

УДК 314.63

ОЦЕНКА КРИТИЧЕСКОЙ ДЛИНЫ РАСТУЩЕЙ ГИФЫ NEUROSPORA CRASSA

© 2003 г. В. В. Смолянинов, Т. В. Потапова*

Институт машиноведения РАН, Научно-исслед. институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Воробьевы горы;
электронная почта: potapova@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 9.01.2002 г.

В отличие от мембраны нервного или мышечного волокна, мембрана растущей верхушки гифы *Neurospora crassa* не эквипотенциальна. Для теоретического моделирования неоднородного распределения источников тока в растущей гифе *N. crassa* мы предприняли попытку изучить наиболее простую модель источника тока, в которой форма профиля тока представляется смещенной функцией Хевисайда. Эта функция постоянного скачка имеет только один подгоночный параметр – величину смещения постоянной плотности тока относительно верхушки гифы.

Задача о распределении источников тока в растущей гифе решается нами стандартным математическим методом – как граничная задача для конечного отрезка волокна с закрытыми (непроводящими) границами. Чтобы подготовить решение этой задачи для любых профилей плотности тока, требуется, как известно, сначала определить функцию источника (“функцию Грина”), т.е. распределение потенциала, формируемое микроэлектродным источником тока, который является экспериментальным аналогом теоретической δ -функции Дирака. Когда функция источника известна, тогда можно выбирать произвольные формы профиля распределения плотности тока и определять создаваемые этим током распределения поля потенциала методом вычисления интегральной свертки. В этой работе мы ограничились рассмотрением случая, когда в апикальной зоне роста источники тока отсутствуют, а в более дистальных областях имеют постоянную плотность. Именно в этом варианте мы получаем простой критерий оценки критической длины апикального сегмента, на котором плотность источника тока равна нулю. Результат моделирования хорошо согласуется с экспериментальными данными.

История электрофизиологических исследований мицелиального плесневого гриба *Neurospora crassa* началась с пионерской работы К. Слеймана [1], в которой было установлено наличие электрогенного протонного насоса в клеточной мембране, а также электрической связи через септальные поры между клетками, обеспечивающей древовидной структуре мицелия *N. crassa* электрическую непрерывность, т.е. электрическую и диффузионную синцитиальность. Последующие микроэлектродные исследования гиф *N. crassa* позволили получить дополнительные данные об электрофизиологических свойствах наружной мембраны и межклеточных контактов этого организма [2–4]. Например, мы обнаружили, что при экспериментальном нарушении электрической связи на участках гиф, удаленных от растущих верхушек, электрически изолированные клетки сохраняют высокие значения мембранного потенциала (МП) [2]. При таком же нарушении электрической связи вблизи растущих верхушек мы наблюдали асимметричную реакцию: старые молодые верхушечные клетки при электрической изоляции от более взрослой части гифы резко снижали величину МП [3, 4]. Для объяснения этого феномена асимметрии ответа была успешно привлечена концепция энергетической коопера-

ции между клетками, осуществляемой за счет неоднородного распределения электрогенных протонных насосов в электрически связанных клетках (см. [3, 4]). Различные варианты кооперативных взаимодействий между клетками с помощью электрической связи известны для многих микроорганизмов, растений и животных, а также для зародышей и культивируемых тканей [5].

В экспериментах с микрохирургическим отделением апикальных фрагментов гифы *N. crassa* мы впервые обнаружили существование критической (“пороговой”) длины фрагмента $L^* \approx 0.2\text{--}0.3$ мм: фрагменты с длиной $l > L^*$, сохраняют способность автономного роста, а фрагменты с длиной $l \leq L^*$, – не растут [6].

Феномен пространственного порога роста верхушек гиф тоже можно объяснить в рамках концепции энергетической кооперации взрослых и растущих клеток и даже получить количественные оценки необходимого распределения токовых источников, используя кабельные модели растущего гифального волокна [7]. Это объяснение базируется на экспериментальном факте неоднородного распределения МП вдоль растущей верхушки гифы: МП выше в дистальных (не растущих) обла-

стях мицелия (≈ -180 мВ) и ниже в апикальных (растущих) концах гиф (≈ -130 мВ) [3, 4]. Для количественного описания электрической гетерогенности верхушки гифы ранее была предложена и изучена электрофизиологическая модель распределенного протонного источника мембранного тока, в которой выбрана гладкая “сигмоидно-экспоненциальная” форма профиля продольного распределения плотности тока, содержащая два подгоночных параметра [7].

Настоящая работа является продолжением теоретической работы [7]. Здесь мы предположили, что для обеспечения непрерывной монотонности изменения МП вдоль растущей верхушки гифы выбор гладко возрастающей формы плотности протонного тока (основного генератора МП) не является обязательным. С одной стороны, имеющиеся экспериментальные данные о характере распределения МП гифы допускают большой выбор форм профилей плотности тока. С другой стороны, полезно изучить наиболее простую модель распределения источника тока. Например, простейшую форму профиля плотности тока можно представлять смещенной функцией Хевисайда. Эта функция постоянного скачка имеет только один подгоночный параметр – величину смещения постоянной плотности тока относительно верхушки гифы. В данной работе показано, что такой упрощенный подход к моделированию неоднородного распределения источников тока в растущей верхушке гифы *N. crassa* согласуется с экспериментальными данными.

ИСТОЧНИКИ ПОТЕНЦИАЛА И ТОКА

Задача о распределении источников тока в гифальной верхушке решается нами как граничная задача для конечного отрезка волокна. Чтобы получить решение общей задачи для любых профилей плотности тока, требуется сначала определить функцию источника (“функцию Грина”), т.е. распределение потенциала, формируемое микроэлектродным источником тока, который является экспериментальным аналогом δ -функции Дирака. Когда функция источника известна, тогда можно выбирать произвольные формы профиля распределения плотности тока и определять распределение поля потенциала методом вычисления интегральной свертки.

