

УДК 535.37

## РАСЧЕТ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА ФОТООТСЧЕТОВ В СИСТЕМАХ РЕГИСТРАЦИИ ФЛУКТУАЦИЙ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

В. В. СКАКУН<sup>1)</sup>, В. В. АПАНАСОВИЧ<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь

Исследование молекулярного состава вещества на основе расчета распределения числа фотоотсчетов является эффективным методом анализа экспериментальных данных во флуоресцентной флукуационной спектроскопии. Этот метод относится к числу неинвазивных и позволяет изучать процессы димеризации молекулярных комплексов в живых клетках, что востребовано в биологии, медицине и фармацевтике. Получение теоретического распределения числа фотоотсчетов сопряжено с рядом трудностей как алгоритмического, так и вычислительного характера. Проведен сравнительный анализ трех основных методов расчета распределения числа фотоотсчетов и предложена методика, гарантирующая его корректное вычисление во всем диапазоне изменения параметров модели и ширины канала регистрации. Вывод аналитических выражений представлен для случая гауссовской аппроксимации профиля засветки с коррекцией на внефокусное излучение и нормировки на первые два момента профиля. Другие способы аппроксимации профиля засветки и нормировки оцениваемых параметров можно осуществить аналогично. Предложенная методика программно реализована в пакете *FFS Data Processor*, который используется для глобального анализа потоков фотоотсчетов во флуоресцентной флукуационной спектроскопии и обеспечивает эффективный расчет распределения числа фотоотсчетов в широком диапазоне оцениваемых параметров.

**Ключевые слова:** флуоресцентная флукуационная спектроскопия; распределение числа фотоотсчетов; РФФ; FIDA; РСН; производящая функция числа фотоотсчетов.

## CALCULATION OF PHOTON COUNTING DISTRIBUTION IN FLUORESCENCE INTENSITY FLUCTUATIONS REGISTRATION SYSTEMS

V. V. SKAKUN<sup>a</sup>, V. V. APANASOVICH<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Belarusian State University, 4 Niezaliežnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

Corresponding author: V. V. Skakun (skakun.victor@gmail.com)

The study of the molecular composition of a substance based on the calculation of photon counting distribution is an effective method for analysing experimental data in fluorescence fluctuation spectroscopy. This method is non-invasive and makes it possible to resolve the processes of dimerisation of molecular complexes in living cells, which is in demand

### Образец цитирования:

Скакун ВВ, Апанасович ВВ. Расчет распределения числа фотоотсчетов в системах регистрации флукуаций интенсивности флуоресценции. *Журнал Белорусского государственного университета. Физика.* 2023;2:22–38.  
<https://doi.org/10.33581/2520-2243-2023-2-22-38>

### For citation:

Skakun VV, Apanasovich VV. Calculation of photon counting distribution in fluorescence intensity fluctuations registration systems. *Journal of the Belarusian State University. Physics.* 2023;2:22–38. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2520-2243-2023-2-22-38>

### Авторы:

**Виктор Васильевич Скакун** – кандидат физико-математических наук, доцент; докторант кафедры системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиофизики и компьютерных технологий.

**Владимир Владимирович Апанасович** – доктор физико-математических наук, профессор; профессор кафедры системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиофизики и компьютерных технологий.

### Authors:

**Viktor V. Skakun**, PhD (physics and mathematics), docent; doctoral student at the department of system analysis and computer simulation, faculty of radiophysics and computer technologies.  
[skakun.victor@gmail.com](mailto:skakun.victor@gmail.com)

<https://orcid.org/0000-0003-0880-4188>

**Vladimir V. Apanasovich**, doctor of science (physics and mathematics), full professor; professor at the department of system analysis and computer simulation, faculty of radiophysics and computer technologies.

[apanasovich@bsu.by](mailto:apanasovich@bsu.by)

<https://orcid.org/0000-0003-4525-4234>

in biology, medicine and pharmaceuticals. Obtaining a theoretical photon counting distribution is a complicated task in both algorithmic and computational sense. In this paper, a comparative analysis of the three main methods for calculating photon counting distribution is carried out and an effective method for its calculating is proposed, which guarantees the correct calculation of photon counting distribution over the entire range of variation of the model parameters and the width of the counting time interval. The derivation of all expressions is given for the case of a Gaussian approximation of the brightness profile with correction for out-of-focus emission and normalisation to the first two moments of the profile. Other ways of approximating the brightness profile and normalising the estimated parameters can be made similarly. The proposed technique is implemented in *FFS Data Processor* software package, which is designed for a global analysis of photocounts in fluorescence fluctuation spectroscopy and allows efficient calculation of photon counting distribution in a wide range of estimated parameters.

**Keywords:** fluorescence fluctuation spectroscopy; photon counting distribution; PCD; FIDA; PCH; generating function of the number of photocounts.

## Введение

Флуоресцентная флукуационная спектроскопия (ФФС) позволяет исследовать вещество как *in vitro*, так и *in vivo* на одномолекулярном уровне без нарушения термодинамического равновесия [1]. Все методы ФФС объединяет общий принцип проведения измерений: регистрация флуоресценции производится из предельно малого открытого объема, который определяется лучом лазера, сфокусированного конфокальной оптической системой с высокой числовой апертурой и однофотонной чувствительностью [2]. Оценки параметров исследуемого вещества являются результатом статистического анализа флукуаций интенсивности флуоресценции, которые могут происходить вследствие изменения как количества и местоположения молекул или молекулярных комплексов в малом неоднородно освещенном объеме, так и их характеристической яркости (т. е. среднего количества фотонов, излученных одной молекулой или молекулярным комплексом в единицу времени). Предполагается, что молекулярный комплекс обладает естественной флуоресценцией либо несет на себе одну или несколько флуоресцентных меток и регистрируется в эксперименте как единое целое. Сочетание высокой чувствительности и неинвазивности приводит к интенсивному применению этих методов для измерения коэффициента диффузии белков, а также индекса стехиометрии белковых комплексов, анализа динамики быстрых молекулярных процессов и фотохимических реакций в живых клетках, исследования процессов димеризации и изомеризации [1; 3; 4].

Наиболее известным методом ФФС является метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS), позволяющий на основе анализа автокорреляционной функции (АКФ) потока фотоотсчетов разрешать смесь веществ, различающихся диффузионным коэффициентом [2; 5]. Для разрешения смеси веществ, различающихся характеристической яркостью или индексом стехиометрии (например, смеси мономер – димер), широко применяются анализ распределения интенсивности флуоресценции (*fluorescence intensity distribution analysis*, FIDA) [6; 7], анализ гистограмм счета фотонов (*photon counting histogram*, PCH) [8–10] и кумулянтный анализ фотоотсчетов (*fluorescence cumulants analysis*, FCA) [11–13]. Методы FIDA, PCH и FCA используют распределение числа фотоотсчетов (РЧФ) (методы FIDA и PCH – напрямую, а метод FCA – через промежуточное вычисление факториальных кумулянтов числа фотоотсчетов). Следует отметить, что методы FIDA и PCH отличаются способом их алгоритмической реализации, выбором функции, аппроксимирующей профиль засветки, и нормировкой, определяющей абсолютные значения оцениваемых параметров. Основными оцениваемыми параметрами являются концентрация вещества (среднее количество молекул в объеме наблюдения) и молекулярная (характеристическая) яркость. Известно, что методы FIDA, PCH и FCA математически эквивалентны, т. е. они могут быть выведены в общем виде из единой производящей функции (ПФ) числа фотоотсчетов [13; 14].

В настоящее время актуальным является применение техники так называемого глобального (иначе совместного) анализа АКФ и РЧФ, комбинирующего методы FCS и PCH (или FIDA) [4]. В этом случае обычно выполняется анализ множества РЧФ, вычисленных с разной шириной канала (интервала) регистрации [4]. Поскольку во всех рассмотренных методах ФФС оценки параметров получаются с помощью итерационного анализа экспериментальных данных по методу наименьших квадратов, то объем вычислений может быть очень велик. Также типичным для ФФС является анализ большого количества либо простых повторений измерений, либо измерений при мало отличающихся условиях, что еще значительно увеличивает время вычислений. Если модель FCS представлена относительно простым аналитическим выражением, то в методах FIDA и PCH для расчета применяется сложный алгоритм, требующий численного интегрирования и (в зависимости от метода) либо преобразования Фурье, либо

вычисления множества последовательных конволюций. Если алгоритм, реализующий расчет РЧФ, не является эффективным, то это может привести к недопустимо большим затратам времени на выполнение анализа.

Решением проблемы стал метод быстрого расчета РЧФ на основе разложения в ряд Тейлора (обозначим его как FGFC), при котором удается избавиться от численного интегрирования сложной функции [14; 15]. Но, к сожалению, данный метод имеет существенные ограничения на область изменения параметров модели. С увеличением значения яркости либо ширины канала регистрации (эти два параметра всегда неразрывно присутствуют в модели в виде произведения), а также числа молекул в объеме наблюдения в рассчитываемом РЧФ начинают появляться искажения (рис. 1, б). Даже при незначительном дальнейшем увеличении значений параметров вид РЧФ может полностью исказиться (рис. 1, в), и весь расчет закончится вычислительной ошибкой. На рис. 1, а, представлен пример расчета РЧФ непосредственно вблизи границы его корректного вычисления. При дальнейшем увеличении ширины канала регистрации в пределах менее 1 % вычисление РЧФ становится невозможным.

