

БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

УДК 53.08; 519.25; 519.876.5

Скакун  
Виктор Васильевич

МОДЕЛИРОВАНИЕ И АНАЛИЗ ПРОЦЕССОВ РЕГИСТРАЦИИ И  
ОБРАБОТКИ СЛУЧАЙНЫХ ПОТОКОВ СОБЫТИЙ В СИСТЕМАХ  
ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ФЛУКТУАЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата физико-математических наук

по специальности 05.13.01 –  
системный анализ, управление и обработка информации

Минск, 2009

Работа выполнена в Белорусском государственном университете

**Научный руководитель – Апанасович Владимир Владимирович,**  
доктор физико-математических наук,  
профессор, заведующий кафедрой системного  
анализа факультета радиофизики и электроники  
Белорусского государственного университета.

**Официальные оппоненты: Гулаков Иван Романович,**  
доктор физико-математических наук,  
профессор, профессор кафедры общей физики  
физического факультета Белорусского  
государственного университета;

**Маталыцкий Михаил Алексеевич,**  
доктор физико-математических наук,  
профессор, заведующий кафедрой  
стохастического анализа и эконометрии  
факультета математики и информатики  
Учреждения образования «Гродненский  
государственный университет имени Янки  
Купалы».

**Оппонирующая организация –** ГНУ «Институт физики имени Б.И. Степанова  
НАН Беларуси».

Защита состоится 24 апреля 2009 г. в 14:00 на заседании совета по защите  
диссертации Д 02.01.14 при Белорусском государственном университете по  
адресу: 220030, г. Минск, ул. Ленинградская 8, корпус юридического факультета,  
ауд. 407.

Тел. учёного секретаря: 209-57-09.

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной библиотеке  
Белорусского государственного университета.

Автореферат разослан " 20 " марта 2009 г.

Ученый секретарь  
совета по защите диссертаций  
доктор физико-математических наук,  
профессор

В.А. Саечников

## КРАТКОЕ ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время для изучения свойств вещества широко используются флуоресцентные методы исследования. Сочетание высокой чувствительности с отсутствием разрушающего воздействия на исследуемое вещество приводит к интенсивному применению этих методов для анализа возбужденных состояний молекул, фотохимических реакций, динамики быстрых молекулярных процессов, изучения живых клеток, белков и биологических мембран. Среди флуоресцентных методов особый интерес представляют методы флуоресцентной флуктуационной спектроскопии (ФФС), позволяющие исследовать вещество на одномолекулярном уровне без нарушения термодинамического равновесия через регистрацию флуктуаций интенсивности флуоресценции, вызванных изменением числа флуоресцентных молекул в освещенном объеме, образованном сфокусированным лучом лазера, или (и) изменением их квантового выхода.

Системы регистрации, применяемые в ФФС, представляют собой сложнотехнические комплексы устройств, каждый из которых может влиять на процесс преобразования потока фотонов. Основным элементом формализации при создании моделей процессов, происходящих в системе регистрации, выступают потоки случайных событий. Для создания аналитических моделей предлагается использовать математический аппарат производящих функционалов (ПФЛ). При невозможности создания аналитически разрешимых моделей возможным выходом является применение имитационного моделирования.

Анализ данных ФФС предполагает создание моделей, соединяющих характеристики исследуемого вещества с характеристиками зарегистрированного потока фотонов, а также разработку методов, алгоритмов и программных средств обработки информации, получаемой в процессе эксперимента. Для создания моделей, адекватно описывающих физические процессы в исследуемом веществе, необходимо учитывать физику процессов, происходящих и в системе регистрации. Применение моделей без учета инструментальных искажений с идеализированным представлением профиля засветки ведет к получению значительных ошибок в оценках параметров исследуемого вещества. Современные исследования предполагают интенсификацию процесса измерения и обработки данных вследствие необходимости проведения большого числа экспериментов, что требует разработки систем хранения и обработки данных.

Решение поставленных задач требует использования методов системного анализа. Исследуемым объектом является сложная физико-техническая система, требующая комплексного изучения процессов взаимодействия излучения с веществом, процессов формирования неоднородной области засветки, процессов детектирования потока фотонов и преобразования его в поток временных событий, а также разработки методов хранения, обработки и анализа данных.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Связь работы с крупными научными программами, темами**

Тема диссертации соответствует направлению 6 «Математическое и физическое моделирование систем, структур и процессов в природе и обществе», пунктам 6.1 «Математические модели и их применение к анализу систем и процессов в природе и обществе» и 6.5 «Аппаратные и программные комплексы и системы для информационного обеспечения» Перечня приоритетных направлений фундаментальных и прикладных научных исследований РБ на 2006-2010 гг., утвержденного Постановлением Совета Министров РБ №512 от 17.05.2005.

Исследования проводились в рамках выполнения в Белорусском государственном университете следующих научно-исследовательских работ: г.б. НИР №719/18 «Разработка методов событийного моделирования динамики функционирования стохастических дискретных процессов и систем» (1998 г., номер госрегистрации 19963416); г.б. НИР № 833/18 «Разработка моделей и методов анализа процессов формирования и преобразования стохастических потоков сигналов» (2000 г., номер госрегистрации 19991554); г.б. НИР № 504/18 «Разработка моделей и методов многомерного анализа кинетики флуоресценции» (2001 г., номер госрегистрации 19992329); г.б. НИР № 466/18 «Разработка теоретических основ статистического анализа временных характеристик случайных потоков в системах автоматизации физического эксперимента» (2003 г., номер госрегистрации 20013802).

### **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей диссертационной работы является разработка аналитических и имитационных моделей систем регистрации потоков фотонов, а также создание методов, алгоритмов и программных средств обработки и анализа данных одномолекулярной флуоресцентной флуктуационной спектроскопии.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Разработать аналитические модели системы преобразования потоков случайных событий с использованием аппарата производящих функционалов.
2. Разработать и реализовать программный комплекс имитационного моделирования систем регистрации потоков фотонов в ФФС.
3. Разработать систему обработки и хранения данных флуоресцентной спектроскопии с использованием технологии реляционных баз данных.
4. Разработать методы, алгоритмы и программные средства анализа распределения числа фотоотсчетов с учетом инструментальных искажений системы регистрации.
5. Разработать методы, алгоритмы и программные средства кумулянтного анализа фотоотсчетов для исследования одномолекулярных систем в ФФС.

Объектом исследования являются системы регистрации и обработки данных флуоресцентной флуктуационной спектроскопии. Предметом исследования являются модели, методы, алгоритмы и программные средства регистрации, обработки и анализа данных в системах ФФС.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Программный комплекс имитационного моделирования систем регистрации и обработки данных флуоресцентной флуктуационной спектроскопии, который представляет анализируемую систему в виде последовательности базовых преобразователей и позволяет создавать сложные модели, состоящие из большого числа блоков преобразования, без необходимости изменения программного кода и последующей компиляции программы. Использование комплекса позволило оценить эффективность разработанных методов анализа данных и влияние инструментальных искажений системы регистрации на анализируемые характеристики потоков фотоотсчетов.

2. Метод анализа распределения числа фотоотсчетов, разработанный на основе полученной производящей функции числа фотоотсчетов с коррекцией профиля засветки, характеризующийся отсутствием зависимости яркости и количества молекул в объеме наблюдения от параметров коррекции профиля засветки вследствие предложенной нормализации и позволяющий значительно уменьшить время анализа данных в сравнении с ранее предложенными методами.

3. Метод генерации начальных приближений для анализа распределения числа фотоотсчетов и кумулянтного анализа, основанный на методе моментов, позволивший находить оценки яркости и количества молекул одно- и двухкомпонентных систем совместно с параметрами коррекции профиля засветки. Метод может быть также использован как самостоятельный метод быстрой оценки параметров исследуемого вещества.

4. Аналитические выражения для факториальных кумулянтов распределения числа фотоотсчетов с коррекцией профиля засветки, характеризующиеся отсутствием зависимости числа оцениваемых параметров от количества анализируемых кумулянтов и позволяющие проводить анализ одиночного набора кумулянтов без постановки калибровочного эксперимента. Найденные выражения позволили получить формулы пересчета оценок яркости и количества молекул в объеме наблюдения при использовании различных нормализаций, применяемых в известных и предложенных методах анализа распределения числа фотоотсчетов.

5. Структуры данных измерений и результатов анализа в системах флуоресцентной флуктуационной спектроскопии, на основе которых созданы реляционные базы данных, характеризующиеся возможностью хранения в целостном виде набора анализируемых характеристик совместно с результатами их анализа и позволяющие автоматизировать процесс предварительной обработки и анализа больших объемов данных.

