

КРИВЫЕ NURBS В СПЕКТРАЛЬНОМ АНАЛИЗЕ ПЕРЕКРЫВАЮЩИХСЯ ПОЛОС ПОГЛОЩЕНИЯ НЕКОТОРЫХ ХРОМОФОРОВ БЕЛКОВ

И. А. Лавриненко, Г. А. Вашанов, В. Г. Артюхов

ФГБОУ ВО «Воронежский государственный университет»

Поступила в редакцию 01.08.2018 г.

Аннотация. Рассмотрена возможность применения неоднородных рациональных базовых сплайнов (NURBS) различного порядка (2–8) в качестве сглаживающей аппроксимации интегральных спектров поглощения белков перед их последующим дифференцированием по второй производной.

В экспериментах объектом исследования выступали спектры поглощения гемоглобина, полученные на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 в диапазоне длин волн 240–320 нм. Спектральная ширина щели составляла 0.5 нм, шаг сканирования — 0.2 нм, скорость сканирования соответствовала режиму «Slow».

Сглаживание исследуемого спектра поглощения осуществлялось с помощью кривых NURBS путем варьирования количества узловых точек и порядка базового сплайна. Разрешение полос поглощения в спектрах образца достигалось вычислением аппроксимированной производной второго порядка методом двусторонней разности (центральная разностная производная) с шагом дифференцирования 0.2 нм.

Сопоставлены результаты вычислений с наиболее часто используемым методом — аппроксимацией сглаживающими кубическими сплайнами (CSS). Установлено, что низкочастотное сглаживание спектров поглощения с помощью кривых NURBS относительно CSS дает более качественный результат с точки зрения оптимизации связанных параметров «разрешение/шум». Однако возможности аппроксимации NURBS ограничиваются на большем шаге потерей информации из спектра поглощения, а на меньшем, с одной стороны — аппаратными ограничениями прибора, с другой — межмолекулярным взаимодействием исследуемых соединений в конденсированном состоянии, что является справедливым и для CSS.

Наилучшим результатом при оптимизации отношения «сигнал/шум» стало использование кривых NURBS с передискретизацией исходного спектра поглощения белка к шагу 0.5 и 1.0 нм и его последующего дифференцирования. Показано, что применение кривых NURBS низких порядков (2, 3) при большом количестве узловых точек может при дальнейшем дифференцировании вносить определенные артефакты преобразований.

Использование NURBS в качестве сглаживающего сплайна также может найти свое применение в задачах разрешения сложных сигналов, регистрируемых от многокомпонентных систем в случае плохого разделения их составляющих хроматографическими, электрофоретическими или другими физико-химическими методами исследования.

Ключевые слова: неоднородный рациональный базовый сплайн, сглаживающий кубический сплайн, фильтрация, дифференцирование, спектр поглощения, NURBS, CSS

Соотнесение полос поглощения к переходам, которые их формируют, является одной из наиболее значимых задач молекулярной спектроскопии биополимеров [1–3]. Молекулярные электронные спектры поглощения белков обычно представляют собой некоторую суперпозицию плохо разрешенных перекрывающихся полос светопоглощения, происхождение которых обусловлено

квантово-механическими переходами различных по своему типу хромофоров [4–7].

Для молекул характерно расщепление системы электронных переходов до более тонких энергетических состояний вследствие колебательных и вращательных движений ядер атомов, что, в совокупности с неквантуемыми уровнями тепловой энергии, делает спектр поглощения изучаемого образца практически непрерывным [8–10].

В конденсированных средах, к которым относятся водные растворы белков, также дополнительно возникают и межмолекулярные взаимодействия, приводящие к существенному сглаживанию спектров светопоглощения таким образом, что наблюдаемый пик поглощения может представлять собой суперпозицию, экстремум которой не соответствует ни одному из основных типов электронных переходов в исследуемой молекуле [11].

Отсюда возникает необходимость увеличения степени разрешения в спектрах поглощения биомолекул, что в определенных пределах и погрешностях может быть достигнуто как физически, путем матричной изоляции отдельных молекул и уменьшения тепловой энергии системы, так и математическими методами, в частности, дифференцированием исходного интегрального спектра (т.е. первообразной) [12–14].

