяризованной) стороне плазматической мембраны.

# 1.13.2. Роль нейротрофинов в направлении конуса роста при воздействии электрическим полем

Примером управляющего фактора служит нейротрофин-3 (NT-3), который представляет собой белок, у человека кодируемый геном NTF3 [32]. Белок NT-3, является нейротрофическим фактором в семействе нейротрофинов Nerve Growth Factor (NGF). Это фактор роста белка, который имеет активность на определенных нейронах периферической и центральной нервной системы; он помогает поддерживать выживаемость и дифференциацию существующих нейронов и усиливает их рост. Нейротрофины — это химические вещества, которые помогают стимулировать и контролировать нейрогенез, т.е. выращивать новые нейроны из нервных стволовых клеток. NT-3 уникален по числу нейронов, которые он может потенциально стимулировать, учитывая его способность активировать два рецептора тирозинкиназы нейротропина TrkC и TrkB. Хотя TrkB опосредует эффекты нейротрофического фактора мозга (BDNF), NT-4 и NT-3, в то время как TrkA связывается и активируется NGF, а TrkC связывается и активируется только NT-3.

Фармакологические эксперименты показали, что катодное притяжение конусов роста клеток Xenopus, взятых из спинного мозга, обуславливается (рисунок 13) нейротрофиновыми рецепторами TrkB и TrkC, нейронным никотиновым ACh рецептором (nAChR) [33], через который кальций хорошо проникает во внутриклеточную среду, рецепторными Trk, PLC, несколькими изоформами PKC, внеклеточным  $Ca^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  из внутриклеточной среды [34, 35-38].

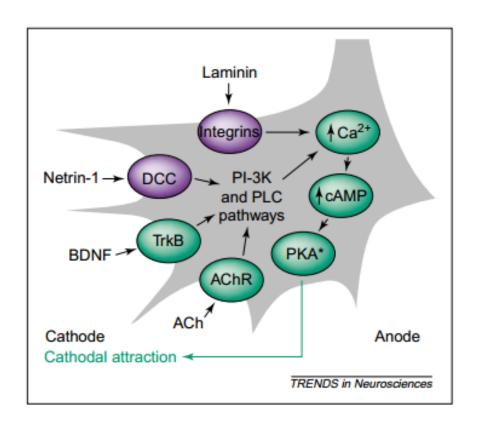


Рисунок 13 — Рецепторы и сигнальные каскады в культуре клеток Хепориз показаны зеленым цветом. Центральным элементом этой модели является увеличенная концентрация  $Ca^{2+}$  в конусе роста. Это может происходить при влиянии фосфоинозитид-3 киназы (PI-3K) и PLC, опосредованного передачей сигналов ACh через AChR, BDNF через его рецептор TrkB или активации рецептора DCC через netrin-1. Концентрация  $Ca^{2+}$  также может быть увеличена напрямую, так как интегрины активируются ламинином. Увеличение концентрации  $Ca^{2+}$  в конусе роста влияет на сAMP, стимулируя РКА, которая, в свою очередь, вызывает катодное притяжение [34]

Экспериментальным путем было установлено, что нейротрофины NT-3, NT-4, BDNF и NGF-3 уменьшали порог напряженности поля, необходимый для переориентации конуса роста к катоду, также BDNF дополнительно приводил к росту самого аксона. Это происходило при напряженности поля порядка 100-150 мВ/мм (рисунок 14).

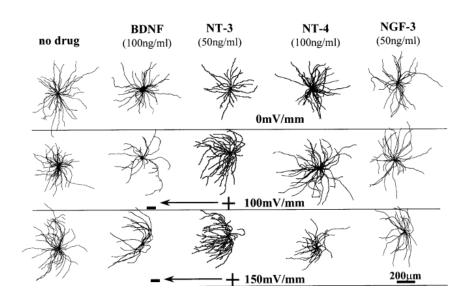


Рисунок 14 — Влияние электрического поля, а также нейротрофинов BDNF, NT-3, NT-4 и NGF-3 на нервную клетку. Верхняя линия: отсутствует ЭП. Средняя линия: ЭП достигает значения 100 мВ/мм. Нижняя линия: ЭП достигает значения 150 мВ/мм [35]

Ученые поясняют это поведение отростков таким образом: AChR быстро движутся к стороне клетки, обращенной к катоду. В наведении конусов роста к катоду также играют роль TrkB и TrkC рецепторы, потенциал-зависимые каналы для прохождения кальция – VGCC. Активность AChR и повышение концентрации кальция напрямую связаны. В конусах роста происходит спонтанное высвобождение ACh, которое начинает активировать сигнальный каскад с помощью AChR. Каскад реакций включает активацию MAPK, PLC и IP3-киназу, что приводит к повышению концентрации цитоплазматического кальция. Изменение концентрации кальция связано также непосредственно с рецепторами Ach [39], увеличенное число которых приводит к повышению концентрации кальция. Активация рецепторов TrkB и TrkC индуцирует высвобождение ACh из конуса роста, который активирует AChR, дополнительно повышая концентрацию кальция. Повышенный уровень кальция также индуцирует высвобождение кальция из внутриклеточных хранилищ (запасов), которые, как известно, чувствительны к RyR. При истощении внутриклеточных запасов кальция стромальная взаимодействующая молекула (STIM1) транслоцирует внутри эндоплазматического ретикулума на участки, близкие к поверхности мембраны, и начинает связывать и активировать белки Orai. После активации белки Orai формируют селективные кальций зависимые каналы (CRAC), которые приводят к притоку внеклеточного кальция [40].

Также следует отметить, что влияние тирозинкиназного ингибитора, тирфостина RG50864, при наличии электрического поля в 140 мВ/мм приводило к преимущественному росту нейритов к аноду. Однако при увеличении концентрации тирфостина RG50864 в 2 раза с 14 мМ до 28 мМ происходил случайный рост нейритов при том же ЭП.

# 1.13.3. Роль ГТФаз в направлении конуса роста при воздействии электрическим полем

Существует также механизм, с помощью которого можно регулировать активность ГТФаз Rac и Cdc42 преимущественно в катодной области, а активность Rho – в анодной области, чтобы направлять конусы роста к катоду [41]. Вполне вероятно, что увеличение концентрации кальция активирует (косвенно) Cdc42 и Rac, но инактивирует Rho. На стороне конуса роста, обращенной к катоду, Cdc42 активируется вследствие повышения концентрации кальция, который активирует путь NWASP-ARP 2/3, где NWASP – нейронный белок синдрома Вискотта-Олдрича, а ARP 2/3 – семисубъединичный белковый комплекс, вызывая увеличенный рост актина. Активация Cdc42 стимулирует активацию Rac, а ГТФаза Rac стимулирует серин/треониновую протеинкиназу (РАК-1). РАК-1 активирует LIM-киназу (LIMK), которая инактивирует актин разрушающий белок кофилина, тем самым увеличивая полимеризацию актина. (Известны также работы, в которых Rac и Cdc42 координируют локальную полимеризацию актина во время FcR-опосредованного фагоцитоза. Однако сами же авторы утверждают, что роль ГТФаз еще точно не определена [42].) В то же время РАК-1 ингибирует MLCK, который предотвращает сокращение актина на основе миозина-II. Активация Rac ингибирует активацию Rho, предотвращая коллапс конуса роста аксона, обращенного к катоду. Вследствие наличия ЭП Rho ГТФаза располагается преимущественно на анодной стороне мембраны конуса роста аксона. Активация Rho приводит к стимуляции MLC киназы (MLCK) посредством цитрона-К, который уменьшает сокращение актиновых филаменов. Также активация Rho приводит к стимуляции протеинкиназы N (PKN), который приводит к усилению деполимеризации актина, что, в свою очередь, проявляется в разрушении микротрубочек (рисунок 15).

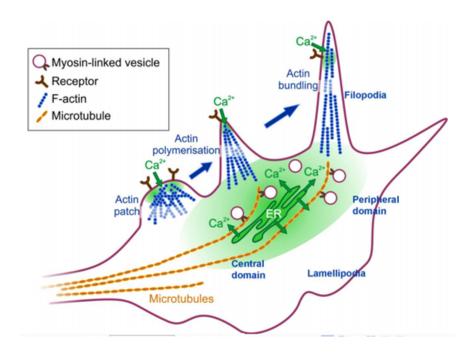


Рисунок 15 — Асимметричные кальциевые сигналы влияют на рост ламеллиподий и филоподий. Конус роста на конце растущего аксона в основном состоит из нитевидных актиновых (F-актиновых) филаментов. Центральный домен богат микротрубочками и органеллами, такими как ЭР. Филоподии растут от периферического домена [40]

Сdc42 также кодирует небольшой ГТФ связывающий белок. Он имеет тридцатипроцентную аминокислотную идентичность с Ras и относится к Rho подсемейству белков. Возможно, связь сборки ГТФазы и полимеризации актина включает SH3-домен. Если Rho-подобные ГТФазы распознают плазмо-мембранные мишени, уже связанные с актином, то это может способствовать взаимодействию с подмножеством SH3 содержащих белков. Результатом этого будет агрегирование, т.е. объединение, ГТФазы группы белков в одном месте в плазматической мембране, что поспособствует полимеризации актина [43].