### **Личный вклад соискателя**

Все приведенные в работе результаты получены автором самостоятельно. В публикациях с соавторами вклад соискателя определяется рамками излагаемых в диссертации результатов. Научному руководителю и соавторам в совместных работах принадлежат выбор направлений исследований, предметные постановки целей и задач, проведение натурных измерений и обсуждение результатов, за что автор им очень благодарен: д. ф-м. н., профессору В.В. Апанасовичу за помощь в разработке аналитических и имитационных моделей систем преобразования потоков случайных событий, Prof. Ton Visser (Microspectroscopy Center, WU) и Dr. Oleg Mayboroda (Department of Parasitology, LUMC) за предоставление результатов натурных измерений и обсуждение результатов их анализа.

### **Апробация результатов диссертации**

Основные результаты работы докладывались на: конференции «Анализ и применение систем и сетей массового обслуживания» (Минск, 1994 г.), 3-ем ежегодном международном семинаре «Nonlinear Phenomena in Complex Systems» (Минск, 1995 г.), международной конференции «Computer Data Analysis and Modeling» (Минск, 1995 г.), международной конференции «Исследование систем и сетей массового обслуживания» (Минск, 1996 г.), 7-ом и 9-ом международном семинаре «Carl Zeiss sponsored Workshop on FCS and Related Methods» (Dresden, 2004 г., Stockholm, 2006 г.), международной конференции «Современные информационные компьютерные технологии» (Гродно, 2008 г.), научных семинарах кафедры системного анализа БГУ, расширенных заседаниях кафедр биохимии и молекулярной физики университета Вагенингена (Wageningen, 1998 г., Wageningen 1999 г.), заседании кафедры паразитологии медицинского центра Лейденского университета (Leiden, 2005 г.).

### **Опубликованность результатов диссертации**

Основные результаты диссертации опубликованы в 18 научных работах, из которых 6 статей в соответствии с п. 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь (общим объемом 6,4 авторского листа), 3 статьи в рецензируемых сборниках научных трудов, 7 тезисов докладов на научных конференциях и 2 постера на научных конференциях. Результаты работы вошли в 2 учебных пособия и включены в 4 отчета по НИР.

### **Структура и объем диссертации**

Работа состоит из перечня условных обозначений и сокращений, введения, общей характеристики работы, четырех глав, заключения, 7 приложений и библиографического списка. Полный объем диссертации составляет 138 страниц. Диссертация содержит 31 рисунок на 12 страницах, 13 таблиц на 4 страницах и 7 приложений на 11 страницах. Библиографический список состоит из 161 наименования (включая публикации автора) и занимает 12 страниц.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ

В главе 1 приведен обзор основных методов ФФС и особенностей моделирования и временного анализа потоков случайных событий. ФФС – это совокупность методов, позволяющих исследовать физико-химические параметры вещества на основе анализа изменений интенсивности флуоресценции. Наиболее известными являются метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS), в котором анализируется автокорреляционная функция фотоотсчетов (АКФ), методы анализа распределения числа фотоотсчетов (РЧФ) FIDA, РСН и кумулянтный метод анализа фотоотсчетов (FCA).

Флуктуации интенсивности могут происходить вследствие диффузии флуоресцентных молекул через освещенный объем  $V$ , определенный сфокусированным лучом лазера или (и) изменением квантового выхода молекул. Интенсивность флуоресценции  $F(t)$  зависит от концентрации  $C$  молекул в объеме  $V$ , их характеристической яркости  $q$  и функции пространственного распределения зарегистрированной интенсивности флуоресценции (профиля засветки)  $B(\mathbf{r})$

$$F(t) = q \int_V C(\mathbf{r}, t) B(\mathbf{r}) d\mathbf{r} . \quad (1)$$

Наиболее часто  $B(\mathbf{r})$  аппроксимируется трехмерным асимметричным распределением Гаусса, вытянутым по оси  $z$   $B_G(\mathbf{r}) = B_0 \exp(-2(x^2 + y^2)/\omega_0^2 - 2z^2/z_0^2)$ , где  $\omega_0$  и  $z_0$  характеризует падение интенсивности флуоресценции соответственно в поперечном и аксиальном направлении и  $B_0 = B(\mathbf{0})$ .

На рисунке 1 приведена структурная схема системы регистрации и обработки данных (СРОД) в ФФС.

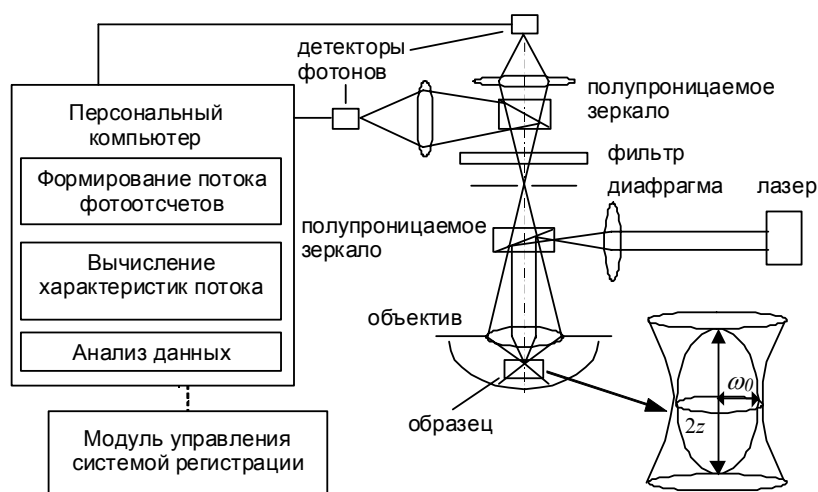


Рисунок 1 – Структурная схема СРОД в ФФС

Луч лазера направляется на вход инвертированного конфокального микроскопа с высоким коэффициентом усиления, отражается от полупрозрачного зеркала и фокусируется на исследуемом образце. Испускаемое флуоресцентное

излучение собирается тем же объективом микроскопа, проходит через диафрагму и фильтр, который задерживает рассеянное излучение лазера, и детектируется лавинными фотодиодами (ЛФД), работающими в режиме однофотонного счета.

Создание адекватных моделей для анализа данных ФФС требует детального изучения физики прибора и влияния отдельных его частей на поток фотонов. Аналитическое и имитационное моделирование случайных потоков со схожими характеристиками и систем их преобразования может способствовать правильной интерпретации полученных результатов и поиску оптимальных режимов измерения. Основным элементом формализации при моделировании системы регистрации выступают потоки случайных событий. Для полного описания процессов преобразования потока фотонов в системе регистрации (сдвиг событий, потери событий вследствие независимых потерь и мертвого времени, а также появление новых событий вследствие шума и послеимпульсов) предлагается использовать положения теории случайных потоков событий и математический аппарат производящих функционалов. В связи с этим приведен обзор методов моделирования потоков случайных событий и систем их преобразования.

**Глава 2** посвящена аналитическому и имитационному моделированию систем регистрации и обработки случайных потоков в ФФС. В разделе 2.1 приведены разработанные аналитические модели последовательного преобразования случайных потоков, слияния независимых потоков и потоков, прошедших произвольное преобразование, а также разветвления с указанными вероятностями выхода. Модель системы регистрации может быть представлена в виде совокупности последовательно расположенных элементарных преобразователей. В этом случае аналитическая модель системы формируется на основе аналитических моделей отдельных ее компонентов. Рассмотрим отдельный преобразователь. На вход системы поступает поток  $A$ , заданный на интервале  $\Theta$ , ПФЛ которого -  $L^A[u; \Theta]$  ( $u$  - пробная функция,  $t_i^A$  - моменты времени). На выходе блока преобразования получим поток  $B$  с ПФЛ  $L^B[v; \Omega]$ . Преобразование потока можно полностью описать условным ПФЛ  $L^{B|A}[v; \Omega | t_1^A, \dots, t_m^A; \Theta]$ . В итоге получим

$$L^B[v; \Omega] = \sum_{m=0}^{\infty} \frac{1}{m!} \int_{\Theta^m} \frac{\delta^m L^A[u; \Theta]}{\delta u(t_1^A) \dots \delta u(t_m^A)} \Bigg|_{u(t)=-1} L^{B|A}[v; \Omega | t_1^A, \dots, t_m^A; \Theta] dt_1^A \dots dt_m^A. \quad (2)$$

