



НЕПАРАМЕТРИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КОЛЛЕКТИВНЫХ СОСТОЯНИЙ СИСТЕМЫ ИОННЫХ КАНАЛОВ

П.С. Иванов, А.А. Бутылин

Рассмотрена проблема выявления устойчивых состояний проводимости ансамбля грамицидиновых ионных каналов, встроенных в бислойную липидную мембрану, и показана необходимость использования несостоятельных оценок плотности распределения при наличии в системе двухуровневой иерархии случайных процессов с близкими характерными временами. Предложен и обоснован непараметрический подход к анализу гистограмм флуктуаций проводимости мембраны. Разложение гистограмм по ортогональному базису функций и применение метода главных компонент позволило исследовать блуждания образа системы в признаковом пространстве и оценить времена устойчивости ее состояний, равные 1-2, 5 и 9 с. Высказана гипотеза о возможном механизме взаимодействия грамицидиновых димеров в мембране, связанном с локальной деформацией бислоя вблизи открытого канала. Обсуждаются перспективы применения использованных статистических процедур при исследовании кооперативных процессов в других биологических системах.

При анализе коллективных эффектов в биологии наибольший интерес представляют системы, в которых функционирование элементарных структурных единиц носит случайный характер, а кооперативность является следствием их взаимодействия. Если, в свою очередь, образование «кластеров» из отдельных единиц тоже подчиняется вероятностным законам, то кооперативность в их поведении приводит к появлению в изучаемой системе иерархии (по крайней мере, двухуровневой) случайных процессов.

При отсутствии периодических процессов в системе применение спектральных методов анализа к временным рядам флуктуаций ее измеряемой характеристики становится неэффективным, а для выявления устойчивых состояний вместо самих временных рядов можно использовать гистограммы, построенные по их фрагментам. На практике встречаются ситуации, когда характерные времена существования коллективных состояний несильно (например, не больше чем на порядок) превосходят времена, описывающие функционирование отдельных единиц. В этом случае для одновременного изучения процессов, относящихся к близким временным диапазонам, длительность накопления одной гистограммы необходимо выбрать не превосходящей наименьшего из характерных времен системы. Описанная ситуация является типичной для функционирования ион-транспортующих систем [1]. В качестве экспериментальной модели катион-селективных клеточных ионных пор в данной работе выбраны грамицидиновые каналы, встроенные в бислойную липидную мембрану (БЛМ).

В группе каналоформеров полипептидной и небелковой природы грамицидиновый канал является наиболее детально изученной системой с известной молекулярной структурой и основными физико-химическими характеристиками [2,3]. Большая часть данных о строении и функционировании этих каналов была получена в экспериментах на одиночных порах. В то же время работы, относящиеся к особенностям функционирования ансамбля каналоформеров, сравнительно редки, поскольку долгое время (под влиянием классического исследования Хладки и Хэйдона [4]) считалось, что работа отдельных грамицидиновых каналов в БЛМ подчиняется принципу вероятностной независимости.

Вопрос о существовании коллективных эффектов в ансамбле каналов стал серьезно обсуждаться в 80-е годы, когда при исследовании липидных дисперсных смесей, содержащих молекулы грамицидина, было обнаружено существование агрегатов из молекул антибиотика [5]. Правильные двумерные периодические структуры из грамицидиновых гексамеров наблюдались и в экспериментах с замораживанием/скальванием везикул со встроенными каналами [6]. Возможность кластеризации молекул грамицидина в плоской БЛМ рассмотрена в работе [7], авторы которой на основании результатов релаксационных экспериментов высказали гипотезу о существовании грамицидиновых тетрамеров и олигомеров более высокого порядка. Очевидно, что непосредственные свидетельства в пользу кооперативного функционирования грамицидиновых пор могут быть получены при анализе флуктуаций проводимости ансамбля каналов в БЛМ.

