

ПОДАВЛЕНИЕ ШУМОВ С ПОМОЩЬЮ**ВЕЙВЛЕТ-ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ПРИ АНАЛИЗЕ СОСТАВА РАСТВОРА БИОМОЛЕКУЛ ПО ЯМР-СПЕКТРУ**

Рассмотрены особенности обработки сигнала ^1H -ЯМР-спектрометра при определении концентрации органических соединений в водно-солевом растворе. Показано, что применение вейвлет-преобразования позволяет значительно повысить отношение сигнал-шум спектра.

В настоящее время широкое применение в физике нашли методы обработки результатов измерений на основе вейвлет-преобразований (ВП), в частности, для фильтрации сигнала, аппроксимации формы линии, компрессии данных, распознавания образов [1]. На их востребованность указывает то, что уже разработаны пакеты прикладных программ по вейвлетам и технике частотно-временного анализа, входящие в состав таких известных математических пакетов как MatLab, MathCad, Mathematica [2].

Идея вейвлет-анализа заключается в разложении исследуемого сигнала на составляющие (проектировании сигнала на ортогональный базис функций определенного вида – вейвлетов), хорошо локализованные как во временной, так и в частотной областях. Вейвлет-анализ, характеризующий сигнал таким двойственным образом, выгодно отличается от классического фурье-анализа гораздо большей детальностью. Вейвлеты открывают новые возможности в очистке приборных сигналов от шума. Расширение WaveletToolbox, который входит в состав системы MatLab, представляет большие возможности по обработке сигналов, как в командном режиме, так и с использованием графического интерфейса пользователя (GUI), что делает его одним из лучших среди аналогичных пакетов расширения математических систем.

Программный пакет MatLab разработан для компьютерной обработки массивов экспериментальных данных и широко применяется в физических, химических и медико-биологических исследованиях. Одним из новых направлений экспериментальной биофизики является метабономика, в которой используются такие высокоинформативные аналитические методы, как ЯМР-спектроскопия, хроматография, масс-спектрометрия и др. [3]. Для обработки сигналов импульсного ЯМР-спектрометра сравнительно недавно был разработан специализированный пакет matNMR [4] и его использование в сочетании с другими расширениями пакета MatLab открывает новые возможности по обработке данных ЯМР-эксперимента. В частности, повышение основных показателей ЯМР-спектрометра – чувствительности и разрешающей способности – имеет большое практическое значение.

В практической ЯМР-спектроскопии отношение сигнал/шум (S/N) определяется как отношение пиковой амплитуды эталонного сигнала S к удвоенной среднеквадратичной амплитуде шума σ_N : $S/N = S/2\sigma_N$. Среднеквадратичная амплитуда шума σ_N может быть вычислена путем численного интегрирования для достаточно длительной шумовой выборки, либо оценена по значениям двойной амплитуды N_{20} зарегистрированного шума, имеющего 100 пересечений с нулевой линией, по формуле $\sigma_N = 0,20\langle N_{D0} \rangle_{100}$.

Для оптимизации ЯМР-спектра согласно требованиям решаемой задачи – повышения отношения сигнал/шум и разрешения, подавления осцилляций на крыльях линий в спектре – производят линейную фильтрацию данных "во временном представлении". Условие линейности фильтрации обеспечивает отсутствие нежелательных интерференционных эффектов при обработке сигнала спада свободной индукции ЯМР-спектров с перекрывающимися линиями. До фурье-преобразования фильтрация в основном сводится к умножению сигнала FID на соответствующую весовую функцию. При этом следует учитывать, что условия обеспечения указанных требований обычно противоречат друг другу. Так повышение разрешения всегда увеличивает высокочастотный шум в спектре и, следовательно, ухудшает чувствительность. Оптимизация соотношения чувствительности и разрешения может привести к нежелательной форме спектральной линии и возрастанию амплитуды пульсаций, которые могут "замаскировать" слабые линии в спектре. В свою очередь подавление пульсаций на крыльях линий в спектре путем аподизации (сглаживания сигнала FID в районе $t = t_{\max}$) может привести к значительному уширению основания резонансного сигнала, что связано с ошибкой интегрирования спектральной линии.