# 1.13.4. Изменение концентрации $Ca^{2+}$ каналов при воздействии электрическим полем

Колин Д. Макгейг исследовал ориентацию нерва лягушки под влиянием внешнего ЭП. В результате было сделано предположение, что при наличии ЭП потенциал-зависимые кальциевые каналы находятся преимущественно на катодной стороне мембраны конуса роста аксона. Это может позволить большему числу кальциевых ионов попадать внутрь клетки и способствовать при наличии мессенджеров усилению роста отростков нервной клетки в сторону катода. При добавлении ионов  $Co^{2+}$  или  $La^{3+}$ , которые являются блокираторами кальциевых каналов, не происходит никакого поворота конуса роста. При наличии кальциевого ионофора A23187 происходит увеличение количества потенциал-зависимых кальциевых каналов, что и объясняет еще более усиленный рост отростков к катоду. В случае, когда на нервную клетку оказывают влияние ионы  $\mathrm{Co}^{2+}$  и кальциевый ионофор А23187 происходит рост к аноду, который объясняется преимущественным блокированием потенциал-зависимых кальциевых каналов в катодной области мембраны нервной клетки (рисунок 16). Следовательно, по данной теории, открытых каналов, находящихся в анодной области, больше, что и способствует росту к аноду [44, 45].

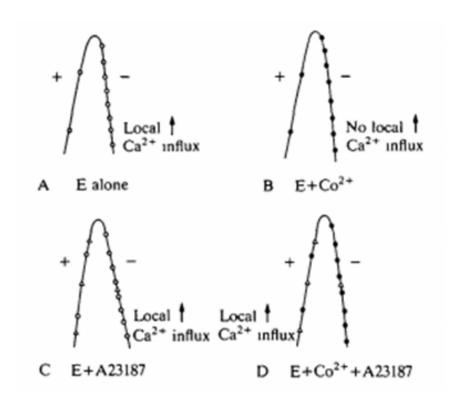


Рисунок 16 — (А) показано, что при наличии ЭП кальциевые каналы находятся преимущественно на катодной стороне мембраны. (В) Происходит блокировка кальциевых каналов с помощью Co<sup>2+</sup>, что приводит к росту аксона в сторону анода. (С) При наличии кальциевого ионофора A23187 происходит увеличение количества потенциал-зависимых кальциевых каналов, что и объясняет еще более усиленный рост отростков к катоду. (D) На нервную клетку оказывают влияние ионы Co<sup>2+</sup> и кальциевый ионофор A23187 происходит рост к аноду, который объясняется преимущественным блокированием потенциал-зависимых кальциевых каналов в катодной области мембраны нервной клетки [44]

### 1.13.5. Применение электрического поля в медицине

Эксперимент, который проводился над культурой клеток при наличии поля напряженностью 400-500 мВ/мм, показал, что более 90 процентов нейронных клеток имели ориентацию преимущественно перпендикулярно градиенту напряжения поля. Удаление градиента напряжения внешнего постоянного поля приводило к потере предпочтительной ориентации с последующим случайным ростом [46]. Также было обнаружено, что минимальный обнаруживаемый отклик нейритов на наличие ЭП имеет место при напря-

женности поля около 7 мВ/мм. Кроме того, было решено, что клеткам нужен внешний направленный сигнал, чтобы начать высокополяризованный процесс образования нейритов [47]. Пока остается неясным, как клетки реагируют на разность напряжений до 0,1 мВ. В одном случае было показано, что, скорее всего, реакция на больший градиент напряжения обусловлена разницей в потенциале мембраны, создаваемой полем, и последствиями этой разницы при пассивном входе кальция в направленную к катоду и аноду сторон клетки. Деполяризация мембранного потенциала увеличивала приток кальция, а гиперполяризация уменьшала ее приток [48]. Недавние данные показывают, что локальная полимеризация актина происходит в точке будущего роста нейритов в результате локального поступления кальция, и этот F-актин в конечном итоге приводит к росту нейритов [49]. Таким образом, приложенное поле может направлять рост нейритов путем смещения поступления кальция в одну сторону конуса роста. Следовательно, скорость и направление роста нервов контролируются устойчивым ЭП [50, 51]. В свою очередь, прерывания эндогенного ЭП [52-57] проявлялись в ярко выраженной форме дефектов развития, включая отсутствие некоторых структур центральной нервной системы (ЦНС). Тем самым, стало известно, что естественные ЭП существуют внутри эмбрионов во время нейрогенеза и что их отсутствие нарушает развитие нервной системы. Также величина ЭП, измеренная in vivo, достаточна для перераспределения заряженных молекул белка [58, 59]. Число и направление делящихся клеток, а также скорость заживления ран зависели от направления ЭП [50, 51]. Например, роговая оболочка млекопитающих создает внутреннюю положительную трансроговичную разность потенциалов от +30 до +40 мВ, путем перекачки натрия и калия внутрь через эпителиальный слой и хлора – наружу [60, 61]. Постоянный ток ЭП мгновенно возникает при ранении роговицы, это, в свою очередь, стимулирует прорастание сенсорного нерва, который направлен к краю раны.

Известно, что путем увеличения или уменьшения эндогенного электрического поля с помощью фармакологических средств можно увеличить или уменьшить степень интенсивности прорастания нервов, направленных к краю раны [50]. Боргенс и др. ученые впервые предложили использовать постоянный ток ЭП, чтобы способствовать восстановлению поврежденного

спинного мозга млекопитающих. Применение небольшого постоянного тока ЭП вызывало как анатомическое, так и функциональное восстановление рефлекса участка нервной системы у значительной части животных [62, 63]. Эксперименты стали проводиться на собаках с различными травмами позвоночника, и снова было выявлено статистическое улучшение по нескольким неврологическим параметрам [64, 65]. Восстановление и регенерация поврежденных или пораженных тканей являются сложными биологическими процессами, во время которых задействованы многие молекулярные, клеточные и тканевые реакции.

Эндогенные электрические поля — это очень плохо понятый, но мощный сигнал, который находится под пристальным вниманием [66-72]. Значительные успехи были достигнуты в понимании иерархической роли электрической сигнализации в отношении других управляющих сигналов [73, 74].

Электрическая стимуляция проводится клинически для лечения переломов костей, заживления ран и при повреждениях спинного мозга. Сочетания электрической стимуляции и других хорошо понятых механизмов биохимического регулирования могут предложить мощные и эффективные методы лечения и восстановления тканей [75].

#### ГЛАВА 2. МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

#### 2.1. Моделирование

Фундаментальная цель моделирования состоит в том, что необходимо понять механизмы, которые лежат в основе пространственно-временного поведения  $Ca^{2+}$  сигналов. Есть три основных типа моделей, и каждая имеет свою область применения. Во-первых, качественные модели, представленные в схематической, а не математической форме, широко используются для представления и обсуждения первоначальных гипотез. Их главное преимущество – простота построения, но это также причина их неудобства, недостаток точности. Качественные модели могут описать возможные сценарии, но не могут предсказать, какие сценарии фактически произойдут. Во-вторых, существуют феноменологические модели. Это математические модели, они описывают поведение наблюдаемой системы, которые часто базируются на общей биологии. Их главное неудобство – это то, что сильно отличающиеся математические модели часто способны вести себя схожим способом, и таким образом согласие между моделью и экспериментом теряет свою значимость для понимания основных механизмов. Наконец, есть количественные, или механистические, модели, основанные в максимально возможной степени на известных механизмах и параметрах. Построение механистических моделей зависит полностью от наличия необходимой экспериментальной информации, и эти модели развиваются с поступлением новых экспериментальных данных. Они имеют преимущество обеспечения точных предсказаний, но их основное неудобство – то, что эти предсказания могут быть чувствительны к изменению параметров модели [76]. Построение и понимание математических моделей может оказаться весьма сложным, что снижает ценность моделирования в исследованиях. Выход из этой ситуации – упрощение модели, отказ от рассмотрения дополнительных деталей.

Для того, чтобы построить математическую модель нашей сигнальной системы, требовалось разобраться в процессах, происходящих внутри филоподий конуса роста аксона. Для этого следовало узнать, каким образом запускается сигнальная система и как она работает в областях гиперполяризации и деполяризации.

