

ОЦЕНКА КОНЦЕНТРАЦИИ
И ЯРКОСТИ МОЛЕКУЛ НА ОСНОВЕ УПРАВЛЯЕМОГО
ИЗМЕНЕНИЯ ИНТЕНСИВНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИВ. В. СКАКУН¹⁾, В. В. АПАНАСОВИЧ²⁾¹⁾Белорусский государственный университет, пр. Независимости, 4, 220030, г. Минск, Беларусь²⁾Независимый исследователь, г. Минск, Беларусь

Аннотация. Предложен новый метод оценки концентрации и характеристической яркости сложных молекулярных комплексов во флуоресцентной флуктуационной спектроскопии на основе измерения вероятности отсутствия фотоотсчетов на интервале регистрации для различных значений интенсивности возбуждения. Изменение интенсивности возбуждения можно реализовать посредством изменения мощности лазера, смены нейтральных фильтров, которые ослабляют интенсивность излучения лазера, и независимого прореживания фотоотсчетов. Основой метода является выражение, связывающее вероятность отсутствия фотоотсчетов на интервале регистрации с коэффициентом аттенюации интенсивности возбуждения. Выведены выражения с учетом и без учета коррекции на внефокусное излучение. Оценки параметров исследуемого вещества находятся путем анализа полученной нелинейной зависимости с помощью метода наименьших квадратов. Разработанный метод прост в реализации, он не требует измерения сложных характеристик регистрируемого потока фотоотсчетов и, как следствие, допускает использование детектора со значительным мертвым временем и вероятностью генерации послеимпульсов. Работоспособность метода проверена на основе анализа смоделированных и экспериментально измеренных данных и сравнения его результатов с результатами, полученными с помощью метода анализа гистограмм счета фотонов.

Ключевые слова: флуоресцентная флуктуационная спектроскопия; производящий функционал; распределение числа фотоотсчетов; РЧФ; вероятность отсутствия фотоотсчетов на интервале регистрации; анализ распределения интенсивности флуоресценции; анализ гистограмм счета фотонов.

Благодарность. Авторы выражают признательность отделу паразитологии Медицинского центра Лейденского университета (Нидерланды), и в частности доктору О. Майбороде, за предоставленные результаты измерения распределения числа фотоотсчетов раствора красителя Alexa-488 в бифере.

Образец цитирования:

Скакун ВВ, Апанасович ВВ. Оценка концентрации и яркости молекул на основе управляемого изменения интенсивности флуоресценции. *Журнал Белорусского государственного университета. Физика*. 2026;1:13–25.
EDN: FPTSLD

For citation:

Skakun VV, Apanasovich VV. Estimation of molecular concentration and brightness based on controlled attenuation of fluorescence intensity. *Journal of the Belarusian State University. Physics*. 2026;1:13–25. Russian.
EDN: FPTSLD

Авторы:

Виктор Васильевич Скакун – кандидат физико-математических наук, доцент; заведующий кафедрой системного анализа и компьютерного моделирования факультета радиопизики и компьютерных технологий.

Владимир Владимирович Апанасович – доктор физико-математических наук, профессор; независимый исследователь.

Authors:

Viktor V. Skakun, PhD (physics and mathematics), docent; head of the department of system analysis and computer simulation, faculty of radiophysics and computer technologies.

skakun@bsu.by
<https://orcid.org/0000-0003-0880-4188>

Vladimir V. Apanasovich, doctor of science (physics and mathematics), full professor; independent researcher.

apanasovichv@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-4525-4234>

ESTIMATION OF MOLECULAR CONCENTRATION AND BRIGHTNESS BASED ON CONTROLLED ATTENUATION OF FLUORESCENCE INTENSITY

V. V. SKAKUN^a, V. V. APANASOVICH^b

^aBelarusian State University,
4 Niezaliezhnasci Avenue, Minsk 220030, Belarus

^bIndependent researcher, Minsk, Belarus

Corresponding author: V. V. Skakun (skakun@bsu.by)

Abstract. A new method for estimating the concentration and characteristic brightness of complex molecular assemblies in fluorescence fluctuation spectroscopy is proposed. This method measures the probability of zero photon counts within the registration interval for different excitation intensities. The excitation intensity can be varied by changing the laser power, neutral density filters that attenuate the laser radiation intensity, and independent photon count thinning. The method is based on an expression relating the probability of zero photon counts within the registration interval to the excitation intensity attenuation coefficient. Expressions are derived with and without correction for out-of-focus emission. Estimates of the parameters of the test substance are found by analysing the obtained non-linear dependence using the least-squares method. The developed method is simple to implement, does not require measuring complex characteristics of the recorded photon count flow, and, as a result, allows the use of a detector with significant dead time and afterpulse probability. The performance of the method was verified by analysing simulated and experimentally measured data and comparing its results with the results obtained using the photon counting histogram method.

Keywords: fluorescence fluctuation spectroscopy; generating functional; photon counting distribution; PCD; probability of zero photon counts within the registration interval; fluorescence intensity distribution analysis; FIDA; photon counting histogram; PCH.

Acknowledgements. The authors express their gratitude to the department of parasitology at the Leiden University Medical Centre (Netherlands), and in particular to doctor O. Maiboroda, for providing the results of measuring the photon counting distribution of the Alexa-488 solution in buffer.

Введение

Наиболее перспективными методами оценки концентрации сложных молекулярных комплексов в исследуемом образце (чаще всего в растворе) и их характеристической яркости являются методы флуоресцентной флуктуационной спектроскопии (ФФС) [1; 2]. В первую очередь к ним относятся метод флуоресцентной корреляционной спектроскопии (*fluorescence correlation spectroscopy*, FCS) [2–4], метод анализа распределения интенсивности флуоресценции (*fluorescence intensity distribution analysis*, FIDA) [5], метод анализа гистограмм счета фотонов (*photon counting histogram*, PCH) [6; 7], метод анализа флуоресцентных кумулянтов (*fluorescence cumulants analysis*, FCA) [8] и их производные. Достоинствами данных методов являются высокая чувствительность и неинвазивность, допускающая исследование молекулярных процессов в живых клетках. Источником информации в ФФС служат зарегистрированные детектором с однофотонной чувствительностью флуктуации интенсивности флуоресценции от молекул, диффундирующих через предельно малый освещенный объем, который образован объективом инвертированного конфокального микроскопа с высокой числовой апертурой ($NA \geq 1,2$) [4]. Применение указанных методов возможно также в случае ограниченной диффузии, например, для исследования свойств молекул в мембранах клеток или молекул, иммобилизованных на подложке [2].