Однако при такой математической обработке исходных спектральных данных одновременно с повышением разрешения, также увеличивается и шумовая компонента, что при заданных условиях проведения эксперимента требует поиска оптимального соотношения шага и порядка численного дифференцирования к возникающему в производных спектрах уровню шума. В противном случае результат вычислений будет малоинформативным.

Одним из способов, позволяющих математическими методами минимизировать тепловой шум в спектре образца, может быть его сглаживание. Наиболее известным и доступным приемом является использование сглаживающих кубических сплайнов (cubic spline smoothing, CSS).

Следует отметить, что, в целом, границы применения сглаживающих сплайнов непрерывно расширяются во всех научных направлениях, связанных с математическими вычислениями, а также в производственных отраслях.

Так, в системах автоматического проектирования при решении задач компьютерной графики в настоящее время широкое распространение получила технология построения векторных объектов на основе NURBS-кривых, т.е. неоднородных рациональных b-сплайнов [15–17]. Являясь, по сути, сглаживающей аппроксимацией, данный сплайн может быть использован для низкочастотной фильтрации исходных экспериментальных данных с их последующим дифференцированием.

Управлением числа контрольных точек, в качестве которых выступают данные измерений спектра поглощения, а также порядка аппрок-

симирующей функции фильтра, можно найти решение, наилучшим образом отвечающее критерию «сигнал/шум» (S/N). При этом производительность аппаратных ресурсов и доступность программных средств практически полностью снимает проблему вычислений при построении неоднородных рациональных b-сплайнов.

Таким образом, нами рассмотрена возможность применения кривых NURBS в качестве сглаживающих низкочастотных фильтров при последующем дифференцировании спектров светопоглощения белков в области поглощения боковых групп аминокислотных остатков на примере водных растворов гемоглобина человека.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования выступали спектры поглощения гемоглобина, полученные на спектрофотометре Shimadzu UV-2401 в диапазоне длин волн 240–320 нм. Спектральная ширина щели составляла 0.5 нм, шаг сканирования — 0.2 нм, скорость сканирования соответствовала режиму «Slow».

Сглаживание исследуемого спектра поглощения осуществлялось с помощью кривых NURBS путем варьирования количества узловых точек и порядка базового сплайна.

В качестве контроля при аппроксимации исходного спектра поглощения выступал сглаживающий кубический сплайн.

Разрешение полос поглощения в спектрах образца достигалось вычислением аппроксимированной производной второго порядка методом двусторонней разности (центральная разностная производная) с шагом дифференцирования 0.2 нм [18, 19].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведен сравнительный анализ вторых производных спектров поглощения растворов гемоглобина в диапазоне длин волн 240–320 нм, полученных с применением CSS и NURBS.

В первой части исследований рассмотрен характер влияния порядка кривой NURBS на степень сглаживания исходного (интегрального) спектра поглощения белка относительно стандартной процедуры аппроксимации CSS.

Для этого спектр поглощения с помощью интерполирующего кубического сплайна был дискретизирован к шагу узлов сетки в 1.0 нм. Это позволяет смоделировать спектр светопоглощения, регистрируемый большинством приборов,

ограниченных, как по спектральной разрешающей способности, так и по шагу сканирования. Преобразованный спектр поглощения далее был аппроксимирован CSS и NURBS к первоначальному шагу (0.2 нм), и дифференцирован по второй производной. Такой подход дает возможность изучить, прежде всего, степень сглаживания искаженных шумовой компонентой исходных спектральных данных на предыдущем этапе вычислений. Увеличение шага дифференцирования до 0.5 нм и более однозначно повышает отношение S/N и не позволяет более точно исследовать особенности сглаживания с помощью NURBS и CSS, что не отвечает условиям поставленной задачи исследования.