## 2.2. Схематическое пояснение образования областей деполяризации и гиперполяризации

Для того, чтобы нагляднее представить, как ЭП влияет на микровыросты конуса роста аксона, можно изобразить, как то же самое ЭП влияет на сому нервной клетки (назовем ее "Cell"). Мы помещаем Cell в раствор, проводящий электрический ток, и начинаем влиять электрическим полем. На схеме "-" означает катод, "+" означает анод. Можно представить сопротивление цитоплазмы клетки как Rc, сопротивление мембраны клетки как Rm и сопротивление электролита в виде цепочки N резисторов, каждая из которых имеет одинаковое сопротивление Rэ (рисунок 17). Направление тока J, состоящего из отрицательно заряженных ионов, берем от "-" к "+". Сопротивление электролита порядка нескольких Ом, сопротивление цитоплазмы клетки порядка 10-100 Ом, сопротивление мембраны порядка МОм. Так как сопротивление мембраны много больше сопротивлений цитоплазмы и электролита (Rm >> Rc > Rэ), то током, который проходит по участку цепи через мембрану, можно пренебречь. И остается только один ток, который проходит участок цепи, состоящий из N числа резисторов электролита.

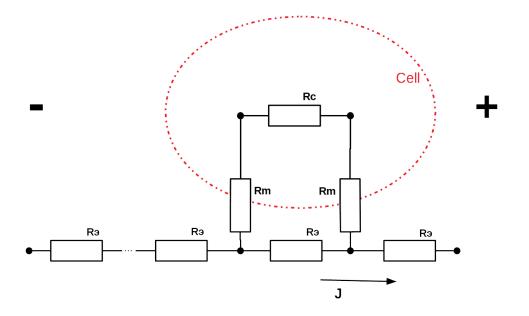


Рисунок 17 — Схематическое пояснение образования областей деполяризации и гиперполяризации. Rc — сопротивление цитоплазмы клетки, Rm — сопротивление мембраны клетки, Rэ — сопротивление одного из N числа сопротивлений электролита, J — ток, "-" — катод, "+" — анод

Формула для нахождения тока, проходящего черех N число резисторов электролита:  $J=\frac{U}{N\cdot R}$ . Так как резисторы одинаковые, будем считать, что R9 = R. Напряжения на разных участках цепи можно найти по формулам:  $U_1=J\cdot R$ ,  $U_2=J\cdot 2R$ , ...,  $U_N=J\cdot NR$ . Причем,  $U_N>U_{N-1}>...>U_2>U_1$ . Из этого следует, что потенциал в области анода выше, чем потенциал в области катода. Потенциал внутри клетки отрицательный, следовательно, разнось потенциалов между цитоплазмой клетки и катодом ниже, чем у цитоплазмы клетки анода. А деполяризация, как известно, образуется при низкой разности потенциалов между цитоплазмой клетки и внешней окружающей ее мембраной. Это низкая разность потенциалов обеспечивается как раз таки в области катода, а в области анода (ввиду наличия большой разности потенциалов) образуется область гиперполяризации.

Данное пояснение также объясняет образование областей гиперполяризации и деполяризации на филоподиях самого конуса роста аксона. Т.е. оно применимо как к соме нервной клетки, изображенной на рисунке, так и

к его аксону с находящимися на нем микровыростами.

#### 2.3. Схема сигнальной системы, управляющей конусом роста аксона

Для того, чтобы выяснить, каков механизм управления изменением конуса роста аксона, необходимо было объединить данные, приведенные в литературном обзоре, в общую схему. В этой схеме можно выделить основной модуль, управляющий ростом и ретракцией отростков аксона. Схема приведена на рисунке 18.

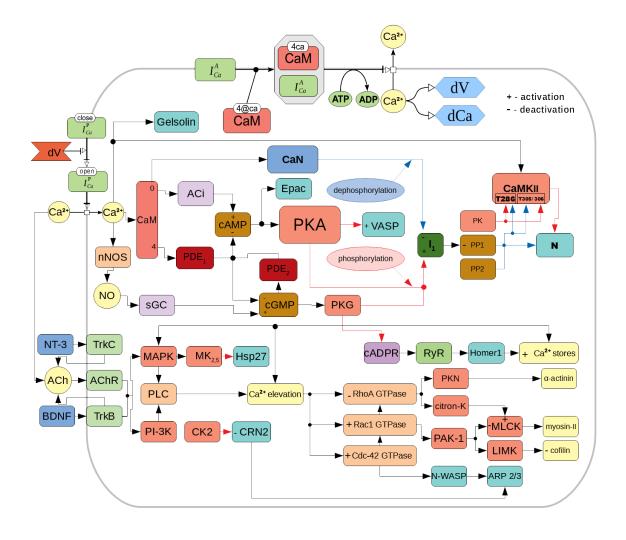


Рисунок 18 — Схема сигнальной системы в клетке, которая управляет конусом роста аксона

Изменение разности потенциалов dV приводит к открытию потенциал-

зависимых кальциевых каналов  $I_{Ca}^P$ , что в дальнейшем способствует пропусканию кальция внутрь клетки и увеличению его концентрации. Также этому способствует наличие ACh и AChR, пропускающих его. В свою очередь взаимодействующие с CaM каналы активного транспорта кальция  $I_{Ca}^A$  благодаря энергии гидролиза аденазинтрифосфата (ATP) в аденазиндифосфат (ADP) способствуют выведению (откачке) кальция из клетки.

Из теоретических данных [77] известно, что время жизни потенциалзависимых кальциевых каналов  $I_{Ca}^P$  больше в той области, где происходит деполяризация клетки. Следовательно, в области деполяризации концентрация кальция должна быть больше. В отличие от области гиперполяризации, где время жизни  $I_{Ca}^P$  меньше.

В нашей теории мы предполагем, что вследствие уменьшения времени жизни кальциевого канала в открытом состоянии в области гиперполяризации мембраны уменьшается интенсивность входящего кальциевого тока на анодной стороне филоподий конуса роста аксона. Уменьшение концентрации стационарного кальция, в свою очередь, приводит к активации кальмодулином аденилатциклазы [22] и, как следствие, к росту концентрации сАМР. сАМР активизирует РКА, что приводит к фосфорилированию связывающего центра серина (S157) белка VASP. Нефосфорилированный белок VASP никак не влияет на полимеризацию актиновых филаментов. При фосфорилировании же S157 блокируется связывание VASP со спектрином, что в дальнейшем ингибирует полимеризацию актиновых филаментов и их комплексообразование.

Другим действием комплекса кальций-кальмодулин при повышенной концентрации стационарного кальция является активация PDE1, которая подавляет эффект сАМР как вторичного посредника. В результате VASP не фосфорилируется и не предотвращает дальнейшее комплексообразование актиновых филаментов и их полимеризацию.

На стороне конуса роста, обращенной к катоду, гуанизин-трифосфат Cdc42 активируется вследствие повышения концентрации стационарного кальция, что в дальнейшем активирует N-WASP и ARP 2/3, вызывая увеличенный рост актиновых филаментов. Другой гуанизин-трифосфат Rac1, также активируемый повышенной концентрацией стационарного кальция,

стимулирует РАК-1. РАК-1 активирует LIM-киназу, которая инактивирует актин-разрушающий белок кофилин, тем самым увеличивая полимеризацию актина. В то же время РАК-1 ингибирует МLСК, предотвращая сокращение актин-миозинового комплекса. Активация же гуанизин-трифосфата Rho, наоборот, стимулирует МLСК посредством цитрона-К, который увеличивает сокращение актин-миозинового комплекса. Также активация Rho приводит к стимуляции РКN, которая при помощи α-актинина усиливает деполимеризацию актина, что, в свою очередь, также проявляется в разрушении микровыростов. Однако активация Rac1 ингибирует Rho, предотвращая коллапс филоподий, направленных в сторону катода.

Увеличенное количество кальция на катодной стороне также способствует совместно с протеинкиназой образованию CaMKII, которая засчет фосфорилирования центров Т286, Т305, Т306 начинает фосфорилировать белки, меняя при этом их конформацию и способствуя сборке актиновых филаментов и в дальнейшем микротрубочек.

При низкой концентрации кальция в области анода активизируется также CaN, который дефосфорилирует ингибитор I1, отвечающий за ингибирование PP1, что приводит к более усиленному дефосорилированию белков. Это выражается в блокировке сборки актиновых филаментов.

Но безответным остается вопрос отсутствия дальнейшего разрушения конуса роста аксона нервной клетки при начавшемся разрушении ее микровыростов. Существует предположение насчет их автономности. Из свойства автономности следует, что изменение концентрации стационарного кальция при изменении трансмембранной разности потенциалов будет происходить независимо у каждой филоподии.