В ФФС характеристическая яркость – это среднее число фотонов на флуоресцентную молекулу при прохождении ее через объем наблюдения, прямо пропорциональное интенсивности возбуждения, собственной яркости флуорофора и количеству флуорофоров на частицу. Данная физическая величина определяет способность молекулы излучать фотоны под действием возбуждающего излучения. Чаще всего характеристическая яркость измеряется в количестве фотонов, зарегистрированных от одной молекулы в единицу времени (*count per second per molecule*, cpsm). Анализ характеристической яркости сложных молекулярных комплексов позволяет не только разрешать смеси веществ, отличающихся квантовым выходом, но и оценивать степень стехиометрии комплекса (мономер –

N -мер), открывая возможность для исследования процессов олигомеризации [9; 10]. Для соотнесения оценки характеристической яркости с оценками, получаемыми при других измерениях, можно воспользоваться калибровочным измерением яркости некоторого стабильного флуорофора, например, серии Atto.

Теория методов ФФС основана на анализе определенной характеристики потока фотоотсчетов. Так, в методе FCS анализируется автокорреляционная функция (АКФ) потока фотоотсчетов [4], в методах PCN и FIDA – распределение числа фотоотсчетов (РЧФ) [5; 6], а в методе FSA анализируются факториальные кумулянты РЧФ [8]. Разработанные в более позднее время производные вышеупомянутых методов – FIMDA [11], PCMH [12] и TIFSA [13] – требуют расчета множества РЧФ (или факториальных кумулянтов РЧФ), вычисляемых с разной шириной интервала регистрации. Стоит отметить, что предложен метод глобального анализа АКФ и РЧФ, комбинирующий достоинства методов FCS и PCN (или FIDA) [14; 15]. Кроме того, разработаны методы, основанные на анализе характеристик потока фотоотсчетов и более высоких порядков [16; 17]. Нарастание объема и порядка исследуемых характеристик приводит к существенному повышению сложности их расчета и анализа, а также требует наличия дорогостоящей и быстродействующей аппаратуры, способной с высокой точностью регистрировать моменты прихода на детектор отдельных фотонов.

Ранее нами был предложен метод оценки концентрации флуоресцентных молекул в ФФС на основе анализа простейшей характеристики потока фотоотсчетов – вероятности отсутствия фотоотсчетов на интервале регистрации (*probability of zero photon counts within the registration interval*, PZPC; далее – ВОФИР) [18]. Данная характеристика очень проста в вычислении: необходимо разбить поток фотоотсчетов на карманы достаточной малой ширины T (будем называть их интервалами регистрации), посчитать количество интервалов, на которых не было зарегистрировано ни одного фотоотсчета, и поделить на общее количество интервалов. Достоинством ВОФИР является не только простота алгоритма ее вычисления, но и возможность существенно удешевить регистрирующую аппаратуру благодаря тому, что нет необходимости считать точное количество фотонов, попадающих в интервал регистрации, достаточно только констатировать факт наличия или отсутствия хотя бы одного фотоотсчета на этом интервале. Указанное обстоятельство позволяет снизить требования к длительности мертвого времени детектора и быстродействию электроники.

Дополнительной проблемой анализа РЧФ и факториальных кумулянтов РЧФ является зависимость РЧФ от ширины интервала регистрации T . При значительном уменьшении величины T с целью снизить влияние происходящих в веществе динамических процессов и увеличить объем измеренных данных РЧФ может быть представлено всего несколькими точками, что не позволяет проводить анализ этой характеристики с использованием многокомпонентной модели либо включать в модель коррекции на внефокусное излучение [7] или динамические процессы [11; 13]. Число параметров в модели может легко превышать количество точек в анализируемой кривой, тогда как ВОФИР будет иметь ненулевое значение в достаточно большом диапазоне интенсивности возбуждения и ширины интервала регистрации при типичных для ФФС концентрациях исследуемого вещества и характеристической яркости молекул.

Таким образом, целью исследования является разработка метода оценки концентрации и характеристической яркости молекул в ФФС, основанного на анализе ВОФИР. С учетом нелинейной зависимости ВОФИР от характеристической яркости молекул и, соответственно, от интенсивности возбуждающего излучения предлагается новый метод анализа, использующий ступенчатое или непрерывное изменение интенсивности возбуждения, легко реализуемое посредством смены нейтральных фильтров, ослабляющих интенсивность излучения лазера, либо путем вращения колеса с неоднородно нанесенным поглощающим покрытием. Кроме того, можно эмулировать уменьшение интенсивности засветки, применяя независимое прореживание событий потока с заданной вероятностью потерь [19].

Для вывода выражения, связывающего ВОФИР с коэффициентом аттенуации интенсивности возбуждения, будем использовать теорию производящих функционалов (ПФЛ) потока фотоотсчетов [19; 20]. Достоинством применения ПФЛ является возможность получать различные характеристики потока фотоотсчетов путем его дифференцирования [19; 20]. Зная ПФЛ потока, ВОФИР можно получить, просто положив пробную функцию ПФЛ равной минус единице.

Материалы и методы исследования

Материалы. В работе использовался краситель Alexa-488 maleimide (*Molecular Probes Europe BV*, Нидерланды). В качестве растворителя был выбран фосфатно-солевой буфер (0,035 моль/л фосфат,

0,15 моль/л NaCl; pH 7,6). Хранение красителя и пробоподготовка осуществлялись согласно рекомендациям производителя. При исследовании образцов использовались 96-луночные планшеты с боросиликатным дном (*Polyfiltronics*, США).

Методы. Измерения проводились с помощью системы ConfoCor-2 (*Carl Zeiss*, Германия), оснащенной водно-иммерсионным объективом Zeiss Neofluar (увеличение $\times 40$; NA = 1,2) этого же производителя в качестве фокусирующей оптики. Для возбуждения флуоресценции использовалась линия 488 нм аргонового ионного лазера. Результаты измерения РЧФ раствора красителя в буфере были предоставлены отделом паразитологии Медицинского центра Лейденского университета (Нидерланды).