Если преобразование потока является покомпонентно независимым, то для нахождения моментных функций более удобным является выражение

$$L^B[v; \Omega] = 1 + \sum_{m=1}^{\infty} \frac{1}{m!} \int_{\Phi^m} \frac{\delta^m L^A[u; \Theta]}{\delta u(t_1^A) \dots \delta u(t_m^A)} \Bigg|_{u(t)=0} \prod_{i=1}^m (L^{B|A}[v; \Omega | t_i^A] - 1) dt_1^A \dots dt_m^A. \quad (3)$$

При смешивании независимых потоков ПФЛ суммарного потока  $R$  равен произведению ПФЛ смешиваемых потоков, а для зависимых входных потоков, когда на первый вход смесителя поступает поток  $A^1$  с ПФЛ  $L^1[u; \Omega^1]$ , прошедший



какое-либо преобразование, заданное условным ПФЛ  $L|_1[u; \Omega^2 | t_1^1, \dots, t_n^1; \Omega^1]$ , а на второй вход поступает исходный поток до преобразования, получим

$$L^R[u; \Omega^2] = \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{n!} \int_{(\Omega^1)^n} \pi_n^1(t_1^1, \dots, t_n^1; \Omega^1) \prod_{i=1}^n [1 + u(t_i^1)] L|_1[u; \Omega^2 | t_1^1, \dots, t_n^1; \Omega^1] dt_1^1 \dots dt_n^1, \quad (4)$$

где  $\pi_n^1(t_1^1, \dots, t_n^1; \Omega^1)$  - плотности распределения совместного появления ровно  $n$  событий на области  $\Omega^1$ . При разветвлении потоков с вероятностями  $q_i(t)$  ( $q_1(t) + \dots + q_n(t) = 1$ ) совместный ПФЛ входного и выходного потоков примет вид

$$L[v; u_1, u_2, \dots, u_n; \Theta] = L^A[(1 + v(\cdot))(1 + q_1(\cdot)u_1(\cdot) + \dots + q_n(\cdot)u_n(\cdot)) - 1; \Theta]. \quad (5)$$

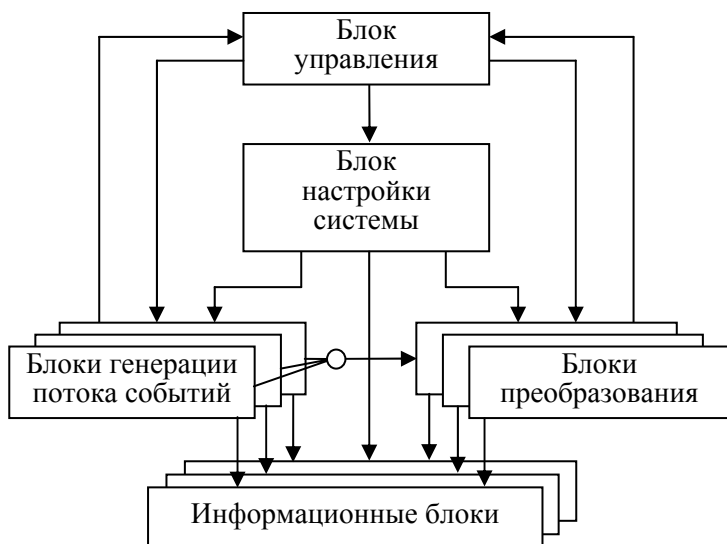
Разработанные модели позволяют исследовать широкий круг процессов, происходящих в системах регистрации во флуоресцентной спектроскопии.

Раздел 2.2 посвящен разработке имитационной модели системы регистрации в ФФС. Представлено формализованное описание системы регистрации в виде цепочки блоков генерации и блоков преобразования (БП) (смотри рисунок 2). Во время работы БП вносит искажения в поток, поступающий на его вход. Искаженный поток с выхода одного БП поступает на вход очередного и т.д. Смешивание и разветвление потоков также можно реализовать по такой схеме, размещая всякий раз после генератора потока блок смешивания событий и при разветвлении рассматривая только одну из ветвей.

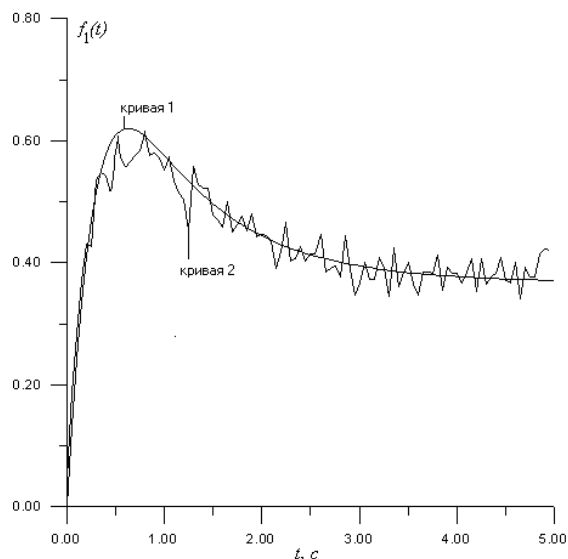
Разработан программный комплекс имитационного моделирования, позволяющий генерировать потоки случайных событий и исследовать их характеристики (вычислять интенсивность, АКФ и РЧФ) при наличии в системе сдвига событий, аддитивного шума, послеимпульсов, потерь событий вследствие мертвого времени и отличной от единицы эффективности регистрации фотонов. Библиотека генераторов потока позволяет моделировать элементарный одноточечный, отрицательно-биномиальный, парно-коррелированный потоки, а также потоки Бернулли, Пуассона и Кокса. Мертвое время и сдвиг событий моделируются с постоянной, равномерной и экспоненциально распределенной длительностью. Послеимпульсы моделируются как вторичный поток Пуассона с малой постоянной или экспоненциально затухающей интенсивностью. Генерация послеимпульсов осуществляется как после событий основного потока, так и после каждого послеимпульса. Особенностью разработанного комплекса является возможность создания сложных моделей, состоящих из большого числа БП, без необходимости изменения программного кода и последующей компиляции программы.

Использование комплекса позволило оценить эффективность разработанных методов анализа данных и влияние инструментальных искажений системы регистрации на анализируемые характеристики потоков фотоотчетов. На рисунке 3 (кривая 2) представлена интенсивность выходного потока, появляющегося на

выходе системы, состоящей из трех последовательно соединенных блоков преобразования: независимых потерь, линейного сдвига и продлевающего мертвого времени (исходный поток является стационарным пуассоновским). Полученная на основании формул (2) и (3) выходная интенсивность представлена кривой 1. Проведенные вычислительные эксперименты показали хорошее совпадение результатов аналитического и имитационного моделирования.



**Рисунок 2 – Структурная схема системы преобразования случайных потоков**



**Рисунок 3 – Интенсивность выходного потока**

В разделе 2.3 представлена разработанная имитационная модель потока фотоотсчетов (в виде парнокоррелированного потока) с постоянной интенсивностью и заданной АКФ, также имитационная модель потока фотоотсчетов в ФФС с заданным РЧФ. Разработан и программно реализован алгоритм прямой генерации РЧФ и факториальных кумулянтов (ФК) РЧФ, основанный на вычислении теоретического распределения с заданными параметрами и добавлении биномиального шума к каждой точке полученной кривой. Разработаны и программно реализованы алгоритмы анализа данных по методам FIDA, РСН, FCA. Проведенные вычислительные эксперименты с помощью разработанных имитационных моделей, программного комплекса и алгоритмов анализа данных показали, что искажения вследствие независимых потерь, мертвого времени и послеимпульсов не оказывают существенного влияния на анализируемые характеристики потока фотонов при типичных для ФФС условиях измерения (смотри таблицу 1). К смоделированному потоку фотонов вначале был добавлен шум – конфигурация I, затем шум и непродлевающее мертвое время ( $5E-8$  с) – конфигурация II, затем шум и послеимпульсы (0.3%) – конфигурация III, затем шум, послеимпульсы и непродлевающее мертвое время – конфигурация IV.

Таблица 1 – Результаты моделирования СРОД

Параметр	Ожидаемое значение	Оценки параметров, полученные по методу РСН			
		Конфигурация I	Конфигурация II	Конфигурация III	Конфигурация IV
$N$ (кол. молекул)	3	3.014±0.007	3.047±0.007	3.011±0.012	3.040±0.01
$q$ (яркость)	100000	99709±138	97692E±233	100180±246	98225±322
$\lambda$ (интенс. шума)	2000	1767±104	2000 (фикс.)	1702±185	2000 (фикс.)