Очевидно, что едва ли не единственным свидетельством в пользу коллективного поведения ансамбля каналов является наличие множества выделенных уровней проводимости системы, которое сохраняется неизменным на определенных временах (среднее значение проводимости при фиксированном числе ионных пор остается постоянным практически на всем протяжении эксперимента). Для обнаружения подобного «спектра» уровней при построении экспериментальных оценок плотности распределения проводимости (гистограмм) приходится производить довольно мелкое разбиение диапазона возможных её значений на отдельные интервалы, а существование по крайней мере двух слабо различающихся характерных времен функционирования системы (априорное предположение, основанное на известной молекулярной картине работы грамицидинового канала) заставляет ограничиться малыми периодами накопления. В результате получаемые гистограммы будут являться несостоятельными оценками плотности распределения [8]. Вследствие этого при их анализе параметрические методы, предполагающие заданность семейства распределений исследуемой случайной величины или построенной для нее статистики, приходится оставить в стороне и обратиться к непараметрическим статистическим процедурам.

Воспроизводимость форм гистограмм величин проводимости БЛМ на ограниченных временных интервалах можно трактовать как нахождение этой системы в определенном состоянии. Несмотря на феноменологический характер такого определения, анализ устойчивости и эволюции форм несостоятельных оценок плотности распределения позволяет оценить характерные времена нахождения системы в различных состояниях, а на их основе - высказать определенные гипотезы о механизмах, обеспечивающих кооперативное поведение её функциональных элементов.

Материалы и методы

Бислойные мембраны формировали по методу Мюллера и др. [9] из растворенного в *n*-гептане и *n*-декане азолектина (SIGMA) на отверстии диаметром 0.5 мм в тефлоновой кювете. В качестве электролита использовался 0.1 М KCl (х.ч.). Каналы в БЛМ формировали путем естественного встраивания молекул грамицидина А, В и С (Boehringer Mannheim). Опыты проводили при

комнатной температуре. В связи с необходимостью установления равновесия между процессами встраивания и десорбции грамицидиновых молекул регистрацию флуктуаций ионного тока через мембрану при поданном постоянном напряжении начинали не раньше, чем через 35-40 минут после добавления грамицидина.

Флуктуации мембранной проводимости исследовали при наложении на мембрану постоянного напряжения в диапазоне 10-100 мВ от гальванического элемента. В качестве предусилителя использовали операционный усилитель постоянного тока Keithley-427 (максимальный коэффициент усиления 10^{11} В/А). Верхняя частота среза фильтра в разных опытах составляла 30 или 100 Гц. Для подавления 50 - герцевых наводок применяли заградительный активный фильтр на 40 дБ.

Для регистрации флуктуаций проводимости БЛМ со встроенными грамицидиновыми каналами установка была сопряжена с персональным компьютером IBM PC286 через АЦП Ф7077/2 (собственное время преобразования 3 мкс). Для повышения разрешающей способности регистрирующей аппаратуры осуществляли сдвиг стационарного среднего значения напряжения, снимаемого с усилителя, до нулевой величины и последующее усиление сигнала до максимального использования входного диапазона АЦП. Перед началом количественного анализа временных рядов в случае необходимости проводили дополнительную фильтрацию при помощи цифрового синусного фильтра низких частот Баттеруорта.

Построение гистограмм по временным рядам флуктуаций проводимости и их непараметрический анализ проводился на компьютере IBM PC386 с использованием программного обеспечения, разработанного одним из авторов совместно с Н.Г. Ирошниковым.

Статистический анализ состояний ансамбля грамицидиновых каналов

Основным математическим объектом для количественного анализа являлись несостоятельные гистограммы амплитуд флуктуаций проводимости БЛМ со встроенными грамицидиновыми каналами. Каждая гистограмма формировалась по 100 или 200 последовательным точкам временного ряда, что соответствовало суммарному времени ее накопления 0.5-1.0 с в зависимости от частоты оцифровки. Для выявления характерных времен системы использовались гистограммы, построенные как по соседним, так и по перекрывающимся частям временного ряда, а также по частям, разделенным некоторым промежутком времени.

Формально компоненты гистограммной оценки плотности вероятности $\hat{p}(x)$ могут быть записаны в виде

$$p_l^{\wedge}(x) = \frac{1}{nV_l} \sum_{i=1}^n v_l(x_i), \quad l = 1, \dots, m, \quad (1)$$

где $x = (x_1, \dots, x_n)$ - выборка объема n , $v_l(x_i) = 1$ при $x_i \in I_l$ и $v_l(x_i) = 0$ в противном случае; m - число интервалов группирования данных; I_l - l -й интервал группирования; V_l - длина этого интервала.