Простейший вариант распределения протонного тока, создаваемого электрогенными насосами клеточных мембран *N. crassa*, моделируется, как отмечалось выше, смещенной функцией Хевисайда, которая определяется следующим образом: в апикальной зоне роста источники тока отсутствуют, а в более дистальных областях имеют постоянную плотность. Хевисайдовский вариант распределения источников тока дает нам простой критерий оценки критической длины апикального сегмента,

т.е. такой длины, на которой плотность источника тока равна нулю.

Пусть x – расстояние вдоль гифы от апикальной верхушки, где $x = 0$, в дистальном направлении. Тогда, согласно имеющимся экспериментальным данным (см. [3, 4]), общая характеристика профиля МП $U(x)$ фактически сводится к двум граничным величинам:

$$U(0) \equiv U_0 \approx -130 \text{ мВ}, \quad U(x \gg \lambda) \equiv U_\infty - 180 \text{ мВ}, \quad (1a)$$

где λ – характеристическая длина волокна, $\lambda \approx 0.4-0.5$ мм. При этом известно [1, 2], что суммарные величины МП (1a) содержат пассивные компоненты, $E \approx -50$ мВ, которые можно вычистить из суммарного МП: $U(x) - E \equiv u(x)$. Поэтому, переходя к описанию МП с помощью переменной $u \equiv U - E$, мы исключаем из рассмотрения пассивную компоненту E , создаваемую источником ЭДС, и учитываем только активную компоненту, формируемую протонным источником тока, $J(x)$. Для компоненты $u(x)$ условия (1a) имеют следующий вид:

$$u(0) \equiv u_0 \approx -80 \text{ мВ}, \quad (1b)$$

$$u(x \gg \lambda) \equiv u_\infty \approx -130 \text{ мВ} \Rightarrow K \equiv u_\infty / u_0 \approx 1.625.$$

Существование пассивной компоненты МП демонстрируют эксперименты по электрической изоляции верхушечных фрагментов гиф. Когда длина фрагмента l не превосходит пороговую длину L^* (см. выше), т.е. $l \leq L^*$, тогда МП фрагмента $U \approx -50 \text{ мВ} \approx E$. Из этого следует простая гипотеза.

Гипотеза пороговой длины гифы. Апикальный сегмент гифы пороговой длины L^ не содержит мембранных источников протонного тока.*

Стационарное распределение в однородном волокне продольного тока I и мембранного потенциала U описывается математически так называемыми кабельными уравнениями, т.е. системой обыкновенных дифференциальных уравнений первого порядка [8]:

$$dU/dx = -r_c I, \quad dI/dx = -(U - E)/r_m + J,$$

где r_c и r_m – удельные сопротивления цитоплазмы и мембраны; E и J – мембранные источники ЭДС и тока. Удельные сопротивления r_c и r_m связаны с характеристическими величинами длины λ и сопротивления ρ (или проводимости $\sigma \equiv 1/\rho$) следующим образом: $r_c \equiv \rho/\lambda$, $r_m \equiv \rho\lambda$.

Соглашение о масштабах. Характеристическая длина λ является единицей длины, а характеристическое сопротивление ρ – единицей сопротивления.

Если не менять обозначения длин l и координат x , то принятие соглашения о масштабах следует понимать как формальные замены: $l/\lambda \rightarrow l$, $x/\lambda \rightarrow x$. Для других переменных используем сле-

дующие явные замены: $u \equiv U - E, i \equiv \rho I, j \equiv \lambda \rho J$. После таких явных и неявных замен кабельные уравнения приобретают каноническую форму:

$$du/dx = -i, \quad di/dx = -u + j. \quad (2a)$$

Используя векторный вариант записи, получаем уравнение:

$$dq/dx = -\mathbf{I}q + \mathbf{j} \Leftrightarrow q \equiv \begin{pmatrix} u \\ i \end{pmatrix}, \quad \mathbf{j} \equiv \begin{pmatrix} 0 \\ j \end{pmatrix}, \quad \mathbf{I} \equiv \begin{pmatrix} 0 & 1 \\ 1 & 0 \end{pmatrix}. \quad (2б)$$

Для строчной записи векторов-столбцов используется форма: $q \equiv (u, i)'$, $j \equiv (0, j)'$, где штрих означает операцию транспонирования. Отметим попутно, что условие: $\Gamma = \mathbf{I} -$ критерий симметричности постоянной матрицы коэффициентов \mathbf{I} .

Используя далее масштабированные уравнения (2), окончательную подгонку модельного распределения $u(x)$ будем делать по относительному критерию K , см. (1б), но сначала получим необходимые формулы.

ФУНКЦИЯ ИСТОЧНИКА ОТРЕЗКА ВОЛОКНА

Уточним граничную задачу. Рассматриваемый нами объект f – отрезок волокна суммарной длины $l = l_1 + l_2$. Граничные сечения отрезка f определяются векторами q_0 и q_2 , а также нагрузочными проводимостями $y_0 \equiv i_0/u_0$ и $y_2 \equiv i_2/u_2$ (рис. 1):

$$q_0 \equiv (u_0, i_0)' \equiv u_0(1, y_0)'; \quad q_2 \equiv (u_2, i_2)' \equiv u_2(1, y_2)'.$$

Будем далее отрезок f при необходимости обозначать полным символом $f(l|y_0, y_2)$.