В разделе 2.4 представлены разработанные структуры данных (информационные модели) измерений и результатов анализа в ФФС. Разработаны и реализованы базы данных (БД) измерений и результатов анализа, а также алгоритмы расчета АКФ, РЧФ и ФК РЧФ потоков фотоотчетов, сохраненных в специальных форматах ведущих производителей систем регистрации с возможностью режекции выбросов интенсивности. Разработанные БД и алгоритмы предварительной обработки данных вошли в состав трех программных комплексов: FCS Data Processor, TRFA Data Processor и TRFD Fitting Software.

**Глава 3** посвящена разработке моделей и методов анализа РЧФ в ФФС. В разделе 3.1 получено аналитическое выражение для производящей функции (ПФ) числа фотоотчетов с коррекцией профиля засветки. ПФ  $G(\xi)$  распределения  $P(n)$  числа зарегистрированных фотонов, испущенных флуоресцентными молекулами, находящимися в равновесном состоянии в открытом объеме наблюдения  $V$  в течение интервала наблюдения  $T$  имеет вид

$$G(\xi) = \exp \left\{ \lambda T (\xi - 1) + \sum_i \langle C \rangle_i \sum_{k=1}^{\infty} \left( (\xi - 1)^k q_i^k T^k \chi_k / k! \right) \right\}, \quad (6)$$

где  $\lambda$  - интенсивность фонового сигнала,  $\langle C \rangle_i$  - средняя концентрация молекул  $i$ -той компоненты,  $q_i$  - характеристическая яркость,  $\chi_k = \int_V B^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$ ,  $B(\mathbf{r})$  - профиль засветки. Достоинством полученной ПФ является высокая скорость вычислений, что является следствием применения аналитического интегрирования (вместо численного в методах FIDA, РСН). Для коррекции профиля засветки в виде

$$F_k = (\chi_k - \chi_{Gk}) / \chi_{Gk}, \quad \chi_{Gk} = \int_V B_G^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad k > 0, \quad (7)$$

где  $B_G(\mathbf{r})$  - гауссовская аппроксимация профиля засветки, получим

$$G(\xi) = \exp \left\{ \lambda T (\xi - 1) + \sum_i \langle C \rangle_i \sum_{k=1}^{\infty} \left( (\xi - 1)^k q_i^k T^k (1 + F_k) \chi_{Gk} / k! \right) \right\}. \quad (8)$$

Показано, что ПФ с коррекцией профиля засветки может быть представлена произведением трех ПФ: ПФ числа фотонов, регистрируемых из основной области засветки

$$G_{main}(\xi) = \exp \left\{ \sum_i \langle C \rangle_i \int_V \left( e^{(\xi-1)q_i T B_G(\mathbf{r})} - 1 \right) d\mathbf{r} \right\}, \quad \text{ПФ числа фотонов}$$

регистрируемых из дополнительной области засветки (коррекция профиля засветки)

$$G_{corr}(\xi) = \exp \left\{ \sum_i \langle C \rangle_i \sum_{k=1}^{\infty} \left( (\xi - 1)^k q_i^k T^k F_k \chi_{Gk} / k! \right) \right\} \quad (\text{для коррекции}$$

первого порядка представляет собой ПФ стационарного потока Пуассона с интенсивностью  $\sum_i \langle C \rangle_i q_i T F_1 \chi_{G1}$  и ПФ фонового сигнала  $G_{bg}(\xi) = \exp\{\lambda T(\xi - 1)\}$ .

В разделе 3.2 показана эквивалентность методов РСН, FIDA, FCA путем вывода использующихся в них теоретических моделей из полученной ПФ числа фотоотсчетов. Различие методов РСН и FIDA проявляется только в используемой аппроксимации профиля засветки и алгоритмических подходах их реализации.

В разделе 3.3 предложен метод генерации начальных приближений (НП) для метода FIDA. Метод основан на статистическом методе моментов и может использоваться как самостоятельный быстрый неитерационный метод анализа РЧФ. В терминах факториальных кумулянтов (ФК) РЧФ  $K_k$  система нелинейных уравнений, используемая для оценки всех параметров метода FIDA, имеет вид

$$\begin{aligned} K_1 &= (\lambda + \sum_i N_{FIDAi} q_{FIDAi} T) \\ K_k &= A_0 B_0^k (2ak + 6b + k^2) / k^4 \times \sum_i N_{FIDAi} q_{FIDAi}^k T^k, \quad k = 2, 3, \dots, \end{aligned} \quad (9)$$

где  $N_{FIDA} = \langle C \rangle \chi_1^2 / \chi_2$ ,  $q_{FIDA} = q \chi_2 / \chi_1$ ,  $A_0 = v / 8u^2$ ,  $B_0 = 8u / v$ ,  $u = 2a + 6b + 1$ ,  $v = 2a + 3b + 2$ ,  $a$  и  $b$  – параметры коррекции профиля засветки. Получены системы нелинейных уравнений и предложен неитерационный способ их решения для однокомпонентной системы с известной и оцениваемой интенсивностью фонового шума, а также для двухкомпонентной системы с известными параметрами  $a$ ,  $b$  и известной интенсивностью фонового шума. Предложен эффективный алгоритм нахождения НП для двухкомпонентной системы, заключающийся в делении диапазона изменения инструментальных параметров  $a$ ,  $b$  на несколько частей, и последующего решения системы (9) в узлах полученной решетки. Начальными приближениями становится набор параметров с наименьшим значением критерия  $\chi^2$ .

НП были протестированы на смоделированных и измеренных данных. Применение НП позволяет значительно ускорить анализ данных (в тестовых примерах на измеренных данных в среднем в 7 раз) и повысить его устойчивость (в тестовых примерах вероятность получения вычислительных ошибок или неверных результатов была снижена почти на 50%).

Исследование НП позволило провести проверку идентифицируемости модели в методе FIDA. Показано, что существует линия разрыва в области определения параметров и при определенных значениях ФК и фиксации параметра  $\lambda$  модель характеризуется тремя эквивалентными наборами параметров (смотри рисунок 4). Поскольку физически значимые оценки концентрации и яркости остаются неизменными для всех трех наборов параметров, выбор набора параметров может быть произвольным.

В разделе 3.4 разработан метод анализа РЧФ, основанный на полученной в разделе 3.1 ПФ числа фотоотсчетов с коррекцией профиля засветки. Показано, что метод РСН с коррекцией вида (7) имеет зависимость числа молекул и их яркости

от параметров коррекции, что не позволяет сравнивать полученные оценки напрямую и проводить глобальный анализ со связыванием зависимых параметров. Для устранения указанного недостатка предложено использовать дополнительное уравнение нормализации для определения значения начального параметра  $B_0$  (в методе РСН  $B_0 = 1$ , что и является источником возникновения зависимости при вводе коррекции). ПФ числа фотоотсчетов (8) примет вид

$$G(\xi) = \exp \left\{ \lambda T(\xi - 1) + \frac{(1 + F_2)}{(1 + F_1)^2} \sum_i N_{2MNi} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi - 1)2\sqrt{2}(1 + F_1)q_{2MNi}T)^k (1 + F_k)}{(1 + F_2)^k k!(2k)^{3/2}} \right\}, \quad (10)$$

где введены новые обозначения  $N_{2MN} = \langle C \rangle \chi_1^2 / \chi_2$  и  $q_{2MN} = q\chi_2 / \chi_1$ .

Произведенная замена переменных совпадает с заменой, сделанной при выводе НП для метода FIDA, что означает  $N_{FIDA} = N_{2MN}$ ,  $q_{FIDA} = q_{2MN}$  и подтверждает эквивалентность использованных нормализаций.

Программная реализация метода выполнена в Borland Builder 5.0. РЧФ  $P(n)$  находилось путем вычисления ПФ (10) и применения обратного преобразования Фурье (IFT)  $P(n) = IFT(G(e^{i\varphi}))$ ,  $n = 0, 1, \dots, m - 1$ ,  $\varphi = 2\pi n/m$ . Анализ РЧФ основан на методе наименьших квадратов и предполагает подгонку теоретического распределения к экспериментально полученному. Тестирование метода, проведенное на смоделированных и измеренных данных, показало, что разработанный метод характеризуется: большей чувствительностью при разрешении многокомпонентных систем (по сравнению с методом FIDA); отсутствием зависимости между параметрами модели, выявленной в методе РСН с однотипной коррекцией профиля засветки; большей точностью определения молекулярной яркости и большей скоростью вычислений (в 10 и более раз, смотри рисунок 5) в сравнении с методами РСН, FIDA.