Оценка $\hat{p}(x)$ теряет свойство состоятельности, как только количество интервалов m группирования выбирается того же порядка, что и объем выборки, в противоположность традиционным рекомендациям типа [10]

$$0.7n^{0.4} \leq m \leq 1.25n^{0.4}. \quad (2)$$

В этом случае форма выборочного распределения имеет мало общего с предполагаемой гладкой кривой функции плотности (как правило,

одномодалной), а характеризуется появлением некоторого числа хорошо разрешенных максимумов и минимумов. При построении гистограмм по экспериментальным данным число интервалов группирования находилось в диапазоне 25-50. Конкретное значение выбиралось ближайшим к программно заданной величине, так чтобы ширина разряда оставалась кратной разрешающей способности АЦП по амплитуде.

Для исследования вопроса о наличии устойчивых состояний ансамбля каналов и оценки средних времен нахождения системы в этих состояниях каждой гистограмме был поставлен в соответствие вектор (точка) в пространстве признаков небольшой размерности. В результате эволюцию во времени формы распределения анализировали по движению изображающей точки в признаковом пространстве. Главным критерием при построении пространства признаков является сохранение максимума информации об особенностях формы гистограмм.

Достаточно информативным методом параметризации оценки плотности является ее разложение по некоторому базису функций, в качестве которого может выступать система ортогональных полиномов. В данном случае для анализа состояний ансамбля каналов использовалось разложение по системе тригонометрических функций, что на вероятностном языке соответствует выборочному оцениванию характеристической функции случайной величины

$$Y_k = \Delta x \sum_{l=0}^{m-1} y_l \exp(-j \frac{2\pi}{m} lk), \quad (3)$$

где y_l - ординаты гистограммы, m - их число, Δx - шаг по оси абсцисс, k изменяется от 0 до $[m/2]$, $j^2 = -1$. Вектор признаков формировался из нескольких первых коэффициентов Фурье Y_k , получаемое признаковое пространство имело размерность от 6 до 9 в разных случаях.

Случайные блуждания образа гистограммы в признаковом пространстве исследовали при помощи координаты вдоль траектории $s(t)$ в евклидовой метрике. Число измерений и процедуры построения и параметризации были одинаковыми для всей совокупности анализировавшихся гистограмм. Производная натуральной координаты по времени

$$s(t) = [s(t+\tau) - s(t)]/\tau = \left[\sum_{k=1}^q (Y_k(t+\tau) - Y_k(t))^2 \right]^{1/2}/\tau \quad (4)$$

(где q - размерность признакового пространства, τ - сдвиг между двумя соседними частями ряда, по которым строятся гистограммы, t - время начала записи таких частей, то есть текущее время в эксперименте) позволяет судить о скорости случайных блужданий изображающей точки.

Типичная зависимость $s(t)$ представлена на рис. 1, а. Хаотический вид функции $s(t)$ для гистограмм, построенных по соседним участкам временного ряда, заставил обратиться к «зависимым» гистограммам, порождаемым частично перекрывающимися выборками. Степень зависимости определялась отношением τ/T , где T - время дискретизации случайного сигнала. Как видно из рис. 1, переход к «зависимым» гистограммам позволяет исследовать случайные блуждания в признаковом пространстве с большим временным разрешением и обнаружить периоды устойчивости формы распределений на временах, больших времени накопления одной гистограммы.

Количественное оценивание времен устойчивости проводилось по автокорреляционной функции $C_{ss}(\tau)$ для производной $s(t)$. Типичные зависимости для $C_{ss}(\tau)$ вместе с 5%-ной доверительной полосой показаны на рис. 2, иллюстрирующем достоверное отличие значений автокорреляционной функции от нуля. В результате оценивания $C_{ss}(t)$ для нескольких временных рядов при разных частотах оцифровки входного сигнала (2 - 200 Гц) были получены три времени, характеризующих протекание процессов в исследуемой системе: 1-2, 5 и 9 с.

