

ВЛИЯНИЕ ВЕСОВЫХ ФАКТОРОВ НА РАБОТУ ЛИНЕЙНОГО АЛГОРИТМА АНАЛИЗА ДАННЫХ ФАЗОВО-МОДУЛЯЦИОННЫХ ИЗМЕРЕНИЙ ВРЕМЕН ЗАТУХАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

А. В. Дигрис*, В. С. Шишков, Е. Г. Новиков,
В. В. Скакун, В. В. Апанасович

УДК 535.372

Белорусский государственный университет,
220030, Минск, просп. Независимости, 4, Беларусь; e-mail: digris@bsu.by

(Поступила 3 апреля 2019)

Рассмотрен линейный алгоритм анализа зависимостей сдвига фаз от частоты модуляции, измеряемых фазово-модуляционным методом. Анализ выполнен в терминах модели, представляющей собой сумму экспонент, адаптированную для использования в частотной области. Алгоритм основан на линеаризации модели относительно коэффициентов, зависящих от оцениваемых параметров, и последующем применении линейного взвешенного метода наименьших квадратов. Точность получаемых оценок зависит от способа определения задействованных весовых факторов. Выполнено сравнительное тестирование качества работы рассматриваемого алгоритма при нескольких способах расчета весовых факторов, исследованы причины, влияющие на их качество. Предложен способ вычисления весовых факторов, повышающий эффективность работы алгоритма.

Ключевые слова: флуоресцентная спектроскопия, фазово-модуляционный метод, многоэкспоненциальная модель.

The linear algorithm for analysis of variable-frequency phase shift dependencies measured by the frequency-domain method is considered. The analysis is performed in terms of a multi-exponential model adapted for frequency domain. The algorithm is based on the linearization of the model with respect to the coefficients depending on the estimated parameters, and subsequent application of the linear weighted least squares method. The accuracy of the obtained parameter estimations depends on the way of determining the involved weighting factors. Comparative testing of the algorithm with several ways for calculating the weighting factors is done, the reasons affecting their quality were investigated. An approach for calculating weighting factors is proposed that increases the efficiency of the algorithm.

Keywords: fluorescence spectroscopy, frequency-domain method, multi-exponential model.

Введение. Изучение свойств сложных молекулярных систем, а также протекающих в них процессов — важная задача современной биологии, химии, медицины [1—4]. Для ее решения широко применяются экспериментальные методы флуоресцентной спектроскопии, среди которых одним из наиболее известных является фазово-модуляционный метод [1, 4, 5]. При измерениях данным методом образец возбуждается светом, интенсивность которого модулирована с частотой ω . В ходе эксперимента используются различные частоты модуляции, для каждой из которых измеряется сдвиг фаз φ между сигналами возбуждения и флуоресценции. Получаемая таким образом зависимость $\varphi(\omega)$ выступает в качестве экспериментальных данных, которые затем анализируются для получения оценок параметров исследуемой молекулярной системы. В качестве модели для аппроксимации зависимости $\varphi(\omega)$ часто используется адаптированная для этой цели многоэкспоненциальная функция [1, 6—8].

INFLUENCE OF WEIGHTING FACTORS ON THE WORK OF A LINEAR ALGORITHM FOR ANALYSIS OF FREQUENCY-DOMAIN DATA OF FLUORESCENCE DELAY TIMES

A. V. Digris*, V. S. Shishkov, E. G. Novikov, V. V. Skakun, V. V. Apanasovich (Belarusian State University, 4 Nezavisimosti Prosp., Minsk, 220030, Belarus; e-mail: digris@bsu.by)