Для повышения точности интегрирования целесообразно при фильтрации изменить форму резонансной линии, путем лоренц-гауссова преобразования, заключающемся в умножении сигнала спада свободной индукции на весовую функцию: $h(t) = \exp(t/T_2^* - \sigma^2 t^2/2)$, где t – время, T_2^* – постоянная времени естественного спада сигнала FID , σ – параметр преобразования, определяющий ширину спектральной линии ($\sigma = \text{const}$). Умножение на $h(t)$ преобразует линию лоренцевой формы с полушириной на полувысоте $\Delta\nu_{1/2} = 1/2\pi T_2^*$ в гауссову линию $S(\nu)$ с полушириной – $\Delta\nu_{1/2} = 0,187\sigma$. Предельное сужение линии ограничено значением времени регистрации $FID - t_{\max}$. Точность интегрирования спектральной линии $S(\nu)$ гауссовой формы выше, поскольку ее "крылья" быстрее спадают и, следовательно, можно точнее определить

локализацию сигнала. При этом может произойти и определенная аподизация сигнала *FID*, снижающая уровень шума в ЯМР-спектре.

На величину интеграла резонансной линии, оказывает большое значение положение базовой линии сигнала и высокочастотные помехи (шум). ЯМР-спектр $S(\nu) \equiv \{S_i\}$ в рамках аддитивной модели можно представить в виде суммы трех составляющих: $S(\nu) = S^*(\nu) + B(\nu) + C(\nu)$, где ν – частота, $S^*(\nu)$ – очищенный от помех спектр, $B(\nu)$ – смещение базовой линии спектра, $C(\nu)$ – шум. При таком разделении учтено то, что $B(\nu)$ и $C(\nu)$ – являются малыми добавками, $B(\nu)$ – медленноменяющаяся функция, а $C(\nu)$ – напротив, подобна белому шуму.

Для снижения уровня шума сигнала используются процедуры прямого и обратного дискретного вейвлет-преобразования (ДВП) из расширения WaveletToolbox. Удаление шумов заключается в декомпозиции ЯМР-спектра $S(\nu)$ на аппроксимирующие составляющие, которые представляют сглаженный сигнал, и детализирующие составляющие, описывающие осцилляции. Поскольку шумовая компонента в основном отражена в детализирующих коэффициентах d_i (вейвлет-коэффициентах), то, удерживая только d_i , превосходящие заданные пороги, путем обратного ДВП производится реконструкция сигнала уже с меньшим уровнем шума [2]. Процесс декомпозиции и реставрации ЯМР-сигнала схематично представлен в виде дерева на рисунке 1. Чаще всего используется жесткая или мягкая пороговая обработка коэффициентов

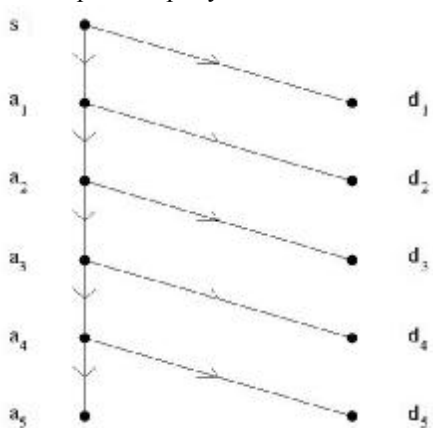


Рисунок 1 - Вейвлет-дерево декомпозиции пятого уровня ЯМР-спектра: s - сигнал, a_i , d_i - аппроксимирующий и детализирующий коэффициенты i -го уровня, соответственно

разложения. В первом случае сохраняются коэффициенты $|d_i| \geq \tau$, где τ – установленный порог ($\tau_i > 0$), оставшиеся коэффициенты обращаются в нуль. Во втором режиме наряду с обращением в нуль коэффициентов d_i , если $|d_i| < \tau$, производится уменьшение по модулю остальных коэффициентов на τ . Для правильной установки значения τ в системе MatLab предусмотрен в частности, просмотр спектрограмм коэффициентов декомпозиции и пороговых уровней.