Филоподии, вообще говоря, — это тонкие выросты диаметром примерно 0.й мкм и длиной до 10 мкм и более. Изменение концентрации стационарного кальция у филоподий, находящихся со стороны анода, никак не повлияет на изменение концентрации стационарного кальция у филоподий со стороны катода. Следовательно, автономность в контексте кальциевой сигнализации позволяет рассматривать каждый микровырост отдельно от конуса роста аксона в целом. Чтобы подтвердить данную теорию, нужно было более детально разбрать происходящие внутри микровыростов конуса роста аксо-

на процессы. Для этих целей была создана модель, описывающая динамику кальция в филоподии конуса роста аксона.

# **2.4.** Описание динамики кальция в микровыростах конуса роста аксона нервной клетки

В мелких отростках конуса роста аксона отсутствует эндоплазматический ретикулум, следоватьельно, можно исследовать поведение кальция в такой системе при помощи математического моделирования.

Первоначально были сделаны следующие предположения. После увеличения концентрации кальция в конусе роста аксона, возникшие при кальциевых осцилляциях, ионы кальция диффундируют в микровырост — филоподию. В филоподии действует активный транспорт — так называемые кальциевые помпы, находящиеся в клеточной мембране, которые удаляют кальций из него. Существует также пассивное проникновение ионов кальция через мембрану против градиента электрохимического потенциала и диффузионный ток, направленный вдоль всего микровыроста конуса роста аксона.

Примерный упрощенный схематический вид процессов, происходящих внутри конуса роста аксона и его микровыроста на рисунке 19.

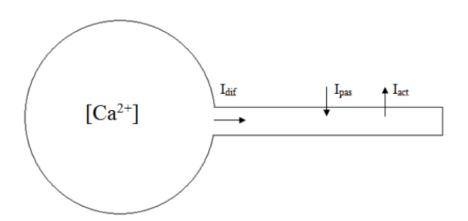


Рисунок 19 — Схематическое изображение конуса роста аксона и его микровыроста – филоподии

Для простоты в данной работе мы перешли от трехмерной модели к рассмотрению одномерной модели [78]. Т.е. направление диффузионных то-

## 2.5. Моделирование динамики кальция в отростке аксона нервной клет-ки

Для описания динамики кальция было составлено дифференциальное уравнение:

$$V_i \cdot \frac{\partial [Ca_i^{2+}]}{\partial t} = V_i \cdot D_{Ca} \cdot \frac{\partial^2 [Ca_i^{2+}]}{\partial x^2} + S_i \cdot (J_{act} + J_{pas}), \tag{2}$$

где равенство  $\frac{\partial [Ca_i^{2+}]}{\partial t} = D_{Ca} \cdot \frac{\partial^2 [Ca_i^{2+}]}{\partial x^2}$  является уравнением Фика, которое описывает диффузию кальция,  $[Ca_i^{2+}]$  – концентрация кальция в цитоплазме ( $\mathbf{M} \cdot \mathbf{n}^{-1}$ ),  $V_i$  – цитоплазматичекий объем исследуемого участка ( $\mathbf{n}$ ),  $S_i$  – площадь поверхности цитоплазматической мембраны (мкм²),  $D_{Ca}$  – константа диффузии для кальция, взаимодействующего с белком – кальмодулином ( $\mathbf{m}^2 \cdot c^{-1}$ ),  $J_{pas}$  – кальциевый поток пассивного транспорта ( $\mathbf{M} \cdot c^{-1} \cdot \mathbf{m} \mathbf{k} \mathbf{m}^{-2}$ ),  $J_{act}$  – кальциевый поток активного транспорта ( $M \cdot c^{-1} \cdot \mathbf{m} \mathbf{k} \mathbf{m}^{-2}$ ).

Для того, чтобы в дальнейшем перейти от токов к потокам, будем использовать уравнение Нернста-Планка:

$$J = \frac{I}{z \cdot F},\tag{3}$$

где I — это ток генерируемый потоком J, z — заряд иона кальция, F — константа Фарадея.

#### 2.5.1. Ток активного транспорта

РМСА — это кальциевая АТФазная помпа плазменной мембраны, которая связывает один ион кальция за цикл и выталкивает его во внеклеточное пространство (используя энергию гидролиза АТФ), когда он связан с СаМ с четырьмя ионами кальция. То есть, РМСА способствует появлению кальциевого тока активного транспорта  $I_{act}$ , который можно определить при помощи системы уравнений:

$$\begin{cases} I_{act} = N_{act} \cdot i_{act} \cdot P_1 \left( [Ca_i^{2+}] \right) \cdot P_2 \left( [Ca_i^{2+}] \right) = J_{act} \cdot P_1 \left( [Ca_i^{2+}] \right) \\ P_1 \left( [Ca_i^{2+}] \right) = \frac{CaM \left( [Ca_i^{2+}] \right)}{K_{CaM} + CaM \left( [Ca_i^{2+}] \right)} \cdot \frac{[Ca_i^{2+}]}{K_i + [Ca_i^{2+}]} \\ P_2 \left( [Ca_{out}^{2+}] \right) = \frac{K_{out}}{K_{out} + [Ca_{out}^{2+}]} \\ J_{act} = N_{act} \cdot i_{act} \cdot P_2 \left( [Ca_{out}^{2+}] \right), \end{cases}$$

$$(4)$$

где  $N_{act}$  — число РМСА в цитоплазматической мембране,  $i_{act}$  — усредненный по времени ток, проходящий через один активированный канал РМСА,  $P_1\left([Ca_i^{2+}]\right)$  — вероятность связывания одного иона  $Ca^{2+}$  с РМСА,  $P_2\left([Ca_{out}^{2+}]\right)$  — вероятность высвобождения ионов  $Ca^{2+}$  с помощью РМСА на внешней стороне цитоплазматической мембраны,  $K_{CaM}$  — афинность кальмодулина с РМСА  $(M\cdot \pi^{-1})$ ,  $K_i$  и  $K_{out}$  — константы равновесной диссоциации во взаимодействиях  $Ca^{2+}$  (внутреннего и внешнего) с РМСА  $(M\cdot \pi^{-1})$ ,  $J_{act}$  — максимальное значение кальциевого тока активного транспорта через один мкм $^2$ , генерируемого цитоплазматическими насосами.

Активация CaM кальцием, в свою очередь, может быть представлена уравнением:

$$CaM\left([Ca_i^{2+}]\right) = \frac{[Ca_i^{2+}]^4}{(K_m + [Ca_i^{2+}])^4},$$
 (5)

так как для связывания с РМСА нужен именно активированный четырьмя ионами кальция СаМ. Здесь  $K_m$  – афинность СаМ для кальция.

#### 2.5.2. Ток пассивного транспорта

Кальциевый ток пассивного транспорта  $I_{pas}$ , который можно определить при помощи системы уравнений:

$$\begin{cases} I_{pas} = N_{pas} \cdot i_{pas} \\ i_{pas} = -g_{pas} \cdot \frac{R \cdot T}{F} (\psi_i - E_a) \\ E_a = 0.5 \cdot \ln \left( \frac{\left[ Ca_{out}^{2+} \right]}{\left[ Ca_i^{2+} \right]} \right), \end{cases}$$

$$(6)$$

где  $N_{pas}$  — число кальциевых каналов в активном состоянии, расположенных в цитоплазматической мембране,  $i_{pas}$  — усредненный по времени ток, проходящий через один активированный канал пассивного транспорта,  $g_{pas}$  — средняя проводимость одного кальциевого канала, R — универсальная газовая постоянная, T — температура, в которой находится клетка, F — константа Фарадея,  $\psi_i$  — цитоплазматический трансмембранный потенциал (мВ),  $E_a$  — равновесная разность потенциала.