В настоящее время стандартным способом нахождения оценок параметров модели является использование нелинейного метода наименьших квадратов (НМНК) [1, 7, 8]. Его применение совместно с нелинейными относительно неизвестных параметров моделями, к которым относится и многоэкспоненциальная модель, ведет к необходимости организации итерационной процедуры анализа данных, основанной на использовании методов оптимизации. Скорость работы такой процедуры, а также ее способность находить оптимальный набор оценок параметров модели, обеспечивающий наилучшую аппроксимацию экспериментальных данных, во многом зависят от начальных приближений, которые необходимо задавать для параметров перед началом выполнения итераций. Поэтому построение и использование дополнительных линейных алгоритмов генерации начальных приближений совместно с НМНК в значительной степени позволяет повысить эффективность всей процедуры обработки данных [8—10]. Такие алгоритмы обычно строятся на основе определенных математических преобразований модели, используемой для аппроксимации экспериментальных данных, которые приводят к получению уравнений, линейных относительно искомым параметрам. По этой причине данные алгоритмы не требуют применения итерационных методов оптимизации для нахождения оценок параметров. Алгоритмы генерации начальных приближений характеризуются относительно высокой скоростью работы, приемлемой точностью и отсутствием необходимости знать какую-либо информацию о значениях параметров перед началом анализа. Алгоритм генерации начальных приближений для анализа зависимости $\varphi(\omega)$, предложенный в [11], позволяет повысить эффективность обработки экспериментальных данных с использованием НМНК. Дальнейшие исследования показали, что качество работы алгоритма [11] во многом определяется способом расчета используемых в нем весовых факторов.

В настоящей работе исследованы причины, оказывающие влияние на качество рассчитываемых весовых факторов в рамках линейного алгоритма анализа зависимости сдвига фаз от частоты модуляции. Представлены результаты работы алгоритма при нескольких вариантах вычисления весовых факторов, выполнен их сравнительный анализ, позволяющий определить способ, дающий наилучший результат.

Метод. Для анализа зависимости $\varphi(\omega)$, получаемой в ходе измерений фазово-модуляционным методом, используется модель вида [1, 8, 11]:

$$\varphi(\omega, \mathbf{A}) = \arctg[N(\omega, \mathbf{A})/D(\omega, \mathbf{A})], \quad (1)$$

где \mathbf{A} — вектор оцениваемых параметров модели; $N(\omega, \mathbf{A})$ и $D(\omega, \mathbf{A})$ — действительная и мнимая части преобразования Фурье от теоретической функции затухания флуоресценции $I(t, \mathbf{A})$. Для рассматриваемого метода $I(t, \mathbf{A})$ задается многоэкспоненциальной моделью:

$$I(t, \mathbf{A}) = \sum_{j=1}^n a_j e^{-t/\tau_j}, \quad (2)$$

где a_j и τ_j — предэкспоненциальный фактор и время затухания флуоресценции для j -й экспоненты; n — число экспонент; $\mathbf{A} = \{a_1, \dots, a_n, \tau_1, \dots, \tau_n\}$.

Подставляя (2) в (1), получаем окончательный вид используемой модели [8, 11]:

$$\varphi(\omega, \mathbf{A}) = \arctg \left(\frac{\sum_{j=1}^n \frac{\omega a_j \tau_j^2}{1 + \omega^2 \tau_j^2}}{\sum_{j=1}^n \frac{a_j \tau_j}{1 + \omega^2 \tau_j^2}} \right). \quad (3)$$

В [11] показано, что выражение (3) может быть преобразовано к уравнению вида:

$$\sum_{k=0}^{M-1} C_k(\mathbf{A}) F_k(\omega) = 0, \quad (4)$$

где

$$C_k(\mathbf{A}) = \sum_{j=1}^n a_j \tau_j P_k^j, \quad F_k(\omega) = \omega^{2k} \operatorname{tg}(\varphi(\omega, \mathbf{A})) \quad \text{при } k = 0, \dots, M/2 - 1;$$

$$C_k(\mathbf{A}) = \sum_{j=1}^n a_j \tau_j^2 P_{k-M/2}^j, \quad F_k(\omega) = -\omega^{2k-M+1} \quad \text{при } k = M/2, \dots, M - 1;$$