На рисунке 1А показаны вторые производные спектров поглощения гембелка после аппроксимации исходного интегрального спектра CSS (контроль, поз. 1) или кривыми NURBS различных порядков (от второго до восьмого, поз. 2–8). Разностные спектры вторых производных для пар функций 2–1, 3–2, 4–3, 5–4, 6–5, 7–6 и 8–7 представлены на рисунке 1В с соответствующими обозначениями.

Из представленных данных следует, что аппроксимация с помощью кривых NURBS во всех

приведенных случаях дает лучшие результаты относительно кубического сглаживания. Гибкость в подборе порядка сплайна позволяет тонко подстроить необходимую степень фильтрации, которая задается исследователем. Однако, как показано на рисунке 1А (поз. 2, 3), применение кривых NURBS низких порядков (2, 3) с большим количеством узловых точек может вносить при последующем дифференцировании определенные артефакты преобразований. Это более детально отображено на рисунке 2 в области пиков полос поглощения боковых групп фенилаланина.

Необходимо также отметить, что в области поглощения гемоглобина от 300 до 320 нм наблюдается относительно высокий уровень шума. Это связано, как с аппаратными особенностями спектрофотометра (участок диапазона, где снижена интенсивность излучения источников света дейтериевой и галогенных ламп накаливания, точка смены ламп), так и, собственно, относительно низким молярным показателем поглощения белка на этом участке спектра (и как следствие, приводящим к высокой фотометрической ошибке).

При анализе спектров поглощения биополимеров необходимо учитывать рассмотренные выше обстоятельства. Вместе с тем, данный участок