Анализ экспериментально измеренных РЧФ выполнялся с помощью метода РСН. Алгоритм анализа и основные выражения подробно описаны в работах [15; 21]. Для определения количества молекул, участвующих в процессе излучения фотонов, использовалась величина эффективного объема $V_{\text{eff}} = \frac{\chi_1^2}{\chi_2}$, где

$$\chi_k = \int_D B^k(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad (1)$$

$B(\mathbf{r})$ есть функция профиля засветки, а интегрирование производится по всему объему наблюдения D [22]. Таким образом, среднее число молекул в исследуемом объеме определяется как

$$N_{\text{eff}} = cV_{\text{eff}},$$

где c – средняя концентрация молекул. При однофотонном возбуждении флуоресценции функция $B(\mathbf{r})$ хорошо аппроксимируется гауссовой функцией вида

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

где ω_0 и z_0 характеризуют падение интенсивности флуоресценции в поперечном и аксиальном направлениях соответственно, а значение B_0 может быть принято равным единице (профиль засветки в максимуме нормирован к единице). В ФФС объем наблюдения D является открытым и не имеет физических границ. Поскольку интенсивность возбуждения очень быстро падает с удалением от фокуса, а размеры кюветы с веществом намного больше ω_0 , интегрирование в формуле (1) можно производить в бесконечных пределах. Для гауссова профиля засветки получаем

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

Имитационное моделирование потока фотоотсчетов с заданным РЧФ выполнялось по алгоритму, приведенному в публикациях [23; 24]. Результатом работы данного алгоритма является массив интенсивности потока фотоотсчетов (число фотоотсчетов, полученных для каждого интервала регистрации). Для вычисления ВОФИР $\tilde{P}_0$ (тильда обозначает измеренное или оцененное значение в противоположность теоретическому значению P_0) достаточно посчитать количество нулей в этом массиве и поделить на общее количество элементов массива M :

$$\tilde{P}_0 = \frac{\sum_{i=1}^M 1|_{n(i)=0}}{M},$$

где $n(i)$ – ненормированная интенсивность потока фотоотсчетов.

Анализ зависимости ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения проводился с помощью метода наименьших квадратов, при этом использовалась функция `nlinfit` пакета *Matlab*. Стандартные отклонения величины $\tilde{P}_0$, необходимые для выполнения взвешенного анализа, вычислялись в предположении биномиальной статистики измеренных данных:

$$\text{std}(\tilde{P}_0) = \frac{\tilde{P}_0(1 - \tilde{P}_0)}{M}.$$

Данное предположение следует из физики эксперимента, а также из того факта, что биномиальное распределение используется и при анализе РЧФ в методах РСН и FIDA [5; 6] ($\tilde{P}_0$ есть первая точка РЧФ). Доверительные интервалы оцененных параметров вычислялись по методу асимптотических стандартных ошибок [25] с применением функции `nlparci` пакета *Matlab*:

$$p \pm t_{1-\frac{\alpha}{2}, d} s, \quad (4)$$

где p – оцененный параметр; $t_{1-\frac{\alpha}{2}, d}$ – квантиль распределения Стьюдента при $\alpha = 1 - \beta$; β – доверительная вероятность (чаще всего она равна 0,95); d – число степеней свободы, рассчитываемое как число точек в анализируемой кривой минус число оцениваемых параметров; s – стандартные ошибки оцениваемых параметров, вычисленные на основе матрицы вариаций – ковариаций, возвращаемой функцией `nlinfoit` пакета *Matlab*.

ПФЛ потока фотоотсчетов. Выражение для ПФЛ потока случайных событий имеет следующий вид [19; 20]:

$$L[u, \Omega] = \left\langle \prod_{j=1}^n [1 + u(t_j)] \right\rangle_{t, n}, \quad (5)$$

где $u(t)$ есть произвольная пробная функция, принимающая значения из интервала $[-1; 0]$, а $\langle \rangle_{t, n}$ означает усреднение значений функции по числу появившихся точек и по их координатам $t_1, t_2, \dots$ в интервале регистрации Ω . Выполнив усреднение в формуле (5), можем записать выражение для ПФЛ в развернутом виде [19]:

$$L[u, \Omega] = \sum_{i=0}^{\infty} \frac{1}{i!} \int_{\Omega} \pi_i(t_1, \dots, t_i; \Omega) \prod_{j=1}^i [1 + u(t_j)] dt_1 \dots dt_i,$$

где $\pi_i(t_1, \dots, t_i; \Omega)$ задают совместную плотность вероятности появления в области Ω точно i событий, которые попадают в интервалы $[t_1, t_1 + dt_1), \dots, [t_i, t_i + dt_i)$.

Имея выражения для ПФЛ, можно находить характеристики потока фотоотсчетов с помощью простых математических преобразований. Например, для вычисления ВОФИР P_0 достаточно положить пробную функцию равной минус единице [19; 20]:

$$P_0 = \pi_0(\Omega) = L[u; \Omega] \Big|_{u=-1}.$$

Результаты и их обсуждение

В работе предложен новый метод оценки концентрации и характеристической яркости молекул в ФФС на основе анализа ВОФИР, измеренной для различных значений интенсивности возбуждения (будем называть его метод ВОФИРА (PZPCA)). Метод базируется на нелинейной зависимости ВОФИР от интенсивности флуоресценции молекул и может быть реализован путем ступенчатого уменьшения (или увеличения) интенсивности возбуждающего сигнала лазера, которое легко реализовать посредством изменения мощности лазера либо смены нейтральных фильтров, ослабляющих интенсивность излучения лазера. Многие коммерческие микроскопы, например Nikon Ti, оснащены встроенной турелью для быстрой смены фильтров. При невозможности воспользоваться встроенной турелью фильтров можно применять внешние устройства, например моторизованное колесо с фильтрами FW102CWNEB (*Thorlabs*, США). Кроме того, можно произвести несколько последовательных измерений при одинаковых условиях, а затем выполнить независимое прореживание точек потока с заданной вероятностью потерь [19; 20].

Рассмотрим некоторый открытый объем наблюдения D , образованный лучом лазера, сфокусированным с помощью объектива с высокой числовой апертурой. В этом объеме находятся молекулы, излучающие фотоны. Фотоны регистрируются детектором с однофотонной чувствительностью и в виде потока фотоотсчетов сохраняются в системе. Молекулы могут свободно входить в освещенный объем и покидать его вследствие процесса свободной диффузии. Обозначим через $\lambda(t, \mathbf{r})$ интенсивность флуоресценции, которая зарегистрирована системой от одной молекулы, находящейся в точке с радиус-вектором $\mathbf{r}$ в области засветки в момент времени t . ПФЛ такой системы может быть записан в следующем виде [18]:

$$L[u; \Omega] = \exp \sum_{j=1}^K \left\{ c_j \int_D \left[\exp \left\{ \int_{\Omega} \lambda_j(t, \mathbf{r}) u(t) dt \right\} - 1 \right] d\mathbf{r} \right\},$$

где $\Omega = [T_0, T_0 + T]$ – интервал регистрации; $u(t)$ – формальный параметр (пробная функция); K – число видов молекул (компонент) в исследуемом образце; c_j – средняя концентрация j -й компоненты. Предположим, что интенсивность $\lambda_j(t, \mathbf{r})$ является стационарной. Тогда

$$\lambda_j(t, \mathbf{r}) = qB(\mathbf{r}),$$

где q – характеристическая яркость молекулы, равная произведению интенсивности засветки в фокусе, квантового выхода молекулы, коэффициента экстинкции и эффективности системы регистрации. Значение T_0 можно положить равным нулю. В итоге ПФЛ потока примет следующий вид [18]:

$$L[u; \Omega] = \exp \sum_{j=1}^K \left\{ c_j \int_D \left[\exp \left\{ \int_0^T q_j B(\mathbf{r}) u(t) dt \right\} - 1 \right] d\mathbf{r} \right\}. \quad (6)$$