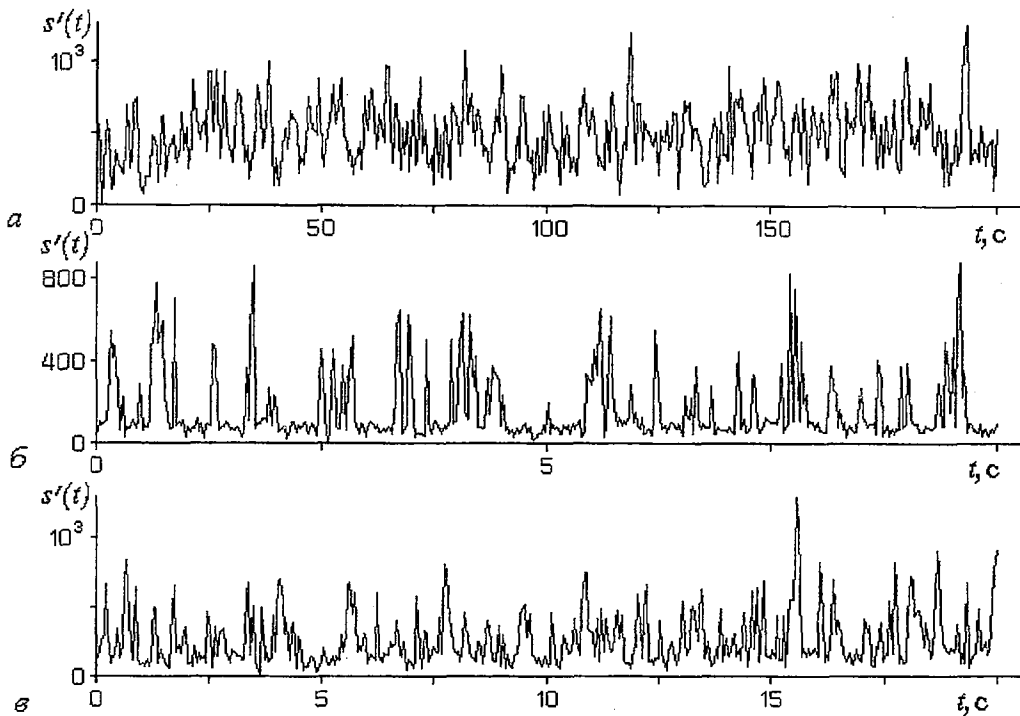


Рис. 1. Изменения производной от натуральной координаты во времени при $\tau = NT$ (а), $\tau = 5T$ (б) и $\tau = 10T$ (в). В каждой гистограмме $N = 100$ измерений. Размерность признакового пространства равна 8. Частота оцифровки $1/T = 200$ Гц

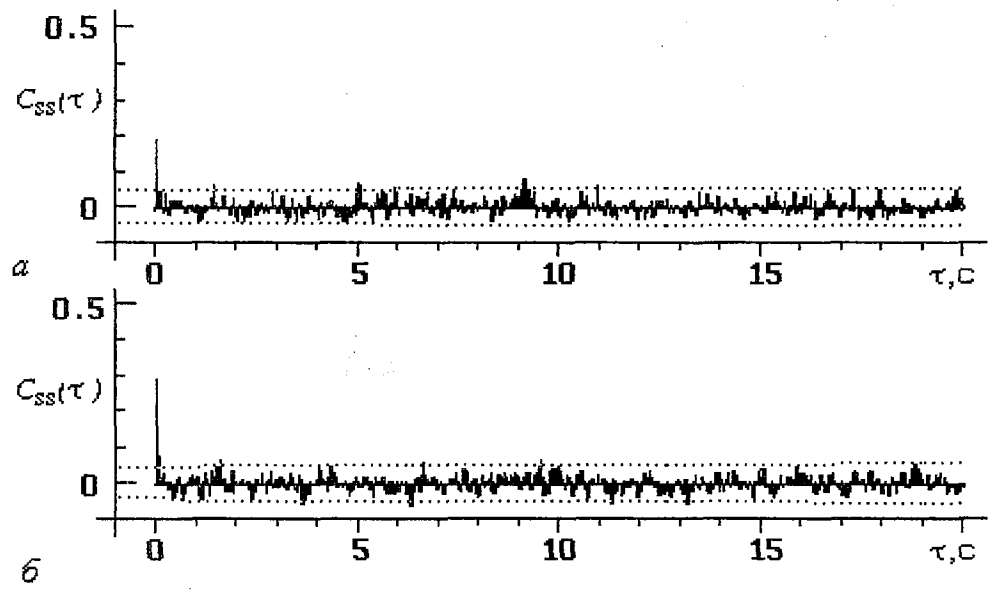


Рис. 2. Примеры автокорреляционных функций для производной от натуральной координаты и зависимых гистограмм: а - частота оцифровки 20 Гц; б - частота оцифровки 200 Гц, частота среза фильтра 30 Гц. Потенциал на мембране - 50 мВ, среднее число одновременно открытых каналов - 65. В гистограммах по 100 измерений, для формирования признакового пространства использованы коэффициенты разложения Фурье от 1-го до 8-го. Приведенные фрагменты получены на разных временных рядах. Показана 5%-ая доверительная полоса для ненулевых значений автокорреляционной функции