Теперь рассмотрим решение однородного векторного уравнения (2б). Для пассивного волокна, когда токовый источник отсутствует, скаляр $j = 0$, вектор $\mathbf{j} = \mathbf{o} \equiv (0, 0)'$, общее решение записывается в виде экспоненты от матрицы коэффициентов:

$$q(x) = \mathbf{A}(-x)q_0 \Leftrightarrow \mathbf{A}(x) \equiv e^{x\mathbf{I}} \equiv \text{ch}(x)\mathbf{E} + \text{sh}(x)\mathbf{I}, \quad (3)$$

здесь $\mathbf{E} \equiv \text{diag}(1, 1)$ – матричная единица; \mathbf{A} – матрица передачи, которая связывает вектор q_0 на-

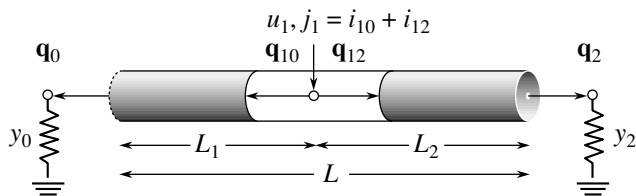


Рис. 1. Электрическая схема отрезка гифы длины L . Показаны направления входных и выходных продольных токов двух сегментов, имеющих длины L_1 и L_2 . Здесь j_1 – входной ток внешнего источника, создающий входной потенциал u_1 и входные токи сегментов i_{10} и i_{12} . Относительно других символов см. текст.

чального сечения $x = 0$ с вектором q произвольного сечения x . Из экспоненциальной формы записи матрицы передачи видно, что:

$$\mathbf{A}(-x) \equiv e^{-x\mathbf{I}} \equiv \text{ch}(x)\mathbf{E} + \text{sh}(x)\mathbf{I}, \equiv \mathbf{A}^{-1}(x),$$

т.е. смена знака аргумента эквивалентна обращению матрицы передачи.

Если какие-либо дополнительные источники отсутствуют, то $q_0 = \mathbf{o}$ и тогда возможно единственное решение – нулевое, $q(x) \equiv \mathbf{o}$. Пусть, однако, в сечении $x = l_1$ находится микроэлектрод, создающий единичный входной ток (см. рис. 1):

$$j_1 = 1 \equiv i_{10} + i_{12} = (y_{10} + y_{12})u_1 \equiv y_{\text{вх}}u_1, \quad (4)$$

тогда во входном сечении возникает потенциал u_1 , а также продольные токи i_{10} и i_{12} , которые являются входными токами левого и правого сегментов волокна, а входы сегментов имеют входные проводимости $y_{10} \equiv i_{10}/u_1$ и $y_{12} \equiv i_{12}/u_1$, поэтому $y_{\text{вх}} \equiv y_{10} + y_{12}$ – суммарная входная проводимость волокна в сечении электрода, $y_{\text{вх}} \equiv j_1/u_1$.

Если входные сечения правого и левого сегментов отрезка f определяются векторами: $q_{10} \equiv (u_1, i_{10})'$, $q_{12} \equiv (u_1, i_{12})'$, то общее решение (3) определяет связи входных и выходных потенциалов и токов:

$$q_{10} = \mathbf{A}(l_1)q_0, \quad q_{12} = \mathbf{A}(l_2)q_2. \quad (5)$$

Отсюда находим общую формулу входной проводимости отрезка $f(l_1 + l_2|y_0, y_2)$:

$$y_{\text{вх}} \equiv f(l_1; y_0) + f(l_2; y_2) \Leftrightarrow f(l; y) \equiv (y + \text{th}l)/(1 + y\text{th}l). \quad (6)$$

Выделим частные варианты этой формулы, используемые ниже:

1) $y = 1 \Rightarrow f(l; 1) = 1$ – случай характеристической нагрузки, которая является входной проводимостью полубесконечного волокна; модель $f(l|y_0, 1)$ эквивалентна полубесконечному волокну в дистальном направлении, тогда $y_{\text{вх}} \equiv f(l_1; y_0) + 1$; модель $f(l|1, 1)$ эквивалентна бесконечному волокну, $y_{\text{вх}} \equiv 2$;

2) $y = 0 \Rightarrow f(l; 0) = \text{th}l$ – случай изолирующей (непроводящей) нагрузки; модель $f(l|y_0, 0)$ эквивалентна полузакрытому отрезку волокна с непроводящим дистальным торцом, $y_{\text{вх}} \equiv f(l_1; y_0) + \text{th}l_2$; модель $f(l|0, 0)$ эквивалентна закрытому отрезку волокна с обоими непроводящими торцами, $y_{\text{вх}} \equiv \text{th}l_1 + \text{th}l_2$.

Чтобы определить функцию источника (функцию Грина) отрезка $f(l|y_0, y_2)$, необходимо описать распределение потенциала $u(x)$ как в правом, так и в левом сегменте при фиксированном положении токового источника в сечении $x = l_1$, когда $0 \leq l_1 \leq l$.

Рассмотрим левый сегмент: $x \in [0; l_1]$ (рис. 2a).

Привлекая общее решение (3), имеем уравнение:

$$q(x) = \mathbf{A}(x)q_0 \quad (7a)$$

Эта формула отличается от формулы (3) знаком аргумента матрицы передачи, так как источник тока теперь находится справа от сечения x и продольный ток направлен к апикальной части, тогда как в первичном описании (3) подразумевалось обратное направление продольного тока. Учитывая первую формулу (5), имеем два уравнения:

$$u(x)/u_0 = \operatorname{ch}x + y_0 \operatorname{sh}x;$$

$$u_1/u_0 = \operatorname{ch}l_1 + y_0 \operatorname{sh}l_1;$$

из которых, учитывая (4) и исключая u_0 , находим:

$$u(x) = (\operatorname{ch}x + y_0 \operatorname{sh}x)u_1 / (\operatorname{ch}l_1 + y_0 \operatorname{sh}l_1) \leftarrow x \in [0; l_1]; \quad (8a)$$

здесь для единичного тока $j_1 = 1$ имеем $u_1 = r_{\text{вх}} \equiv 1/y_{\text{вх}}$ – входное сопротивление.

