# ГЛОБАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ КРИВЫХ ЗАТУХАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ МЕТОДОМ ФАЗОВЫХ ВЕКТОРОВ

## К. Д. Тарапович

Белорусский государственный университет, г. Минск, ksenia.lacteavia@gmail.com науч. рук.: А. В. Дигрис, старший преподаватель

Глобальный анализ кривых затухания флуоресценции позволяет получить значения времён затухания флуоресценции, чувствительных к различным параметрам биохимической среды и реакциям, протекающим в образце, находящемся в возбуждённом состоянии. В данной статье представлены результаты тестирования качества работы одного из наиболее эффективных и широко используемых методов глобального анализа кривых затухания флуоресценции – метода фазовых векторов.

*Ключевые слова*: флуоресцентная спектроскопия; кривые затухания флуоресценции; время затухания флуоресценции; глобальный анализ; метод фазовых векторов.

## МЕТОД ФАЗОВЫХ ВЕКТОРОВ

Метод фазовых векторов основан на совместной обработке комплексных величин, получаемых в результате применения преобразования Фурье к обрабатываемому набору кривых затухания флуоресценции.

В качестве модели для отдельных кривых затухания флуоресценции часто используется функция, вида:

$$d_k(t) = a_k^1 e^{-t/\tau_1} + a_k^2 e^{-t/\tau_2}$$
(1)

где  $\tau_1$  и  $\tau_2$  – времена затухания флуоресценции;  $a_k^1$  и  $a_k^2$  - предэкспоненциальные коэффициенты,  $k = \overline{1, n}$  и n – число кривых в наборе.

Применяя преобразование Фурье к выражению (1), получаем:

$$D_k(w) = \frac{\int_0^\infty d_k(t)e^{j\omega t}dt}{\int_0^\infty d_k(t)dt} = \frac{a_1\tau_1}{(1-jw\tau_1)(a_1\tau_1+a_2\tau_2)} + \frac{a_2\tau_2}{(1-jw\tau_2)(a_1\tau_1+a_2\tau_2)}$$
(2)

Коэффициенты Фурье  $D_k(w)$  можно представить графически в виде набора точек, координатами которых будут являться их действительная и мнимая части (рисунок 1). Для двухэкспоненциальной модели (1) такие точки будут лежать на отрезке прямой, пересекающей полуокружность с единичным диаметром и с центром в точке (0,0.5) в местах расположения коэффициентов Фурье для отдельных одноэкспоненциальных компонент, входящих в (1).



Рис. 1. Графическое представление метода фазовых векторов

Совокупность комплексных величин, полученных после применения преобразования Фурье к анализируемым кривым затухания флуоресценции, можно аппроксимировать прямой линией вида[1, с. 250]:

$$ImD_k(w) = u' + v'ReD_k(w)$$
(3)

Коэффициенты *u'* и *v'* данной прямой находят методом наименьших квадратов, минимизируя следующий функционал:

$$Q = \sum_{k=1}^{n} (u' + vReD'_{k}(w) - ImD'_{k}(w))^{2} = min$$
(4)

где величины  $D'_{k}(w)$  вычисляются как:

$$D'_{k}(w) = \frac{D_{k}^{\prime IRF}(w)}{L'(w)},$$
 (5)

где  $D_k^{\prime IRF}(w)$  и L'(w) – коэффициенты Фурье для k-й обрабатываемой кривой затухания флуоресценции и импульса отклика системы, соответственно.

На основании полученных оценок u' и v' можно найти оценки времён затухания и предэкспоненциальных коэффициентов[1, с. 250][2, с. 5]:

$$\tau'_{1,2} = \frac{1 \pm \sqrt{1 - 4u'(u' + v')}}{2wu'} \tag{6}$$

$$\alpha'_{k} = \frac{w(\tau'_{2} + \tau'_{1})ReD'_{k}(w) + (w^{2}\tau'_{1}\tau'_{2} - 1)ImD'_{k}(w) - w\tau'_{2}}{w(\tau'_{1} - \tau'_{2})}$$
(7)

$$a_{k}^{\prime 2} = \frac{\tau'_{1} \alpha'_{k}}{(\tau'_{1} \alpha'_{k} + \tau'_{2} (1 - \alpha'_{k}))}$$
(8)

$$a_k^{\prime 1} = 1 - a_k^{\prime 2} \tag{9}$$

#### ТЕСТИРОВАНИЕ МЕТОДА

Для тестирования метода моделировалось N = 100 наборов по n = 15 кривых на основе модели (1) с  $a_1 = [0.1 \dots 0.9], a_2 = 1 - a_1$  и  $\tau_1 = 1$  нс,  $\tau_2 = 3$  нс на временном диапазоне от 0 до T = 30 нс на K = 512 карманах. Импульс отклика оборудования моделировался с использованием нормального распределения со средним значением 2 и дисперсией 0.0064. Все смоделированные кривые содержали пуассоновский шум.

Для каждого набора находятся оценки времен затухания  $\tau_1^k$  и  $\tau_2^k$  и вычисляются медианы относительных ошибок предэкспоненциальных коэффициентов median( $\delta a_1^k$ ) и median( $\delta a_2^k$ ). Далее рассчитываются средние полученных значений из всех наборов:  $<\tau_1>=mean(\tau_1)$ ,  $<\tau_2>=mean(\tau_2)$ ,  $<\delta a_1>=mean(median(\delta a_1))$  и  $<\delta a_2>=mean(median(\delta a_2))$  и среднеквадратичное отклонение для  $\tau_1$  и  $\tau_2$ .

Результаты тестирования качества работы метода в зависимости от уровня шума в кривых, что определяется числом зарегистрированных фотонов (50 ... 7050), представлены на рисунках 2 – 3. Увеличение числа фотонов (уменьшение уровня шума) сопровождается приближением оценок времён затухания к значениям, использованным при моделировании. Также наблюдается уменьшение среднеквадратичного отклонения (вертикальные отрезки на рисунке 2) и средних медиан относительных ошибок предэкспоненциальных коэффициентов.



*Рис. 2.* Зависимость средней оценки времён затухания и среднего значения медиан относительных ошибок предэкспоненциальных коэффициентов от уровня шума



*Рис. 3.* Графическое представление метода фазовых векторов при различных уровнях шума

Результаты теста в зависимости от числа кривых в наборе, изменяющегося в диапазоне [5 ... 105], при количестве фотонов в каждой кривой равном 200, представлены на рисунке 4.



*Рис. 4.* Зависимость средней оценки времён затухания и среднего значения медиан относительных ошибок предэкспоненциальных коэффициентов от числа кривых в наборе

Наблюдается тенденция к уменьшению среднеквадратичных отклонений времён затухания и погрешности предэкспоненциальных коэффициентов. Влияние же на средние времена затухания не выражено.

#### Библиографические ссылки

- A modified phasor approach for analyzing time-gated fluorescence lifetime images/ F. Fereidouni, A. Esposito, G.A. Blab, H.C. Gerritsen// Journal of Microscopy February – 2010 – Vol. 244
- Global analysis of time correlated singlephoton counting FRET-FLIMdata/ Hernan E. Grecco, Pedro Roda-Navarro, and Peter J. Verveer// OPTICS EXPRESS – 2009 – Vol. 17, No. 8