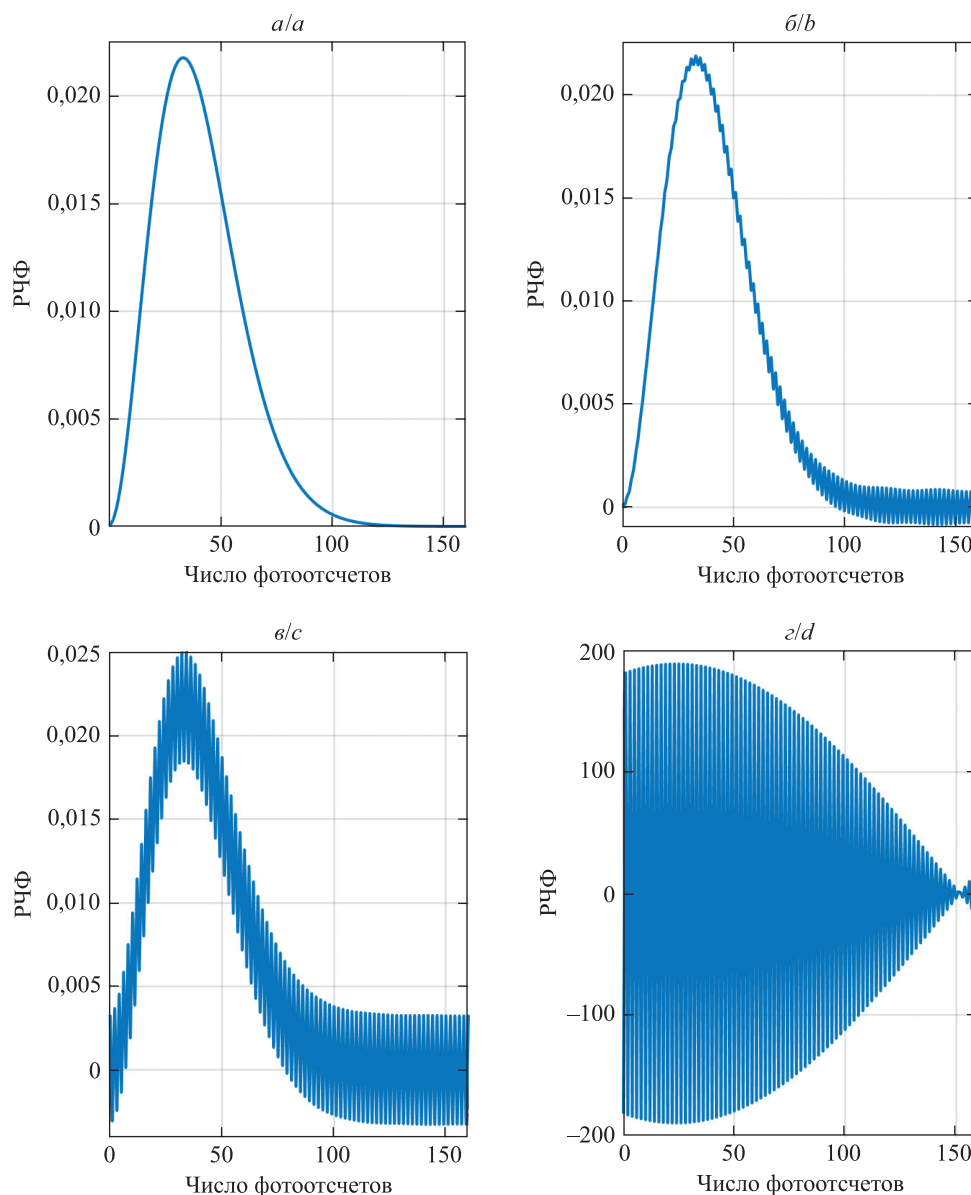


Рис. 1. Вид РЧФ: а – корректное вычисление; б – г – искажения формы РЧФ, наблюдаемые при увеличении ширины канала регистрации в пределах менее 1 %

Fig. 1. Photon counting distribution (PCD) shape:  
а – correct calculation; б – г – distortion of PCD shape, observed  
with an increase in the counting time interval within less than 1 %

Способ расчета РЧФ, используемый в методе FIDA, также не лишен недостатков (принятые в нем вид аппроксимации профиля засветки и способ нормировки приводят к появлению ошибок [16] и нестабильности анализа данных), а наиболее вычислительно-устойчивый метод РСН является очень медленным. Поскольку метод FGFC не работает во всей области определения параметров, встает вопрос о выборе метода расчета РЧФ в зависимости от значений оцениваемых параметров и создании методики, а для целей программной реализации – алгоритма, обеспечивающих вычисление РЧФ в большом диапазоне изменения параметров модели и ширины канала регистрации.

Целью настоящей работы является исследование методов вычисления РЧФ в системах регистрации флуктуаций интенсивности флуоресценции, а также разработка эффективной методики расчета РЧФ, устойчивой к ошибкам в широкой области допустимого изменения параметров модели.

### Теоретические основы исследования

**Анализ РЧФ в ФФС.** Как известно, анализ РЧФ в ФФС производится по методу наименьших квадратов с использованием итерационных методов оптимизации. Чаще всего применяется хорошо зарекомендовавший себя в данной области метод Левенберга – Марквардта [17]. Экспериментальное распределение  $\tilde{P}(n)$  рассчитывается как гистограмма числа фотоотсчетов  $n$ , полученных в ходе эксперимента с шириной канала регистрации  $T$ , при этом  $n$  меняется от нуля до максимально выпавшего числа фотоотсчетов  $m$ . В качестве критерия качества при анализе одной кривой используется взвешенный критерий  $\chi^2$ , задаваемый формулой

$$\chi^2 = \frac{1}{m-l} \sum_{n=0}^m \frac{(\tilde{P}(n) - P(n))^2}{\sigma_n^2},$$

где  $l$  – число оцениваемых при анализе параметров;  $P(n)$  – теоретическое (модельное) РЧФ, вычисленное при заданных параметрах исследуемой молекулярной системы и экспериментальной установки;  $\sigma_n$  – стандартные отклонения значений экспериментального РЧФ. Выражение для расчета критерия  $\chi^2$  при глобальном анализе нескольких кривых РЧФ приведено в работе [18]. Стандартные отклонения вычисляются в предположении биномиальной статистики [8].

**Метод FIDA.** Удобным инструментом для изучения свойств потока зарегистрированных фотоотсчетов, несущих информацию об исследуемом веществе, является ПФ числа точек потока, определяемая как  $G(\xi) = \langle \xi^n \rangle_n = \sum_{n=0}^{\infty} P(n) \xi^n$ , где  $\xi$  – некоторая вспомогательная переменная ( $0 \leq \xi < 1$ ). Распределение  $P(n)$  легко найти через обратное преобразование Фурье от характеристической функции, получаемой из ПФ путем замены формальной переменной  $\xi$  на комплексную экспоненту  $e^{i\varphi}$ :

$$P(n) = \text{БПФ}^{-1} \left( G(e^{i\varphi}) \right), \quad n = 0, 1, \dots, m-1, \quad \varphi = \frac{2\pi n}{m}, \quad (1)$$

где БПФ – быстрое преобразование Фурье.

Производящая функция  $G(\xi)$  распределения  $P(n)$  числа фотонов, излученных флуоресцентными молекулами, находящимися в равновесном состоянии в открытом объеме наблюдения  $V$  в течение короткого интервала регистрации  $T$ , может быть записана в следующем виде [6]:

$$G(\xi) = \exp \left( \sum_i C_i \int_V \left( e^{(\xi-1)q_i T B(\mathbf{r})} - 1 \right) d\mathbf{r} \right), \quad (2)$$

где  $B(\mathbf{r})$  – функция профиля засветки, описывающего пространственное распределение зарегистрированной интенсивности флуоресценции;  $C_i$  – концентрация молекул  $i$ -й компоненты;  $q_i$  – характеристическая яркость молекул  $i$ -й компоненты, определяемая количеством фотонов, испущенных одной молекулой в единицу времени, и равная произведению интенсивности засветки в фокусе, коэффициента поглощения лазерного излучения молекулами вещества, квантового выхода флуоресценции и эффективности системы регистрации. Выражение (2) получено в предположении, что вклад каждой молекулы в зарегистрированный поток фотонов независим, интенсивность флуоресценции постоянна в пределах ширины канала (интервала) регистрации  $T$ , а процессами фоторазрушения и насыщения можно пренебречь.

Ключевой особенностью метода FIDA является аппроксимация профиля засветки экспоненциальной функцией одного аргумента с преобразованием дифференциала этого аргумента в виде полинома [6; 7]:

$$\frac{d\mathbf{r}}{dx} = A_0(x + ax^2 + bx^3), \quad x = \ln \left[ \frac{B_0}{B(\mathbf{r})} \right],$$

где  $a$  и  $b$  – параметры, зависящие от используемой в эксперименте аппаратуры (далее – инструментальные параметры). Такое приближение позволяет учесть разброс значений, вызванный различием оптических параметров измерительной системы и возникновением систематических ошибок в результате ее разбалансировки. Значения  $A_0$  и  $B_0$  предлагается вычислять из системы уравнений нормировки вида [6]

$$\int_V B(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = 1, \quad \int_V B^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = 1. \quad (3)$$

**Метод РСН.** В методе РСН для нахождения распределения  $P(n)$ , зарегистрированного от двух и более молекул, используется последовательное вычисление конволюций одномолекулярного РЧФ  $p^{(1)}(n, q, V_0)$  [8] по формуле

$$p^{(1)}(n, q, V_0) = \frac{1}{V_0} \int_{V_0} \text{Poi}(n, qTB(\mathbf{r})) d\mathbf{r}, \quad (4)$$

где  $\text{Poi}(n, \eta)$  обозначает распределение Пуассона с параметром  $\eta$ , а измерения производятся в объеме наблюдения  $V_0$ . Распределение  $P(n)$ , зарегистрированное от  $N$  молекул с концентрацией  $C$  в открытом объеме наблюдения  $V_0$  ( $N = CV_0$ ), есть сумма одномолекулярных распределений  $p^{(1)}(n, q, V_0)$ , свернутых между собой  $j - 1$  раз и взвешенных на вероятность нахождения  $j = 0, 1, \dots$  молекул в объеме наблюдения (по распределению Пуассона с параметром  $CV_0$ ) [8]:

$$P(n, N, q) = \sum_{j=0}^{\infty} p^{(j)}(n, q) \text{Poi}(j, CV_0), \quad (5)$$

$$p^{(j)}(n, q) = \underbrace{p^{(1)} \otimes \dots \otimes p^{(1)}}_{j-1 \text{ раз}}(n, q), \quad p^{(0)}(n, q) = \begin{cases} 1, & n = 0, \\ 0, & n \neq 0. \end{cases}$$

При однофотонном возбуждении функция профиля засветки  $B(\mathbf{r})$  аппроксимируется трехмерным асимметричным гауссовским распределением, вытянутым по оси  $z$  [19]:

$$B_G(\mathbf{r}) = B_G(x, y, z) = B_0 \exp \left( \frac{-2(x^2 + y^2)}{\omega_0^2} - \frac{2z^2}{z_0^2} \right), \quad (6)$$