$$P_0^j \equiv 1, \quad P_k^j = \sum_{\substack{m_k=1 \\ m_k \neq j}}^{n-k+1} \sum_{\substack{m_{k-1}=m_k+1 \\ m_{k-1} \neq j}}^{n-k+2} \dots \sum_{\substack{m_1=m_2+1 \\ m_1 \neq j}}^n \prod_{l=m_1}^{m_k} \tau_l^2;$$

$$M = 2n.$$

В (4) часть функций $F_k(\omega)$ зависит от сдвига фаз φ . Если при проведении измерений получен набор экспериментальных значений $\varphi(\omega)$, то (4) можно использовать для получения оценок коэффициентов C_k , на основании которых вычисляются оценки параметров модели (3), входящие в вектор A . Поскольку уравнение (4) линейно относительно C_k , эти коэффициенты можно найти с использованием линейного МНК, минимизируя квадратичную форму [11]:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left(\sum_{k=0}^{M-1} C_k F_k^i \right)^2 / W_i = \min, \quad (5)$$

где N — количество значений сдвига фаз φ , полученных из эксперимента для разных частот модуляции ω ; W_i — весовой фактор, соответствующий i -й частоте модуляции, имеющий смысл дисперсии величины $\sum_{k=0}^{M-1} C_k F_k^i$; F_k^i — значение функции $F_k(\omega)$ для i -й частоты модуляции. Величины W_i вычисляются на основании закона распространения ошибок [12]:

$$W_i = \left(\sum_{k=0}^{n-1} C_k \omega_i^{2k} / \cos^2 \varphi_i \right)^2 W_i^\varphi, \quad (6)$$

где W_i^φ — дисперсия i -го измеренного сдвига фаз. Поскольку весовые факторы в (6) зависят от оцениваемых коэффициентов C_k , использование данного выражения напрямую при решении задачи минимизации (5) ведет к необходимости применения итерационной процедуры оптимизации. Чтобы этого избежать, точные значения C_k в (6) заменяются их оценками, полученными невзвешенным МНК, путем решения задачи минимизации вида [11]:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^N \left(\sum_{k=0}^{M-1} C_k F_k^i \right)^2 = \min. \quad (7)$$

После получения оценок коэффициентов C_k оценки времен затухания флуоресценции τ_j , $j = 1, \dots, n$, в модели (3) получают как положительные действительные корни полинома вида [11]:

$$\sum_{k=0}^{n-1} (-1)^k \tau^{2(n-k)-1} C_k - \sum_{k=0}^{n-1} (-1)^k \tau^{2(n-k-1)} C_{n+k} = 0. \quad (8)$$

Оценки предэкспоненциальных коэффициентов a_j , $j = 1, \dots, n$, вычисляются согласно [11]:

$$a_j = \sum_{k=0}^{n-1} (-1)^k \tau_j^{2(n-k-1)} C_k / \left(\tau_j \sum_{k=0}^{n-1} (-1)^k \tau_j^{2(n-k-1)} P_k^j \right). \quad (9)$$

При получении оценок C_k в соответствии с (5) важную роль играют используемые весовые факторы W_i . Как показано ранее [11], вычисление оценок C_k только с применением невзвешенного МНК (7) ведет к значительному снижению способности алгоритма определять в соответствии с (8) правильное число компонент в (3) и получению менее точных оценок параметров. В то же время C_k , полученные при решении задачи минимизации (7), могут быть использованы для вычисления W_i на основе (6).

Как следует из (6), для вычисления W_i необходимы значения C_k с $k = 0, \dots, n-1$. Чтобы избежать тривиального решения задачи минимизации (5), коэффициент C_0 априори принимается равным единице, поэтому его значение всегда точно известно. Оставшиеся коэффициенты оцениваются в соответствии с (7), где F_k^i вычисляются на основе экспериментальных значений $\varphi(\omega)$. По этой причине оценки указанных коэффициентов содержат определенную ошибку, которая оказывает влияние на точность вычисления W_i и качество работы рассматриваемого алгоритма в целом. Кроме того, как показано в [11], для получения приемлемых оценок параметров с помощью рассматриваемого алгоритма в (6) вместо коэффициентов C_k можно использовать их аппроксимации вида $C_k^* = \tau^{2k}$, где τ — порядок времен затухания флуоресценции, соответствующих анализируемому экспериментальным данным. Величина τ может быть рассчитана как отношение оценок двух коэффициентов C_k из (4).