Найдем выражение для P_0 :

$$P_0 = L[u; \Omega]_{u=-1} = \exp \sum_{j=1}^K \left\{ c_j \int_D \left[\exp \{ -q_j TB(\mathbf{r}) \} - 1 \right] d\mathbf{r} \right\}. \quad (7)$$

Разложим экспоненту под знаком интеграла в выражении (7) в ряд Маклорена:

$$P_0 = \exp \sum_{j=1}^K \left\{ c_j \int_D \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(-q_j TB(\mathbf{r}))^k}{k!} d\mathbf{r} \right\} = \exp \sum_{j=1}^K \left\{ c_j \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(-q_j T)^k \chi_k}{k!} \right\}.$$

Учитывая линейную зависимость характеристической яркости молекул q от интенсивности возбуждающего излучения I_0 при однофотонном возбуждении флуоресценции и отсутствии эффектов насыщения и фоторазрушения [26], запишем выражение для ВОФИР при некотором коэффициенте аттенюации интенсивности возбуждения w , определенном как множитель к начальному значению интенсивности возбуждения в условиях отсутствия аттенюации интенсивности возбуждения (величина $w = 0,5$ соответствует двукратному уменьшению интенсивности возбуждения):

$$P_0(w) = \exp \sum_{j=1}^K \left\{ c_j \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(-q_j w T)^k \chi_k}{k!} \right\}. \quad (8)$$

Для исключения неизвестных параметров профиля засветки ω_0 и z_0 , присутствующих в выражении для χ_k (3), положим, что $B_0 = 1$, и сделаем переход от концентрации к количеству молекул в объеме наблюдения:

$$P_0(w) = \exp \sum_{j=1}^K \left\{ \gamma_2 N_{\text{eff},j} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(-q_j w T)^k \gamma_k}{k!} \right\}, \quad (9)$$

где $\gamma_k = \frac{\chi_k}{\chi_1}$ – так называемые геометрические факторы профиля засветки. При аппроксимации профиля

засветки гауссовой функцией вида (2) $\gamma_k = k^{-\frac{3}{2}}$.

Значения параметров c_j и q_j в выражениях (6)–(9) зависят от ширины интервала регистрации T , поскольку динамические процессы, например диффузия молекул и переходы в триплетное состояние, в модели (6) не учитываются. Можно выполнить коррекцию на динамические процессы и получить не зависящие от T оценки c_{0j} и q_{0j} с помощью выражений

$$q_{0j} = \frac{q_j}{B_2(T, \tau_{\text{diff},j}, a, \tau_{\text{trip}}, F_{\text{trip}})},$$

$$c_{0j} = c_j B_2(T, \tau_{\text{diff},j}, a, \tau_{\text{trip}}, F_{\text{trip}}),$$

где

$$B_2(T, \tau_{\text{diff},j}, a, \tau_{\text{trip}}, F_{\text{trip}}) = \frac{2}{T^2} \int_0^T (T-t) g_t(t, \tau_{\text{diff},j}, a, \tau_{\text{trip}}, F_{\text{trip}}) dt,$$

а $g_t(t, \tau_{\text{diff}, j}, a, \tau_{\text{trip}}, F_{\text{trip}})$ – это часть выражения для АКФ в методе FCS, зависящая от времени [11; 12; 15]. Например, для случая свободной трехмерной диффузии молекул одного типа с учетом переходов в триплетное состояние $g_t(t, \tau_{\text{diff}, j}, a, \tau_{\text{trip}}, F_{\text{trip}})$ имеет вид

$$g_t(t, \tau_{\text{diff}, j}, a, \tau_{\text{trip}}, F_{\text{trip}}) = \frac{1 - F_{\text{trip}} + F_{\text{trip}} e^{-\frac{t}{\tau_{\text{trip}}}}}{1 - F_{\text{trip}}} \frac{1}{\left(1 + \frac{t}{\tau_{\text{diff}, j}}\right) \sqrt{1 + \frac{t}{a^2 \tau_{\text{diff}, j}}}},$$

где $\tau_{\text{diff}, j}$ – характеристическое диффузионное время j -й компоненты; $a = \frac{z_0}{\omega_0}$; F_{trip} и τ_{trip} – фракция и среднее время пребывания молекул в триплетном состоянии соответственно [4; 11; 12]. При выборе малой ширины интервала регистрации ($T \ll \tau_{\text{diff}}$) $B_2(T) = T^2$. В целях упрощения изложения данная зависимость не будет явно отражена в приведенных в работе формулах, но ее всегда следует учитывать. Без выполнения коррекции на динамические процессы сравнивать полученные оценки концентрации и характеристической яркости можно только при одинаковой ширине интервала регистрации. Эта зависимость также не позволяет упростить схему получения экспериментальных данных, уменьшив время регистрации вместо уменьшения мощности лазера с помощью введения коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения w .

Применение выражения (9) для аппроксимации экспериментальных данных, полученных при однофотонном возбуждении флуоресценции, равно как и экспериментальных данных, полученных при анализе РЧФ с помощью метода РСН, в большинстве случаев не представляется возможным из-за большого отклонения фактического профиля засветки от предполагаемого трехмерного асимметричного гауссова приближения (2) [7]. Чтобы улучшить модель, в работе [7] ввели дополнительные параметры аппроксимации F_k , определяемые как относительная разность между интегралом (1) k -й степени фактической функции профиля засветки $B(\mathbf{r})$ (в максимуме нормированной к единице ($B_0 = 1$)) и интегралом ее трехмерной гауссовой аппроксимации $\chi_{G, k}$:

$$F_k = \frac{\chi_k - \chi_{G, k}}{\chi_{G, k}}. \quad (10)$$

В большинстве случаев поправки первого порядка (все F_k равны нулю, кроме F_1) достаточно для достижения хорошей аппроксимации экспериментальных данных.