где  $\omega_0$  и  $z_0$  характеризуют падение интенсивности флуоресценции в поперечном и аксиальном направлении соответственно,  $B_0 = B(\mathbf{0})$  полагается равным единице (профиль нормирован на единицу в максимуме). В ФФС объем наблюдения  $V_0$  является открытым (молекулы могут беспрепятственно покидать этот объем и, наоборот, входить в него вследствие свободной диффузии) и не имеет четко очерченных физических границ. Для определения количества молекул, участвующих в процессе излучения фотонов, используют величину приведенного объема  $V_{PSF} = \int_V B(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$  или чаще всего так называемого эффективного объема [9; 20]

$$V_{\text{eff}} = \frac{\left( \int_V B(\mathbf{r}) d\mathbf{r} \right)^2}{\int_V B^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r}}. \quad (7)$$

Поскольку интенсивность флуоресценции быстро падает по мере удаления от фокуса и размер кюветы с веществом намного больше, чем размер освещенной области, интегрирование в выражении (7) производится в бесконечных пределах. При однофотонном возбуждении и нормализации к эффективному объему ( $N_{\text{eff}} = CV_{\text{eff}}$ ) одномолекулярное РЧФ имеет вид [9; 10]

$$p_{3DG}^{(1)}(n, q) = \frac{1}{Q\sqrt{\pi n}} \int_0^{\infty} \gamma(n, qTe^{-2x^2}) dx, \quad n = 1, 2, \dots, \quad (8)$$

$$p_{3DG}^{(1)}(0, q) = 1 - \sum_{n=1}^m p_{3DG}^{(1)}(n, q),$$



где  $\gamma(n, x)$  – неполная гамма-функция;  $Q = \frac{V_0}{V_{\text{eff}}}$  – константа, взятая такой, что произведение  $QV_{\text{eff}}$  будет достаточно велико, чтобы полностью включать объем наблюдения  $V_0$ . Соответственно [9; 10],

$$P(n, N_{\text{eff}}, q) = \sum_{j=0}^{\infty} p^{(j)}(n, q) \text{Poi}(j, CV_0) = \sum_{j=0}^{\infty} p^{(j)}(n, q) \text{Poi}(j, QN_{\text{eff}}). \quad (9)$$

В конечном счете РЧФ смеси  $M$  независимых флуоресцирующих компонент будет сверткой РЧФ каждого вида [8]:

$$P(n) = P(n, N_{\text{eff},1}, q_1) \otimes \dots \otimes P(n, N_{\text{eff},M}, q_M). \quad (10)$$

Применение уравнений (8) и (9) для аппроксимации экспериментальных данных, полученных по методу однофотонного возбуждения, в большинстве случаев не представляется возможным из-за значительного отклонения фактического профиля засветки от предполагаемого трехмерного асимметричного гауссовского приближения [9]. Для улучшения модели в работе [9] были введены дополнительные параметры аппроксимации  $F_k$ , определяемые как относительная разность между интегралом  $k$ -й степени фактической функции профиля засветки  $\chi_k = \int_V B^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r}$  (нормированной на единицу в максимуме ( $B_0 = 1$ )) и интегралом ее трехмерной гауссовской аппроксимации  $\chi_{3DG,k}$ :

$$F_k = \frac{\chi_k - \chi_{3DG,k}}{\chi_{3DG,k}}. \quad (11)$$

Использование  $F_k$  в виде формулы (11) приводит к следующему выражению одномолекулярного РЧФ [9]:

$$p_{3DGC}^{(i)}(n, q_C) = \frac{1 + F_2}{(1 + F_1)^2} \left[ p_{3DG}^{(i)}(n, q_C) + \frac{1}{n!Q} \sum_{k=n}^{\infty} \frac{(-1)^{k-n} (q_C T)^k F_k}{(k-n)!(2k)^{\frac{3}{2}}} \right],$$

где  $q_C$  – характеристическая яркость с учетом введенной коррекции. В большинстве случаев только поправка первого порядка (все  $F_k$  равны нулю, кроме  $F_1$ ) достаточна для достижения хорошего соответствия экспериментальным данным.

**Метод FGFC.** Метод быстрого вычисления РЧФ через разложение экспоненты под интегралом в выражении (2) в ряд Тейлора был независимо и почти одновременно разработан двумя авторскими коллективами<sup>1</sup> [14; 15].

Разложим экспоненту под интегралом в выражении (2) в ряд Тейлора:

$$\begin{aligned} G(\xi) &= \exp \left\{ \sum_i C_i \sum_{k=0}^{\infty} \left[ \frac{(\xi - 1)^k q_i^k T^k \int_V B^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r}}{k!} - 1 \right] \right\} = \\ &= \exp \left\{ \sum_i C_i \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(\xi - 1)^k (B_0 q_i T)^k \chi_k}{k!} \right\}. \end{aligned}$$

Принимая во внимание формулу (11), получаем

$$G(\xi) = \exp \left\{ \sum_i C_i \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(\xi - 1)^k (B_0 q_i T)^k (1 + F_k) \chi_{3DG,k}}{k!} \right\}. \quad (12)$$

Ряд в выражении (12) быстро сходится при типичных для ФФС значениях параметров. Достоинством применения выражения (12) является то, что в этом случае не требуется численного нахождения интеграла от сложной функции. Все  $\chi_{3DG,k}$  могут быть найдены аналитически [14; 15]:

<sup>1</sup>Correction for out-of-focus emission in fluorescence fluctuation spectroscopy; generalization of the algorithms [Electronic resource] : [poster on conf. «The 9<sup>th</sup> Carl Zeiss sponsored workshop on FCS and related methods» (Stockholm, 2006 Dec. 4–6)] / V. V. Skakun, E. G. Novikov, O. A. Mayboroda. URL: <http://elib.bsu.by/handle/123456789/48832> (date of access: 15.11.2022).

$$\chi_{3DG, k} = \int_{-\infty}^{+\infty} B_{3DG}^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = B_0^k k^{\frac{-3}{2}} \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \omega_0^2 z_0. \quad (13)$$

Как и в методе FIDA, результирующее распределение  $P(n)$  получается через обратное преобразование Фурье (1).

### Результаты и их обсуждение

Как уже отмечалось во введении, метод FGFC, не требующий расчета определенных интегралов от сложной функции, является вычислительно-эффективным, но имеет существенные ограничения на область изменения параметров модели и ширины канала регистрации. Для определения источника указанной проблемы найдем ПФ для случая нормировки на первые два момента профиля засветки и сформулируем алгоритм ее расчета. Выбор нормировки на первые два момента профиля засветки, впервые предложенный в методе FIDA [6], является очень перспективным, так как наряду с геометрическими параметрами профиля  $\omega_0$  и  $z_0$  позволяет оценить неизвестное значение профиля засветки в фокусе  $B_0$ , что обеспечивает получение независимых от способа коррекции профиля оценок числа молекул и яркости [13; 15].

При разработке алгоритма расчета РЧФ сделаем следующие упрощения: коррекция на свободную диффузию и переходы в триплетное состояние не учитываются, мертвым временем и вероятностью появления послеимпульсов детектора можно пренебречь. Данные упрощения практически не сужают область применения полученных результатов. Коррекция на вышеупомянутые динамические процессы фактически производится путем пересчета оцениваемых параметров в самом начале вычисления РЧФ, а коррекция на неидеальность регистрирующей аппаратуры – уже на финальной стадии. Алгоритм расчета РЧФ по методу РСН с коррекцией на динамические процессы и неидеальность детектора изложен в работах [4; 18]. Коррекция того же вида для метода FIDA представлена в публикациях [7; 21].

Введем обозначение  $A_0 = \omega_0^2 z_0$  в выражении (13) и, соответственно, в выражении (3). Для определения неизвестных параметров  $A_0$  и  $B_0$  будем использовать систему нормировочных уравнений

$$\int_V B(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = \chi_1, \quad \int_V B^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = \chi_2. \quad (14)$$

Подставим выражение (13) в формулу (11), и из решения системы уравнений (14) получим

$$A_0 = \frac{(1 + F_2)\chi_1^2}{\pi^{\frac{3}{2}}(1 + F_1)^2 \chi_2}, \quad B_0 = \frac{2\sqrt{2}(1 + F_1)\chi_2}{(1 + F_2)\chi_1}. \quad (15)$$

Тогда ПФ числа фотоотсчетов (12) примет вид

$$G_{2MN}(\xi) = \exp \left\{ \sum_i \pi^{\frac{3}{2}} A_0 C_i \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi - 1) B_0 q_i T)^k (1 + F_k)}{k!(2k)^{\frac{3}{2}}} \right\} = \\ = \exp \left\{ \frac{1 + F_2}{(1 + F_1)^2} \sum_i N_{2MN, i} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi - 1) 2\sqrt{2}(1 + F_1) q_{2MN, i} T)^k (1 + F_k)}{(1 + F_2)^k k!(2k)^{\frac{3}{2}}} \right\}, \quad (16)$$

где введены параметры  $N_{2MN} = \frac{C\chi_1^2}{\chi_2}$  и  $q_{2MN} = \frac{q\chi_2}{\chi_1}$  (индекс  $2MN$  обозначает нормировку вида (3) или (14)).

В работе [13] было показано, что при данном виде нормировки наблюдаемое значение яркости  $q_{2MN}$  отличается от истинной яркости  $q$  фактором  $\gamma_2 = \frac{\chi_2}{\chi_1} = \frac{1}{2\sqrt{2}}$ . Подставим последнее выражение в формулу (16):

$$G_{2MN}(\xi) = \exp \left\{ \frac{1 + F_2}{(1 + F_1)^2} \sum_i N_{2MN, i} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi - 1)(1 + F_1) q_i T)^k (1 + F_k)}{(1 + F_2)^k k!(2k)^{\frac{3}{2}}} \right\}. \quad (17)$$

Достоинством выражения (17) является возможность получения оценки яркости  $q$  непосредственно в процессе анализа. В противном случае значение яркости приходилось бы пересчитывать каждый раз при необходимости сравнения с результатами анализа, полученными при другом виде нормировки. Без коррекции на внефокусное излучение выражение (17) примет вид

$$G_{2,MN}(\xi) = \exp \left\{ \sum_i N_{2,MN,i} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{((\xi-1)q_i T)^k}{k!(2k)^{\frac{3}{2}}} \right\}. \quad (18)$$

Ввиду симметрии ПФ относительно частоты Найквиста расчет ПФ можно производить только при  $n = 0, 1, \dots, \frac{m}{2}$ ,  $\varphi = \frac{2\pi n}{m}$ ,  $\xi = e^{i\varphi}$ . Оставшиеся значения при  $n = \frac{m}{2} + 1, \dots, m - 1$  вычисляются по формулам

$$\begin{aligned} G_{\text{real}}(n) &= G_{\text{real}}(m-n), \\ G_{\text{imag}}(n) &= -G_{\text{imag}}(m-n), \end{aligned} \quad (19)$$

где  $G_{\text{real}}(n)$  и  $G_{\text{imag}}(n)$  – действительная и мнимая части ПФ соответственно.