Использование величины $s(t)$ не позволяет определить истинный характер блужданий образа гистограммы в признаковом пространстве. Временные интервалы, соответствующие малым значениям производной $s(t)$ и достоверно выявленные при $\tau < NT$, могут отвечать либо «дрожаниям» около некоторого центра (тогда всплески на графиках $s(t)$ должны означать смену локальной области устойчивости), либо медленному движению (эволюции) вдоль некоторого направления (локальные области устойчивости при этом могут вообще отсутствовать).

Для внесения большей определенности в картину блужданий была проведена визуализация траекторий системы в признаковом пространстве методом главных компонент [11]. Алгоритм главных компонент сводится к такому линейному ортогональному преобразованию координат признакового пространства, что в новых координатах рассеяние данных вдоль k -ой оси оказывается больше рассеяния вдоль $(k+1)$ -ой. В случае, когда первые три главные компоненты объясняют значительную долю дисперсии исходных данных, ограничение анализа соответствующим трехмерным подпространством не приведет к заметной потере информации. Для анализа устойчивости и эволюционирования типов несостоятельных распределений использование трех главных компонент было вполне достаточным: доля объясненной дисперсии обычно превосходила 70%.

На рис. 3 представлена типичная траектория изображающей точки в подпространстве трех главных компонент (z_1, z_2, z_3) для массива из 140 «зависимых» гистограмм. Отчетливо проявляются пространственные структуры, соответствующие разным типам формы распределения (обведены сплошными линиями). Анализ траектории показывает, что указанные области отвечают устойчивым состояниям системы: вместо беспорядочных скачков между областями наблюдается продолжительная локализация в каждой из них. При этом на основе проведенного анализа можно утверждать, что с большой вероятностью и во все промежуточные моменты времени траектория находится в пределах данной локальной области. Медленные блуждания системы в признаковом пространстве наблюдаются и в области центрального скопления, а единичные скачкообразные перемещения соответствуют переходам между устойчивыми состояниями. Кроме того, в подпространстве главных компонент отчетливо видны возвращения системы в данное состояние. На рис. 4 показаны типичные представители гистограмм, попавших в разные области признакового

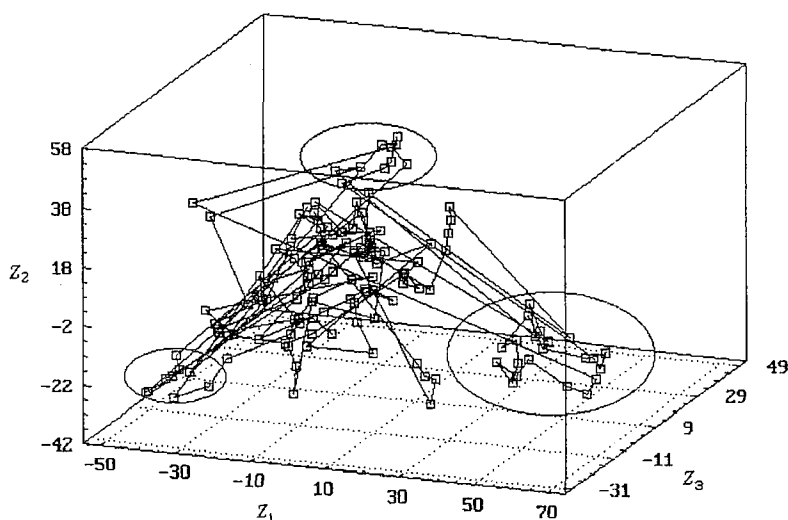


Рис. 3. Траектория для 140 зависимых гистограмм в подпространстве первых трех главных компонент. Параметры гистограмм - как на рис. 2, б. Сплошными линиями обведены локальные области, отвечающие устойчивым состояниям ансамбля каналов