Рассмотрим теперь правый сегмент: $x \in [l_1; l \equiv l_1 + l_2]$ (рис. 2б). Вместо (7а) имеем:

$$\mathbf{q}(x) = \mathbf{A}(l-x)\mathbf{q}_2, \quad (7b)$$

и еще вторую формулу (5), которые совместно дают:

$$u(x)/u_2 = \operatorname{ch}(l-x) + y_2 \operatorname{sh}(l-x);$$

$$u_1/u_2 = \operatorname{ch}l_1 + y_2 \operatorname{sh}l_2$$

Исключая u_2 , получаем:

$$u(x) = (\operatorname{ch}(l-x) + y_2 \operatorname{sh}(l-x))u_1 / (\operatorname{ch}l_1 + y_2 \operatorname{sh}l_2) \leftarrow x \in [l_1; l]. \quad (8б)$$

Пара выражений (8а) и (8б) совместно определяет искомую функцию источника.

РАСПРЕДЕЛЕННЫЙ ИСТОЧНИК ТОКА

После рассмотрения общих моделей обратимся к конкретным граничным условиям, характерным для интактного гифального волокна и верхушечного фрагмента гифы.

Верхушка гифы соответствует, как это следует из разных предварительных оценок, закрытому торцу, поэтому в предыдущих формулах следует полагать $y_0 = 0$. Дистальный конец фрагмента гифы после отсечения изолируется от наружной среды, т.е. и здесь $y_2 = 0$. Следовательно, верхушечный фрагмент представляется моделью $\mathbf{f}(l|0, 0)$.

Напротив, для интактной гифы дистальная область вполне удовлетворительно представляется полубесконечным волокном, следовательно, конечная часть интактной гифы соответствует модели $\mathbf{f}(l|0, 1)$.

Полагая в общих формулах (8а) и (8б) граничные условия: $y_0 = y_2 = 0$, после простых преобразований для фрагмента гифы, т.е. для модели $\mathbf{f}(l|0, 0)$, получим:

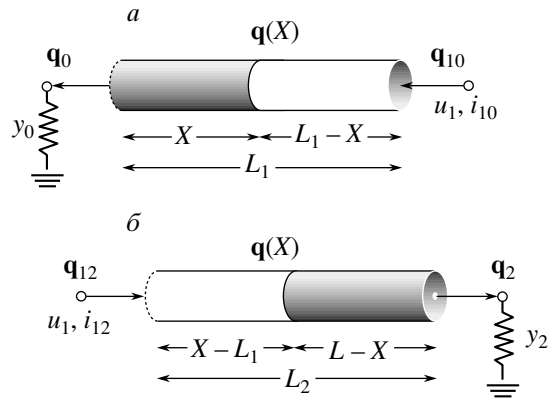


Рис. 2. Расчетные схемы левого (а) и правого (б) сегментов отрезка гифы (см. рис. 1), используемые для описания распределения потенциала.

$$u(x) = \operatorname{ch}x \operatorname{ch}(l-l_1) / \operatorname{sh}l \equiv g_1(x, l_1) \leftarrow x \in [0; l_1]; \quad (9a)$$

$$u(x) = \operatorname{ch}(l-x) \operatorname{ch}l_1 / \operatorname{sh}l \equiv g_2(x, l_1) \leftarrow x \in [l_1; l]. \quad (9б)$$

Фиксируя в этих формулах длину апикального сегмента l_1 , совершим предельный переход $l_2 \rightarrow \infty$. Для модели $\mathbf{f}(l|0, 1)$ с полубесконечным вторым сегментом получим:

$$u(x) = \exp(-l_1) \operatorname{ch}x \equiv g_{1\infty}(x, l_1) \leftarrow x \in [0; l_1]; \quad (10a)$$

$$u(x) = \operatorname{ch}l_1 \exp(-x) \equiv g_{2\infty}(x, l_1) \leftarrow x \in [l_1; l]. \quad (10б)$$

Иллюстрации свойств функций (9) и (10) даны на рис. 3а. На этом рисунке апикальный сегмент имеет одну фиксированную длину $l_1 = 0.5$, а дистальный сегмент – четыре длины $l_2 \in \{0.5; 0.8; 1.5; \infty\}$. Пассивный дистальный сегмент оказывает только шунтирующее влияние на входное сопротивление “точечного” (микроэлектродного) источника тока. Поэтому, как видно из приведенных графиков, чем длиннее дистальный сегмент, тем меньше величина создаваемого поля потенциала.

Рассмотрим теперь распределенный источник тока $j(x)$ кабельных уравнений (2).

Решения (9) и (10), полученные для микроэлектродного источника тока в сечении $x = l_1$, соответствуют теоретической схеме, в которой источник представляется обобщенной δ -функцией Дирака, т.е. в нашем случае, когда $j(x) = \delta(x - l_1)$. Решения дифференциальных уравнений, получаемые для δ -источников, принято называть фундаментальными (“функциями Грина”), так как на их основе получаются (методом интегрирования) решения для произвольных распределенных источников $j(x)$. Простейшая стандартная форма распределения плотности источника – равномерная, определяемая на конечном или на полубесконечном интервале координат. Функция “единичного скачка” $j(x) = \delta(x - l_1)$, называемая обычно функцией Хевисайда, равна 0 при $x < l_1$ и равна 1 при $x \geq l_1$.