Таким образом, алгоритм расчета РЧФ по методу FGFC (обозначим его как AL1) имеет следующий вид.

1. Инициализация параметров:  $m = 2^l$  (при этом  $l$  выбирается таким, чтобы  $m$  превышало максимально выпавшее число фотоотсчетов или было равно ему и результирующее РЧФ полностью обращалось в нуль),  $\varphi = \frac{2\pi n}{m}$ .

2. Расчет РЧФ по формуле (18) для  $n = 0, 1, \dots, \frac{m}{2}$ . Суммирование по  $k$  производится до тех пор, пока сумма абсолютных значений действительной и мнимой частей очередного значения под знаком суммы не станет меньше некоторого заранее заданного малого числа  $eps$  (например,  $eps = 10^{-9}$ ), определяющего точность расчета. Вычисления выполняются в рекуррентном виде: при  $k = 1$  создаются переменные

$$z = (e^{i\varphi} - 1)q_i T \text{ и } s = \frac{z}{2^2}, \text{ затем в цикле для } k = 2, 3, \dots \text{ последовательно рассчитываются } z = \frac{z(e^{i\varphi} - 1)q_i T}{k}$$

$$\text{и } s = s + \frac{z}{(2k)^{\frac{3}{2}}}.$$

3. Расчет оставшихся  $\frac{m}{2} - 2$  значений РЧФ по формуле (19).

Алгоритм вычисления РЧФ для других видов нормировки и аппроксимации профиля засветки отличается от изложенного только выбором параметров  $A_0$  и  $B_0$  и формулой расчета  $\chi_k$ .

Имея алгоритм расчета РЧФ, реализуем его на языке М в среде исполнения *Matlab* и проанализируем причины появления проблем с вычислением РЧФ и их следствие. Вначале рассмотрим случай корректного вычисления ПФ. Параметры модели:  $q = 2 \cdot 10^5$  фотоотсчетов в секунду от одной молекулы;  $T = 1 \cdot 10^{-5}$  с;  $N_{2,MN} = 10$ . Коррекция на внефокусную засветку не учитывается. Число точек, в которых рассчитывается ПФ, составляет величину  $m = 128$ . На рис. 2, а, представлен график действительных значений выражения под экспонентой в ПФ (18), а на рис. 2, б, показано РЧФ, являющееся результатом обратного преобразования Фурье (1) от ПФ.

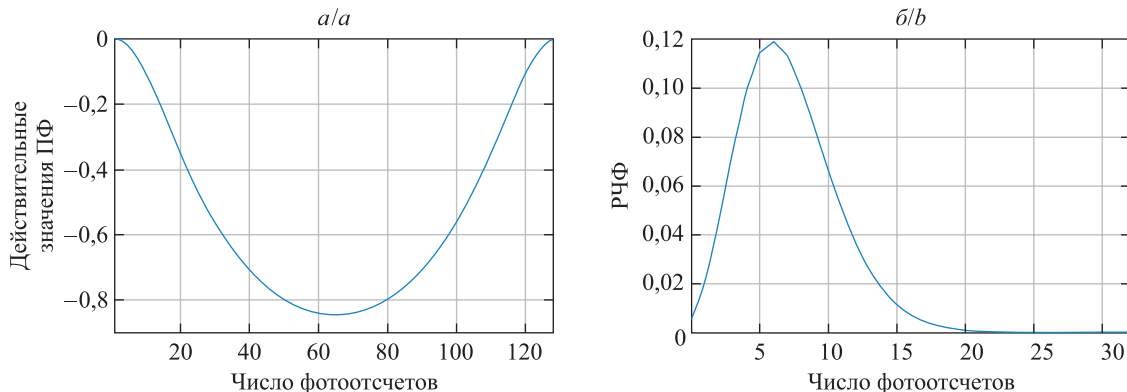


Рис. 2. График действительных значений выражения под экспонентой в ПФ (18) (а) и результирующее РЧФ (б)

Fig. 2. Graph of the real values of the expression under the exponent in generating function (18) (а) and the resulting PCD (б)



При увеличении ширины канала регистрации до  $1,1 \cdot 10^{-4}$  с на графике действительных значений выражения под экспонентой (рис. 3, *a*), а также на графике мнимых значений (данные не представлены) появляются осцилляции, хотя само распределение по-прежнему рассчитывается достаточно корректно (оценки параметров  $N_{2MN}$  и  $q$ , полученные по методу моментов [13] на основе вычисленных распределений, совпадают с исходными значениями). Но проблема с вычислениями остается. Например, при уменьшении числа молекул с 10 до 1 в РЧФ с хорошо заметными периодами наблюдаются небольшие осцилляции (рис. 3, *б*).

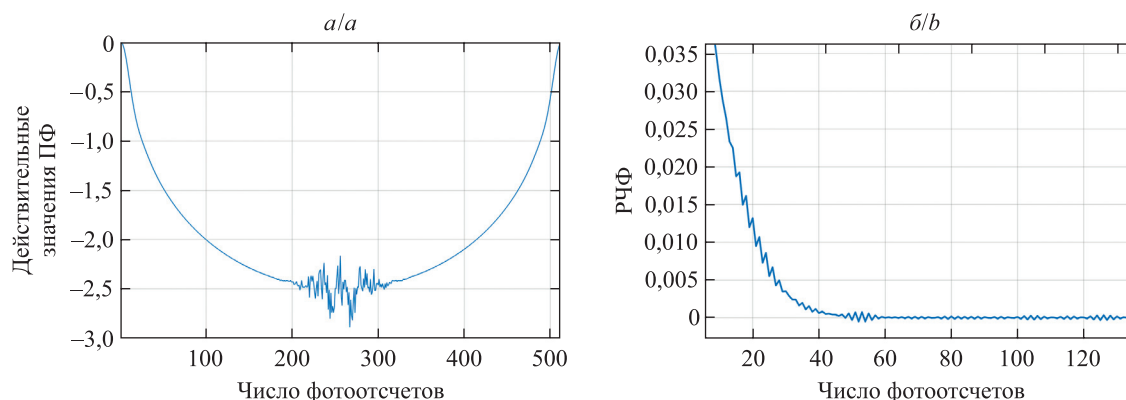


Рис. 3. График действительных значений выражения под экспонентой в ПФ (18) при  $T = 1,1 \cdot 10^{-4}$  с (*a*) и результирующее РЧФ при  $N_{2MN} = 1$  (*б*)

Fig. 3. Graph of the real values of the expression under the exponent in generating function (18) at  $T = 1.1 \cdot 10^{-4}$  s (*a*) and the resulting PCD at  $N_{2MN} = 1$  (*b*)

При дальнейшем увеличении ширины канала регистрации величина осцилляций начинает сильно возрастать, и уже при ширине  $1,2 \cdot 10^{-4}$  с вид РЧФ меняется с суперпуассоновского распределения на набор осцилляций, при нечетных значениях числа фотоотсчетов принимающих физически неприемлемые отрицательные значения (рис. 4, *б*).

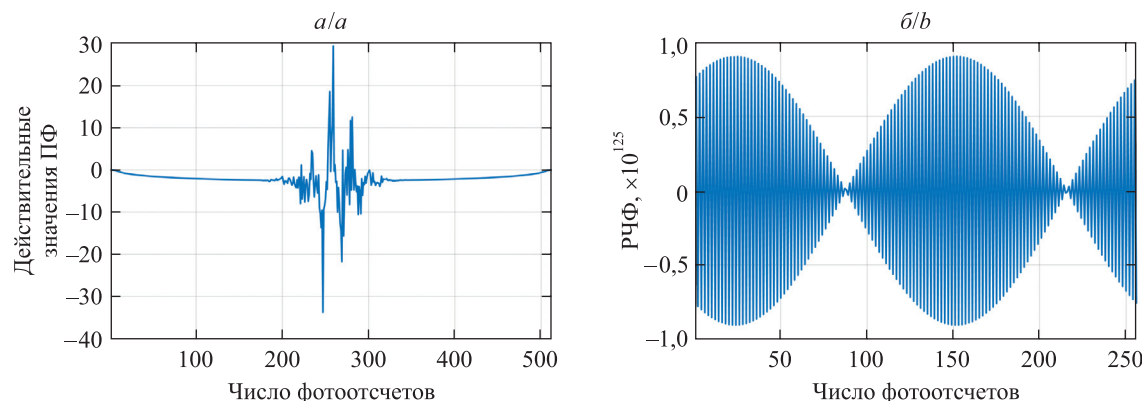


Рис. 4. График действительных значений выражения под экспонентой в ПФ (18) при  $T = 1,2 \cdot 10^{-4}$  с (*a*) и результирующее РЧФ (*б*)

Fig. 4. Graph of the real values of the expression under the exponent in generating function (18) at  $T = 1.2 \cdot 10^{-4}$  s (*a*) and the resulting PCD (*b*)

Отметим, что появление даже незаметных глазу искажений формы РЧФ в отсутствие экспериментального шума приводит к существенным ошибкам в оценках параметров. Для выяснения причины возникновения осцилляций рассмотрим, что представляют собой значения под знаком суммы от единицы до бесконечности в формуле (18) на частоте Найквиста (для нашего случая равной  $\frac{m}{2}$ ), где размах осцилляций максимален. Исходя из вида разложения экспоненты в ряд Тейлора и того факта, что  $\xi - 1 = e^{i\varphi} - 1$  принимает отрицательные значения, следует ожидать знакопеременный ряд с быстро затухающими значениями как для действительной, так и для мнимой компоненты (положительные значения для четных  $k$ , отрицательные значения для нечетных  $k$ ). Вид действительной компоненты для первых двух рассмотренных случаев представлен на рис. 5 (мнимая компонента имеет похожий вид). С увеличением произведения  $qT$  размах значений знакопеременного ряда стремительно возрастает (см. рис. 5, *a*) и быстро достигает

величин, когда вследствие ограниченности количества разрядов для представления десятичных чисел в вычисление знакопеременного ряда начинается вноситься существенная ошибка (см. рис. 5, б).