На основании приведенных выше рассуждений протестирована эффективность рассматриваемого алгоритма при следующих способах вычисления весовых факторов W_i :

- 1) по выражению (6), полученному на основе закона распространения ошибок;
- 2) по формуле из [11]:

$$W_i = \left(\sum_{k=0}^{n-1} (\tau_{\text{ord}} \omega_i)^{2k} \right)^2 / \cos^2 \varphi_i W_i^\varphi, \quad (10)$$

где $\tau_{\text{ord}} = 10^{\lceil \lg(C_n/C_0) \rceil}$ — порядок времен затухания флуоресценции, соответствующих анализируемому

данным; квадратные скобки означают взятие целой части;

3) по выражению, предлагаемому в настоящей работе:

$$W_i = \left(\left[\sum_{k=0}^{n-1} \left(\frac{C_n}{C_0} \omega_i \right)^{2k} \right] / \cos^2 \varphi_i \right)^2 W_i^\varphi, \quad (11)$$

где учитывается, что соотношение C_n/C_0 дает порядок времен затухания флуоресценции для обрабатываемых данных, как видно из выражений для C_k , приведенных в пояснениях к (4).

Во всех трех случаях коэффициенты C_k , необходимые для вычисления W_i , получены путем решения задачи минимизации (7).

Результаты и их обсуждение. Представленные выше алгоритмы с тремя способами вычисления весовых факторов реализованы программно и протестированы на смоделированных данных. Смоделированные данные представляют собой совокупность зависимостей $\varphi(\omega)$, рассчитанных на 20 частотах, выбранных в диапазоне 20—160 МГц. Сдвиги фаз вычислены в соответствии с (3) при $n = 2$. К каждому полученному значению φ добавлен нормальный шум [11, 13] со средним, равным нулю, и среднеквадратическим отклонением (СКО), зависящим от проводимого теста. Для всех 20 точек в рамках отдельной генерируемой кривой $\varphi(\omega)$ использовано одно и то же значение СКО [11, 13].

При проведении каждого теста моделировался набор из 1000 зашумленных кривых $\varphi(\omega)$, которые различались реализациями статистического шума. Каждая кривая проанализирована всеми тестируемыми вариантами алгоритма, в результате чего получены соответствующие ей наборы оценок параметров модели (3). На основании оценок параметров, полученных для всего набора кривых, вычислены итоговые величины, соответствующие проводимому типу теста и характеризующие качество работы методов.

На первом этапе протестирована способность алгоритмов распознавать присутствие в обрабатываемых данных нескольких компонент модели (3), различающихся временами затухания флуоресценции. В тестируемых алгоритмах число компонент определяется количеством времен затухания флуоресценции, получаемых из (8). В качестве показателя качества работы алгоритмов в данном тесте используется разрешающая способность, которая определяется как процент случаев в рамках обрабатываемого набора смоделированных кривых, когда метод верно определил число компонент. Результаты тестирования представлены на рис. 1. Как видно из рис. 1, а, с увеличением уровня шума в обрабатываемых данных разрешающая способность всех трех алгоритмов падает, причем скорость падения тем выше, чем меньше разница между временами затухания флуоресценции отдельных компонент. Вместе с тем при всех трех соотношениях времен затухания разрешающая способность алгоритма, использующего весовые факторы, вычисляемые по (11), более устойчива к росту статистического шума, чем для остальных алгоритмов. Наихудшие результаты в данном тесте показывает алгоритм, использующий весовые факторы, рассчитываемые по (6). Схожие результаты демонстрирует рис. 1, б, где представлена зависимость разрешающей способности тестируемых алгоритмов от времени затухания флуоресценции второй компоненты τ_2 при времени затухания флуоресценции первой компоненты $\tau_1 = 1$ нс. Для обоих уровней статистического шума, использованных при тестировании, разрешающая способность всех трех алгоритмов тем больше, чем сильнее различаются τ_1 и τ_2 . Наилучшую разрешающую способность демонстрирует алгоритм с весовыми факторами, рассчитанными по (11).