Подставим выражение (10) в формулу (9):

$$P_0(w) = \exp \sum_{j=1}^K \left\{ c_j \sum_{k=1}^{\infty} \frac{(-q_j w T)^k (1 + F_k) B_0^k k^{-\frac{3}{2}} \left(\frac{\pi}{2}\right)^{\frac{3}{2}} \omega_0^2 z_0}{k!} \right\}. \quad (11)$$

Введем обозначение $A_0 = \omega_0^2 z_0$ в выражении (11) и аналогично работе [21] для определения неизвестных параметров A_0 и B_0 будем использовать систему нормировочных уравнений

$$\int_V B(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = \chi_1, \quad \int_V B^2(\mathbf{r}) d\mathbf{r} = \chi_2. \quad (12)$$

Получим

$$A_0 = \frac{(1 + F_2) \chi_1^2}{\pi^2 (1 + F_1)^2 \chi_2}, \quad B_0 = \frac{2\sqrt{2} (1 + F_1) \chi_2}{(1 + F_2) \chi_1}. \quad (13)$$

Подставим выражения (13) в формулу (11) и введем обозначения $N_{2MN} = c \frac{\chi_1^2}{\chi_2}$ и $q_{2MN} = q \frac{\chi_2}{\chi_1}$ (индекс $2MN$ (*two moments normalised*) обозначает нормализацию вида (12)). В итоге получим

$$P_0(w) = \exp \sum_{j=1}^K \left\{ N_{2MN,j} \frac{1+F_2}{(1+F_1)^2} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{[-q_{2MN,j} w T \cdot 2\sqrt{2}(1+F_1)]^k (1+F_k)}{(1+F_2)^k k! (2k)^{\frac{3}{2}}} \right\}. \quad (14)$$

В работе [27] было показано, что при данном виде нормировки наблюдаемая яркость q_{2MN} отличается от истинной яркости q фактором $\gamma_2 = \frac{\chi_2}{\chi_1} = \frac{1}{2\sqrt{2}}$: $q_{2MN,j} = \frac{q_j}{2\sqrt{2}}$ и $N_{2MN} = N_{\text{eff}}$. Подставив последние выражения в формулу (14), получим

$$P_0(w) = \exp \left\{ \frac{1+F_2}{(1+F_1)^2} \sum_{j=1}^K N_{\text{eff},j} \sum_{k=1}^{\infty} \frac{[-q_j w T (1+F_1)]^k (1+F_k)}{(1+F_2)^k k! (2k)^{\frac{3}{2}}} \right\}. \quad (15)$$

Выведенные выражения (9) и (15) позволяют находить оценки количества молекул в объеме наблюдения и их характеристической яркости на основе анализа зависимости ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения, выполненного, например, с помощью метода наименьших квадратов. Следовательно, предложенный метод также дает возможность разрешать смесь веществ с различным квантовым выходом или индексом стехиометрии. Для оценки качества аппроксимации экспериментальных данных можно применять взвешенный критерий χ^2 , так как при больших значениях M статистика ВОФИР близка к гауссовой статистике. Чтобы использовать критерий χ^2 , необходимо иметь число экспериментальных точек, по крайней мере на единицу превышающее число оцениваемых параметров. Соответственно, для анализа данных однокомпонентной системы без коррекции на внефокусное излучение требуется минимум три измерения ВОФИР с разными значениями аттенюации интенсивности возбуждения. Конечно, качество аппроксимации экспериментальных данных будет намного выше при большем количестве измерений с различными значениями интенсивности флуоресценции. Для улучшения качества анализа необходимо выбирать параметры проведения эксперимента так, чтобы максимизировать нелинейность получаемой зависимости. Эмпирически установлено, что при малых концентрации и характеристической яркости молекул, а также малой ширине интервала регистрации зависимость ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения имеет тенденцию приближаться к линейной зависимости, исключающей возможность оценивания трех и более параметров. Известно¹, что минимальная дисперсия оценки вероятности наступления некоторого события достигается при значении вероятности, равном 0,5. Это очевидно, так как накопить необходимую статистику для оценки вероятности наступления очень редких событий, равно как и преимущественно происходящих событий, крайне сложно. К сожалению, зависимость ВОФИР обычно имеет большой разброс значений – от очень малых до приближающихся к единице. Тем не менее нужно стремиться выбирать параметры измерения так, чтобы получаемые значения ВОФИР не имели тенденцию приближаться либо к малым значениям, либо к единице.

Вычислительные эксперименты

Произведем вычислительный эксперимент с использованием имитационного моделирования потока фотоотсчетов системы ФФС [23; 24]. Положим, что $K = 1$, $q = 10^5$ cpsm, $N_{\text{eff}} = 2$, $T = 2 \cdot 10^{-5}$ с, $F_k = 0$. Будем уменьшать интенсивность засветки и, следовательно, характеристическую яркость q от начального значения (коэффициент аттенюации интенсивности возбуждения равен единице) 19 раз до некоторой конечной величины (коэффициент аттенюации интенсивности возбуждения составляет $\frac{1}{10}$ от первоначального значения). Число интервалов регистрации M , определяющих отношение сигнала к шуму в экспериментальных данных, примем равным 50 000. Вычисленная на основе смоделированных данных зависимость ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения ($\tilde{P}_0(w)$) и теоретическая зависимость ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения ($P_0(w)$), которая была построена с использованием значений параметров, принятых при моделировании, представлены на рис. 1, а. График взвешенных остатков ($\tilde{P}_0(w) - P_0(w)$) отображен на рис. 1, б. Весовые факторы вычислялись в предположении биномиальной статистики ВОФИР (см. раздел «Материалы и методы исследования»).

¹ Скаун В. В., Апанасович В. В., Тихоненко О. М. Имитационное моделирование стохастических систем : учеб. пособие для студентов учреждений высш. образования по специальностям радиофизики и компьютерных технологий. Минск : РИВШ, 2022. 168 с.

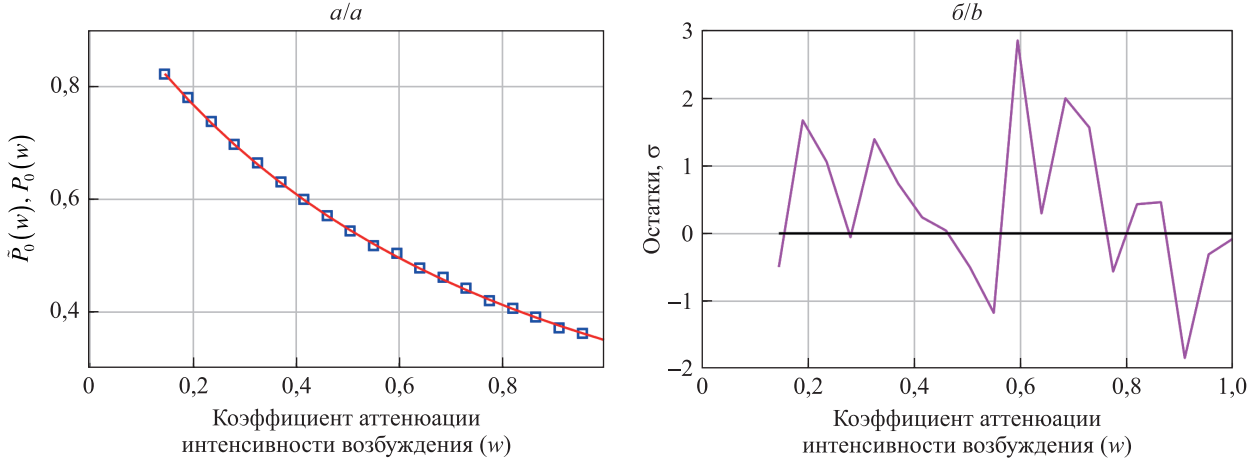


Рис. 1. Результаты вычислительного эксперимента при $M = 50\,000$:
a – смоделированная (квадраты) и теоретическая (сплошная линия) зависимости ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения;
б – график взвешенных остатков