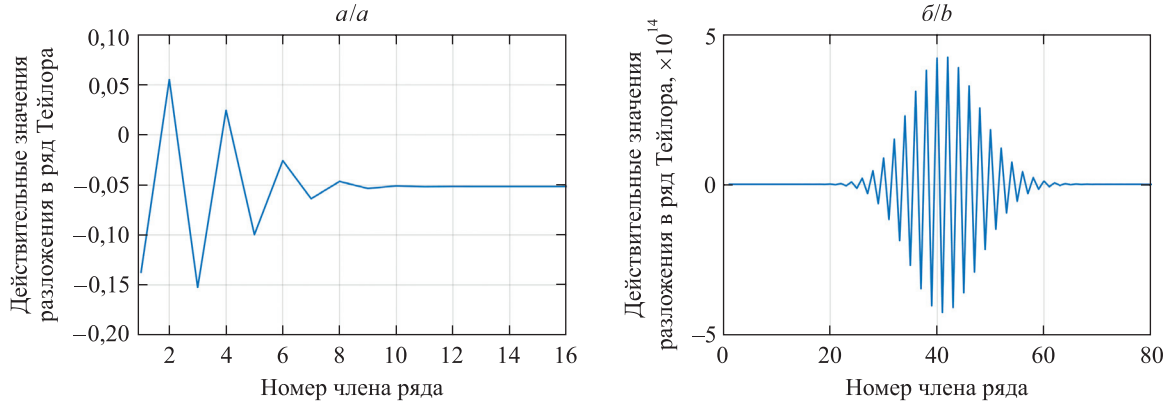


Рис. 5. Вид действительной компоненты в разложении в ряд Тейлора для случаев, рассмотренных на рис. 2 (корректное вычисление РЧФ) (а) и рис. 4 (проблемы с вычислением РЧФ) (б)

Fig. 5. The form of the real component in the expansion in a Taylor series for the cases considered in fig. 2 (correct calculation of PCD) (a) and fig. 4 (problems in calculation of PCD) (b)

Следующим по эффективности расчета РЧФ является метод FIDA, в котором отсутствует разложение экспоненты в ряд Тейлора. Можно сразу же прогнозировать решение проблем, выявленных для метода FGFC. Поскольку в методе FIDA используется полиномиальная аппроксимация профиля засветки, для разработки алгоритма расчета РЧФ необходимо вначале произвести замену профиля на гауссовский. В работе [16] было показано, что применение полиномиальной аппроксимации приводит к потере однозначной идентифицируемости модели (имеется до трех решений, обеспечивающих получение идентичных результатов) и появлению плоскости разрыва в области определения параметров коррекции, где значения ПФ устремляются в бесконечность. Использование трехмерного асимметричного гауссовского распределения с коррекцией на внефокусное излучение является простым, понятным и эффективным решением для анализа данных ФФС [4; 9; 20].

В декартовой системе координат выражение (2) можно представить в виде

$$G(\xi) = \exp \left\{ \sum_i C_i \iiint (e^{(\xi-1)q_i TB(x,y,z)} - 1) dx dy dz \right\}. \quad (20)$$

Для сведения трехмерного интеграла в выражении (20) к одномерному предлагаем использовать специальное преобразование из декартовой системы координат в модифицированную сферическую систему координат:

$$\begin{cases} x = r\omega_0 \cos \varphi \sin \alpha, \\ y = r\omega_0 \sin \varphi \sin \alpha, \\ z = z_0 r \cos \alpha. \end{cases} \quad (21)$$

Якобиан такого преобразования равен величине  $\sqrt{g} = \omega_0^2 z_0 r^2 \sin \alpha$ , и выражение для  $B(\mathbf{r})$  в виде формулы (6) упрощается до  $B(r) = B_0 e^{-2r^2}$ . После интегрирования по  $\varphi$  и  $\alpha$  выражение (20) примет вид

$$G(\xi) = \exp \left\{ \sum_i 4\pi\omega_0^2 z_0 C_i \int_0^\infty (e^{(\xi-1)q_i TB_0 e^{-2r^2}} - 1) r^2 dr \right\}. \quad (22)$$

Для более тесного сравнения с формулой (2) сделаем замену переменных  $2r^2 = x$ . Тогда  $r = \sqrt{\frac{x}{2}}$  и  $dr = \frac{\sqrt{2}dx}{4\sqrt{x}}$ , и ПФ примет вид

$$G(\xi) = \exp \left\{ \sum_i \sqrt{2}\pi\omega_0^2 z_0 C_i \int_0^\infty (e^{(\xi-1)q_i TB_0 e^{-x}} - 1) \sqrt{x} dx \right\}.$$

Соответственно, имеем  $B(r) = B_0 e^{-x}$  и  $dr = \sqrt{x} dx$ . С учетом данных выражений становится понятным выбор полиномиальной аппроксимации профиля засветки.

Как и ранее, введем обозначение  $A_0 = \omega_0^2 z_0$  в выражении (22) и для определения неизвестных параметров  $A_0$  и  $B_0$  будем использовать систему нормировочных уравнений (14). Аналогично, из решения системы уравнений (14) получим выражение (15). В этом случае ПФ числа фотоотсчетов примет вид

$$G_{2MN}(\xi) = \exp \left\{ \sum_i 4\pi A_0 C_i \int_0^\infty \left( e^{(\xi-1)q_i T B_0 e^{-2r^2}} - 1 \right) r^2 dr \right\} = \\ = \exp \left\{ \sum_i \frac{4(1+F_2)N_{2MN,i}}{\sqrt{\pi}(1+F_1)^2} \int_0^\infty e^{(\xi-1)\frac{2\sqrt{2}(1+F_1)}{1+F_2} q_{2MN,i} T e^{-2r^2}} - 1 \right\} r^2 dr \right\},$$

где введены обозначения  $N_{2MN} = \frac{C\chi_1^2}{\chi_2}$  и  $q_{2MN} = \frac{q\chi_2}{\chi_1}$ . Произведя обратную замену  $q = \frac{q_{2MN}\chi_1}{\chi_2} = \frac{q_{2MN}}{2\sqrt{2}}$ , аналогично выражению (17) получим

$$G_{2MN}(\xi) = \exp \left\{ \sum_i \frac{4(1+F_2)N_{2MN,i}}{\sqrt{\pi}(1+F_1)^2} \int_0^\infty \left( e^{(\xi-1)\frac{1+F_1}{1+F_2} q_i T e^{-2r^2}} - 1 \right) r^2 dr \right\}. \quad (23)$$

Без коррекции на внефокусное излучение формула (23) упрощается:

$$G_{2MN}(\xi) = \exp \left\{ \sum_i \frac{4N_{2MN,i}}{\sqrt{\pi}} \int_0^\infty \left( e^{(\xi-1)q_i T e^{-2r^2}} - 1 \right) r^2 dr \right\}. \quad (24)$$

Таким образом, алгоритм расчета РЧФ по методу FIDA (обозначим его как AL2) имеет следующий вид.

1. Инициализация параметров:  $m = 2^l$  (при этом  $l$  выбирается таким, чтобы  $m$  превышало максимально выпавшее число фотоотсчетов и результирующее РЧФ полностью обращалось в нуль),  $\varphi = \frac{2\pi n}{m}$ .

2. Расчет РЧФ по формуле (23) или (24) для  $n = 0, 1, \dots, \frac{m}{2}$ . Если используемый алгоритм расчета определенного интеграла не поддерживает задание бесконечных пределов, то вычисление интеграла для случая гауссовской аппроксимации профиля засветки можно проводить в пределах от 0 до 2,6. Если требуется более высокая точность расчетов, то вычисляемый интеграл можно представить в виде суммы двух определенных интегралов (от 0 до 2,4 и от 2,4 до 5).

3. Расчет оставшихся  $\frac{m}{2} - 2$  значений РЧФ по формуле (19).

Вычисление РЧФ по формулам (23), (24) и (1) не имеет недостатка, выявленного для метода FGFC. Графики значений как подэкспоненциального выражения в ПФ, так и самого РЧФ для случаев, рассмотренных на рис. 2 и 4, не имеют никаких осцилляций (рис. 6).

Вычисления остаются корректными фактически для всего диапазона параметров, применяемого на практике в ФФС. Для случая гауссовской аппроксимации профиля засветки подынтегральная функция практически во всей области изменения параметров модели не имеет разрывов, выбросов, большого градиента и других проблем, затрудняющих взятие определенного интеграла (рис. 7). Можно заменить интеграл в бесконечных пределах интегралом в конечных пределах (от 0 до 2,6) (установлено эмпирически путем анализа подынтегральной функции, вычисленной с разными параметрами).

Несмотря на то что в данном способе расчета РЧФ на первый взгляд все хорошо, проблемы вычислительного характера все же присутствуют. Иногда расчет заканчивается численной ошибкой, чаще всего связанной с вычислением экспоненты. Проблемы с использованием данного алгоритма также характерны для полиномиального профиля. При приближении инструментальных параметров  $a$  и  $b$  к области разрыва (см. [16, fig. 3]) вычисление интеграла обычно заканчивается численной ошибкой.

Наиболее стабильным и свободным от проблем вычислительного характера является алгоритм, основанный на использовании одномолекулярного РЧФ с последующим взятием от него конволюций [8; 18]. Но этот алгоритм является и наиболее медленным, особенно для случая, когда максимальное число фотоотсчетов, наблюдаемое в эксперименте, либо количество молекул в объеме наблюдения становится большим. Выражения (5) и (8) получены для нормализации к эффективному объему и не позволяют сделать вывод о выборе значения искусственно введенного параметра  $Q$ . Значение яркости  $q_C$  является функцией введенных параметров коррекции профиля [13].