Последующее тестирование проводилось с целью определения качества оценок параметров модели (3), получаемых с помощью рассматриваемых алгоритмов. Для каждого тестируемого алгоритма на основании полученных с его помощью оценок параметров вычислялись среднее значение $M(p_k)$ и СКО $\sigma(p_k)$:

$$M(p_k) = \frac{1}{1000} \sum_{i=1}^{1000} p_k^i, \quad (12)$$

$$\sigma(p_k) = \sqrt{\frac{1}{1000} \sum_{i=1}^{1000} (p_k^i - M(p_k))^2}, \quad (13)$$

где p_k^i — оценка параметра (a_k или τ_k) для k -й компоненты модели (3), полученная после анализа i -й кривой $\varphi(\omega)$.

Результаты тестирования качества восстановления параметров рассматриваемыми алгоритмами представлены в табл. 1. Как видно, алгоритм, использующий весовые факторы, рассчитанные по (11), позволяет получать средние значения оценок параметров, наиболее близкие к значениям, использо-

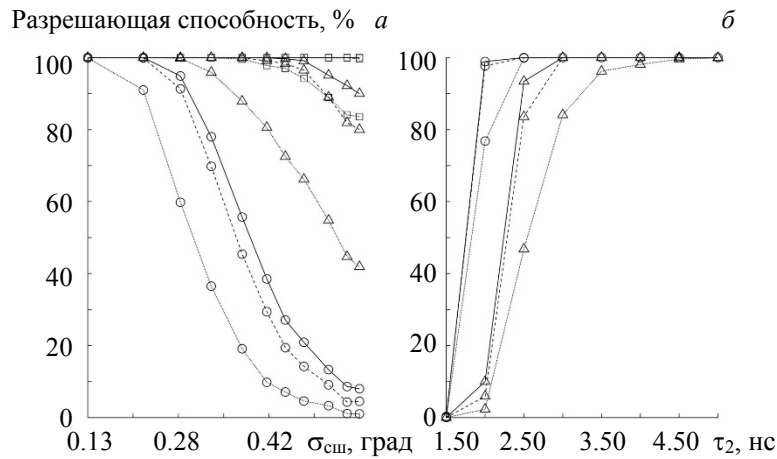


Рис. 1. Зависимость разрешающей способности от уровня статистического шума (а) и времени затухания флуоресценции второй компоненты (б) для алгоритмов, где весовые факторы вычисляются по формулам (6) (пунктир), (10) (штриховая) и (11) (сплошная линия); а — $a_1 = 0.67$, $a_2 = 0.33$, $\tau_1 = 1$ нс и $\tau_2 = 2$ нс (о), 2.5 нс (Δ) и 3 нс (\square); б — СКО = 0.25° (о) и 0.55° (Δ)

Т а б л и ц а 1. Результаты анализа зависимостей сдвига фаз от частоты модуляции с использованием двухэкспоненциальной модели

$\sigma_{сш}$, град	τ_1/τ_2	Ве- ли- чина	Алгоритм с весовыми факторами, рассчитанными по (6)				Алгоритм с весовыми факторами, рассчитанными по (10)				Алгоритм с весовыми факторами, рассчитанными по (11)			
			a_1 (0.67)	τ_1 , нс (1.00)	a_2 (0.33)	τ_2 , нс	a_1 (0.67)	τ_1 , нс (1.00)	a_2 (0.33)	τ_2 , нс	a_1 (0.67)	τ_1 , нс (1.00)	a_2 (0.33)	τ_2 , нс
0.25	3	<i>M</i>	0.65	0.96	0.35	2.90	0.64	0.95	0.36	2.87	0.65	0.97	0.35	2.93
		σ	0.023	0.038	0.023	0.095	0.023	0.039	0.023	0.092	0.021	0.035	0.021	0.086
	5	<i>M</i>	0.67	0.99	0.33	4.96	0.66	0.98	0.34	4.89	0.67	0.99	0.33	4.97
		σ	0.006	0.019	0.006	0.075	0.008	0.022	0.008	0.098	0.006	0.018	0.006	0.075
0.55	3	<i>M</i>	0.53	0.70	0.47	2.48	0.55	0.77	0.45	2.56	0.59	0.84	0.41	2.69
		σ	0.060	0.186	0.060	0.207	0.044	0.107	0.044	0.140	0.043	0.093	0.043	0.148
	5	<i>M</i>	0.65	0.93	0.35	4.68	0.64	0.92	0.36	4.55	0.66	0.96	0.34	4.85
		σ	0.020	0.057	0.020	0.242	0.017	0.051	0.017	0.191	0.012	0.038	0.012	0.146