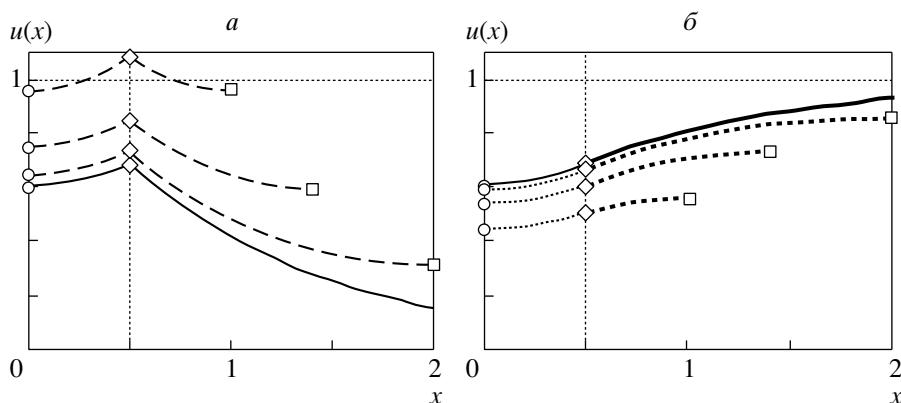


Рис. 3. Поля потенциала $u(x)$, формируемые микроэлектродным источником тока (а) и распределенными источниками тока (б). В этих примерах апикальный сегмент имеет фиксированную длину $L_1 = \lambda/2$, а дистальный сегмент представлен четырьмя вариантами длин: $L_2 = \lambda/2, \lambda, 3\lambda/2, \infty$. Обозначения в тексте.

Итак, пусть распределение протонного тока в гифе, создаваемого электрогенными насосами клеточных мембран, имеет вид $j(x) = \varepsilon(x - a)$, где $a = l_1$ – длина апикального сегмента, на котором $j(x) = 0$, а при $x \geq a$ и до $x = l$ плотность тока постоянна и равна единице, $j(x) = 1$. Выделим точку χ заданного распределенного источника $j(\chi)$, $\chi \in [a; l]$. Потенциал в фиксированной точке x , создаваемый малым участком источника $j(\chi)d\chi$, описывается функцией $g_1(x, \chi)$, когда $\chi > x$, и к нему прибавляется потенциал $g_2(x, \chi)$, когда $\chi < x$. Так как функции $g_1(x, \chi)$ и $g_2(x, \chi)$ различны, интегральный потенциал в точке x формируется интегрированием влияния по двум интервалам распределения источника – до сечения x и после этого сечения:

$$u(x) = \int_a^x g_2(x; \chi) d\chi + \int_x^l g_1(x, \chi) d\chi = \\ = \text{ch}(l-x)(\text{sh}x - \text{sh}a)/\text{sh}l + \text{ch}x \text{sh}(l-x)/\text{sh}l.$$

После упрощения вычисленных первообразных функций и подстановки $a = l_1$ получаем следующее распределение потенциала в активной зоне источника тока:

$$u(x) = 1 - \text{ch}(l-x)\text{sh}l_1/\text{sh}l \Leftarrow x \in [l_1; l \equiv l_1 + l_2], \quad (11)$$

из которого находим граничные потенциалы активной зоны:

$$\begin{aligned} u_1 \equiv u(l_1) &= \text{ch}l_1 \text{sh}l_2/\text{sh}l, \\ u_2 \equiv u(l) &= 1 - \text{sh}l_1/\text{sh}l. \end{aligned} \quad (11б)$$

Для описания распределения потенциала в пассивной апикальной зоне, воспользуемся упрощенной формулой (8а), при $y_0 = 0$, подставляя в нее величину u_1 из (11б):

$$u(x) = \text{ch}x u_1/\text{ch}l_1 = \text{ch}x \text{sh}l_2/\text{sh}l \Leftarrow x \in [0; l_1]. \quad (11в)$$

Отсюда находим еще один граничный потенциал апикальной верхушки гифы:

$$u_0 \equiv u(0) = \text{sh}l_2/\text{sh}l. \quad (11г)$$

На этом теоретическое описание поля потенциала $u(x)$, формируемое распределенным источником тока $j(x) = \varepsilon(x - l_1)$ в модели фрагмента гифы $f(l|0, 0)$, завершается.

Остается получить аналогичное описание для модели $f(l|0, 1)$, представляющей полубесконечное гифальное дерево. Это можно сделать двумя способами, дающими одинаковый результат: 1) проинтегрировать функции источника (10), полагая дистальную границу интегрирования $l = \infty$; 2) совершить в полученных формулах (11) предельный переход $l_2 \rightarrow \infty$. Не останавливаясь на вычислительных деталях, выпишем результирующие формулы в том же порядке, как и формулы (11а–г):

$$u(x) = 1 - \text{sh}l_1 \exp(-x) \Leftarrow x \in [l_1; \infty); \quad (12а)$$

$$u_1 \equiv u(l_1) = \text{ch}l_1 \exp(-l_1), \quad u_\infty \equiv u(\infty) = 1; \quad (12б)$$

$$u(x) = \text{ch}x \exp(-l_1) \Leftarrow x \in [0; l_1]. \quad (12в)$$

$$u_0 \equiv u(0) = \exp(-l_1). \quad (12г)$$

На рис. 3б построены графики функций (11) и (12). Здесь, как и на рис. 3а, для апикального сегмента выбрана постоянная длина $l_1 = 0.5$, а дистальный сегмент представлен четырьмя вариантами длины $l_2 \in \{0.5; 0.8; 1.5; \infty\}$. Поле потенциала, формируемое распределенным источником тока дистального сегмента, принципиально отличается от поля микроэлектродного источника. При этом, как видно из приведенных графиков, чем длиннее активный дистальный сегмент, тем выше потенциал и пассивного, и активного сегментов.

Относительный экспериментальный критерий (16) определяет отношение граничных мембранных потенциалов интактного гифального волокна.