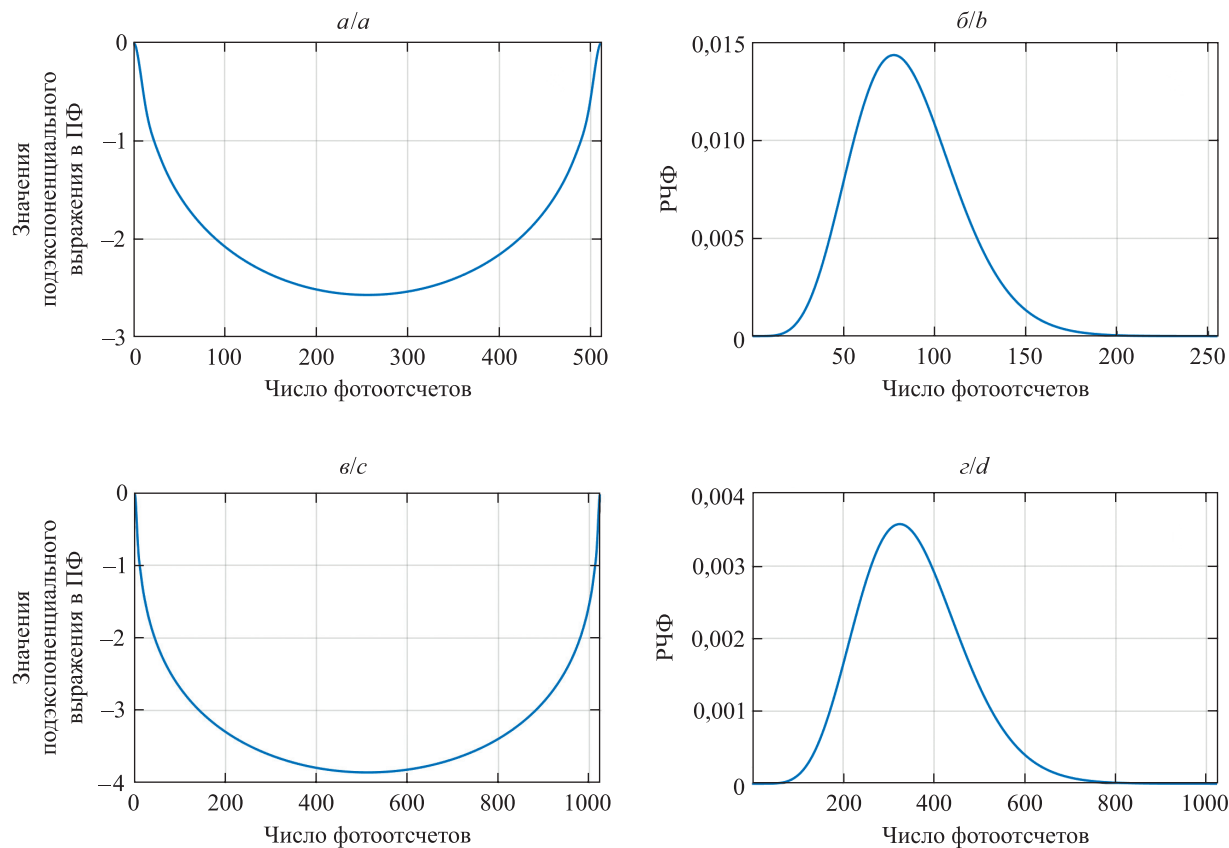


Рис. 6. Графики значений подэкспоненциального выражения в ПФ (а, в) и результирующего рЧФ (б, г) для случаев, рассмотренных на рис. 2 (а, б) и рис. 4 (в, г)  
Fig. 6. Graphs of the values of the expression under the exponent in generating function (a, c) and the resulting PCD (b, d) for the cases considered in fig. 2 (a, b) and fig. 4 (c, d)

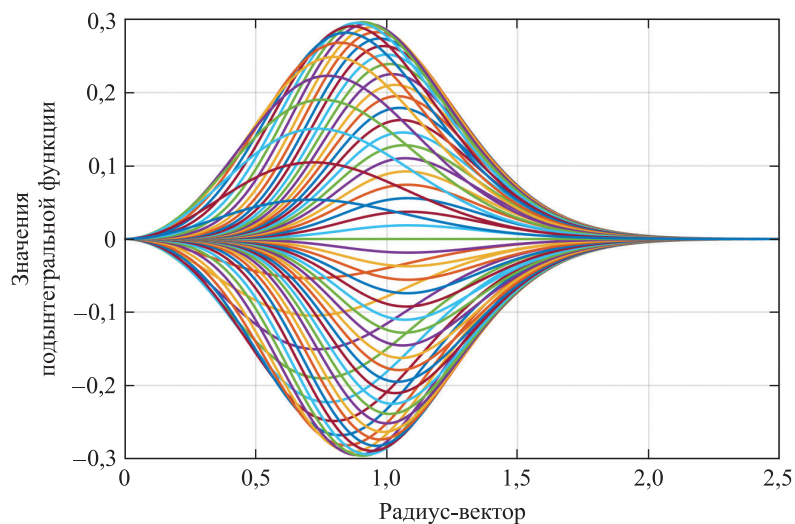


Рис. 7. График значений подынтегральной функции в выражении (24).

Параметры:  $q = 6 \cdot 10^4$  фотоотсчетов в секунду от одной молекулы;  
 $T = 5 \cdot 10^{-5}$  с;  $N_{2MN} = 5$ ;  $m = 64$

Fig. 7. Graph of the values of the integrand in expression (24).  
Parameters:  $q = 6 \cdot 10^4$  counts per second per molecule;  $T = 5 \cdot 10^{-5}$  s;  $N_{2MN} = 5$ ;  $m = 64$

Осуществим вывод аналитических выражений для расчета РЧФ в случае гауссовской аппроксимации профиля засветки (6) с  $B_0 \neq 0$  и нормировки вида  $2MN$ .

Для сведения трехмерного интеграла в уравнении (4) к одномерному применим преобразование системы координат (21). Выражение (6) сводится к следующему виду:  $B(r) = B_0 e^{-2r^2}$ ,  $r = \sqrt{\frac{x^2}{\omega_0^2} + \frac{y^2}{\omega_0^2} + \frac{z^2}{z_0^2}}$ .

В данном преобразовании координат размер объема наблюдения  $V_0$  при заданном радиусе  $r_0$  зависит от параметров  $\omega_0$  и  $z_0$ :

$$V_0 = \int_0^{r_0} \int_0^{2\pi} \int_0^\pi r^2 \omega_0^2 z_0 \sin \alpha \, dr \, d\phi \, d\alpha = \frac{4\pi}{3} r_0^3 \omega_0^2 z_0.$$

После интегрирования по  $\phi$  и  $\alpha$  выражение (4) примет вид

$$\begin{aligned} p_{3DG}^{(1)}(n, q) &= \frac{4\pi \omega_0^2 z_0}{V_0 n!} \int_0^{r_0} \left( qTB_0 e^{-2r^2} \right)^n e^{-qTB_0 e^{-2r^2}} r^2 \, dr = \\ &= \frac{3}{r_0^3 n!} \int_0^{r_0} \left( qTB_0 e^{-2r^2} \right)^n e^{-qTB_0 e^{-2r^2}} r^2 \, dr. \end{aligned} \quad (25)$$

Обратим внимание, что полученное распределение вероятностей нормировано:  $\sum_n p_{3DG}^{(1)}(n, q) = 1$  для любого  $r_0$ . В ФФС объем наблюдения является открытым. Когда объем наблюдения открыт, выбор радиуса  $r_0$  имеет решающее значение:  $V_0$  растет пропорционально  $r_0^3$ , поэтому количество молекул в этом объеме и, следовательно, количество сверток, необходимых для расчета РЧФ, увеличивается очень быстро, что делает алгоритм неэффективным. Длину радиуса нужно брать как можно меньше, но так, чтобы она полностью перекрывала область возбуждения молекул. Приемлемым критерием может быть  $p_{3DG}^{(1)}(0, q) > 0$ . Подынтегральная функция в выражении (25) быстро обращается в нуль с ростом  $r_0$  для любого  $k > 0$ . Это позволяет установить бесконечный верхний предел интегрирования в выражении (25) и проводить вычисления в более эффективном виде [9] через неполную гамма-функцию  $\gamma(a, x) = \int_0^x e^{-t} t^{a-1} dt$ :

$$\begin{aligned} p_{3DG}^{(1)}(n, q) &= \frac{3}{4r_0^3 n!} \int_0^\infty \gamma(n, qTB_0 e^{-2x^2}) \, dx, \quad n = 1, 2, \dots, \\ p^{(1)}(0, q) &= 1 - \sum_{n=1}^m p^{(1)}(n, q). \end{aligned} \quad (26)$$

Выражение (26) зависит от  $r_0$ , а выражение (5) – от неизвестных  $\omega_0$  и  $z_0$ . Для устранения неизвестных введем понятие ссылочного объема  $V_{\text{ref}}$ , обозначение  $A_0 = \omega_0^2 z_0$  и константу  $Q = \frac{V_0}{V_{\text{ref}}}$  аналогично тому, как это было сделано в работе [9]:

$$p_{3DG}^{(1)}(n, q) = \frac{\pi A_0}{Q V_{\text{ref}} n!} \int_0^\infty \gamma(n, qTB_0 e^{-2x^2}) \, dx, \quad n = 1, 2, \dots,$$

$$P(n, N_{\text{ref}}, q) = \sum_{j=0}^\infty p_{3DG}^{(j)}(n, q) \text{Poi}(j, CQV_{\text{ref}}) = \sum_{j=0}^\infty p_{3DG}^{(j)}(n, q) \text{Poi}(j, N_{\text{ref}}Q),$$

где  $N_{\text{ref}} = CV_{\text{ref}}$ . При нормировке вида (14) получим выражение (15), а также

$$\begin{aligned} p_{3DG}^{(1)}(n, q_{2MN}) &= \frac{\chi_1^2(1+F_2)\chi_2}{Q\sqrt{\pi}\chi_2(1+F_1)^2\chi_1^2 n!} \int_0^\infty \gamma\left(n, \frac{2\sqrt{2}(1+F_1)\chi_2}{(1+F_2)\chi_1} q_{2MN} T e^{-2x^2}\right) \, dx = \\ &= \frac{1+F_2}{Q\sqrt{\pi}(1+F_1)^2 n!} \int_0^\infty \gamma\left(n, \frac{2\sqrt{2}(1+F_1)}{1+F_2} q_{2MN} T e^{-2x^2}\right) \, dx, \quad n = 1, 2, \dots, \end{aligned}$$

$$P(n, N_{2MN}, q_{2MN}) = \sum_{j=0}^\infty p_{3DG}^{(j)}(n, q_{2MN}) \text{Poi}(j, QN_{2MN}),$$