Примечание: $\sigma_{сш}$ — СКО статистического шума, *M* — среднее значение оценок параметра (12), σ — СКО оценок параметра (13).

ванном при моделировании. Этот же вариант алгоритма демонстрирует наименьший разброс оценок параметров, что подтверждается их СКО. Алгоритм, использующий для расчета весовых факторов исходную формулу (6), по сравнению с алгоритмом, в котором применяется выражение (10), показывает лучшие результаты при низком уровне шума и большем расстоянии между временами затухания флуоресценции двух компонент модели (3). Однако при увеличении уровня статистического шума в обрабатываемых данных качество работы алгоритма, использующего (6), ухудшается в большей степени, чем других протестированных алгоритмов, что выражается в росте отклонения средних оценок параметров от точных значений и росте их СКО.

Представленные результаты тестов показывают, что для повышения точности рассматриваемого в работе алгоритма исходное выражение (6) для расчета весовых факторов, полученное на основании закона распространения ошибок, необходимо модифицировать, как в (11). Причина этого — наличие в (6) коэффициентов C_k , которые оцениваются на основе анализируемых данных с использованием невзвешенного МНК и, как следствие, отклоняются от своих точных значений. Соответственно, качество оценок этих коэффициентов оказывает влияние на точность весовых факторов, используемых

в (5), и точность получаемых оценок параметров. Для проверки данного предположения исследовано поведение оценок коэффициентов C_k , получаемых при решении задачи минимизации (7). В качестве величины, показывающей качество восстановления C_k , использована их относительная ошибка:

$$\delta = (C_{\text{оц}} - C_{\text{теор}})/C_{\text{теор}}, \quad (14)$$

где $C_{\text{оц}}$ — оценка соответствующего коэффициента, получаемая невзвешенным МНК; $C_{\text{теор}}$ — точное значение данного коэффициента, рассчитанное на базе параметров модели (3), использованных при моделировании. Для величин δ , полученных для каждого из параметров C_k после обработки 1000 смоделированных зависимостей $f(\omega)$, вычислены математическое ожидание и СКО. Результаты тестирования приведены на рис. 2. Как видно, коэффициент C_2 , используемый для вычисления весовых коэффициентов в (11) при анализе данных двухкомпонентной моделью (3), оценивается невзвешенным МНК (7) в несколько раз точнее, чем коэффициенты C_1 и C_3 . Относительная ошибка для C_2 составляет 10—20 %, тогда как для двух оставшихся коэффициентов 60—140 %. Это обеспечивает более точное вычисление весовых факторов с помощью выражения (11), несмотря на используемую в нем аппроксимацию, по сравнению с базовой формулой (6). Вместе с тем качество восстановления коэффициента C_2 ухудшается с увеличением разницы между временами затухания флуоресценции двух компонент в модели (3), в то время как C_1 и C_3 демонстрируют обратную зависимость. Данная тенденция наблюдается и в случае взвешенного МНК (5), с использованием которого предлагаемый метод получает итоговые оценки параметров.