Экспериментальные данные и модельные оценки геометрических и электрических параметров гиф *Neurospora crassa*

№ п/п	X_1 , мм	X_2 , мм	U_1 , мВ	U_2 , мВ	U_1^* , мВ	L^* , мм	λ , мм	L_1 , мм	E , мВ	A	U_∞ , мВ	U_0 , мВ	γ^*
1	0.13	0.36	110	125	50	0.20	0.36	0.18	50	93	143	106	0.556
2	0.06	0.45	130	145	100	0.20	0.46	0.23	82	78	160	129	0.334
3	0.10	0.50	120	150	55	0.30	0.48	0.24	25	154	179	118	0.5

Примечание. Содержащиеся в таблице геометрические и электрические параметры $\{X_1, X_2, U_1, U_2, U_1^*, L^*\}$ для каждого из трех объектов относятся к интактной гифе и к верхушечному фрагменту той же гифы. Эти данные соответствуют следующей схеме электрофизиологического эксперимента (см. [9]). Сначала электродами Э1 и Э2, имеющими координаты X_1 и X_2 , измерялись мембранные потенциалы U_1 и U_2 интактного гифального волокна. После этих измерений примерно в средней между электродами точке производилось локальное механическое повреждение одной клетки с целью электрической изоляции апикального фрагмента длины $L^* > X_1$. После этого тем же электродом Э1 дополнительно измерялся потенциал U_1^* в той же точке $X_1 < L^*$.

Учитывая формулы (12б) и (12г), мы можем этот критерий теперь представить следующим образом:

$$K \equiv u_\infty/u_0 \approx 1.625 = \exp(l_1) \Rightarrow l_1 = \ln(K) = 0.4855, \quad (13)$$

т.е. как критерий оценки длины пассивной апикальной зоны. Вспоминая о принятом выше правиле масштабирования длин и расстояний, мы можем дать метрическую интерпретацию оценки (13):

$$L_1 \equiv l_1 \lambda = \gamma \lambda \Leftarrow \gamma = 0.4855 \approx 0.5, \quad (14)$$

где γ – коэффициент “апикальной пассивности”.

Итак, длина пассивной апикальной зоны гифального волокна равна примерно половине характеристической длины: если (см. [9]) $\lambda = 0.4\text{--}0.5$ мм, то $L_1 = 0.2\text{--}0.25$ мм.

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученная оценка (14) длины пассивного сегмента является, строго говоря, обобщенной, поскольку основана на обобщенных исходных данных (1) для интактного гифального волокна. Для практических приложений существенно, в какой мере оценка (14), т.е. величина $\gamma \approx 0.5$, согласуется с конкретными экспериментальными данными.

Для ответа на этот вопрос рассмотрим конкретные данные (таблица), приведенные в работе [4] и дополненные оценками характеристической длины λ , которые для тех же трех объектов получены в работе [9].

Для интактного волокна гифы в таблице приведены данные о координатах и потенциалах в двух точках: $\{X_1, X_2, U_1, U_2\}$. Этих данных вполне достаточно, чтобы построить теоретическую кривую мембранного потенциала $U(X)$, проходящую через две экспериментальные точки $U_1(X_1)$ и $U_2(X_2)$. Действительно, выразим связь измеряемой величины потенциала $U(X)$ с теоретической (нормированной, см. выше) величиной потенциала $u(x) \equiv u(X/\lambda)$ следующим естественным образом:

$$U \equiv Au + E \Rightarrow U_1 \equiv Au_1 + E, \quad U_2 \equiv Au_2 + E; \quad (15)$$

где A – амплитудный (“масштабный”) коэффициент, E – эквипотенциальная компонента МП или величина постоянных мембранных источников ЭДС (см. выше).

З а м е ч а н и е о с и м в о л а х. Прописные буквы X и L обозначают размерные координаты и длины, а строчные x и l – безразмерные: $x \equiv X/\lambda$, $l \equiv L/\lambda$.

Система двух линейных уравнений (15) имеет две неизвестные величины $\{A, E\}$, две известные из эксперимента величины потенциала $\{U_1, U_2\}$, а знание двух координат – при дополнительном знании параметров λ и γ , необходимо для вычисления двух модельных потенциалов $u_k \equiv u(x_k/\lambda, \gamma)$, $k = 1, 2$.

Пусть далее $\gamma = 0.5$. Тогда, согласно (14), длина пассивного сегмента интактной гифы $L_1 \equiv \lambda/2$. Для всех трех объектов $X_1 < L_1$ и $X_2 > L_1$ (см. таблицу), т.е. один электрод (одновременно токовый и измерительный [9]) находится в пассивном сегменте, а второй электрод (измерительный) – в активном сегменте. Поэтому, согласно (12), модельные потенциалы u_1, u_2 определяются следующими формулами:

$$u_1 = \text{ch}x_1 \exp(-l_1), \quad u_2 = 1 - \text{sh}l_1 \exp(-x_2). \quad (16a)$$

Сначала вычислим последние потенциалы и затем решим систему (15):

$$E = (u_2 U_1 - u_1 U_2)/(u_2 - u_1), \quad A = (U_1 - E)/u_1. \quad (16б)$$

Расчетные величина ЭДС E и амплитуды A даны в таблице. Используя формулы (12б) и (12г), а также уравнения (15), определим еще граничные потенциалы (см. таблицу) – потенциал апикальной верхушки U_0 и асимптотический дистальный потенциал U_∞ :

$$U_0 \equiv E + Ae^- \gamma, \quad U_\infty \equiv E + A. \quad (16в)$$

Аппроксимационные кривые $U(X)$ поля потенциала интактной гифы для трех эксперименталь-