С целью упрощения за единицу концентрации была взята d=1 мк $M\cdot \pi^{-1}$ . В результате нормировки был сделан переход к следующим переменным:  $(ca_i^{2+})=\frac{[Ca_i^{2+}]}{d},\;(ca_{out}^{2+})=\frac{[Ca_{out}^{2+}]}{d},\;k_{\alpha}=\frac{K_{\alpha}}{d},\alpha=CaM,out,i,m.$ 

Следовательно, система уравнений (7) для кальциевого тока активного транспорта будет выглядеть следующим образом:

$$\begin{cases} I_{act} = N_{act} \cdot i_{act} \cdot p_1 \left( (ca_i^{2+}) \right) \cdot p_2 \left( (ca_{out}^{2+}) \right) = j_{act} \cdot p_1 \left( (ca_i^{2+}) \right) \\ p_1(ca_i^{2+}) = \frac{CaM \left( (ca_i^{2+}) \right)}{k_{CaM} + CaM \left( (ca_i^{2+}) \right)} \cdot \frac{(ca_i^{2+})}{k_i + (ca_i^{2+})} \\ p_2(ca_{out}^{2+}) = \frac{k_{out}}{k_{out} + (ca_{out}^{2+})} \\ j_{act} = N_{act} \cdot i_{act} \cdot p_2 \left( (ca_{out}^{2+}) \right) \\ CaM \left( (ca_i^{2+}) \right) = \frac{(ca_i^{2+})^4}{(k_m + ca_i^{2+})^4}. \end{cases}$$

$$(7)$$

Система уравнений (8), описывающая кальциевый ток пассивного транспорта, будет выглядеть следующим образом:

$$\begin{cases} I_{pas} = N_{pas} \cdot i_{pas} \\ i_{pas} = -g_{pas} \cdot \frac{R \cdot T}{F} (\psi_i - E_a) \\ E_a = 0.5 \cdot \ln \left( \frac{\left( c a_{out}^{2+} \right)}{\left( c a_i^{2+} \right)} \right), \end{cases} \tag{8}$$

Объединяя системы (7) и (8), получаем конечную нормированную систему уравнений, описывающую динамику кальция в микровыросте конуса роста аксона:

$$\begin{cases} \frac{\partial(ca_{i}^{2+})}{\partial t} = D_{Ca} \cdot \frac{\partial^{2}(ca_{i}^{2+})}{\partial x^{2}} + a_{1} \cdot \left(\psi_{i} - 0.5 \cdot \ln\left(\frac{(ca_{out}^{2+})}{(ca_{i}^{2+})}\right)\right) - \\ - a_{2} \cdot p_{1}\left((ca_{i}^{2+})\right) \\ a_{1} = j_{pas}^{norm} = -\frac{S_{i} \cdot N_{pas} \cdot g_{pas} \cdot R \cdot T}{z \cdot F^{2} \cdot V_{i} \cdot d} \\ a_{2} = j_{act}^{norm} = \frac{S_{i} \cdot N_{act} \cdot i_{act} \cdot p_{2}\left((ca_{out}^{2+})\right)}{z \cdot F \cdot V_{i} \cdot d} \\ p_{2}(ca_{out}^{2+}) = \frac{k_{out}}{k_{out} + (ca_{out}^{2+})} \\ p_{1}(ca_{i}^{2+}) = \frac{CaM\left((ca_{i}^{2+})\right)}{k_{CaM} + CaM\left((ca_{i}^{2+})\right)} \cdot \frac{(ca_{i}^{2+})}{k_{i} + (ca_{i}^{2+})}. \end{cases}$$

$$(9)$$

Окончательно дифференциальное уравнение, описывающее динамику кальция, выглядит следующим образом:

$$\frac{\partial(ca_{i}^{2+})}{\partial t} = D_{Ca} \cdot \frac{\partial^{2}(ca_{i}^{2+})}{\partial x^{2}} + j_{pas}^{norm} \cdot \left(\psi_{i} - 0.5 \cdot \ln\left(\frac{(ca_{out}^{2+})}{(ca_{i}^{2+})}\right)\right) -$$

$$-j_{act}^{norm} \cdot \frac{CaM\left((ca_{i}^{2+})\right)}{k_{CaM} + CaM\left((ca_{i}^{2+})\right)} \cdot \frac{(ca_{i}^{2+})}{k_{i} + (ca_{i}^{2+})}.$$

$$(10)$$

### 2.5.3. Численное решение дифференциального уравнения

Для определения основной части значений параметров были использованы экспериментальные и модельные данные из научных работ [14, 79, 80, 81]. При выборе константы диффузии для кальция  $D_{Ca}$  учитывалось то, что кальций связывается с белком кальмодулином, что приводит к замедлению протекания диффузионного распространения кальция. Также для упрощения модели мы представили отросток в форме цилиндра.

Для расчета суммы токов, идущих внутрь клетки, была использована модель Морриса-Лекара [79]:

$$N_{pas} = 0.5 \cdot [1 + tanh(\frac{V - \mu_1}{\mu_2})], \tag{11}$$

где  $\mu_2, \mu_2$  и V – некие параметры модели. Проводим расчеты по формуле (11):

$$N_{pas} = 0.5 \cdot [1 + tanh(\frac{120 + 1.2}{18})] = 1.$$

Находим 
$$j_{pas}^{norm}$$
 тока пассивного транспорта: 
$$j_{pas}^{norm} = -\frac{S_i \cdot N_{pas} \cdot g_{pas} \cdot R \cdot T}{z \cdot F^2 \cdot V_i \cdot d} = -\frac{3.14 \cdot 10^{-12} \cdot 1 \cdot 44 \cdot 8.31}{2 \cdot 96480^2 \cdot 0.0785 \cdot 10^{-15}} \cdot 10^{-3}$$

 $\cdot \frac{310 \cdot 10^{-3}}{_{10-6}} = -0.24 \; \mathrm{c}^{-1}$ , где  $V_i$  была найдена по формуле:

$$V_i = \pi \cdot R^2 \cdot H \tag{12}$$

 $V_i = 3.14 \cdot 0.05^2 \cdot 10^{-12} \cdot 10 \cdot 10^{-18} = 0.0785 \cdot 10^{-18} \text{ m}^3 = 0.0785 \cdot 10^{-15} \text{ m},$ где R – это радиус отростка порядка 0.05 мкм, а H – длина порядка 10 мкм;  $S_i = 2\pi \cdot R \cdot H = 2 \cdot 3.14 \cdot 0.05 \cdot 10^{-6} \cdot 10 \cdot 10^{-6} = 3.14 \cdot 10^{-12} \ \mathrm{m}^2.$ 

В нейронной модели Буллфрога [80] используется параметр  $\mu_{PMCA}$ , характеризующий число каналов в активном состоянии и проводимость одного канала для кальциевого потока на мкм<sup>2</sup>. Этот параметр равен 2000.0  $\cdot 10^{-18}~{
m M/ce}$ к. Так как эта константа используется для потока, то для нахождения  $j_{act}^{norm}$  необходимо, наоборот, умножить параметр модели Буллфрога на

z и F. поэтому получаем выражение для определения 
$$j_{act}^{norm}$$
: 
$$j_{act}^{norm} = \frac{S_i \cdot \mu_{PMCA} \cdot z \cdot F}{z \cdot F \cdot V_i \cdot d} = -\frac{3.14 \cdot 10^{-12} \cdot 2000 \cdot 10^{-12} \cdot 2 \cdot 96480}{2 \cdot 96480 \cdot 0.0785 \cdot 10^{-15} \cdot 10^{-6}} = 80 \text{ c}^{-1}.$$

Все вычисления были выполнены с помощью математического пакета Mathcad15. С помощью дифференциального уравнения, зависящего от времени t и координаты x, была найдена зависимость концентрации кальция от расстояния. Mathcad 15 был выбран в связи с тем, что он включает в себя функцию для решения параболических и гиперболических уравнений в частных производных pdesolve. Функция pdesolve используется в составе вычислительного блока Given – pdesolve для решения параболических и гиперболических уравнений (или систем уравнений) в частных производных, имеющих

в качестве аргументов, как правило, время t и пространственную координату x.

Значения основных констант модели представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Значения для основных констант математической модели

Параметр	Значение	Параметр	Значение
$(ca_i^{2+})$	0.05 - 3.3	$k_m$	1
$(ca_{out}^{2+})$	$10^3$	$k_{CaM}$	0.003
$D_{Ca}$	$50~{ m mkm}^2 \cdot c^{-1}$	$k_{i}$	0.4
$j_{pas}^{norm}$	$0.24 \ c^{-1}$	R	8.31 Дж· $M^{-1} \cdot K^{-1}$
$\psi_i$	-70	F	96480 Кл $\cdot M^{-1}$
$j_{act}^{norm}$	$80 \ { m c}^{-1}$	T	310 K
V	120 мВ	$\mu_1$	-1.2 мВ
$\mu_2$	18 мВ	$g_{pas}$	$44~\mathrm{Cим}~\mathrm{m}^{-2}$
$V_{i}$	$0.0785 \cdot 10^{-15}~\mathrm{J}$	$S_{i}$	$3.14\cdot 10^{-12}~{ m m}^2$

### ГЛАВА 3. АНАЛИЗ МАТЕМАТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

Перейдём теперь к анализу нашей математической модели. В результате вычислений был получен график зависимости концентрации кальция в цитоплазме филоподии конуса роста аксона от расстояния. Концентрация кальция менялась в диапазоне примерно от 0 до 1 мк $M\cdot \pi^{-1}$ , а диапазон распространения был в пределах от 0 до 10 мкм (т.е. расстояние от основания тела конуса роста аксона до конца микровыроста).

Как видно из графика, представленном на рисунке 20, при разных значениях концентрации кальция, которые мы задаем для конуса роста аксона, с увеличением расстояния и приближением к концу филоподии концентрация кальция экспоненциально стремится к стационарному значению, который был в конусе роста изначально. То есть, исходя из данной модели, кальций в конусе роста аксона перестает влиять на кальций в тонких микровыростах, что позволяет в контексте кальциевой сигнализации рассматривать филоподии отдельно от ламеллиподий, т.е. речь идет уже об автономии филоподий относительно ламеллиподий конуса роста аксона.