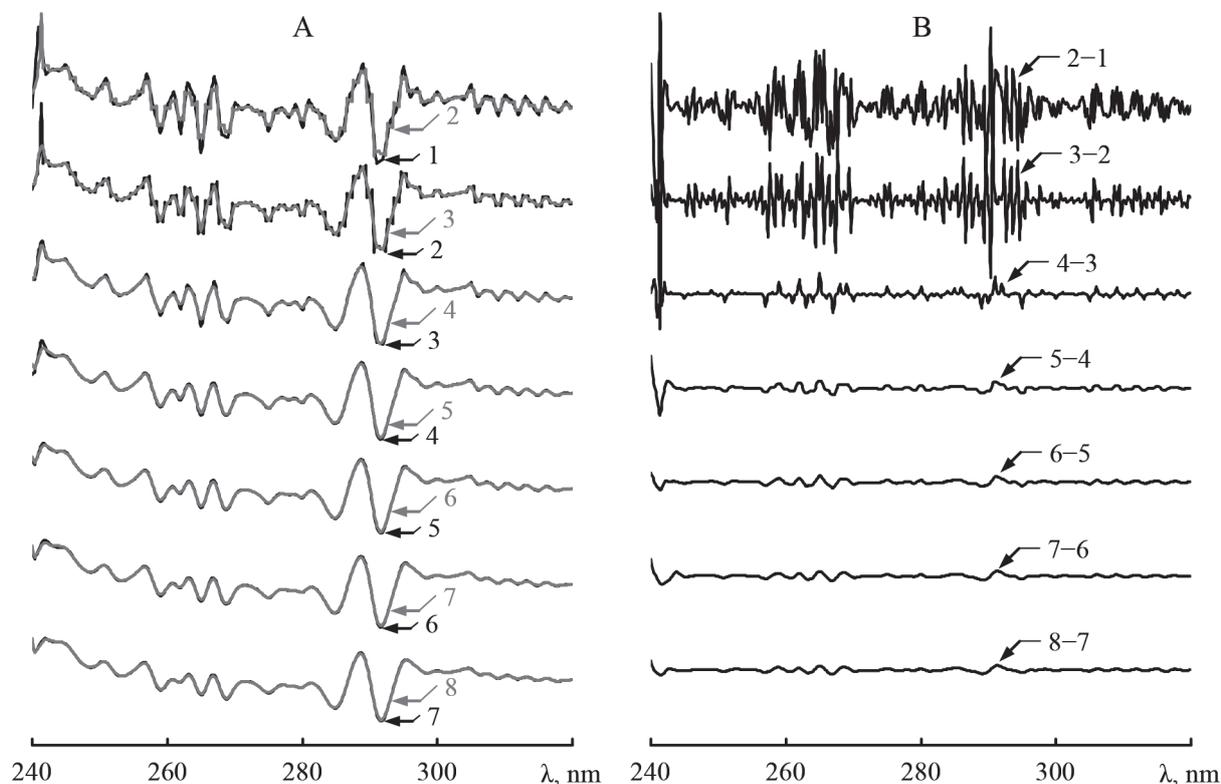


Рис. 1. Вторые производные спектров поглощения гемоглобина (А) после аппроксимации исходного спектра CSS (1) или кривыми NURBS с порядком сплайна от второго до восьмого (2–8) и разностные спектры этих производных (В) для пар функций (2–1), (3–2), (4–3), (5–4), (6–5), (7–6) и (8–7)

диапазона, свободный от поглощения боковыми группами аминокислотных остатков, может быть использован для оценки шумовой компоненты в области спектра 240–300 нм, т.к. доля последней будет меньше относительно участка 300–320 нм по указанным причинам.

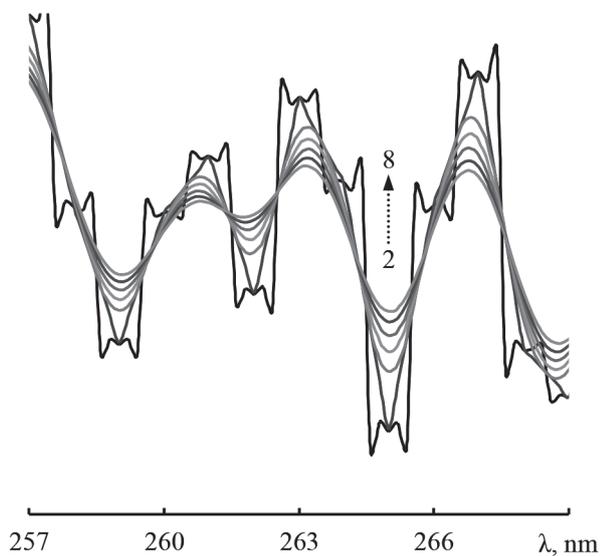


Рис. 2. Вторые производные спектра поглощения гемопротейда после аппроксимации исходного спектра кривыми NURBS различного порядка (от второго до восьмого, 2–8, соответственно) в области пиков полос светопоглощения боковых групп фенилаланина

Таким образом, использование кривых NURBS перед вычислением второй производной в спектрах светопоглощения гемоглобина демонстрирует высокую степень соответствия в положении пиков полос поглощения относительно отмеченных нами ранее [11], где в качестве аппроксимирующей функции выступал сглаживающий кубический сплайн. Результаты анализа перекрывающихся полос поглощения хромофоров, при этом, могут быть перенесены и к текущим данным.

В завершающей части работы нами оценены возможности аппроксимации кривыми NURBS интегральных спектров поглощения гемоглобина относительно CSS с шагом узлов сетки от 0.2 до 5.0 нм и последующим нахождением второй производной.

Исходный спектр поглощения гемоглобина был интерполирован кубическим сплайном с шагом 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 и 5.0 нм, что позволяет выполнить моделирование различных режимов измерения спектрофотометром, не меняя спектральной ширины щели, т.к. последняя определяет интен-

сивность световых потоков, и, следовательно, меняет отношение сигнал/шум. В противном случае, на результаты проводимого анализа, это обстоятельство повлияло бы существенным образом.

Далее, полученные спектры были аппроксимированы с применением CSS и NURBS 8 порядка, передискретизированы и дифференцированы по второй производной с шагом в 0.2 нм. Аргументация шага дифференцирования приведена выше.

Как следует из представленных данных (рисунок 3А), фильтрация спектра поглощения с помощью NURBS (поз. 2) при шаге в 0.2 нм показывает лучшие результаты относительно сглаживания CSS (контроль, поз. 1), однако, этого недостаточно для надежного разрешения перекрывающихся полос поглощения. Отношение S/N недостаточно и определяется, прежде всего, аппаратной функцией спектрофотометра (чувствительностью фотодетектора, интенсивностью источника и спектральной шириной щели).