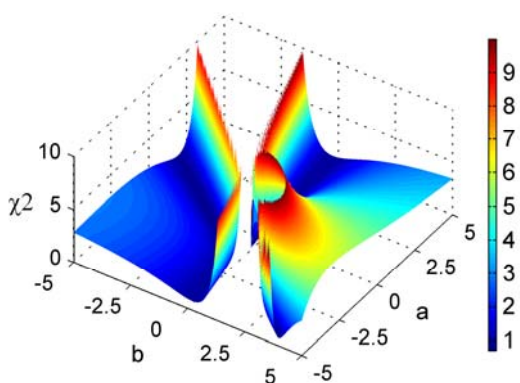


Рисунок 4 – Поверхность  $\chi^2$ , построенная при варьировании  $a$  и  $b$

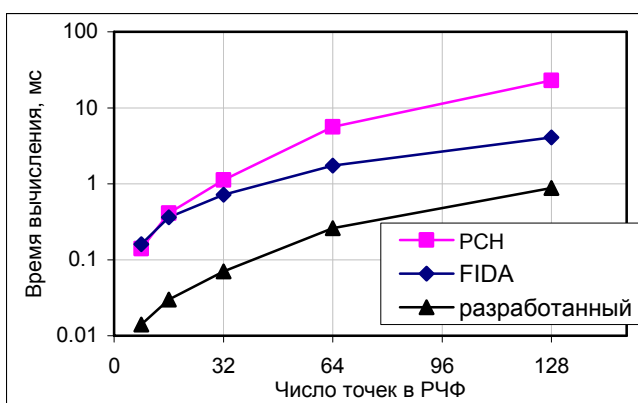


Рисунок 5 – Сравнение методов по скорости вычисления

Глава 4 посвящена разработке моделей и методов кумулянтного анализа РЧФ в ФФС. В разделе 4.1 получены аналитические выражения для

факториальных кумулянтов распределения числа фотоотсчетов с коррекцией профиля засветки. Выведенная в разделе 3.1 ПФ числа фотоотсчетов позволяет получить выражения для ФК любого порядка путем дифференцирования ПФ

$$\begin{aligned} K_1 &= \lambda T + (1 + F_1) \chi_{G1} \sum_i \langle C \rangle_i q_i T \\ K_k &= (1 + F_k) \chi_{Gk} \sum_i \langle C \rangle_i q_i^k T^k, \quad k = 2, \dots \end{aligned} \quad (11)$$

Для гауссовского распределения  $\chi_{Gk} = B_0^k k^{-3/2} (\pi/2)^{3/2} w_0^2 z_0$ . Так как объем наблюдения во флуоресцентном флуктуационном эксперименте не может быть измерен напрямую, значения параметров  $\omega_0$  и  $z_0$  неизвестны, и модель является неидентифицируемой без дополнительных знаний (условий нормализации). При нормализации к эффективному объему  $\langle C \rangle_i = N_{eff i} / V_{eff}$ ,  $V_{eff} = \chi_1^2 / \chi_2$ , применяемому традиционно в методе FCS, и коррекции первого порядка  $F_1 \neq 0, F_k = 0, k = 2, 3, \dots$  получим

$$\begin{aligned} K_1 &= \lambda T + \sum_i N_{eff Ci} q_{Ci} T / (2\sqrt{2}(1 + F_1)) \\ K_k &= \gamma_2 \gamma_k \sum_i N_{eff Ci} q_{Ci}^k T^k / (1 + F_1)^2, \quad k = 2, 3, \dots, \end{aligned} \quad (12)$$

где  $q_{Ci} = B_0 q_i$ ,  $N_{eff Ci}$  - число молекул в скорректированном объеме и  $\gamma_k = \chi_k / \chi_1$  - гамма-фактор, равный отношению интегралов от профиля засветки. Для гауссовской аппроксимации  $\gamma_k = 1/k^{3/2}$  при  $B_0 = 1$ . При нормализации к объему наблюдения  $\langle C \rangle_i = N_{PSFi} / V_{PSF}$ ,  $V_{PSF} = \chi_1$  соответственно получим

$$\begin{aligned} K_1 &= \lambda T + \sum_i N_{PSFCi} q_{Ci} T \\ K_k &= \gamma_2 (1 + F_k) \sum_i N_{PSFCi} q_{Ci}^k T^k / (1 + F_1), \quad k = 2, 3, \dots, \end{aligned} \quad (13)$$

где  $N_{PSFCi} = N_{PSFi} / B_0$ . Для отличия методов кумулянтного анализа, основанных на полученных выражениях, от метода FCA будем добавлять к названию метода префикс OFC. Введение коррекции профиля засветки приводит к появлению зависимости параметров  $q_C$  и  $N_{PSFCi}$  от параметра  $B_0$ . Как и для аналогичного метода анализа РЧФ (смотри раздел 3.4), зависимость параметров можно устранить, введя нормализацию на объем наблюдения и яркость в фокусе засветки (обозначим 2MN FCA)

$$\begin{aligned} K_1 &= \lambda T + \sum_i N_{2MNi} q_{2MNi} T \\ K_k &= \gamma_2 \gamma_k \frac{(1 + F_2)(1 + F_k)}{(1 + F_1)^2} \left( \frac{2\sqrt{2}(1 + F_1)}{1 + F_2} \right)^k \sum_i N_{2MNi} (q_{2MNi} T)^k. \end{aligned} \quad (14)$$

Выражения для ФК с аппроксимацией профиля засветки экспоненциальной функцией одного аргумента  $B(\mathbf{r}) = B_0 e^{-x}$  с преобразованием элемента объема в виде полинома этого аргумента  $dr/dx = A_0 (x + ax^2 + bx^3)$  (в дальнейшем

полиномиальная аппроксимация) и нормализацией на объем наблюдения и яркость в фокусе засветки примут вид (обозначим POLY FCA)

$$\begin{aligned} K_1 &= \lambda T + \sum_i N_{POLYi} q_{POLYi} T \\ K_2 &= \sum_i N_{POLYi} q_{POLYi}^2 T^2 \\ K_k &= A_0 B_0^k (2ak + 6b + k^2) / k^4 \times \sum_i N_{POLYi} q_{POLYi}^k T^k, \end{aligned} \quad (15)$$

где  $N_{POLYi} = \langle C \rangle_i \chi_1^2 / \chi_2$ ,  $q_{POLYi} = q_i \chi_2 / \chi_1$ ,  $A_0 = v / 8u^2$ ,  $B_0 = 8u / v$ ,  $u = 2a + 6b + 1$ ,  $v = 2a + 3b + 2$ . Полученные теоретические выражения (модели) позволяют улучшить качество анализа экспериментальных данных вследствие введения коррекции профиля засветки. Другим достоинством разработанных моделей является отсутствие зависимости количества параметров модели от количества анализируемых кумулянтов и возможность анализа одиночного набора кумулянтов без проведения калибровочного эксперимента (что характерно для ранее предложенной коррекции профиля засветки в методе FCA).

В разделе 4.2 показано, что оценки яркости и количества молекул в методах FCA и РСН с коррекцией профиля засветки зависят от параметров коррекции, что не позволяет проводить глобальный анализ со связыванием зависимых параметров, а также сравнивать результаты нескольких экспериментов. Найденные в разделе 4.1 выражения для ФК позволили получить формулы пересчета оценок яркости

$$q_C = (1 + F_1)q / (1 + F_2), \quad q_{2MN} = q_{POLY} = \gamma_2 q, \quad q_{2MN} = q_{POLY} = \gamma_2 q_C (1 + F_2) / (1 + F_1) \quad (16)$$

и количества молекул в объеме наблюдения

$$N_{POLY} = N_{2MN} = N_{eff} = N_{effC} = N_{PSF} / \gamma_2, \quad N_{PSFCi} = N_{PSFi} (1 + F_2) / (1 + F_1). \quad (17)$$

Использование формул (16) и (17) позволяет получить независимые от параметров коррекции значения яркости и количества молекул, следовательно, сравнивать результаты, полученные при различных значениях параметров коррекции.