Стационарное значение концентрации кальция было найдено в MathCad15 путем вычисления ранее полученного дифференциального уравнения, описывающего динамику кальция в отростке, с учетом того, что  $\frac{\partial (ca_i^{2+})}{\partial t} = 0 \text{ и } D_{Ca} \cdot \frac{\partial^2 (ca_i^{2+})}{\partial x^2} = 0, \text{ следовательно:}$ 

$$a_{1} \cdot \left(\psi_{i} - 0.5 \cdot \ln\left(\frac{\left(ca_{out}^{2+}\right)}{\left(ca_{i}^{2+}\right)}\right)\right) - a_{2} \cdot \frac{CaM\left(\left(ca_{i}^{2+}\right)\right)}{k_{CaM} + CaM\left(\left(ca_{i}^{2+}\right)\right)} \cdot \frac{\left(ca_{i}^{2+}\right)}{k_{i} + \left(ca_{i}^{2+}\right)} = 0$$

$$(13)$$

Таким образом, получилось, что значение стационарного кальция  $\mathrm{Ca}_{st}=0.31~\mathrm{mk}M\cdot\mathrm{n}^{-1}$ 

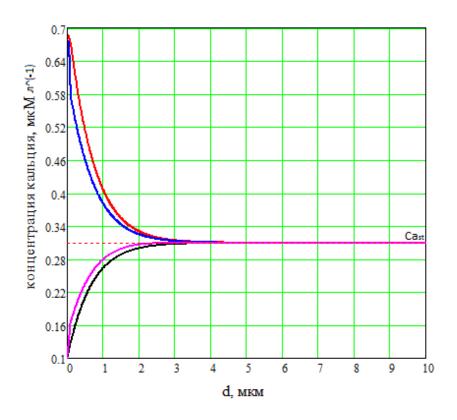


Рисунок 20 — Распределение концентрации кальция в тонком микровыросте — филоподии. Разные цвета графиков соответствуют концентрациям кальция в разные моменты времени: красный — 1.33 секунды; синий — 1.245 секунды; розовый — 0.0008 секунды; черный — 0.1 секунды.  $Ca_{st} = 0.31 \text{ мк} M \cdot \pi^{-1}$  - стационарная концентрация кальция

Также на графике можно видеть динамику кальция в разные моменты времени. Граничные условия были подобраны таким образом, что при времени t < 0.1 с концентрация кальция равна примерно  $0.1 \text{ мк} M \cdot \pi^{-1}$ , а при t > 0.1, концентрация кальция примерно равна  $0.69 \text{ мк} M \cdot \pi^{-1}$ . И, как видно из графиков, при резком изменении концентрации кальция в 7 раз система не успевает моментально среагировать и перераспределить кальций (синий график), но когда время стремится к 1.33 секунды, кальций начинает все более равномерно распределяться и это распределение достигает предельного значения (красный график). Т.е. при 2, 3, 4 и т.д. секундах распределение кальция не будет превышать порогового значения, которое было достигнуто при 1.33 секунды. То же самое и относится к распределению концентрации кальция, которое было ниже стационарного (черный и розовый графики).

#### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Направление развития конуса роста аксона определяется сигнальной системой, работа которой, несмотря на все проведенные исследования, до сих пор остается не до конца выясненной.

В целом считается, что физические и химические факторы во внеклеточной среде играют важную роль в определении направления роста нейритов. Одним из видов физических факторов, определяющих направление конуса роста аксонов, является наличие в ткани слабых внеклеточных электрических полей. Причем исследования показывают, что рост нейритов в экспериментах был направлен преимущественно к катоду внеклеточного электрического поля. Мы попытались объяснить результаты экспериментов на основе анализа внутриклеточных процессов.

Когда происходит развитие конуса роста аксонов, прежде всего, формируются филоподии (Ф) — тонкие выросты диаметром примерно 0.1 мкм и длиной до 10 мкм и более. Нами был проведен анализ динамики кальция в таком микровыросте конуса роста аксона нервной клетки при помощи математической модели и были сделаны выводы об автономности Ф относительно ламеллиподий и друг друга. Из свойства автономности следует, что изменение концентрации стационарного кальция при изменении трансмембранной разности потенциалов будет происходить независимо у каждой Ф. Изменение концентрации стационарного кальция у Ф, находящихся со стороны анода, никак не повлияет на изменение концентрации стационарного кальция у Ф со стороны катода. Следовательно, автономность в контексте кальциевой сигнализации позволяет рассматривать каждый микровырост отдельно от конуса роста аксона в целом.

Таким образом, мы предполагаем, что механизм управления конусом роста аксонов с помощью электрического поля обусловлен тем, что в Ф, направленных в сторону катода, происходит увеличение концентрации стационарного кальция, которое индуцирует активацию сигнальной системы, представленной в виде схемы в данной работе, приводящей к сборке, а со стороны анода при уменьшении концентрации кальция — к разборке цитоскелета.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Gallo, G. Regulation of Growth Cone Actin Filaments by Guidance Cues [Text] / G. Gallo, P. Letourneau, C. Paul // Journal of Neurobiology. 2004. Vol. 58, No. 1. P. 92-102.
- 2. Gordon-Weeks, P. Microtubules and Growth Cone Function [Text] / P. Gordon-Weeks, R. Phillip // Journal of Neurobiology. 2004. Vol. 58, No. 1. P. 70-83.
- 3. Arena, S. Genetic analysis of the kinome and phosphatome in cancer [Text] / S. Arena, S. Benvenuti, A. Bardelli // Cellular and Molecular Life Sciences. 2005. —Vol. 62, No. 18. P. 2092-2099.
- 4. Berridge, M. Inositol trisphosphate and calcium signalling [Text] / M. Berridge // Nature. —1993. —Vol. 361, No. 6410. P. 315-325.
- 5. Berridge, M. Calcium signalling remodelling and disease [Text] / M. Berridge // Biochemical Society Transactions. 2012. —Vol. 40, No. 2. P. 297-309.
- 6. Fernandes, I. Calcium-induced calmodulin conformational change. Electrochemical evaluation [Text] / I. Fernandes, A. Oliveira-Brett // Bioelectrochemistry. —2017. —Vol. 113. P. 69–78.
- 7. Wagenen, S. Regulation of Neuronal Growth Cone Filopodia by Nitric Oxide [Text] / S. Wagenen, V. Rehder // Journal of Neurobiology. —1999.—Vol.39. —No.2.—P.168–185.
- 8. Wagenen, S. Regulation of Neuronal Growth Cone Filopodia by Nitric Oxide Depends on Soluble Guanylyl Cyclase [Text] / S. Wagenen, V. Rehder // Journal of Neurobiology. —2001. —Vol.46. —No.3.— P.206–219.
- 9. Zhong, L. Nitric Oxide Regulates Neuronal Activity via Calcium Activated Potassium Channels Cyclase [Text] / L. Zhong, S. Estes, L. Artinian, V. Rehder // PLOS ONE. —2013. —Vol.8. —No.11.
- 10. Tojima, T. The Nitric Oxide-cGMP Pathway Controls the Directional Polarity of Growth Cone Guidance via Modulating Cytosolic Ca2+ Signals [Text]/ T. Tojima, R. Itofusa, H. Kamiguchi // Journal of Neuroscience. 2009. Vol. 29, No. 24. P. 7886-7897.
- 11. Welshhans, K. Nitric oxide regulates growth cone filopodial dynamics via ryanodine receptor-mediated calcium release [Text] / K. Welshhans, V. Rehder // European Journal of Neuroscience. 2007. Vol. 26, No. 6. P. 1537-1547.