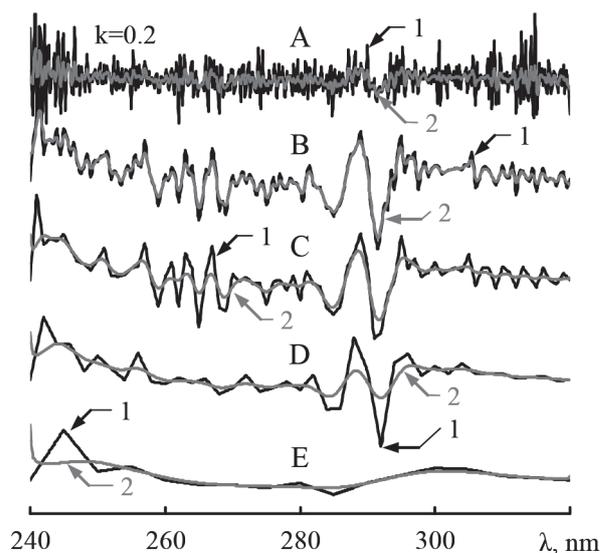


Рис. 3. Вторые производные спектров поглощения гемоглобина после аппроксимации сглаживающим кубическим сплайном (1) и неоднородным рациональным базовым сплайном 8 порядка (2); А, В, С, D и Е — шаги интерполяции кубическим сплайном 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 и 5.0 нм, соответственно; графики В–Е представлены в одном масштабе, А — с коэффициентом 0.2

Увеличение шага до 0.5 и 1.0 нм позволило повысить качество дифференцированных спектров поглощения с преимуществом за методом сглаживания посредством NURBS-кривых (рисунок 3В и С). Вероятно, следует считать шаг сглаживания 0.5–1.0 нм наиболее оптимальным с точки зрения

информативности, что также отмечается и другими исследователями [20].

Последующее увеличение шага до 2.0 и 5.0 нм (рисунок 3D и E) снижает разрешающую способность в дифференцированных спектрах поглощения гембелка. Причем, это наблюдается в большей степени для NURBS-кривой, которая превращается в характерный, моделирующий по опорным точкам сплайн, свойства которого являются определяющими в задачах компьютерной графики (рисунок 3E, поз. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как показали результаты экспериментов, низкочастотное сглаживание спектров поглощения с помощью кривых NURBS относительно CSS перед их последующим дифференцированием, дает более качественный результат с точки зрения оптимизации связанных параметров «разрешение/шум». Однако возможности аппроксимации NURBS ограничиваются на большем шаге потерей информации из спектра поглощения, а на меньшем — с одной стороны, аппаратными ограничениями прибора, с другой — межмолекулярным взаимодействием исследуемых соединений в конденсированной среде.

Использование NURBS в качестве сглаживающего сплайна также может найти свое применение в задачах разрешения сложных сигналов, регистрируемых от многокомпонентных систем в случае плохого разделения их составляющих хроматографическими, электрофоретическими или другими физико-химическими методами исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М. Квантовая механика (нерелятивистская теория). Москва, Физматлит, 2004, 800 с.
2. Зигбан К., Нордлинг К. Электронная спектроскопия. Москва, Мир, 1971, 493 с.
3. Демченко А.П. Ультрафиолетовая спектрофотометрия и структура белков. Киев, Наук. думка, 1981, 208 с.

*Воронежский государственный университет
Артюхов В. Г. доктор биологических наук,
профессор, заведующий кафедрой биофизики и
биотехнологии*

Тел.: +7 (473) 220-89-81

E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru

4. Вовна В.И. Электронная структура органических соединений по данным фотоэлектронной спектроскопии. Москва, Наука, 1991, 247 с.

5. Коровин Н.В. Курс общей химии. Москва, Высшая школа, 1990, 446 с.

6. Butler P.H. Point group symmetry applications: methods and tables. Berlin Heidelberg, Springer Science & Business Media, 2012, p. 576.