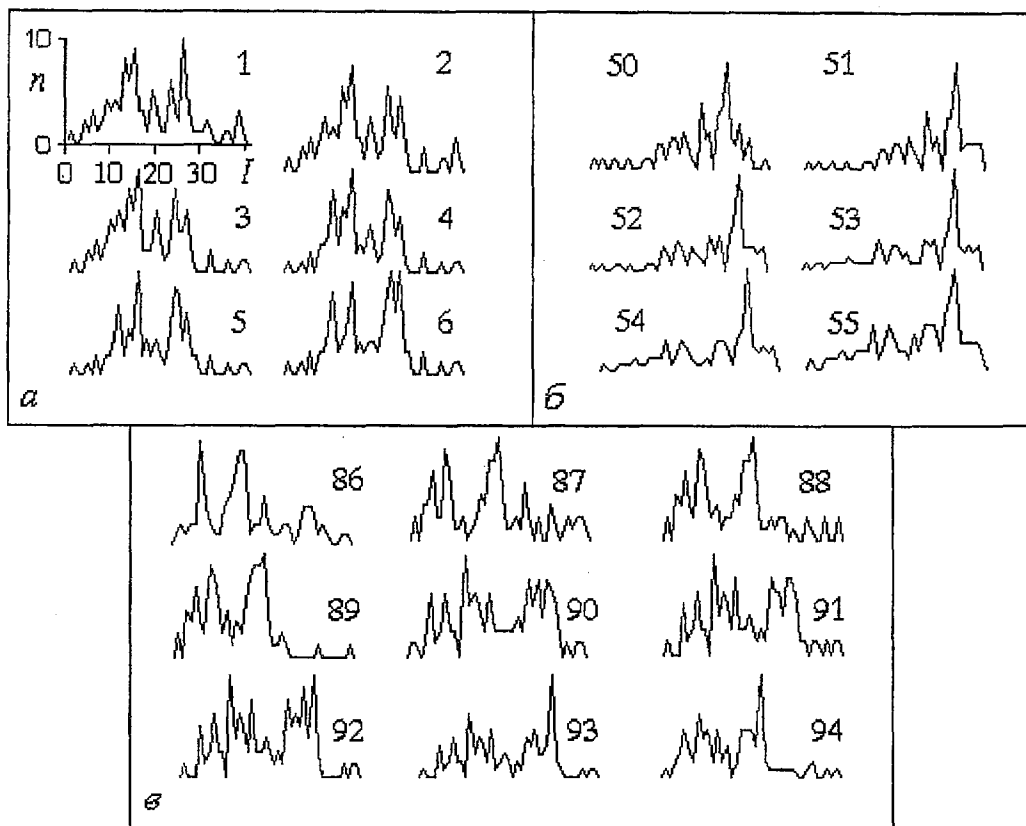


Рис. 4. Типичные представители разных типов формы для совокупности зависимых гистограмм, соответствующих блужданиям системы в подпространстве главных компонент (рис. 3). Фрагменты а-в отвечают трем пространственным областям устойчивости. Номера гистограмм соответствуют разным положениям изображающей точки на траектории. Один разряд гистограммы равен 0.78 пА. Экспериментальные параметры - как на рис. 2,б

пространства. Визуализация данных в подпространстве главных компонент позволила непосредственно оценить времена жизни устойчивых состояний по продолжительности пребывания образа гистограммы в локальных областях признакового пространства. Полученные таким методом значения оказались близки к величинам, найденным по автокорреляционной функции $C_{ss}(t)$, причем меньшие времена (1-2 и 4-5 с) наблюдались чаще.

Обсуждение

Обнаружение времен устойчивости состояний ансамбля грамицидиновых каналов, достоверно превосходящих среднее время жизни одиночной поры в проводящем состоянии, можно рассматривать как указание на наличие кооперативности в их функционировании. Конкретный механизм синхронизации процессов открывания/закрывания грамицидиновых каналов в бислое на сегодняшний день неизвестен. Авторами [6] предложена модель взаимодействия аминокислотных остатков, расположенных на углах треугольной (в поперечном сечении) молекулы грамицидина. В таком случае грамицидиновый кластер оптимального размера может состоять из шести отдельных проводящих единиц.