- 12.Wen, Z. A CaMKII/calcineurin switch controls the direction of Ca 2+-dependent growth cone guidance [Text]/ Z. Wen, C. Guirland, G. Ming, J. Zheng // Neuron. 2004. Vol. 43, No. 6. P. 835-846.
- 13. Sutherland, D. The interdependent roles of Ca2+ and cAMP in axon guidance [Text] / D. Sutherland, G. Goodhill // Developmental Biology. —2013. —Vol. 75. —No. 4.— P. 402-410.
- 14. Valeyev, N. Multiple calcium binding sites make calmodulin multifunctional [Text] / N. Valeyev, P. Heslop-Harrison, I. Postlethwaite, N. Kotov, D. Bates// Molecular BioSystems. —2008. —Vol. 4. —No. 1.— P. 1-100.
- 15. Masada, N. Distinct Mechanisms of Regulation by Ca2+/Calmodulin of Type 1 and 8 Adenylyl Cyclases Support Their Different Physiological Roles [Text] / N. Masada, A. Ciruela, D. MacDougall, D. Cooper // THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. —2009. —Vol. 284. —No. 7.— P. 4451-4463.
- 16. Pi, H. CaMKII control of spine size and synaptic strength: Role of phosphorylation states and nonenzymatic action [Text] / H. Pi, N. Otmakhov, F. Gaamouch, D. Lemelin, P. Koninck, J. Lisman // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. —2010. —Vol. 107. No. 32.— P. 14437-14442.
- 17. Gasperini, R. Homer regulates calcium signalling in growth cone turning [Text] / R. Gasperini, D. Choi-Lundberg, M. Thompson, C. Mitchell, L. Foa // Neural Development. —2009. —Vol. 4. —No. 29.—P. 1-18.
- 18. Forbes, E. Calcium and cAMP Levels Interact to Determine Attraction versus Repulsion in Axon Guidance [Text] / E. Forbes, A. Thompson, J. Yuan, and G. Goodhill // Neuron. —2012. —Vol. 74.— P. 490–503.
- 19. Kostenko, S. PKA-induced F-actin rearrangement requires phosphorylation of Hsp27 by the MAPKAP kinase MK5 [Text] / S. Kostenko, M. Johannessen, U. Moens // Cellular Signalling. 2009. Vol. 21, No. 5. P. 712-718.
- 20. Xavier, C. Phosphorylation of CRN2 by CK2 regulates F-actin and Arp2/3 interaction and inhibits cell migration [Text] / C. Xavier, R. Rastetter, M. Blömacher, M. Stumpf, M. Himmel, R. Morgan, M. Fernandez, C. Wang, A. Osman, Y. Miyata, R. Gjerset, L. Eichinger, A. Hofmann, S. Linder, A. Noegel, C. Clemen // Scientific Reports. 2012. Vol. 2.
- 21. McQuown, S. Phosphodiesterase 1b (PDE1B) Regulates Spatial and Contextual Memory in Hippocampus [Text] / S. McQuown, S. Xia, K. Baumgartel, R. Barido, G. Anderson, B. Dyck, R. Scott, M. Peters // Frontiers in Molecular Neuroscience.—2019. —Vol. 12. —No. 21.

- 22. Яковлев, А.В. Учебное пособие. Аденилатциклазная и гуанилатциклазная системы внутриклеточных вторичных посредников. / Яковлев А.В., Яковлева О.В., Ситдикова Г.Ф. Казань: Изд-во КГУ, 2009.
- 23. Benz, P. Differential VASP phosphorylation controls remodeling of the actin cytoskeleton [Text] / P. Benz, Peter M. Benz, C. Blume, S. Seifert, S. Wilhelm, J. Waschke, K. Schuh, F. Gertler, T. Münzel, T. Renné // Journal of Cell Science. —2009. —Vol. 122. P. 3954-3965.
- 24. Yin, H. Ca2+ Control of Actin Filament Lengt [Text] / H. Yin, J. Hartwig, K. MaruyamaS, T. Stossel // THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. —1981. —Vol. 256. —No. 18.— P. 9693-9697.
- 25. Averaimo, S. Intermingled cAMP, cGMP and calcium spatiotemporal dynamics in developing neuronal circuits [Text] / S. Averaimo, X. Nicol // Frontiers in Cellular Neuroscience. —2012. —Vol. 8. P. 376.
- 26. Nicol, X. Routes to cAMP: Shaping neuronal connectivity with distinct adenylate cyclases [Text] / X. Nicol, P. Gaspar // European Journal of Neuroscience. —2014. —Vol. 39, No. 11, . P. 1742-1751.
- 27. Wang, H. The role of Ca<sup>2+</sup>-stimulated adenylyl cyclases in bidirectional synaptic plasticity and brain function [Text] / H. Wang, M. Zhang // Reviews in the neurosciences. —2012. —Vol. 23, No. 1. P. 67-78.
- 28. Azavedo, E. Radiological evidence of response to electrochemical treatment of breast cancer [Text] / E. Azavedo, G. Svane, B. Nordenström // Clinical Radiology. —1991. —Vol. 43. —No. 2.— P. 84-87.
- 29. Gentzkow, G. Electrical Stimulation to Heal Dermal Wounds [Text] / G. Gentzkow // The Journal of Dermatologic Surgery and Oncology. —1993. Vol. 19. —No. 8.— P. 753-758.
- 30. Astrom, M. Relationship between Neural Activation and Electric Field Distribution during Deep Brain Stimulation [Text] / M. Astrom, E. Diczfalusy, H. Martens, K. Wardell // IEEE Transactions on Biomedical Engineering. 2015. —Vol. 62, No. 2. P. 664-672.
- 31. Patel, N. Orientation of neurite growth by extracellular electric fields [Text] / N. Patel, M. Poo // The Journal of neuroscience. —1982. —Vol. 2, No. 4. P. 483-496.

- 32. Maisonpierre, P. Human and rat brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3: Gene structures, distributions, and chromosomal localizations [Text] / P. Maisonpierre, M. Le Beau, R. Espinosa, N. Ip, L. Belluscio, S. de la Monte, S. Squinto, M. Furth, G. Yancopoulos // Genomics. —1991. —Vol. 10. —No.3.—P. 558–568.
- 33. Erskine, L. Growth cone neurotransmitter receptor activation modulates electric field-guided nerve growth [Text] / L. Erskine, C. McCaig // Developmental Biology. —1995. —Vol. 171. —No. 2.— P. 330-339.
- 34.McCaig, C. Rajnicek A.M., Song B. Has electrical growth cone guidance found its potential? [Text]/ C. McCaig, A. Rajnicek B. Song // TRENDS in Neurosciences. —2002. —Vol. 25, No. 7.
- 35. McCaig, C. Neurotrophins enhance electric field-directed growth cone guidance and directed nerve branching [Text] / C. McCaig, L. Sangster, R. Stewart // Developmental Dynamics. —2000. —Vol. 217. —No. 3.— P. 299–308.
- 36. McCaig, C. Nerve growth and nerve guidance in a physiological electric field. In Nerve Growth and Nerve Guidance [Text] / C. McCaig, L. Erskine // Portland Press. —1996. P. 151–170.
- 37. Erskine, L. Growth Cone Neurotransmitter Receptor Activation Modulates Electric Field-Guided Nerve Growth [Text] / L. Erskine, C. McCaig // Developmental Biology. —1995. —Vol. 171. —No. 2.— P. 330–339.
- 38. Stewart, R. Calcium-Channel Subtypes and Intracellular Calcium Stores Modulate Electric Field-Stimulated and Field-Oriented Nerve Growth [Text] / R. Stewart, C. McCaig, L. Erskine // Developmental Biology. —1995. —Vol. 171. —No. 2.— P. 340–351.
- 39. Rajnicek, A. The Direction of Neurite Growth in a Weak DC Electric Field Depends on the Substratum: Contributions of Adhesivity and Net Surface Charge [Text] / A. Rajnicek, K. Robinson, C. McCaig // DEVELOPMENTAL BIOLOGY. —1998. —Vol.203.— P.412–423.
- 40. Gasperini, R. How does Calcium interact with the Cytoskeleton to Regulate Growth Cone Motility during Axon Pathfinding? [Text] / R. Gasperini, M. Pavez, A. Thompson, C. Mitchell, H. Hardy, K. Young, G. Chilton, L. Foa // Molecular and Cellular Neuroscience. —2017. —Vol.84.— P.29-35.
- 41. Rajnicek, A. Temporally and spatially coordinated roles for Rho, Rac, Cdc42 and their effectors in growth cone guidance by a physiological electric field [Text] / A. Rajnicek, L. Foubister and C. McCaig // Journal of Cell Science. 2006. Vol. 119, No. 9.— P. 1723-1735.