При количественном химическом анализе растворов, например, биологических жидкостей организма [3], производится интегрирование ЯМР-спектра высокого разрешения. Для выявления влияния совместного применения линейной фильтрации сигнала *FID* и удаления шумов с помощью вейвлет-анализа была проведена обработка в среде MatLab протонного ЯМР-спектра водного раствора фрагмента ДНК и ароматического лиганда. На рисунке 2 представлен исследуемый ^1H -ЯМР-спектр, в области резонансов ароматических протонов водно-солевого раствора дезоксигептануклеотида d(GCGAAGC) и антибиотика

дауномицина. Видно, что резонансные линии протонов Н2, Н8, Н6 оснований гептамера гораздо слабее, чем линии ароматических протонов Н1, Н2, Н3 хромофора антибиотика. Это обусловлено тем, что концентрация гептамера в растворе была выбрана гораздо меньшей концентрации антибиотика для сравнения результатов интегрирования спектральных линий различной интенсивности при данном уровне шума.

При приготовлении раствора антрациклиновый антибиотик дауномицин (“Fluka”) использовали без дополнительной очистки, дезоксигептануклеотид 5'-d(GpCpGpApApGpC) синтезирован компанией “OSWEL DNA SERVICE” (Великобритания). Образцы лиофилизировали из 99,95% D_2O и растворяли в 0.1 М фосфатном буфере рD 7.1, содержащем 10^{-4} моль/л EDTA. Концентрацию исходного раствора антибиотика определяли спектрофотометрически используя молярный коэффициент экстинкции $\epsilon_{\text{DAU}} = 1,15 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda = 480 \text{ nm}$). Одномерные ^1H ЯМР спектры измерены на импульсном спектрометре с фурье-преобразованием “Bruker DRX” (резонансная частота 500 МГц) при $T = 313 \text{ K}$ [5]. Полное отнесение резонансных сигналов необменивающихся с растворителем протонов антибиотика и дезоксигептануклеотида было выполнено с использованием результатов двумерных корреляционных экспериментов 2D-TOCSY и 2D-NOESY [5].

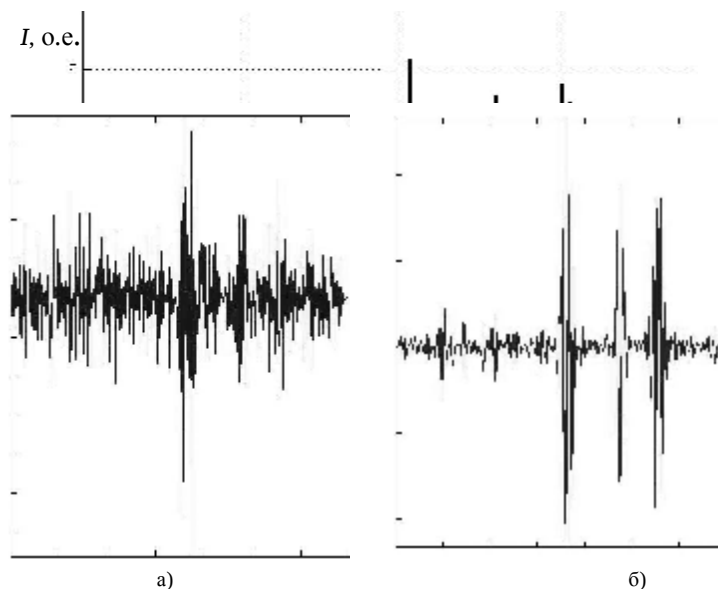


Рисунок 3 – Графики зависимостей вейвлет-коэффициентов декомпозиции ЯМР-сигнала от частоты: а) - первого уровня d_1 ; б) - второго уровня d_2

На рисунке 2 представлены для сравнения ЯМР-спектры раствора гептамера с дауномицином, сигнал спада свободной индукции которых перед фурье-преобразованием прошел гауссовскую аподизацию. В результате аподизации протонные резонансные сигналы как антибиотика, так и олигонуклеотида сузились. Например, отношение значений ширины резонансной линии после гауссовской аподизации к ширине линии в исходном спектре для протона НЗ дауномицина составило $\Delta_{\text{GAUSS}}/\Delta_0 = 0,89$. В верхнем спектре на рисунке 2 были удалены шумы с помощью специальной процедуры в среде MatLab, основанной на прямом и обратном вейвлет-преобразованиях. Для шумоподавления были выбраны вейвлеты Мейера (dmey) и Добеши (dbN) [2]. Величины жестких порогов для спектрограмм детализирующих коэффициентов (см. рисунок 3) устанавливались адаптивно в рамках модели белого шума [2], и были одинаковы на всех пяти уровнях. Величина порога рассчитывалась по формуле $\sigma(2 \cdot \log(n))^{1/2}$, где σ – дисперсия коэффициентов детализации 5-го уровня (d_5), n – количество точек сигнала.