Разработан алгоритм генерации НП для всех предложенных моделей в кумулянтном анализе. Например, для однокомпонентной модели с коррекцией профиля засветки в виде (7) и нормализации на  $V_{eff}$  оценки всех параметров можно найти по формулам (параметр  $\lambda$  известен)  $N_{effC} = (K_1 - \lambda T)^2 / K_2$ ,  $q_C = 8\sqrt{3}K_4 / (9K_3T)$ ,  $F_1 = 64\sqrt{3}K_4^2(K_1 - \lambda T) / (243K_3^3) - 1$ ,  $F_2 = 16\sqrt{2}K_2K_4 / (27K_3^2) - 1$ , а для двухкомпонентной – необходимо решение следующей системы нелинейных уравнений

$$\begin{aligned} 2\sqrt{2}(1 + F_1)(K_1 - \lambda T) / (1 + F_2) &= (N_{effC1}q_{C1} + N_{effC2}q_{C2})T \\ 8(1 + F_1)^2 K_2 / (1 + F_2)^2 &= (N_{effC1}q_{C1}^2 + N_{effC2}q_{C2}^2)T^2 \\ 6\sqrt{6}(1 + F_1)^2 K_3 / (1 + F_2) &= (N_{effC1}q_{C1}^3 + N_{effC2}q_{C2}^3)T^3 \\ 8\sqrt{8}(1 + F_1)^2 K_4 / (1 + F_2) &= (N_{effC1}q_{C1}^4 + N_{effC2}q_{C2}^4)T^4. \end{aligned} \quad (18)$$

Систему (18) можно свести к полиному третьего порядка относительно  $q_1$  и решить как численно, так и аналитически. Разработанный алгоритм позволяет также генерировать НП для анализа РЧФ с однитипной аппроксимацией профиля засветки. Результаты тестирования на смоделированных и измеренных данных показали эффективность НП.

В разделе 4.4 приведены результаты тестирования метода кумулянтного анализа с предложенной коррекцией профиля засветки на смоделированных и измеренных данных. На рисунке 6 и в таблице 2 представлены результаты кумулянтного анализа красителя Alexa 488, а также результаты методов FCA, FIDA и PCH для сравнения. Экспериментальные данные были предоставлены кафедрой паразитологии Медицинского центра Лейденского университета. Все измерения были выполнены с помощью СРОД ConfoCor 2 (Carl Zeiss, Germany). Яркость, пересчитанная к истинным значениям (соответственно (16)) показана в скобках. Как видно из представленных результатов, применение коррекции значительно улучшает качество анализа измеренных данных.

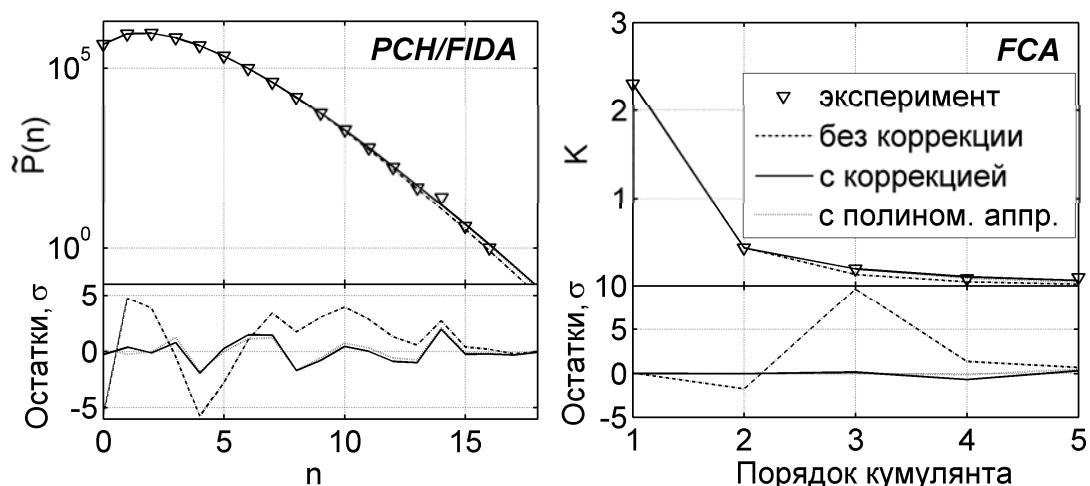


Рисунок 6 – Результаты анализа красителя Alexa 488

Таблица 2 – Результаты анализа Alexa 488

Метод	$\chi^2$	Параметр			
		$N$	$q \cdot 10^4$	$F/a$	$b$
PCH	12.0	12.44 [12.09; 12.85]	6.52 [6.31; 6.73]	–	–
FCA	48.8	12.18 [11.16; 13.37]	6.66 [6.07; 7.24]	–	–
OFC PCH	1.39	12.29 [12.15; 12.44]	10.48 [9.53; 11.23] (6.60)	0.57 [0.45; 0.70]	–
OFC FCA	0.59	12.28 [12.05; 12.56]	10.21 [8.74; 11.66] (6.61)	0.55 [0.32; 0.77]	–
FIDA	1.37	12.29 [12.12; 12.44]	2.33 [2.30; 2.36] (6.59)	-1.13 [-1.27; -1.06]	0.24 [0.16; 0.27]
POLY FCA	0.38	12.28 [12.05; 12.50]	2.34 [2.29; 2.38] (6.62)	-1.05 [-1.32; -0.92]	0.23 [0.08; 0.26]
2MN FCA	0.59	12.29 [12.05; 12.56]	2.34 [2.31; 2.36] (6.62)	0.55 [0.32; 0.77]	–



В **Приложениях** приводятся вспомогательные результаты к главам 2-4. Приведены примеры применения аналитических моделей систем преобразования потоков событий; расчет первых 4 факториальных кумулянтов; решение систем уравнений, применяемых для генерации НП; сведение трехмерного интеграла к одномерному в выражениях, использующих асимметричное гауссовское распределение; рассмотрена нормализация на объем и яркость в фокусе засветки в методе РСН и приведены структуры данных БД измерений и результатов анализа во время разрешимой флуоресцентной спектроскопии.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

### **Основные научные результаты диссертации**

1. Разработаны аналитические и имитационные модели систем преобразования потоков случайных событий, включающие модели последовательного преобразования, слияния и разветвления случайных потоков, а также модели потоков фотонов с заданной автокорреляционной функцией и распределением числа фотоотсчетов. На основе полученных моделей создан программный комплекс имитационного моделирования систем регистрации и обработки данных ФФС, позволяющий создавать сложные модели без необходимости изменения программного кода и последующей компиляции программы. Использование комплекса позволило оценить эффективность разработанных методов анализа данных и влияние инструментальных искажений системы регистрации на анализируемые характеристики потоков фотоотсчетов. [3, 4, 5, 7, 10, 11, 12, 13, 21, 22, 23]

2. Получено выражение для производящей функции числа фотоотсчетов с коррекцией профиля засветки. Показано, что известные методы анализа распределения числа фотоотсчетов могут быть выведены с использованием полученной производящей функции. Разработан метод анализа распределения числа фотоотсчетов, характеризующийся отсутствием зависимости яркости и количества молекул в объеме наблюдения от параметров коррекции профиля засветки, а также значительно большей скоростью вычислений в сравнении с ранее предложенными методами. [6, 17]

3. Предложен эффективный метод генерации начальных приближений для анализа распределения числа фотоотсчетов и кумулянтного анализа, позволяющий находить оценки яркости и количества молекул одно- и двухкомпонентных систем, а также параметров коррекции профиля засветки. Показано, что его применение позволяет существенно увеличить скорость схождения к глобальному минимуму, а также снизить вероятность получения вычислительных ошибок. Предложенный метод может быть также использован как самостоятельный метод быстрой оценки параметров исследуемого вещества. [3, 5, 16, 18]

4. Получены аналитические выражения для факториальных кумулянтов распределения числа фотоотсчетов с коррекцией профиля засветки. Применение полученных выражений позволяет проводить анализ одиночного набора кумулянтов без постановки калибровочного эксперимента и устранить зависимость числа оцениваемых параметров от количества анализируемых кумулянтов. Получены формулы пересчета яркости и количества молекул в объеме наблюдения при использовании различных аппроксимаций профиля засветки и выбранной нормализации. [5, 9, 17, 18]

5. Разработаны базы данных измерений и результатов анализа во флуоресцентной спектроскопии, а также алгоритмы предварительной обработки данных, включающие расчет авто(кросс)корреляционной функции, распределения числа фотоотсчетов и факториальных кумулянтов распределения числа фотоотсчетов с возможностью режекции выбросов интенсивности. Разработанные базы данных вошли в состав трех программных комплексов: FCS Data Processor, TRFA Data Processor и TRFD Fitting Software. [1, 2, 3, 4, 8, 14, 15, 19, 20]

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Разработанный программный комплекс имитационного моделирования системы преобразования потоков случайных событий, обладая высокой степенью общности, обеспечивает возможность моделирования широкого круга систем регистрации потоков фотонов во флуоресцентной спектроскопии. Комплекс может быть использован также и как основа лабораторного практикума.