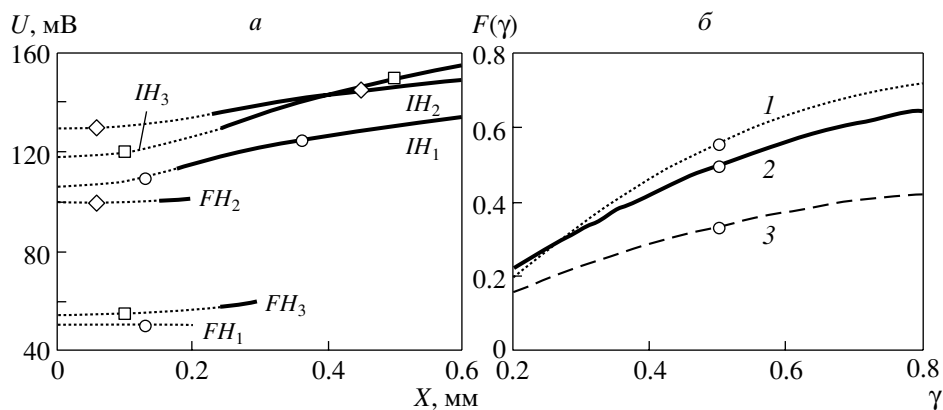


Рис. 4. Реконструкции распределений потенциалов $U(X)$ в интактных гифах и изолированных фрагментах (а), а также калибровочные кривые $\gamma^* = F(\gamma)$, определяющие связь длин пассивных сегментов гифы и фрагмента (б). Обозначения в тексте

ных объектов из таблицы показаны на рис. 4а. На каждой из кривых $U(X)$, которые снабжены идентификаторами IH_{1-3} , выделены три точки: представляющие, во-первых, микроэлектродные измерения $U_1(X_1)$ и $U_2(X_2)$ – эти точки снабжены маркерными вертикальными стрелками, во-вторых – границу пассивного сегмента, которая находится между электродными точками.

Итак, для интактной гифы теоретическая оценка (14) длины пассивного сегмента согласуется с конкретными экспериментальными данными и позволяет для каждого случая реконструировать распределение потенциала $U(X)$ вдоль волокна.

Если бы мы располагали только данными $\{X_1, X_2, U_1, U_2\}$ для интактной гифы, то на этом мы могли бы завершить наше обсуждение соответствия теории и эксперимента. Однако, располагая дополнительными данными $\{X_1^* = X_1, U_1^*, L^*\}$ о потенциале U_1^* фрагмента в точке x_1^* и о его длине L^* , мы можем попытаться определить длину пассивного сегмента фрагмента $L_1^* \equiv \gamma^* \lambda$, считая, как это и делалось в работе [9], характеристическую длину λ одинаковой для интактной гифы и ее фрагмента. Кроме того, для предварительного сравнительного анализа мы можем принять гипотезу сохранения величины ЭДС и амплитудного коэффициента:

$$E^* = E, \quad A^* = A. \quad (17)$$

Гипотеза неизменности (17) свойств источников ЭДС и протонного тока позволяет нам ограничиться вопросом сравнительной оценки длины пассивного сегмента фрагмента. Иначе говоря, нам теперь требуется оценить: справедлива ли гипотеза $\gamma^* = \gamma$, т.е. сохраняют ли электрически изолированные верхушечные фрагменты гифы длину пассивного сегмента интактной гифы?

Из полученных оценок следует, что фрагменты гифы не всегда удовлетворяют гипотезе $\gamma^* = \gamma$. Действительно, для трех объектов, представленных в таблице, мы имеем следующие предварительные заключения.

1. Длина фрагмента 1-го объекта $L^* = 0.2$ мм немного больше длины $L_1 = 0.18$ мм пассивного сегмента интактной гифы. Поэтому, принимая гипотезу $\gamma^* = \gamma$, мы должны ожидать, что величина U_1^* будет немного больше величины E . Полученное совпадение этих потенциалов $U_1^* = E = 50$ мВ можно объяснить тем, что длина фрагмента здесь совпадает с длиной его пассивного сегмента, $L^* = L_1^* > L_1$, значит здесь $\gamma^* > \gamma$.

2. Напротив, длина фрагмента 2-го объекта $L^* = 0.2$ мм меньше длины $L_1 = 0.23$ мм пассивного сегмента интактной гифы. Поэтому здесь, следуя гипотезе $\gamma^* = \gamma$, мы должны ожидать, что величина U_1^* будет равна величине E . Но для этого объекта (см. таблицу) характерно превышение регистрируемого потенциала $U_1^* = 100$ мВ величины $E = 82$ мВ. Чтобы объяснить неравенство $U_1^* > E$, нужно считать $L_1^* < L_1$, т.е. что длина пассивного сегмента интактной гифы уменьшается при формировании фрагмента.

3. Наконец, длина фрагмента 3-го объекта $L^* = 0.3$ мм больше длины $L_1 = 0.24$ мм пассивного сегмента интактной гифы и потенциал $U_1^* = 55$ мВ больше $E = 25$ мВ. Поэтому для этого объекта гипотеза $\gamma^* = \gamma$ вполне справедлива.

Можно ли оценку длины пассивного сегмента фрагмента или величины γ^* получить аналитическими средствами?