Наличие нескольких времен жизни устойчивых состояний ансамбля каналов позволяет предположить существование кластеров с разным числом грамицидиновых димеров. При этом модель, исходящая из наличия ван-дер-ваальсового взаимодействия между отдельными молекулами каналоформера, не является единственно возможной.

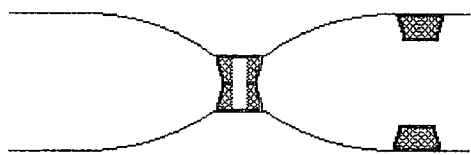


Рис. 5. Деформация бислоя вблизи грамицидинового канала в проводящем состоянии

локальному уменьшению толщины мембраны вблизи соседней поры. В результате переход в проводящее состояние одного из каналов может повлиять на открывание соседних (одной или нескольких) близко расположенных пор, причем степень такого влияния должна зависеть от расстояния между ними. Взаимная стабилизация двух или большего числа грамицидиновых димеров в открытом состоянии приведет к увеличению соответствующего среднего времени жизни. Логично предположить также, что закрывание одного из открытых каналов будет стимулировать закрывание соседних. Обнаруженные времена устойчивости состояний ансамбля каналов 5 и 9 с, их слабое изменение при варьировании некоторых экспериментальных условий и применяемых статистических методов в рамках описанной модели можно рассматривать как указание на существование в БЛМ «кластеров» грамицидиновых каналов с разным числом образующих их элементарных проводящих единиц.

Многомерные методы, примененные к анализу флуктуаций проводимости ансамбля грамицидиновых каналов, могут быть использованы при исследованиях коллективных процессов в других биологических системах. Одно из очевидных приложений - анализ подсостояний проводимости клеточных ионных каналов. Возникающие здесь проблемы связаны с надежной идентификацией разных подуровней при большом их числе и недостаточно высоком отношении сигнал/шум, а также с количественным описанием изменений числа и характеристик отдельных подуровней, происходящих при инактивации или деградации канала, действии блокаторов и т.д. [12].

Непараметрические методы анализа можно рассматривать в качестве альтернативы уже применяемым процедурам идентификации подуровней проводимости, в которых используются описание подуровней в виде откликов системы на внешний импульс [13], назначение порогов для дисперсии тока в каждом подсостоянии [14] или зависимость дисперсии от среднего значения для фрагментов ряда, вырезаемых скользящим окном [15]. Существующие алгоритмы обладают непостоянной точностью или применимы только к слабо зашумленным данным. Между тем даже при высоком (но неизменном) уровне шума максимумы на гистограмме величин проводимости, отвечающие разным подуровням, будут воспроизводиться на одних и тех же местах, а «пики», обусловленные шумом, - появляться и пропадать. Проецирование гистограмм в подпространство главных компонент позволяет выделить достаточно многочисленный класс распределений, по форме которых можно статистически надежно оценить значения проводимости в промежуточных подсостояниях. Подобная процедура требует сложных вычислений, но зато лишена многих ограничений, свойственных другим методам. Непараметрический подход позволяет также исследовать эволюцию подсостояний при изменяющихся внешних условиях.

Авторы выражают искреннюю признательность В.А. Твердислову и Л.В. Яковенко за плодотворные обсуждения настоящей работы.

Библиографический список

1. Иванов П.С., Бутылин А.А. Ионные каналы как модель кооперативной биологической системы // Доклады Межд. научно-технической конф. «Актуальные проблемы фундаментальных наук». 7-10 июня 1991 г. М.: Изд. МГТУ, 1991. Т. 3. С. 23.