Применение разработанных моделей и методов анализа распределения числа фотоотсчетов и факториальных кумулянтов распределения числа фотоотсчетов позволит получать более достоверные оценки параметров исследуемого вещества вследствие введения коррекции профиля засветки. Устранение зависимости между параметрами модели в случае коррекции профиля засветки позволит повысить точность определения количества молекул и характеристической яркости, а также проводить глобальный анализ различных характеристик со связыванием этих параметров. Применение начальных приближений позволит увеличить производительность и устойчивость анализа данных при минимизации усилий исследователя (экспериментатора).

Применение разработанной на основе технологии реляционных баз данных системы хранения и обработки данных позволит поднять производительность анализа данных ФФС. Разработанные базы данных, модели и методы анализа данных ФФС реализованы в программном комплексе FCS Data Processor. В настоящее время FCS Data Processor используется в мире для исследования сложных биологических образцов рядом научных лабораторий. В частности, FCS Data Processor использовался для проведения кумулянтного анализа структуры GFP - CLIP-170, для анализа РЧФ флуоресцентно помеченных рецепторов BRI1, AtSERK1(3) и для анализа процессов жизнедеятельности клетки по методу FCS.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

### Статьи в научных журналах

1. Thermal stability of a flavoprotein assessed from associative analysis of polarized time-resolved fluorescence spectroscopy / A.V. Digris, V.V. Skakun, E.G. Novikov, A. van Hoek, A.J.W.G. Visser // *Eur. Biophys. J.* – 1999. – № 28. – P. 526-531.
2. Excitation Energy Migration in a Photonic Dye-Zeolite Antenna: Computational Techniques / M. Meyer, M. Yatskou, M. Pfenniger, S. Huber, G. Calzaferri, A. Digris, V. Skakun, E. Barsukov, V.V. Apanasovich // *J. Comput. Methods in Sci. and Eng. (JCMSE)*. – 2003. – № 3. – P. 201-208.
3. Integrated data analysis in time-resolved fluorescence and fluorescence correlation spectroscopy / M.M. Yatskou, A.V. Digris, E.G. Novikov, V.V. Skakun and V.V. Apanasovich // *Recent Research Developments in Physical Chemistry*. – 2004. – Vol. 7, Part I. – P. 165-183.
4. Global Analysis of Fluorescence Fluctuation Data / V.V. Skakun, M.A. Hink, A.V. Digris, R. Engel, E.G. Novikov, V.V. Apanasovich, A.J.W.G. Visser // *Eur. Biophys. J.* – 2005. – № 34. – P. 323–334.
5. Initial Guesses Generation for Fluorescence Intensity Distribution Analysis / V.V. Skakun, E.G. Novikov, V.V. Apanasovich, H.J. Tanke, A.M. Deelder, O.A. Mayboroda // *Eur. Biophys. J.* – 2006. – № 35(5). – P. 410-423.
6. Скакун, В.В. Анализ распределения числа фотоотсчетов с коррекцией профиля засветки в одномолекулярной флукуационной спектроскопии / В.В. Скакун, В.В. Апанасович // *Вестник Белорусского гос. ун-та. Сер. 1, Физика. Математика. Информатика*. – 2008. – № 2. – С. 31–35.

### Статьи в сборниках научных трудов и материалах научных конференций

7. Skakun, V.V. Modeling of discrete stochastic system with a sequence of event transformation / V.V. Skakun, V.V. Apanasovich // *Intelligent Technologies in Human-Related Sciences: proceedings of the International Conference ITHURS-96, Leon, Spain, Jul. 5-7, 1996 : in 2 vol. / Univ. de Leon; editor: E.L. Gonzalez. – Leon, 1996. – Vol. 2. – P. 395–398.*
8. Анализ фазовых спектров затухания люминесценции фотонной антенны на цеолит-красителях / В.В. Апанасович, Е.А. Барсуков, А.В. Дигрис, В.В. Скакун, Н.Н. Яцков, М. Майер, Ш. Хубер, Д. Калсафери // *Радиофизика и электроника: Сб. науч. тр.* – Минск: БГУ, 2003. - Вып. 6.– С. 35-40.
9. Скакун, В.В. Кумулянтный анализ потоков фотонов в флуоресцентной флукуационной спектроскопии / В.В. Скакун, В.В. Апанасович // *Современные информационные компьютерные технологии: сб. науч. ст. Междунар. науч. конф.*

mcIT-2008, Гродно, 21-24 апр. 2008 г. : в 2 ч. / Гродн. гос. унив.; редкол.: Е. А. Ровба [и др.]. – Гродно, 2008. – Ч. 2. – С. 258-261.

### Тезисы

10. Скакун, В.В. Интегрированная система имитационного моделирования систем преобразования случайных потоков / В.В. Скакун // Анализ и применение систем и сетей массового обслуживания: материалы науч. конференции, Минск, 6 - 8 дек. 1994 г. / Белорус. гос. ун-т. – Минск, 1994. – С. 126.

11. Apanasovich, V.V. Nonlinear dead time distortions of random event flow characteristics in detection systems / V.V. Apanasovich, E.E. Prolisko, V.V. Skakun // Nonlinear Phenomena in Complex Systems: Third Annual Seminar: proceedings of the International conference NPCCS'94, Polatsk, Feb. 14-16, 1994 / Institute of Physics; ed.: V. I. Kuvshinov [et al.]. – Minsk, 1995. – P. 374 - 375.

12. Skakun, V.V. Program complex for simulation of point processes transformation systems / V.V. Skakun, V.V. Apanasovich // Computer Data Analysis and Modeling: proc. of the International Conference CDAM, Minsk, Sep. 4-8, 1995 : in 2 vol. / Bel. State Univ.; eds.: Y. Kharin [et al.]. – Minsk, 1995. – Vol. 1. – P. 20 - 21.

13. Скакун, В.В. Анализ систем последовательного преобразования потоков случайных событий / В.В. Скакун, В.В. Апанасович // Исследование систем и сетей массового обслуживания: материалы Междунар. науч. конф. (BWWQT-96), Гродно, 29 – 31 янв. 1996 / Гродненский. гос. ун-т; редкол.: М. А. Матальцкий [и др.]. – Гродно, 1996. – С. 11.

14. Fitting software for fluorescence correlation spectroscopy / A.V. Digris, V.V. Skakoun, E.G. Novikov, V.V. Apanasovich, M.A. Hink, A.J.W.G. Visser // Europ. conf. on the spectroscopy of biological molecules: proc. of the Int. conf., Twente, Aug. 29 to Sep. 2, 1999 / Spectroscopy of Biological Molecules: New Directions; editors: J. Greve [et al.]. – Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1999. – P. 421-422.

15. Global Analysis of fluorescence fluctuation data / A.V. Digris, V.V. Skakoun, E.G. Novikov, V.V. Apanasovich, M.A. Hink, A.J.W.G. Visser // Biophysical Society meeting: A0 poster, New Orleans, Feb. 12 - 16, 2000 // Biophysical J. – 2000. – № 78. – P. 440A.

16. Initial Guesses Generation for Fluorescence Intensity Distribution Analysis / V.V. Skakun, E.G. Novikov, V.V. Apanasovich, H.J. Tanke, A.M. Deelder, O.A. Mayboroda // The 7<sup>th</sup> International Carl Zeiss sponsored Workshop on FCS and Related Methods: proc. of the Int. conf., Dresden, Oct. 5 - 6, 2004 / Workshop abstracts [Electronic resource]. – 2004. – Mode of access: [www.zeiss.de/fcsevents/](http://www.zeiss.de/fcsevents/). – Date of access: 08.03.05.

17. Skakun, V.V. Correction for out-of-focus emission in fluorescence fluctuation spectroscopy; generalization of the algorithms / V.V. Skakun, E.G. Novikov, O.A. Mayboroda // The 9<sup>th</sup> Carl Zeiss sponsored Workshop on FCS and related methods: A1

poster, Stockholm, Dec. 4 - 6, 2006 / Workshop abstracts [Electronic resource]. – 2006. – Mode of access: <http://www.biomolphysics.kth.se/meetings/FCS-2006.html>. – Date of access: 17.01.07.

18. Шингарев, И.П. Начальные приближения для метода анализа распределения счета фотонов двухкомпонентной системы / И.П. Шингарев, В.В. Скакун // Физика конденсированного состояния: тез. докл. XVI Республиканской науч. конф. аспирантов, магистрантов и студентов, Гродно, 23-25 апр. 2008 г.: в 2 ч. / Гродненский. гос. унив.; редкол.: Е. А. Ровба [и др.]. – Гродно, 2008. – Ч. 1. – С. 239 - 240.