- 42. Cougoule, C. Dissociation of Recruitment and Activation of the Small G-protein Rac during FcΥ Receptor-mediated Phagocytosis [Text] / C. Cougoule, A. Dart, J. Lim, E. Caron // THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. —2006. —Vol.281. —No.13.— P. 8756–8764.
- 43. Hall, A. Ras-Related GTPases and the Cytoskeleton [Text] / A. Hall // Molecular Biology of the Cell. —1992. —Vol.3.— P. 475-479.
- 44. McCaig, C. On the Mechanism of Nerve Galvanotropism [Text]/ C. McCaig // Journal of Neuroscience. —1989. —Vol.93.— P. 723-730.
- 45. McCaig, C. Studies on the mechanism of embryonic frog nerve orientation in a small applied electric field [Text]/ C. McCaig // Biological Bulletin. —1989. —Vol.176.— P. 136-139.
- 46. Pan, L. Strict perpendicular orientation of neural crest-derived neurons in vitro is dependent on an extracellular gradient of voltage [Text] / L. Pan, R. Borgens // Journal of Neuroscience Research. —2012. —Vol. 90, No. 7. P. 1335-1346.
- 47. Hinkle, L., C. D. McCaig, and K. R. Robinson. 1981. The direction of growth of differentiating neurones and myoblasts from frog embryos in an applied electric field [Text] / L. Hinkle, C. McCaig, and K. Robinson // The Journal of Physiology.— 1981. Vol. 314, No.1— 121-135.
- 48. Chen, T. Effects of Membrane Potential on Calcium Fluxes of Pelvetia Eggs [Text] / T.Chen, L. Jaffe // Planta. —1978. —Vol. 140. P. 63-67.
- 49. Brawley, S. Cytochalasin Treatment Disrupts the Endogenous Currents Associated with Cell Polarization in Fucoid Zygotes: Studies of the Role of F-Actin in Embryogenesis [Text] / S. Brawley, K. Robinson // The journal of cell biology. —1985. —Vol. 100.—P. 1173-1184.
- 50. Song, B. A physiological electric field directs nerve growth, cell migration and cell division in vivo [Text] / B. Song // Molecular BioSystems. —2001. —Vol. 12.— P. 233.
- 51. McCaig, C. Wound-induced electric fields modulate nerve sprouting cell division and healing [Text] / C. McCaig // Social Neuroscience. —2001. —Vol. 27.— P. 795.
- 52. Shi, R. Embryonic neuroepithelium sodium transport, the resulting physiological potential, and cranial development [Text] / R .Shi, R. Borgens // Developmental Biology. —1994. —Vol. 165. —No. 1.— P. 105-116.
- 53. Hotary, K. Evidence for a role for endogenous electrical fields in chick embryo development [Text] / K. Hotary, K. Robinson// Development. —1992. —Vol. 114. —No. 4.— P. 985–996.

- 54. Hotary, K. Endogenous electrical currents and voltage gradients in Xenopus embryos and the consequences of their disruption [Text] / K. Hotary, K. Robinson// Developmental Biology. —1992. —Vol. 166. —No. 2.— P.789–800.
- 55. Shi, R. Three-dimensional gradients of voltage during development of the nervous system as invisible coordinates for the establishment of embryonic pattern [Text] / R. Shi, R. Borgens // Developmental Dynamics. —1995. Vol. 202. —No. 2.— P. 101-114.
- 56. Borgens, R. Uncoupling histogenesis from morphogenesis in the vertebrate embryo by collapse of the transneural tube potential [Text] / R. Borgens, R. Shi // Developmental Dynamics. —1995. —Vol. 203. —No. 4.— P. 456–467.
- 57. Metcalf, M. Weak applied voltages interfere with amphibian morphogenesis and pattern [Text] / M. Metcalf, R. Borgens // Journal of Experimental Zoology. —1995. —Vol. 268. —No. 4.— P. 322–338.
- 58. Robinson, K. The responses of cells to electrical fields: A review [Text] / K. Robinson // Journal of Cell Biology. —1985. —Vol. 101. —No. 6.— P. 2023-2027.
- 59. Robinson, K. Electric embryos: the embryonic epithelium as a generator of developmental information. In Nerve Growth and Nerve Guidance [Text] / K. Robinson, M. Messerli // Portland Press. —1996.— P. 131–150.
- 60. Candia, O. Short-circuit current related to active transport of chloride in frog cornea: effects of furosemide and ethacrynic acid [Text] / O. Candia // BBA Biomembranes. —1973. —Vol. 298. —No. 4.— P. 1011–1014.
- 61. Klyce, S. Transport of Na, Cl, and water by the rabbit corneal epithelium at resting potential [Text] / S. Klyce // The American journal of physiology. 1975. —Vol. 228. —No. 5.— P. 1446-1452.
- 62. Borgens, R. Behavioral recovery induced by applied electric fields after spinal cord hemisection in guinea pig [Text] / R. Borgens, A. Blight, M. McGinnis // Science. —1987. —Vol. 238. —No. 4825.—P. 366-369.
- 63. Borgens, R. Functional recovery after spinal cord hemisection in guinea pigs: The effects of applied electric fields [Text] / R. Borgens, A. Blight, M. McGinnis // Journal of Comparative Neurology. —1990. —Vol. 296. —No. 4.—P. 634-653.
- 64. Borgens, R. Effects of applied electric fields on clinical cases of complete paraplegia in dogs [Text] / R. Borgens, J. Toombs, A. Blight, M. McGinnis, M. Bauer, W. Widmer, J. Cook // Restorative Neurology and Neuroscience. 1993. —Vol. 5. —No. 5-6.—P. 305-322.

- 65. Borgens, R. An Imposed Oscillating Electrical Field Improves the Recovery of Function in Neurologically Complete Paraplegic Dogs [Text] / R. Borgens, J. Toombs, G. Breur, W. Widmer, D. Waters, A. Harbath, P. March, L. Adams // Journal of Neurotrauma. —1999. —Vol. 16. —No. 7.— P. 639-657.
- 66. Gurtner, G. Wound repair and regeneration [Text] G. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, M. Longaker // Nature. —2008. —Vol. 453. —No. 7193.—P. 314-321.
- 67. Ojingwa, J. Electrical stimulation of wound healing [Text] / J. Ojingwa, R. Isseroff // The Journal of investigative dermatology. —2003. —Vol. 121. —No. 1.—P. 1-12.
- 68. Levin, M. Large-scale biophysics: ion flows and regeneration [Text] / M. Levin // Trends in Cell Biology. —2007. —Vol. 17. —No. 6.— P. 261-270.
- 69. Stewart, S. Bioelectricity and epimorphic regeneration [Text] / S. Stewart, A. Rojas-Muñoz, J. Belmonte // BioEssays. —2007. —Vol. 29. —No. 11.—P. 1133-1137.
- 70. Kloth, L. Electrical Stimulation for Wound Healing: A Review of Evidence From In Vitro Studies, Animal Experiments, and Clinical Trials [Text] / L. Kloth // The International Journal of Lower Extremity Wounds. —2005. —Vol. 4. —No. 1.— P. 23-44.
- 71. Nuccitelli, R. A Role for Endogenous Electric Fields in Wound Healing [Text] / R. Nuccitelli // Current Topics in Developmental Biology. —2003. —Vol. 58.— P. 1-26.
- 72. McCaig, C. Controlling cell behavior electrically: current views and future potential [Text] / C. McCaig, A. Rajnicek, B. Song, M. Zhao // Physiological reviews. —2005. —Vol. 85. —No. 3.—P. 943-978.
- 73. Zhao, M. Electrical signals control wound healing through phosphatidylinositol-3-OH kinase-gamma and PTEN [Text] / M. Zhao, B. Song, J. Pu, T. Wada, B. Reid, G. Tai, F. Wang, A. Guo, P. Walczysko, Y. Gu, T. Sasaki, A. Suzuki, J. Forrester, H. Bourne, P. Devreotes, C. McCaig, J. Penninger // Nature. —2006. —Vol. 442. —No. 7101.—P. 457-460.
- 74. Zhao, M. Electrical fields in wound healing-An overriding signal that directs cell migration [Text] / M. Zhao // Seminars in Cell and Developmental Biology. —2009. —Vol. 20. —No. 6.— P. 674-682.
- 75. Wang, E. Regulation of tissue repair and regeneration by electric fields [Text] / E. Wang, M. Zhao // Chinese Journal of Traumatology. —2010. Vol. 13. —No. 1.—P. 55-61.

- 76. Sneyd, J. Mechanisms of calcium oscillations and waves: a quantitative analysis [Text] / J. Sneyd, J. Keyzer, M. Sanderson // Faseb Journal. —1995. —Vol. 9. —No. 5.— P. 1463-1472.
- 77. Зинченко, В.П. Внутриклеточная сигнализация / Зинченко В.П., Долгачева В.П. Пущино: Изд-во Аналитическая микроскопия, 2003. (80)
- 78. Березин, И.В. Биокинетика / Березин И.В., Варфоломеев С.Д. Москва: Изд-во Наука, 1979.
- 79.Fall, C. Voltage Gated Ionic Currents [Text] / C. Fall, J. Keizer //
  Computational Cell Biology. Interdisciplinary Applied Mathematics.—2002.
  —Vol. 20. P. 21-52.
- 80. Sherman, A. Whole-Cell Models [Text] / A. Sherman, Y-X. Li, J. Keizer // Computational Cell Biology. Interdisciplinary Applied Mathematics.—2002. —Vol. 20. P. 101-139.
- 81. Ventura, A. A Model-Independent Algorithm to Derive Ca2+ Fluxes Underlying Local Cytosolic Ca2+ Transients [Text] / A. Ventura, L. Bruno, A. Demuro, I. Parker, S. Dawson// Biophysical Journal.—2005. —Vol. 88. P. 2403-2421.