Fig. 1. Results of the computational experiment for $M = 50\,000$:
a – simulated (squares) and theoretical (solid line) dependences of the PZPC on the excitation intensity attenuation coefficient;
b – graph of weighted residuals

Получаем очень хорошую аппроксимацию смоделированной зависимости, что говорит о справедливости выражения (9). Повторим эксперимент для случая намного меньшей статистики ($M = 1000$). Если игнорировать время, необходимое для переключения фильтров, то полное время измерения составит всего 0,4 с, что намного меньше типичного времени выполнения измерений в ФФС. В этот раз проведем анализ полученной зависимости с помощью взвешенного метода наименьших квадратов (функция `nlinfit` пакета *Matlab*). Начальные приближения зададим произвольно: $q = 80\,000$ cpsm, $N_{\text{eff}} = 4$. Результаты анализа смоделированной при $M = 1000$ зависимости приведены на рис. 2.

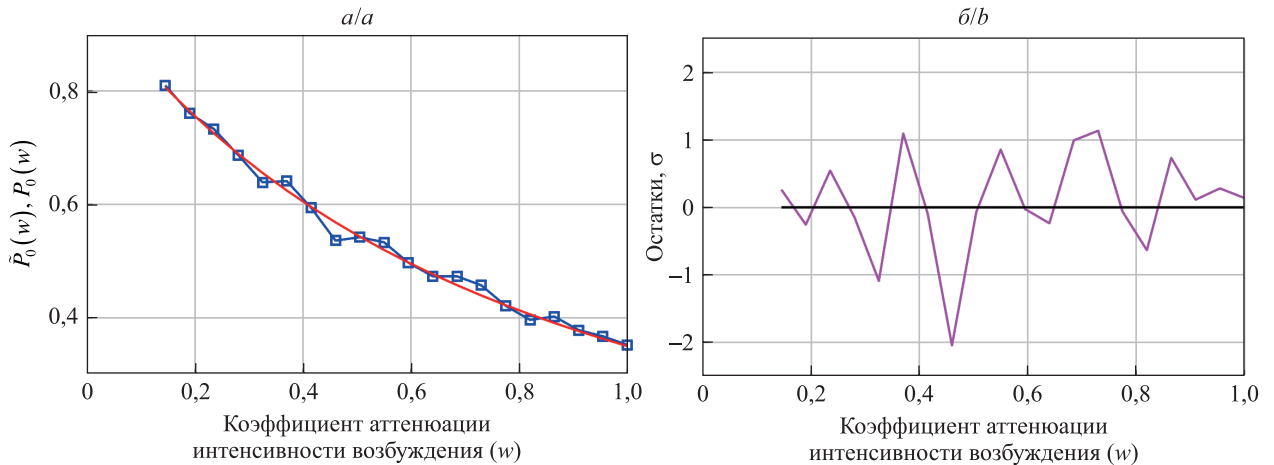


Рис. 2. Результаты анализа зависимости ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения с использованием метода наименьших квадратов:
a – смоделированная (квадраты) и теоретическая (сплошная линия) зависимости ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения;
б – график взвешенных остатков

Fig. 2. Results of the least-squares analysis of the PZPC dependence on the excitation intensity attenuation coefficient:
a – simulated (squares) and theoretical (solid line) dependences of the PZPC on the excitation intensity attenuation coefficient;
b – graph of weighted residuals

Равномерный разброс остатков относительно нуля, близость полученных оценок параметров ($\tilde{q} = (94\,800 \pm 37\,880)$ cpsm, $\tilde{N}_{\text{eff}} = 2,11 \pm 0,70$) к их истинным значениям, принятым при моделировании, и близость значения взвешенного критерия χ^2 к единице ($\chi^2 = 0,98$) свидетельствуют о возможности проведения анализа даже при малой статистике измеренных данных. Доверительные интервалы оцененных

параметров (при доверительной вероятности 0,95) были вычислены по методу асимптотических стандартных ошибок (функция `nlparci` пакета *Matlab*). Данный эксперимент был дополнительно повторен 10 раз при одинаковых условиях для проверки корректности оценки доверительных интервалов. Среднее значение и среднеквадратичное отклонение оцененных параметров составили $\tilde{q} = (99\,500 \pm 22\,780)$ cpsm, $\tilde{N}_{\text{eff}} = 2,08 \pm 0,34$. Для данного случая получили достаточно хорошее соответствие доверительным интервалам, вычисленным с использованием функции `nlparci` пакета *Matlab* (принимая во внимание выражение (4) и тот факт, что $t_{1-\frac{\alpha}{2}, d} = 2,1$).

Следующим шагом являлась проверка метода ВОФИРА на измеренных данных. В качестве образца был выбран раствор красителя Alexa-488. Измерения выполнялись на коммерческой измерительной установке ConfoCor-2. Полное время измерения составило 30 с, а количество зарегистрированных фотонов – около $3 \cdot 10^6$ (средняя интенсивность потока фотоотсчетов примерно $98 \cdot 10^3$ отсчетов в секунду) (рис 3, *a*). Для эмуляции изменения интенсивности потока фотоотсчетов он был разбит на сегменты длительностью 3 с. Уменьшение интенсивности производилось 6 раз, каждый раз с удвоенной вероятностью потерь (всего 7 точек в анализируемой характеристике). Такой подход, по мнению авторов, был бы наиболее простым в технической реализации метода. Для каждого сегмента (исключая первый) применялось независимое прореживание потока с заданной вероятностью потерь, равной коэффициенту аттенюации интенсивности возбуждения w . ВОФИР вычислялась при $T = 5 \cdot 10^{-5}$ с. Принимая во внимание тот факт, что измерения проводились по методу однофотонного счета, анализ данных выполнялся с использованием коррекции на внефокусное излучение (выражение (15)). Графические результаты анализа (результат аппроксимации экспериментальных данных с помощью метода наименьших квадратов и взвешенные остатки) представлены на рис. 3, *b* и *в*. Детали анализа изложены в разделе «Материалы и методы исследования».