7. Flurry R.L. Symmetry Groups: Theory and Chemical Applications. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, 1980, p. 384 p.

8. Philipp D.M., Friesner A. // J. of computational chemistry. 1999. Vol. 20, pp. 1468-1494.

9. Pople J.A., Gordon M. // J. of the American Chemical Society. 1967. Vol. 89, pp. 4253-4261.

10. Mulliken R.S. // The Journal of Chemical Physics. 1955. Vol. 23, pp. 1833-1840.

11. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Рубан М.К. // Журнал прикладной спектроскопии. 2013. Т. 80. № 6. С. 907-913.

12. Parson W.W. Modern Optical Spectroscopy, With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry. Berlin Heidelberg, Springer, 2009, p. 530.

13. Talsky G. Derivative Spectrophotometry: Low and Higher Order. Weinheim, VCH, 1994, p. 228.

14. Лавриненко И.А., Вашанов Г.А., Артюхов В.Г. // Биофизика. 2015. Т. 60. вып. 2. С. 253-261.

15. Piegel L. & Tiller W. The NURBS Book. New York, Springer-Verlag, 1997, p. 327.

16. Голованов Н.Н. Геометрическое моделирование. Москва, Физматлит, 2002, 472 с.

17. Василенко В.А. Сплайн-функции: теория, алгоритмы, программы. Новосибирск, Наука, 1983, 156 с.

18. Вержбицкий В.М. Основы численного анализа. Москва, Высшая школа, 2001, 840 с.

19. Самарский А.А., Гулин А.В. Численные методы. Москва, Наука, 1989, 432 с.

20. Литвин Ф.Ф., Дубровский В.Т., Хатыпов Р.А., Неверов К.В., Калабухова Т.Н., Микулинская Г.В., Сатина Л.Я. Молекулярная спектроскопия: основы теории и практика. Москва, РИОР, 2018, 263 с.

*Voronezh State University
Artyukhov V. G., PhD., DSci., Full Professor,
Head of Biophysics and Biotechnology department
Ph.: +7 (473) 220-89-81
E-mail: artyukhov@bio.vsu.ru*

Вашанов Г. А. доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой физиологии человека и животных

Тел.: +7 (473) 220-84-50

E-mail: c777mt@mail.ru

Vashanov G. A., PhD., DSci., Associate Professor, Head of Human and Animal Physiology department

Ph.: +7 (473) 220-84-50

E-mail: c777mt@mail.ru

*Лавриненко И. А. кандидат биологических наук, доцент кафедры биофизики и биотехнологии

Тел.: +7 (473) 220-85-86

E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

*Lavrinenko I. A., PhD, Associate Professor, department of biophysics and biotechnology

Ph.: +7 (473) 220-85-86

E-mail: lavrinenko_ia@bio.vsu.ru

NURBS IN THE SPECTRAL ANALYSIS OF THE OVERLAPPING BEAMS OF ABSORPTION OF SOME PROTEIN CHROMOPHORES

I. A. Lavrinenko, G. A. Vashanov, V. G. Artyukhov

Voronezh State University

Abstract. The possibility of application of non-uniform rational b-splines (NURBS) various about (2–8) as the smoothing approximation of integrated ranges of absorption of proteins before their subsequent differentiation on the second derivative is considered.

In the experiments, the hemoglobin absorption spectra obtained with the Shimadzu UV-2401 spectrophotometer in the wavelength range 240–320 nm were the object of the study. The spectral width of the slit was 0.5 nm, the scanning step was 0.2 nm, the scan rate corresponded to the “Slow” mode.

Smoothing of the investigated absorption spectrum was carried out with the help of NURBS curves by varying the number of nodal points and the order of the base spline. The resolution of the absorption bands in the spectra of the sample was achieved by calculating the approximated derivative of the second order by the two-sided difference method (the central difference derivative) with a 0.2 nm separation step.