2. Ермишкин Л.Н., Зильберштейн А.Я. Ионные каналы, образуемые антибиотиками. Структура и свойства // Биофизика мембран. М.: ВИНТИ, 1982. Т. 2. С. 82.
3. Andersen O.S. Gramicidin channels // Ann. Rev. Physiol. 1984. Vol. 46. P. 531.
4. Hladky S.B., Haydon D.A. Ion transfer across lipid membranes in the presence of gramicidin A. 1. Studies of the unit conductance channel // Biochim. Biophys. Acta. 1972. Vol. 274. P. 294.
5. Cavatorta P., Spisni A., Casali E., Lindner L., Masotti L., Urry D.W. Inter-molecular interactions of gramicidin A' transmembrane channels incorporated into lysophosphatidylcholine lipid systems// Biochem. Biophys. Acta. 1982. Vol. 689. P. 113.
6. Spisni A., Pasquali-Ronchetti I., Casali E., Lindner L., Cavatorta P., Masotti L., Urry D.W. Supramolecular organization of lysophosphatidylcholine-packaged gramicidin A // Biochim. Biophys. Acta. 1983. Vol. 732. P. 58.
7. Stark G., Strassle M., Takacz Z. Temperature-jump and voltage-jump experiments at planar lipid membranes support an aggregational (micellar) model of the gramicidin A ion channel // J. Membr. Biol. 1986. Vol. 89. P. 23.
8. Бодрова Н.Б., Удальцова Н.В., Иванов П.С., Шноль С.Э. О неслучайности формы «несостоятельных» гистограмм: Препринт/ Научный центр биологических исследований АН СССР. Пущино, 1989. 32 с.
9. Mueller P., Rudin D.O., Tien H.T., Wescott W.C. Reconstitution of cell membranes structure *in vitro* and its transformation into an excitable system // Nature. 1962. Vol. 194. P. 979.
10. Новицкий П.В., Зограф И.А. Оценка погрешностей результатов измерений. Л.: Энергоатомиздат, 1985.
11. Айвазян С.А., Бухштабер В.М., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Прикладная статистика: Классификация и снижение размерности. М.: Финансы и статистика, 1989.
12. Гелетюк В.И., Казаченко В.Н. Кластерная организация ионных каналов. М.: Наука, 1990.
13. Регистрация одиночных каналов. М.: Мир, 1987.
14. Nagy K., Bagany M. Multiple discrete single sodium channel current levels in neuroblastoma cells // Proc. Int. Union Physiol. Sci. 1985. Vol. 16. P. 441.
15. Patlak J.B. Sodium channel subconductance levels measured with a new variance-mean analysis // J. Gen. Physiol. 1988. Vol. 92. P. 413.

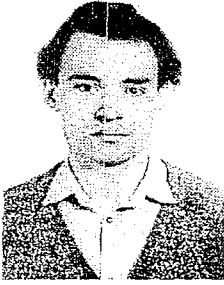
Московский государственный
университет

Поступила в редакцию 1.12.94
после переработки 13.12.95

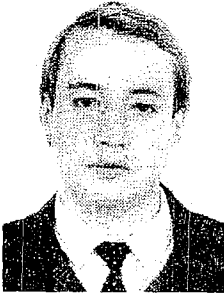
NON-PARAMETRIC ANALYSIS OF COLLECTIVE EFFECTS IN THE ENSEMBLE OF IONIC CHANNELS

P.S. Ivanov, A.A. Butylin

The existence of stable conductance states in the ensemble of gramicidin channels incorporated into bilayer lipid membrane have been studied. Inconsistent estimators of density function are employed as a quantitative tool for description of systems with two-level hierarchy of random processes having similar characteristic times. Non-parametric approach to investigation of histograms of membrane current fluctuations is developed. The expansion of histograms in terms of basic set of orthogonal functions and the use of the main components method allowed to visualize wanderings of image point throughout phase space and to evaluate the characteristic times of stable states which proved to be equal to 1-2, 5, and 9 seconds. Local membrane deformations caused by openings of separate channels are discussed as being responsible for interactions between gramicidin dimers. The advantages of application of non-parametric methods to investigation of cooperative effects in other biological systems are also considered.



Иванов Павел Сергеевич - родился в Москве (1965), окончил Московский государственный университет им М.В. Ломоносова (1988). После окончания работает на кафедре биофизики физического факультета МГУ. Защитил кандидатскую диссертацию на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук в МГУ (1992) в области биофизики ионных каналов. Область научных интересов - биофизика ионного транспорта, теория динамических систем, математическая статистика.



Бутылин Андрей Александрович - родился в Москве (1963), окончил Московский государственный университет им М.В. Ломоносова (1986). После окончания работает на кафедре биофизики физического факультета МГУ. Защитил кандидатскую диссертацию на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук в МГУ (1991) в области биофизики ионных каналов. Область научных интересов - биофизика ионного транспорта, теория динамических систем, медицинская биофизика.