Параметры фильтрации (значения τ) и результаты численного интегрирования спектральных линий J_i ($i = 1 \div 9$, нумерация линий на рисунке 2 справа налево), представлены в таблице 1. Из рисунка 2 и таблицы 1 видно, что подавление шумов значительно увеличивает отношение сигнал/шум спектра, практически не изменяя при этом величины интегралов J_i для протонов дауномицина. Для протонов гептамера изменения значений интегралов J_i также не велики, по сравнению с различиями между ними (для $i = 4 \div 8$). Как можно заметить, несмотря на сравнительно небольшую интенсивность резонансного сигнала Н2,Н8А4 гептамера, значение его интеграла J_9 соответствует двум протонам.

Подавление шума с помощью вейвлет-преобразования в количественном ЯМР-анализе растворов является более предпочтительным, поскольку позволяет одновременно повысить как разрешающую способность, так и отношение сигнал-шум. Напротив, увеличение значения отношения S/N посредством экспоненциальной аподизации сигнала *FID*, как известно, ухудшает разрешение прибора и уширяет основание резонансных линий в ЯМР-спектре.

Определенный интерес представляет исследование применения процедуры шумоподавления на основе вейвлет-преобразования непосредственно сигналу спада свободной индукции. Получаемое в этом случае улучшение разрешения прибора такое же, как и при гауссовской аподизации: отношение значений ширины резонансной линии после шумоподавления к ширине линии в исходном спектре для протона НЗ дауномицина составило $\Delta_{\text{wvp}}/\Delta_0 = 0,89$. В связи с этим следует заметить, что в растворе происходят реакции нековалентного связывания молекул: стопочная самоассоциация ароматических молекул дауномицина, образование короткой

Таблица 1 – Сравнительные характеристики протонных резонансных линий в ЯМР-спектре водно-солевого раствора дауномицина и дезоксигептануклеотида (GCGAAGC), $T = 313 \text{ K}$

	Дауномицин			Дезоксигептануклеотидd(GCGAAGC)					
Протон	H3,H6 C ₇	H1	H2	H8G ₁	H8G ₆	H8G ₃	H2A ₅	H8A ₅	H2,H8 A ₄
№	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	ЯМР-спектр (без аподизации сигнала <i>FID</i>)								
$J_i \times 10^6$	71,1	62,9	63,5	4,07	3,24	2,77	2,85	2,12	5,35
J_i/J_2	1,13	1,00	1,01	0,064	0,052	0,044	0,045	0,034	0,085
$S/2\sigma_N$	24			2,9					
	ЯМР-спектр (без аподизации <i>FID</i>) после удаления шумов ($\tau = 0,289 \cdot 10^6$)								
$J_i \times 10^6$	71,1	63,0	63,4	3,70	3,29	2,65	2,74	2,13	5,18
J_i/J_2	1,13	1,00	1,01	0,059	0,052	0,042	0,044	0,034	0,082
$S/2\sigma_N$	46			4,8					

	ЯМР-спектр (с гауссовской аподизацией сигнала <i>FID</i>)								
$J_i \times 10^6$	37,1	33,1	34,3	2,17	1,89	1,62	1,75	1,24	3,17
J_i/J_2	1,13	1,00	1,04	0,066	0,057	0,049	0,053	0,038	0,096
$S/2\sigma_N$	24,5			3,3					
	ЯМР-спектр (с гауссовской аподизацией <i>FID</i>) после удаления шумов ($\tau = 0,224 \cdot 10^6$)								
$J_i \times 10^6$	37,2	32,9	34,0	1,87	1,94	1,41	1,58	1,19	2,96
J_i/J_2	1,13	1,00	1,03	0,06	0,059	0,043	0,048	0,036	0,090
$S/2\sigma_N$	57			6,3					