The results of computations with the most frequently used method-approximation by cubic spline smoothing (CSS) are compared. It has been established that low-frequency smoothing of the absorption spectra with NURBS curves relative to CSS gives a better result in terms of optimizing the associated “resolution/noise” parameters. However, the possibilities of NURBS approximation are limited at a greater step by the loss of information from the absorption spectrum, and on the smaller, on the one hand, hardware limitations of the device, on the other — the intermolecular interaction of the investigated compounds in the condensed state, which is also true for CSS.

The best result in optimizing the signal-to-noise (S/R) ratio was the use of NURBS curves with oversampling of the original absorption spectrum of the protein to step 0.5 and 1.0 nm and its subsequent differentiation. It is shown that the use of NURBS curves of low orders (2, 3) with a large number of nodal points can introduce certain artifacts of transformations with further differentiation.

The use of NURBS as a smoothing spline can also find its application in problems of resolving complex signals recorded from multicomponent systems in the case of poor separation of their components by chromatographic, electrophoretic, or other physical and chemical methods.

Keywords: non-uniform rational b-spline, cubic spline smoothing, filtration, differentiation, absorption spectrum, NURBS, CSS

REFERENCES

1. Landau L.D., Lifshits E.M. Kvantovaya mekhanika (nerelyativistskaya teoriya). Moscow, Fizmatlit Publ., 2004, 800 p.

2. Zigban K., Nordling K. Elektronnaya spektroskopiya. Moscow, Mir Publ., 1971, 493 p.

3. Demchenko A.P. Ul'trafiol'tovaya spektrofotometriya i struktura belkov. Kiev, Nauk. dumka Publ., 1981, 208 p.

4. Vovna V.I. Elektronnaya struktura organicheskikh soedinenii po dannym fotoelektronnoi spektroskopii. Moscow, Nauka Publ., 1991, 247 p.

5. Korovin N.V. Kurs obshchei khimii. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 1990, 446 p.
6. Butler P.H. Point group symmetry applications: methods and tables. Berlin Heidelberg, Springer Science & Business Media, 2012, p. 576.
7. Flurry R.L. Symmetry Groups: Theory and Chemical Applications. Upper Saddle River, New Jersey, Prentice-Hall, 1980, p. 384 p.
8. Philipp D.M., Friesner A. // J. of computational chemistry, 1999, Vol. 20, pp. 1468-1494.
9. Pople J.A., Gordon M. // J. of the American Chemical Society, 1967, Vol. 89, pp. 4253-4261.
10. Mulliken R.S. // The Journal of Chemical Physics, 1955, Vol. 23, pp. 1833-1840.
11. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Ruban M.K. J. of Applied Spectroscopy, 2014, Vol. 80, No. 6, pp. 899-904.
12. Parson W.W. Modern Optical Spectroscopy, With Exercises and Examples from Biophysics and Biochemistry. Berlin Heidelberg, Springer, 2009, p. 530.
13. Talsky G. Derivative Spectrophotometry: Low and Higher Order. Weinheim, VCH, 1994, p. 228.
14. Lavrinenko I.A., Vashanov G.A., Artyukhov V.G. Biophysics, 2015, Vol. 60, No. 2, pp. 197-204.
15. Piegl L. & Tiller W. The NURBS Book. New York, Springer-Verlag, 1997, p. 327.
16. Golovanov N.N. Geometricheskoe modelirovanie. Moscow, Fizmatlit Publ., 2002, 472 p.
17. Vasilenko V.A. Splain-funktsii: teoriya, algoritmy, programmy. Novosibirsk, Nauka Publ., 1983, 156 p.
18. Verzhbitskii V.M. Osnovy chislennogo analiza. Moscow, Vysshaya shkola Publ., 2001, 840 p.
19. Samarskii A.A., Gulin A.V. Chislennye metody. Moscow, Nauka Publ., 1989, 432 p.
20. Litvin F.F., Dubrovskii V.T., Khatypov R.A., Neverov K.V., Kalabukhova T.N., Mikulinskaya G.V., Satina L.Ya. Molekulyarnaya spektroskopiya: osnovy teorii i praktika. Moscow, RIOR Publ., 2018, 263 p.