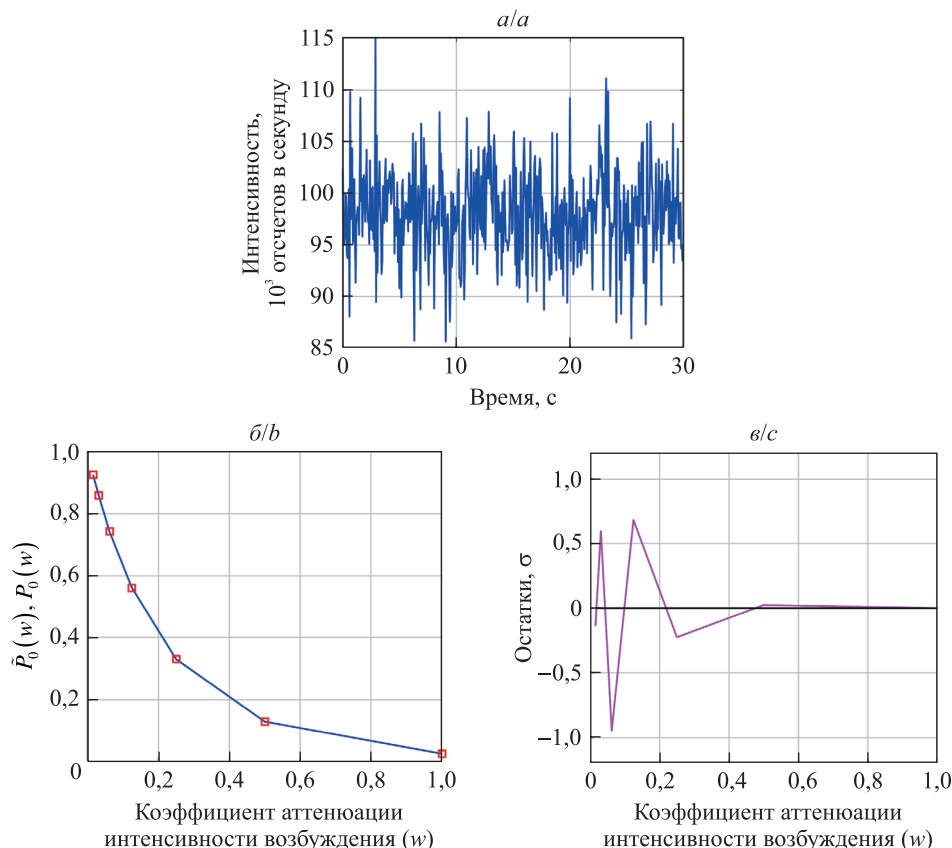


Рис. 3. Результаты анализа измеренных данных с использованием метода ВОФИРА:
a – интенсивность потока фотоотсчетов; *b* – экспериментальная (квадраты) и теоретическая (сплошная линия) зависимости ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения;
в – график взвешенных остатков

Fig. 3. Results of the measured data analysis using the PZPCA method:
a – photon count flow intensity; *b* – experimental (squares) and theoretical (solid line) dependences of the PZPC on the excitation intensity attenuation coefficient;
c – graph of weighted residuals

В целях сравнения оценок параметров для того же измерения (только в этот раз полное время измерения равно 30 с) и той же ширины интервала регистрации T рассчитано РЧФ и проведен анализ полученных данных с помощью хорошо зарекомендовавшего себя метода РСН с коррекцией на внефокусное излучение. Графические результаты анализа представлены на рис. 4. Для непосредственного сравнения оценок параметров использована однотипная нормировка вида (12) [21]. В обоих случаях анализ измеренных данных проведен с помощью функции `nlinfit` пакета *Matlab*, а доверительные интервалы оцененных параметров вычислены по методу асимптотических стандартных ошибок с применением функции `nlparci` пакета *Matlab*. Числовые оценки параметров, полученные в результате анализа зависимости ВОФИР от коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения с использованием метода ВОФИРА, а также анализа РЧФ раствора красителя Alexa-488 с применением метода РСН, сведены в таблицу.

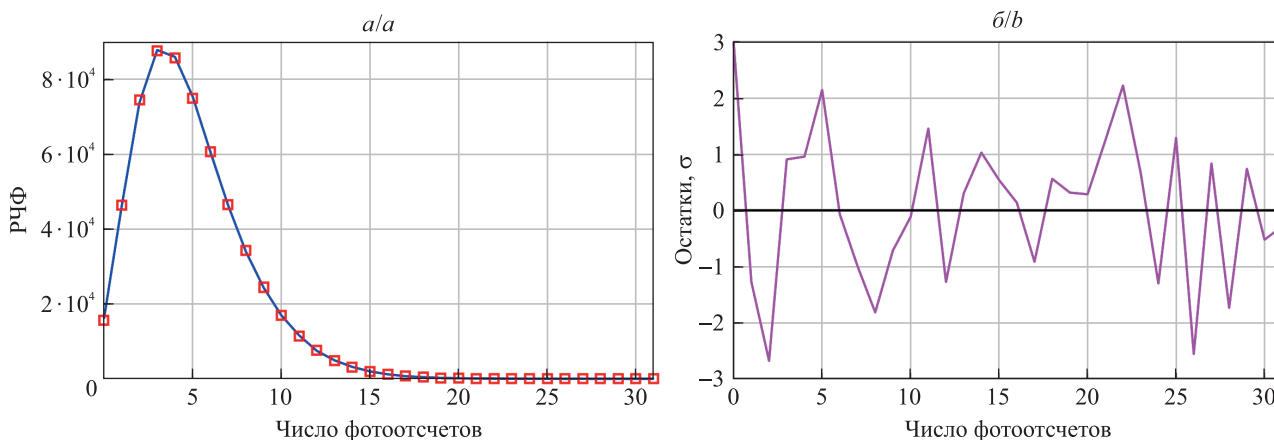


Рис. 4. Результаты анализа измеренных данных с использованием метода РСН:
a – экспериментальное (квадраты) и теоретическое (сплошная линия) РЧФ;
b – график взвешенных остатков

Fig. 4. Results of the measured data analysis using the PCH method:
a – experimental (squares) and theoretical (solid line) photon counting distribution;
b – graph of weighted residuals

**Числовые оценки параметров,
полученные с использованием методов ВОФИРА и РСН**

**Numerical parameter estimates
obtained using the PZPCA and PCH methods**

Параметры	Метод ВОФИРА	Метод РСН
q	$50\,190 \pm 13\,770$	$52\,181 \pm 623$
N_{eff}	$5,49 \pm 1,39$	$5,31 \pm 0,06$
F	$0,65 \pm 0,24$	$0,62 \pm 0,04$
χ^2	0,60	2,03