где  $V_{\text{ref}} = V_{\text{eff}} = \frac{\chi_1^2}{\chi_2}$  и введены обозначения  $N_{2MN} = \frac{C\chi_1^2}{\chi_2}$  и  $q_{2MN} = \frac{q\chi_2}{\chi_1}$ . Общее выражение для одномолекулярного РЧФ с учетом коррекции на внефокусную засветку примет вид (вывод исходного выражения показан в работе [9])

$$\begin{aligned} p_{3DGC}^{(1)}(n, q_{2MN}) &= p_{3DG}^{(1)}(n, q_{2MN}) + \frac{1+F_2}{(1+F_1)^2 Q \pi^{\frac{3}{2}} A_0 n!} \sum_{k=n}^{\infty} \frac{(-1)^{k-n} (B_0 q T)^k F_k}{(k-n)!} \frac{\pi^{\frac{3}{2}} A_0}{2^2 k^2} = \\ &= p_{3DG}^{(1)}(n, q_{2MN}) + \frac{1+F_2}{(1+F_1)^2 Q n!} \sum_{k=n}^{\infty} \frac{(-1)^{k-n} (2\sqrt{2}(1+F_1)q_{2MN}T)^k F_k}{(1+F_2)^k (k-n)! (2k)^{\frac{3}{2}}}. \end{aligned} \quad (27)$$

Если применяется коррекция только до второго порядка ( $F_1 \neq 0$  и  $F_2 \neq 0$ ), то выражение (27) упрощается:

$$\begin{aligned} p_{3DGC}^{(1)}(n, q_{2MN}) &= p_{3DG}^{(1)}(n, q_{2MN}) + \frac{F_1}{1+F_1} \frac{q_{2MN}T}{Q} - \frac{F_2}{1+F_2} \frac{(q_{2MN}T)^2}{Q}, \quad n=1, \\ p_{3DGC}^{(1)}(n, q_{2MN}) &= p_{3DG}^{(1)}(n, q_{2MN}) + \frac{F_2}{1+F_2} \frac{(q_{2MN}T)^2}{2Q}, \quad n=2. \end{aligned}$$

После замены переменных  $q = \frac{q_{2MN}\chi_1}{\chi_2} = \frac{q_{2MN}}{2\sqrt{2}}$  получим финальные выражения:

$$\begin{aligned} p_{3DG}^{(1)}(n, q) &= \frac{1+F_2}{Q\sqrt{\pi}(1+F_1)^2 n!} \int_0^{\infty} \gamma \left( n, \frac{1+F_1}{1+F_2} q T e^{-2x^2} \right) dx, \quad n=1, 2, \dots, \\ p_{3DGC}^{(1)}(n, q) &= p_{3DG}^{(1)}(n, q) + \frac{F_1}{1+F_1} \frac{qT}{2\sqrt{2}Q} - \frac{F_2}{1+F_2} \frac{(qT)^2}{8Q}, \quad n=1, \\ p_{3DGC}^{(1)}(n, q) &= p_{3DG}^{(1)}(n, q) + \frac{F_2}{1+F_2} \frac{(qT)^2}{16Q}, \quad n=2. \end{aligned} \quad (28)$$

При значении  $r_0 = 2,4$  подынтегральная функция практически полностью обращается в нуль,  $Q = \frac{V_0}{V_{\text{ref}}} = \frac{4r_0^3}{3\sqrt{\pi}} = 10,4$ . При больших значениях  $Q$  приходится делать больше конволюций одномолекулярного РЧФ, что значительно снижает скорость вычислений. Эмпирически установлено [18], что значение  $Q$ , необходимое для приемлемо точного расчета распределения  $P(n)$ , зависит от произведения  $qT$ . При  $qT < 10$  его можно безопасно установить равным единице, тогда как для  $qT > 10$  значение  $Q$  должно быть достаточно большим, чтобы полностью охватить объем наблюдения. Это необходимо для сохранения нормированного распределения вероятностей  $p_{3DGC}^{(1)}(n, q_{2MN})$  при любых  $q$  и  $T$ .

В целях упрощения приведем здесь алгоритм без коррекции на внефокусное излучение ( $F_1 = 0$  и  $F_2 = 0$ ) (обозначим его как AL3) (полный алгоритм для случая нормализации к эффективному объему подробно рассмотрен в работе [18]).

1. Вычисление РЧФ для молекул первой компоненты. Значения параметров  $q$  и  $N$  полагаются равными  $q_1$  и  $N_{2MN,1}$  соответственно. Параметр  $Q$  рассчитывается следующим образом: если произведение яркости молекул  $q$  и ширины канала регистрации  $T$  не превышает 10, то  $Q = 1$ , если оно меньше 50, то  $Q = 6$ , если меньше 100, то  $Q = 12$ , в противном случае  $Q = 20$ . Создается результирующий вектор значений  $P(n)$  размера  $m + 1$  и инициализируется нулями.

2. Вычисление значения распределения Пуассона при  $n = 0$  ( $P_{\text{Poiss}0} = P_{\text{Poiss}}(0, NQ) = e^{-NQ}$ ) и значения  $n_{p_{\text{max}}}$ , при котором это распределение близко к своему максимальному значению. Распределение Пуассона (мода распределения) принимает максимальное значение при  $n$ , равном самому параметру распределения. Соответственно,  $n_{p_{\text{max}}} = \lfloor NQ \rfloor$ , где  $\lfloor \quad \rfloor$  означает округление к ближайшему целому.

3. Расчет одномолекулярного РЧФ по формуле (28). Поскольку интеграл в выражении (28) расходуется при  $n = 0$ , то вычисление осуществляется по следующей схеме: вначале рассчитываются все значения  $p^{(1)}(n, q)$  при  $n = 1, 2, \dots, m$ , затем вычисляется значение  $p^{(1)}(0, q) = 1 - \sum_{n=1}^m p^{(1)}(n, q)$ . Полезно сразу же проверить условие  $p^{(1)}(0, q) \geq 0$ . Если оно не выполняется, следует увеличить значение параметра  $Q$ . Интеграл в бесконечных пределах можно заменить интегралом в конечных пределах (от 0 до 2,6) или суммой двух определенных интегралов (от 0 до 2,4 и от 2,4 до 5), если требуется высокая точность вычислений и произведение  $qT$  принимает большое значение.

4. Вычисление взвешенной суммы (5) при  $j = 0$ . Рассчитывается значение  $P(0) = P_{\text{Poiss}0}$ .

5. Вычисление взвешенной суммы (5) при  $j = 1$ . Значения  $p^{(1)}(n, q)$  копируются во вспомогательный массив для расчета конволюций  $P^{(j)}$ . Находятся значения  $P_{\text{Poiss}0} = P_{\text{Poiss}0}NQ$  и  $P(n) = P(n) + P^{(j)}(n)P_{\text{Poiss}0}$ ,  $n = 0, 1, \dots, m$ .

6. Вычисление взвешенной суммы (5) при  $j = 2, \dots, n_{p_{\text{max}}}$ . Пересчитывается значение  $P_{\text{Poiss}0} = P_{\text{Poiss}0} \frac{NQ}{j}$ , и выполняется свертка  $P^{(j)}(n) = P^{(j-1)}(n) \otimes p^{(1)}(n, q)$ . Если  $P_{\text{Poiss}0} > \text{eps}$ , вычисляется значение  $P(n) = P(n) + P^{(j)}(n)P_{\text{Poiss}0}$ ,  $n = 0, 1, \dots, m$ , где  $\text{eps}$  – некоторое малое число (например,  $10^{-9}$ ), определяющее точность расчета взвешенной суммы.

7. Вычисление взвешенной суммы (5) при  $j = n_{p_{\text{max}}} + 1, \dots$ . Пересчитывается значение  $P_{\text{Poiss}0} = P_{\text{Poiss}0} \frac{NQ}{j}$ . Если  $P_{\text{Poiss}0} > \text{eps}$ , выполняется свертка  $P^{(j)}(n) = P^{(j-1)}(n) \otimes p^{(1)}(n, q)$  и вычисляется значение  $P(n) = P(n) + P^{(j)}(n)P_{\text{Poiss}0}$ ,  $n = 0, 1, \dots, m$ . Если  $P_{\text{Poiss}0} < \text{eps}$ , вычисления прекращаются.

8. Расчет РЧФ для второй и последующих компонент. Повторяются п. 1–7 данного алгоритма.

9. Расчет результирующего РЧФ по формуле (10).

Для оценки времени расчета РЧФ по всем трем рассмотренным в работе алгоритмам был проведен следующий вычислительный эксперимент. Время расчета определялось для 100 повторений расчета в цикле. Алгоритмы были запрограммированы на языке М и выполнены в среде *Matlab 2021a*. Эксперимент проводился на компьютере с процессором Intel Core i5-10400 (максимальная тактовая частота 4,3 ГГц), оперативной памятью DDR4 объемом 16 Гб (2666 МГц) и SSD-диском Samsung 970 Evo типа NV2.

Время расчета РЧФ по алгоритмам AL1, AL2 и AL3  
PCD calculation time using AL1, AL2 and AL3 algorithms

Алгоритм	Время вычислений, мс, при параметрах	
	$q = 6 \cdot 10^4$ фотоотсчетов в секунду от одной молекулы; $T = 5 \cdot 10^{-5}$ с; $N_{2MN} = 5$ ; $m = 64$	$q = 2 \cdot 10^5$ фотоотсчетов в секунду от одной молекулы; $T = 5 \cdot 10^{-5}$ с; $N_{2MN} = 10$ ; $m = 512$
AL1 (по методу FGFC)	23	408
AL2 (по методу FIDA)	482	4006
AL3 (по методу PCH)	809	10 720

Из значений, представленных в таблице, очевидно, что применять наиболее стабильный метод расчета РЧФ с вычислением последовательных конволюций неэффективно. Учитывая, что в глобальном анализе приходится рассчитывать РЧФ сотни, тысячи и десятки тысяч раз при самых разных параметрах, разработка эффективной методики расчета становится крайне востребованной задачей.