Примечание – Для относительных значений интегралов J_i/J_2 в качестве нормирующего делителя выбран интеграл J_2 , поскольку резонансный сигнал протона НЗ дауномицина перекрывается с резонансом протона Н6С₇ дезоксигептануклеотида

шпильки и дуплекса дезоксигептануклеотида и интеркаляционных комплексов гептамера с антибиотиком, которые могут значительно увеличить ширину протонных резонансных линий. На рисунке 4 представлены для сравнения ЯМР-спектры с вейвлетной обработкой сигнала *FID* без нее. После вейвлет-реконструкции сигнал спада свободной индукции, для дополнительного подавления шума, подвергался экспоненциальной аподизации. Интегрирование резонансных сигналов протонов Н1, Н2, НЗ дауномицина показало, что значения отношения J_i/J_2 практически совпадают с результатами для ЯМР-спектра, прошедшего гауссовскую аподизацию *FID* с последующим вейвлетным шумоподавлением. К сожалению, для резонансных линий протонов гептамера вследствие их меньшей интенсивности наблюдается большее

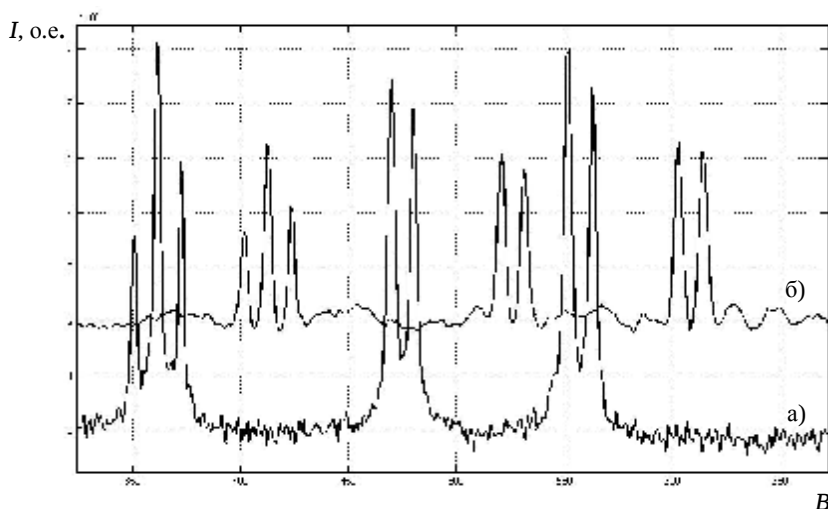


Рисунок 4 - Исходный ¹H-ЯМР-спектр водного раствора гексамера и дауномицина (внизу) и спектр после удаления шума с помощью вейвлет-преобразования и последующей экспоненциальной аподизацией сигнала *FID*

расхождение значений интегралов. Тем не менее, результаты проведенных исследований указывают на целесообразность совместного использования средств пакетов mathNMR и Wavelet Toolbox при определении состава растворов по данным ЯМР-спектроскопии

Библиографический список

1. Graps A. An Introduction to Wavelets / A. Graps // IEEE Computational Science and Engineering. — 1995. — V. 2. — N 2. — Published by the IEEE Computer Society, 10662 Los Vaqueros Circle.
2. Смоленцев Н.К. Основы теории вейвлетов. Вейвлеты в MATLAB / Н.К. Смоленцев. — М.: Изд-во ДМК Пресс, 2005. — 304 с.
3. Lindon J.C. Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance/ J.C. Lindon, E. Holmes, J.K. Nicholson // Prog. NMR Spectrosc. 2001. — V. 39. — P. 1–40
4. Руководство пользователя matNMR (вэб-сайт <http://matnmr.sourceforge.net>)
5. Веселков А.Н. ЯМР анализ комплексообразования ароматических лигандов с дезоксигептануклеотидом 5'-d(GCGAAGC), образующим стабильную шпильчатую структуру в водном растворе / А.Н. Веселков, Р.Дж. Итон и др. // Молекуляр биология. 2002. — Т. 36. — № 5. — С. 880–890.

Поступила в редакцию 17.05.2005 г.