Как видно из приведенных результатов, оценки параметров, полученные с использованием метода ВОФИРА, близки к оценкам, полученным с помощью метода РСН, что свидетельствует о работоспособности предложенного метода и его применимости для оценки концентрации и характеристической яркости молекул в ФФС. Конечно, доверительные интервалы оцененных параметров, вычисленные с помощью метода ВОФИРА, более чем в 2 раза превышают доверительные интервалы, вычисленные с применением метода РСН, поскольку в последнем случае в анализе использовались полный поток (все $3 \cdot 10^6$ фотоотсчетов) и вероятности получения не только 0, но и всех 1, 2, ..., 29 фотоотсчетов, зарегистрированных в течение интервала регистрации T (см. рис. 4). Стоит отметить также возможную некорректность вычисления весов зависимости ВОФИР, следующую из визуального анализа остатков на рис. 4, б (характерен значительно меньший разброс остатков при значениях коэффициента аттенюации интенсивности возбуждения, близких к единице).

Заклучение

Разработан метод оценки концентрации и характеристической яркости молекул в ФФС на основе анализа ВОФИР, измеренной для различных значений интенсивности возбуждения. Уменьшение интенсивности возбуждения в целом благоприятно сказывается на измерениях в ФФС, способствуя снижению вероятности переходов в нежелательное триплетное состояние и значительному уменьшению фотодеградации. Предложенный метод может быть применен и для проведения измерений с постоянной интенсивностью засветки достаточной длительности, позволяющей разбивать поток фотоотсчетов на сегменты и изменять интенсивность потока с помощью независимого прореживания фотоотсчетов. Метод не требует расчета сложных характеристик потока фотоотсчетов и может использоваться в системах, оснащенных детектором со значительным мертвым временем и вероятностью генерации послепulses. Работоспособность метода проверена на основе анализа смоделированных и экспериментально измеренных данных.

Библиографические ссылки

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. Yu L, Lei Y, Ma Y, Liu M, Zheng J, Dan D, et al. A comprehensive review of fluorescence correlation spectroscopy. *Frontiers in Physics*. 2021;9:644450. DOI: 10.3389/FPHY.2021.644450.
3. Hink MA, Borst JW, Visser AJWG. Fluorescence correlation spectroscopy of GFP fusion proteins in living plant cells. In: Marriott G, Parker I, editors. *Biophotonics. Part B*. San Diego: Academic Press; 2003. p. 93–112 (Methods in enzymology; volume 361). DOI: 10.1016/S0076-6879(03)61007-4.
4. Elson EL. Fluorescence correlation spectroscopy: past, present, future. *Biophysical Journal*. 2011;101(12):2855–2870. DOI: 10.1016/j.bpj.2011.11.012.
5. 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.
6. 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.
7. Huang B, Perroud TD, Zare RN. Photon counting histogram: one-photon excitation. *ChemPhysChem*. 2004;5(10):1523–1531. DOI: 10.1002/cphc.200400176.
8. Müller JD. Cumulant analysis in fluorescence fluctuation spectroscopy. *Biophysical Journal*. 2004;86(6):3981–3992. DOI: 10.1529/biophysj.103.037887.
9. Скакун ВВ, Апанасович ВВ. Анализ смеси «мономер – олигомер» в системах одноквантовой флуоресцентной флуктуационной спектроскопии. *Вестник БГУ. Серия 1, Физика. Математика. Информатика*. 2016;2:52–59. EDN: WANNRJ.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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*. San Diego: Academic Press; 2013. p. 99–119 (Methods in enzymology; volume 518). DOI: 10.1016/B978-0-12-388422-0.00005-4.
14. Skakun VV, Engel R, Digris AV, Borst JW, Visser AJWG. Global analysis of autocorrelation functions and photon counting distributions. *Frontiers in Bioscience – Elite*. 2011;3(2):489–505. DOI: 10.2741/e264.
15. 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*. Totowa: Humana Press; 2014. p. 719–741 (Methods in molecular biology; volume 1076). DOI: 10.1007/978-1-62703-649-8_33.
16. Scales N, Swain PS. Resolving fluorescent species by their brightness and diffusion using correlated photon-counting histograms. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226063. DOI: 10.1371/journal.pone.0226063.
17. Gopich IV, Kim J-Y, Chung HS. Analysis of photon trajectories from diffusing single molecules. *The Journal of Chemical Physics*. 2023;159(2):024119. DOI: 10.1063/5.0153114.
18. Скакун ВВ, Апанасович ВВ. Использование аппарата производящих функционалов для анализа потоков фотоотсчетов в системах одноквантовой регистрации интенсивности флуоресценции. *Журнал прикладной спектроскопии*. 2025;92(2):235–245. EDN: WLQAUC.
19. Апанасович ВВ, Коляда АА, Чернявский АФ. *Статистический анализ случайных потоков в физическом эксперименте*. Минск: Университетское; 1988. 254 с.
20. Большаков ИА, Ракошиц ВС. *Прикладная теория случайных потоков*. Москва: Советское радио; 1978. 248 с.
21. Скакун ВВ, Апанасович ВВ. Расчет распределения числа фотоотсчетов в системах регистрации флуктуаций интенсивности флуоресценции. *Журнал Белорусского государственного университета. Физика*. 2023;2:22–38. EDN: GSQXFP.

22. 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.
23. Shingaryov IP, Skakun VV, Apanasovich VV. Simulation of a stream of photon counts in single-molecule fluorescence fluctuation spectroscopy. *Journal of Applied Spectroscopy*. 2012;78(6):892–898. DOI: 10.1007/s10812-012-9549-7.
24. Shingaryov IP, Skakun VV, Apanasovich VV. Simulation of autocorrelation function and photon counting distribution in fluorescence fluctuation spectroscopy. In: Engelborghs Y, Visser AJWG, editors. *Fluorescence spectroscopy and microscopy: methods and protocols*. Totowa: Humana Press; 2014. p. 743–755 (Methods in molecular biology; volume 1076). DOI: 10.1007/978-1-62703-649-8_34.
25. Bevington PR, Robinson DK. *Data reduction and error analysis for the physical sciences*. 3rd edition. Boston: McGraw-Hill; 2003. XII, 320 p.
26. Schwille P, Haupts U, Maiti S, Webb WW. Molecular dynamics in living cells observed by fluorescence correlation spectroscopy with one- and two-photon excitation. *Biophysical Journal*. 1999;77(4):2251–2265. DOI: 10.1016/S0006-3495(99)77065-7.
27. 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.

Получена 30.09.2025 / исправлена 11.11.2025 / принята 17.11.2025.
Received 30.09.2025 / revised 11.11.2025 / accepted 17.11.2025.