На основании проведенных исследований предлагается следующая методика расчета РЧФ. Если значение произведения суммы яркостей молекул всех анализируемых компонент на ширину канала регистрации не превышает некоторого заранее определенного значения  $qT_{\text{max}}$ , то расчет РЧФ осуществляется через промежуточное вычисление ПФ числа фотоотсчетов с последующим применением обратного преобразования Фурье, при этом ПФ рассчитывается по методу FGFC (алгоритм AL1).

При достижении произведением суммы яркостей молекул всех анализируемых компонент на ширину канала регистрации значения  $qT_{\text{max}}$ , а также в случае возникновения ошибки вычислительного характера при использовании метода FGFC расчет РЧФ выполняется через промежуточное вычисление ПФ числа фотоотсчетов с последующим применением обратного преобразования Фурье, но уже по алгоритму, предложенному в методе FIDA (алгоритм AL2).

При возникновении ошибок вычислительного характера расчет РЧФ проводится по методу PCH (с помощью последовательных конволюций одномолекулярного РЧФ) (алгоритм AL3).

Алгоритм вычисления РЧФ, реализующий предложенную методику, имеет следующий вид.

1. Инициализация параметров. Для гауссовского профиля засветки значение  $qT_{\max}$  можно положить равным 20 (установлено эмпирически).

2. Вычисление произведения суммы яркостей молекул всех анализируемых компонент на ширину канала регистрации (обозначим его как  $qTs$ ).

3. Расчет РЧФ:

- если  $qTs \leq qT_{\max}$ , используется алгоритм AL1;
- если возникает ошибка вычислительного характера (ее можно обработать в конструкции try... catch) или  $qTs > qT_{\max}$ , реализуется алгоритм AL2;
- если возникает ошибка вычислительного характера, то применяется алгоритм AL3.

Разработанный алгоритм реализован в программном обеспечении *FFS Data Processor*. Он показал свою эффективность при анализе процессов димеризации зеленого флуоресцирующего белка в живых клетках диктиостелиума [4]. Корректность вычислений РЧФ проверялась путем быстрой оценки параметров модели по методу моментов [13]. Полученные оценки яркости и количества молекул в объеме наблюдения сравнивались с истинными значениями, используемыми при вычислении РЧФ. Во всем диапазоне изменения параметров модели относительная ошибка не превышала  $10^{-7}$  (при наиболее характерных для ФФС параметрах ошибка находилась в пределах  $10^{-9}$ – $10^{-12}$ ), что свидетельствует о высокой точности вычислений.

### Заключение

Выявленные ограничения на допустимый диапазон оцениваемых параметров существенно сужают сферу применения быстрого алгоритма расчета РЧФ по методу FGFC. Если для разового вычисления РЧФ с контролем области определения параметров его использование оправданно и даже рекомендовано, то для глобального анализа данный алгоритм неприемлем. Применение быстрого алгоритма расчета РЧФ в итерационном анализе также чревато возникновением проблем вычислительного характера, так как значения оцениваемых параметров могут выйти за пределы, при которых обеспечивается корректный расчет РЧФ. Следующим по вычислительной эффективности является алгоритм, используемый в методе FIDA. Несмотря на отсутствие сложностей, связанных с вычислением экспоненты путем разложения ее в ряд Тейлора (что в нашем случае приводит к появлению знакопеременного ряда), проблемы вычислительного характера все же присутствуют. Так, несколько экспонент, вложенных друг в друга, способны быстро вызвать переполнение разрядной сетки или же привести к потере точности. Еще одной проблемой является необходимость использования обратного преобразования Фурье, в свою очередь накладывающего ограничения на вычисляемую ПФ. Число точек в ПФ должно быть кратно степени двойки, что при больших значениях  $t$  часто приводит к множеству ненужных вычислений, если максимально выпавшее число фотоотчетов лишь ненамного превосходит предыдущую степень двойки. Если же, наоборот, ПФ не полностью обращается в нуль при выбранном количестве точек, то это приводит к появлению артефакта на РЧФ после применения обратного преобразования Фурье. Наиболее стабильным и свободным от проблем вычислительного характера является алгоритм, основанный на вычислении одномолекулярного РЧФ с последующим применением последовательных конволюций. Но, к сожалению, данный алгоритм очень медленный.

Все вышесказанное потребовало разработки методики вычисления РЧФ, основанной на использовании положений сразу всех трех методов, рассмотренных в данной статье. Для обоснования этой методики получены аналитические выражения и алгоритмы расчета РЧФ, которые могут применяться в глобальном анализе характеристик зарегистрированного потока фотоотчетов и отличаются вычислительной эффективностью и устойчивостью результатов. Вывод аналитических выражений можно повторить и для других видов аппроксимации профиля засветки и нормировки параметров. Особенностью разработанной методики является нахождение истинного значения яркости непосредственно в процессе анализа. В противном случае требовался бы пересчет полученных оценок для сравнения результатов анализа.

Представленные методика и алгоритмы расчета РЧФ могут применяться при разработке программного обеспечения для анализа данных в ФФС, а также при проведении исследований, требующих вычисления множества анализируемых характеристик в большом диапазоне оцениваемых параметров.

### Библиографические ссылки / References

1. Kitamura A, Kinjo M. State-of-the-art fluorescence fluctuation-based spectroscopic techniques for the study of protein aggregation. *International Journal of Molecular Sciences*. 2018;19(4):964. DOI: 10.3390/IJMS19040964.
2. Elson EL, Magde D. Fluorescence correlation spectroscopy. I. Conceptual basis and theory. *Biopolymers*. 1974;13(1):1–27. DOI: 10.1002/BIP.1974.360130102.

3. Yu Lan, Lei Yunze, Ma Ying, Liu Min, Zheng Juanjuan, Dan Dan, et al. A comprehensive review of fluorescence correlation spectroscopy. *Frontiers of Physics*. 2021;9:644450. DOI: 10.3389/FPHY.2021.644450.
4. Nederveen-Schippers LM, Pathak P, Keizer-Gunnink I, Westphal AH, van Haastert PJM, Borst JW, et al. Combined FCS and PCH analysis to quantify protein dimerization in living cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021;22(14):7300. DOI: 10.3390/IJMS22147300.
5. Elson EL. Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophysical Journal*. 2011;101(12):2855–2870. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.11.012.
6. Kask P, Palo K, Ullmann D, Gall K. Fluorescence-intensity distribution analysis and its application in biomolecular detection technology. *PNAS*. 1999;96(24):13756–13761. DOI: 10.1073/pnas.96.24.13756.
7. Palo K, Mets Ü, Jäger S, Kask P, Gall K. Fluorescence intensity multiple distributions analysis: concurrent determination of diffusion times and molecular brightness. *Biophysical Journal*. 2000;79(6):2858–2866. DOI: 10.1016/S0006-3495(00)76523-4.
8. Chen Y, Müller JD, So PTC, Gratton E. The photon counting histogram in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*. 1999;77(1):553–567. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)76912-2.
9. Huang B, Perroud TD, Zare RN. Photon counting histogram: one-photon excitation. *ChemPhysChem*. 2004;5(10):1523–1531. DOI: 10.1002/cphc.200400176.
10. Perroud TD, Huang B, Zare RN. Effect of bin time on the photon counting histogram for one-photon excitation. *ChemPhysChem*. 2005;6(5):905–912. DOI: 10.1002/cphc.200400547.
11. Müller JD. Cumulant analysis in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2004;86(6):3981–3992. DOI: 10.1529/biophysj.103.037887.
12. Wu B, Singer RH, Mueller JD. Time-integrated fluorescence cumulant analysis and its application in living cells. In: Tetin SY, editor. *Fluorescence fluctuation spectroscopy (FFS). Part A*. [S. l.]: Academic Press; 2013. p. 99–119 (Methods in enzymology; volume 518). DOI: 10.1016/B978-0-12-388422-0.00005-4.
13. Skakun VV, Novikov EG, Apanasovich TV, Apanasovich VV. Fluorescence cumulants analysis with non-ideal observation profiles. *Methods and Applications in Fluorescence*. 2015;3(4):045003. DOI: 10.1088/2050-6120/3/4/045003.
14. Meng F, Ma H. A comparison between photon counting histogram and fluorescence intensity distribution analysis. *The Journal of Physical Chemistry B*. 2006;110(51):25716–25720. DOI: 10.1021/jp063845r.
15. Skakun VV, Apanasovich VV. [Photon counting distribution analysis with brightness profile correction in single molecule fluctuation spectroscopy]. *Vestnik Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya 1, Fizika. Matematika. Informatika*. 2008;2:31–35. Russian.
16. Skakun VV, Novikov EG, Apanasovich VV, Tanke HJ, Deelder AM, Mayboroda OA. Initial guesses generation for fluorescence intensity distribution analysis. *European Biophysics Journal*. 2006;35(5):410–423. DOI: 10.1007/s00249-006-0048-8.
17. Marquardt DW. An algorithm for least-squares estimation of nonlinear parameters. *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics*. 1963;11(2):431–441. DOI: 10.1137/0111030.
18. Skakun VV, Digris AV, Apanasovich VV. Global analysis of autocorrelation functions and photon counting distributions in fluorescence fluctuation spectroscopy. In: Engelborghs Y, Visser AJWG, editors. *Fluorescence spectroscopy and microscopy: methods and protocols*. [S. l.]: Humana Press; 2014. p. 719–741 (Methods in molecular biology; volume 1076). DOI: 10.1007/978-1-62703-649-8\_33.
19. Rigler R, Mets Ü, Widengren J, Kask P. Fluorescence correlation spectroscopy with high count rate and low background: analysis of translational diffusion. *European Biophysics Journal*. 1993;22(3):169–175. DOI: 10.1007/BF00185777.
20. Hess ST, Webb WW. Focal volume optics and experimental artifacts in confocal fluorescence correlation spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2002;83(4):2300–2317. DOI: 10.1016/S0006-3495(02)73990-8.
21. Palo K, Mets Ü, Loooris V, Kask P. Calculation of photon-count number distributions via master equations. *Biophysical Journal*. 2006;90(6):2179–2191. DOI: 10.1529/biophysj.105.066084.

Получена 03.02.2023 / исправлена 18.02.2023 / принята 20.02.2023.  
Received 03.02.2023 / revised 18.02.2023 / accepted 20.02.2023.