#### **Учебно-методические издания**

19. Змитрович, А.И. Базы данных и знаний: учебное пособие. / А.И. Змитрович, В.В. Апанасович, В.В. Скакун. – Минск: Издательский центр БГУ, 2007. – 364 с.

20. Скакун, В.В. Системы управления базами данных: пособие для студентов факультета радиофизики и электроники / В.В. Скакун. – Минск: БГУ, 2008. – 114 с.

#### **Программные средства**

21. Скакун, В.В. Интегрированная среда имитационного моделирования систем преобразования случайных потоков / В.В. Скакун, В.В. Апанасович // Каталог фонда программных средств. Программные продукты для персональных ЭВМ. – Минск: изд. центр БГУ, 1995. – Выпуск 5, ч. 2. – С. 19-20.

22. Апанасович, В.В. «TRANS» - интегрированная система имитационного моделирования систем преобразования потоков случайных событий / В.В. Апанасович, В.В. Скакун // Каталог фонда программных средств. Программные продукты для персональных ЭВМ. – Минск: изд. центр БГУ, 1999. – Выпуск 9, ч. 2. – С. 16-17.

23. Апанасович, В.В. «VOLNA» - интегрированная система для анализа временных и корреляционных характеристик случайных процессов в электронных приборах / В.В. Апанасович, В.В. Скакун // Каталог Фонда Программных Средств, программные продукты для персональных ЭВМ. – Минск: изд. центр БГУ, 2001. – Выпуск 10, Ч. 2. – С. 38.

## РЭЗІЮМЭ

Скакун Віктар Васільевіч

### **Мадэляванне і аналіз працэсаў рэгістрацыі і апрацоўкі выпадковых патокаў падзей у сістэмах флуарэсцэнтнай флуктуацыйнай спектраскапіі**

Ключавыя словы: паток фотаадлікаў, сістэма рэгістрацыі і апрацоўкі дадзеных, мадэляванне, флуарэсцэнтная флуктуацыйная спектраскапія (ФФС).

Мэтаі працы з'яўляецца распрацоўка аналітычных і імітацыйных мадэляў дынамікі функцыянавання сістэм рэгістрацыі патокаў фатонаў, а таксама стварэнне метадаў, алгарытмаў і праграмных сродкаў апрацоўкі і аналізу дадзеных ФФС.

Распрацаваны праграмны комплекс імітацыйнага мадэлявання сістэм рэгістрацыі і апрацоўкі дадзеных у ФФС, які прадстаўляе аналізаваную сістэму ў выглядзе паслядоўнасці базавых пераўтваральнікаў і які дазваляе ствараць складаныя мадэлі, утвораныя з вялікай колькасці блокаў пераўтварэння, без неабходнасці змены праграмнага кода.

Прапанаваны метады аналізу размеркавання колькасці фотаадлікаў (РКФ), атрыманы на аснове выведзенай вырабляльнай функцыі колькасці фотаадлікаў з карэкцыйнай профіля засвятлення, які характарызуецца адсутнасцю залежнасці ацэньванай яркасці і колькасці малекул ад параметраў карэкцыі профіля засвятлення і які дазваляе значна паменшыць час аналізу дадзеных у параўнанні з раней прапанаванымі метадамі. Распрацаваны метады генерацыі пачатковых набліжэнняў для аналізу РКФ і кумулянтнага аналізу, які дазваляе знаходзіць адзнакі яркасці і колькасці малекул адна- і двухкампанентных сістэм сумесна з параметрамі карэкцыі профіля засвятлення. Атрыманыя аналітычныя выразы для фактарыяльных кумулянтаў РКФ з карэкцыйнай профіля засвятлення, якія характарызуюцца адсутнасцю залежнасці колькасці ацэньваных параметраў ад колькасці аналізаваных кумулянтаў і якія дазваляюць праводзіць аналіз асобнага набору кумулянтаў без пастаноўкі калібравальнага эксперыменту. Знойдзеныя формулы пераліку адзнак яркасці і колькасці малекул пры выкарыстанні розных нармалізацый, што выкарыстоўваюцца ў метадах аналізу РКФ.

Распрацаваныя структуры дадзеных вымярэнняў і вынікаў аналізу, на аснове якіх створаныя рэляцыйныя базы дадзеных, што дазваляюць аўтаматызаваць працэс апрацоўкі і аналізу дадзеных у ФФС.

Вынікі працы выкарыстоўваюцца пры мадэляванні сістэм рэгістрацыі і аналізе дадзеных у ФФС.

## РЕЗЮМЕ

Скакун Виктор Васильевич

### **Моделирование и анализ процессов регистрации и обработки случайных потоков событий в системах флуоресцентной флукуационной спектроскопии**

Ключевые слова: поток фотоотсчетов, система регистрации и обработки данных, моделирование, флуоресцентная флукуационная спектроскопия (ФФС).

Целью работы является разработка аналитических и имитационных моделей динамики функционирования систем регистрации потоков фотонов, а также создание методов, алгоритмов и программных средств обработки и анализа данных ФФС.

Разработан программный комплекс имитационного моделирования систем регистрации и обработки данных в ФФС, представляющий анализируемую систему в виде последовательности базовых преобразователей и позволяющий создавать сложные модели, состоящие из большого числа блоков преобразования, без необходимости изменения программного кода.

Предложен метод анализа распределения числа фотоотсчетов (РЧФ), разработанный на основе полученной производящей функции числа фотоотсчетов с коррекцией профиля засветки, характеризующийся отсутствием зависимости яркости и количества молекул в объеме наблюдения от параметров коррекции профиля засветки вследствие предложенной нормализации и позволяющий значительно уменьшить время анализа данных в сравнении с ранее предложенными методами. Разработан метод генерации начальных приближений для анализа РЧФ и кумулянтного анализа, позволивший находить оценки яркости и количества молекул одно- и двухкомпонентных систем совместно с параметрами коррекции профиля засветки. Получены аналитические выражения для факториальных кумулянтов РЧФ с коррекцией профиля засветки, характеризующиеся отсутствием зависимости числа оцениваемых параметров от количества анализируемых кумулянтов и позволяющие проводить анализ одиночного набора кумулянтов без постановки калибровочного эксперимента. Найдены формулы пересчета оценок яркости и количества молекул при использовании различных нормализаций, используемых в методах анализа РЧФ и кумулянтов РЧФ.

Разработаны структуры данных измерений и результатов анализа, на основе которых созданы реляционные базы данных, позволяющие автоматизировать процесс обработки и анализа данных в ФФС.

Результаты работы используются при моделировании систем регистрации и анализе данных в ФФС.

## SUMMARY

Victor Skakun

### **Modeling and Analysis of Random Flows of Events in Registration and Processing Systems of Fluorescence Fluctuation Spectroscopy**

Keywords: photon counts, random flows of events, modeling, data registration and processing systems, fluorescence fluctuation spectroscopy (FFS).

The aim of the work is a development of analytical and simulation models of photon registration systems, as well as development of data analysis and data processing methods, algorithms and computer programs in FFS.

Computer simulation program of photon registration systems in FFS is developed. The program represents a registration system in a form of sequence of elementary events transformation blocks and is designed to build up complex models without a need in source code modification and subsequent compilation.

A new method of photon counting distribution (PCD) analysis in FFS based on derived photon counting generation function with brightness profile correction is proposed. It takes into account possible deviations of brightness profile from assumed Gaussian approximation, makes estimators of brightness and number of molecules independent from profile correction parameters due to applied normalization and has ten times less computation time in comparison with earlier proposed methods. Method for initial guesses generation for cumulants and photon counting distribution analysis is developed. This method allows estimating profile correction parameters, brightness and number of molecules of one and two component samples. Analytical expressions for cumulants of PCD with brightness profile correction are derived. Using the derived expressions in the cumulants analysis of FFS data is advantageous since it eliminates dependence of a number of fitted parameters from a number of analyzed cumulants and grants an ability to analyze a single set of cumulants without performing a calibration experiment. Conversion formulas based on obtained expressions are derived for recalculation of brightness and number of molecules for different normalizations used in methods for analysis of PCD and cumulants of PCD.

The data structures are developed to store FFS measured data and analysis results. Relational databases built on the developed data structures are created to automate processing and analysis of FFS data.

The results of work are applied for modeling of photon registration systems and data analysis in single molecule fluorescence spectroscopy.