Дополним систему (15) третьим уравнением, учитывая гипотезу (17):

$$\begin{aligned} U_1 &\equiv Au_1 + E, & U_2 &\equiv Au_2 + E, \\ U_1^* &\equiv Au_1^* + E; \end{aligned} \quad (18)$$

где модельный потенциал u_1^* , для интересующих нас случаев $L^* \leq L_1^* \equiv \gamma^* \lambda$, определим по формуле (11с):

$$u_1^* \equiv u(x_1) = \text{ch } x_1 \text{sh}(l^* - \gamma^*) / \text{sh } l^*. \quad (19)$$

Исключая теперь из тройки уравнений (18) одинаковые константы A и E , получим одно уравнение

$$(U_2 - U_1^*)u_1 - (U_1 - U_1^*)u_2 = (U_2 - U_1)u_1^*, \quad (20)$$

которое будем рассматривать как неявную функцию, связывающую величины γ^* и γ . Чтобы определить функциональную связь $\gamma^* = F(\gamma)$ явным образом, перепишем уравнение (20), учитывая определение (19) и (16а):

$$\begin{aligned} \text{sh}(l^* - \gamma^*) &= G(\gamma) \equiv (a_2 u_1 - a_1 u_2) / b \Rightarrow \gamma^* = \\ &= F(\gamma) \equiv l^* - \text{arsh}(G(\gamma)), \end{aligned} \quad (21a)$$

где $a_1 \equiv (U_1 - U_1^*) / (U_2 - U_1)$, $a_2 \equiv (U_2 - U_1^*) / (U_2 - U_1)$, $b \equiv \text{sh } l^* / \text{ch } x_1$ – константы, а переменными величинами, зависящими от переменной γ , являются, согласно определениям (16а), модельные потенциалы u_1 и u_2 :

$$u_1 = \text{ch}(x_1) \exp(-\gamma), \quad u_2 = 1 - \exp(-x_2) \text{sh}(\gamma). \quad (21б)$$

Графики функциональных зависимостей $\gamma^* = F(\gamma)$ для трех объектов из таблицы даны на рис. 4б, на которых выделены точки, представляющие искомые оценки коэффициента пассивности фрагменты γ^* для одинакового коэффициента пассивности интактной гифы $\gamma = 0, 5$, т.е. определяемые как $\gamma^* = F(0.5)$. Эти оценки (см. таблицу) соответствуют предыдущим предварительным прогнозам (1–3): для 1-го объекта $\gamma^* > \gamma$, для 2-го объекта $\gamma^* < \gamma$, но для 3-го объекта справедлива гипотеза $\gamma^* = \gamma$.

Получив оценки длины пассивной части фрагмента, мы можем завершить реконструкцию поля потенциала каждого из трех фрагментов (см. рис. 4а), которая удовлетворяет гипотезе неизмен-

ности (17) свойств источников ЭДС и протонного тока при механическом отделении верхушечных фрагментов от интактной гифы.

В заключение следует отметить, что гипотеза (17) заслуживает специального исследования с привлечением дополнительных экспериментальных данных. Описанная выше методика модельной реконструкции неоднородного распределения потенциала вдоль грибной гифы допускает проверку разных модификаций выделенных гипотез.

Таким образом, в данной работе использование простой модели распределенного токового источника хевисайдского типа позволило разработать новую эффективную методику полной реконструкции поля потенциала как интактной гифы, так и ее фрагментов.

Работа была поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 99-04а-49115).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Slayman C. L. // J. Gen Physiol. 1965. V. 49. P.93–116.
2. Чайлахян Л.М., Потапова Т.В., Левина Н.Н., Белозерская Т.А., Крицкий М.С. // Биол. мембраны. 1984. Т. 1. С. 44–55.
3. Potapova T.V., Aslanidi K.B., Belozerskaya T.A., Levina N.N. // FEBS Lett. 1988. V. 241. P.173–176.
4. Потапова Т.В., Бойцова Л.Ю. // Биол. мембраны. 1997. Т. 14. С. 661–670.
5. Беркинблит М.Б., Божкова В.П., Бойцова Л.Ю., Миттельман Л.А., Потапова Т.В., Чайлахян Л.М., Шаровская Ю.Ю. // Высокопроницаемые контактные мембраны. М.: Наука, 1981. 466 с.
6. Асланиди К.Б., Бойцова Л.Ю., Потапова Т.В., Смолянинов // Биол. мембраны. 1996. Т. 13. С. 27–37.
7. Асланиди К.Б., Асланиди О.В., Вачадзе Д.М., Морнев О.А., Потапова Т.В., Чайлахян Л.М., Штеманетян Е.Г. // Биофизика. 1997. Т. 42. Вып. 4. С. 941–951.
8. Смолянинов В.В. Математические модели биологических тканей. М.: Наука, 1980. 368 с.
9. Смолянинов В.В., Потапова Т.В. // Биол. мембраны 2003. Т. 20. № 2. С. 142–149.

Estimation of the Critical Length of the Growing *Neurospora crassa* hyphae**V. V. Smolianinov, T. V. Potapova****Institute for Engine Study, Russian Academy of Sciences, Moscow;***Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119899 Moscow, Russia**E-mail: potapova@genebee.msu.su*

Unlike plasma membrane of the nerve or muscle fiber, the plasma membrane of growing tip of *Neurospora crassa* hyphae is not equipotential. To describe theoretically heterogeneous distribution of the current sources on growing *N. crassa* hyphae, we have attempted to study the simplest model of the current source where the form of current profile can be described by the shifted Heaviside function. This step-shift function has only one adjustable parameter, namely, the constant current density about hyphal tip.

Here we solve the problem of the current source distribution along growing hyphae using a standard mathematical method, namely, as the boundary problem for the limited fiber segment with the closed (nonconducting) boundaries.

First, we determine the source function ("Green function"), i.e. the distribution of potential formed by micro-electrode current source, which can be considered as experimental analogue of Dirac δ -function. When the function of source is defined it is possible to select free forms of the current density distribution and use the method of integral reduction calculation for estimation of the potential distribution created by this current. In this work we consider the case when the current sources are absent at the apical growing part and present at a constant density at more distal parts. For this case we obtain the simple criterion for estimation of the critical length of the apical segment possessing zero density of current sources. The results obtained on the model agree well with experimental data.