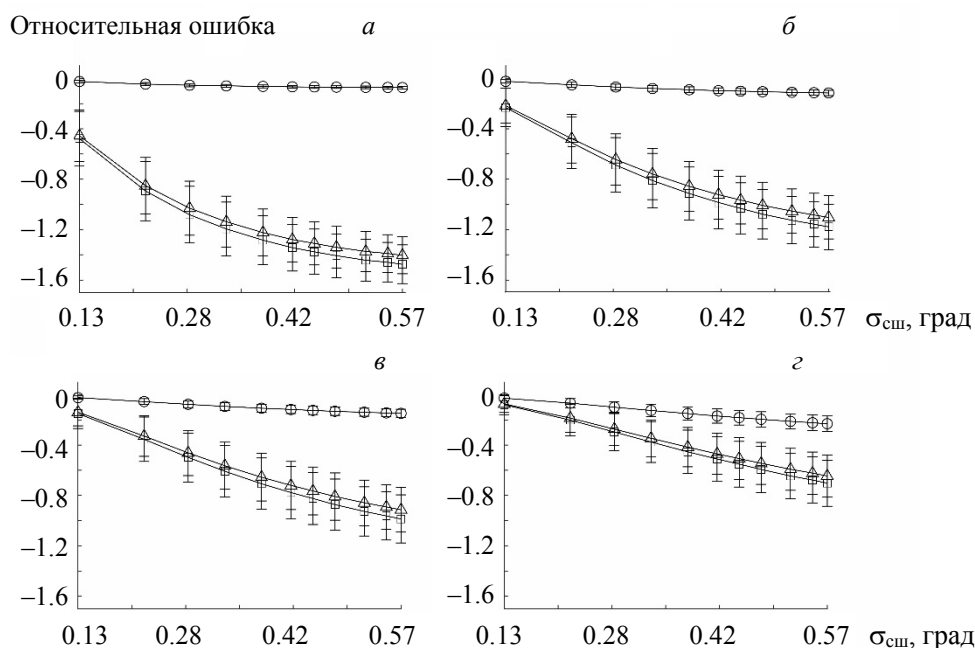


Рис. 2. Зависимость относительной ошибки оценок коэффициентов C_1 (Δ), C_2 (\circ) и C_3 (\square) при решении задачи минимизации (7) от уровня статистического шума; $a_1 = 0.67$, $a_2 = 0.33$, $\tau_1 = 1$ нс и $\tau_2 = 2$ (а), 2,5 (б), 3 (в) и 5 нс (г)

Поскольку при указанных выше условиях относительная ошибка оценок C_1 и C_3 уменьшается быстрее, чем растет относительная ошибка оценки C_2 , а качество восстановления времен затухания флуоресценции (8) и предэкспоненциальных коэффициентов (9) зависит от точности оценок всех трех коэффициентов, то с ростом разницы между τ_1 и τ_2 качество работы описываемого алгоритма растет. Это подтверждается результатами, приведенными на рис. 1 и в табл. 1.

Заключение. Исследовано влияние способа вычисления весовых факторов на работу алгоритма для анализа зависимостей сдвига фаз от частоты модуляции в терминах суммы экспонент, адаптированной для применения в частотной области. Все способы вычисления весовых факторов основаны на выражении, полученном с применением закона распространения ошибок, но отличаются

используемыми аппроксимациями входящих в них коэффициентов C_k . Данные аппроксимации вычисляются на основании оценок коэффициентов C_k , полученных невзвешенным методом наименьших квадратов, точность которых в значительной степени различается для разных k . Использование для расчета весовых факторов коэффициентов C_k , для которых невзвешенный метод наименьших квадратов дает наиболее точные оценки, позволяет повысить разрешающую способность алгоритма и точность получаемых с его помощью оценок параметров. На основании полученных результатов предложен способ вычисления весовых факторов, позволяющий повысить точность работы алгоритма.

- [1] **J. R. Lakowicz**. Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer US, New York (2006) 158—203, 623—795
- [2] **D. V. O'Connor, D. Phillips**. Time Correlated Single Photon Counting, Academic Press, London (1984) 1—35
- [3] **J. N. Demas**. Excited State Lifetime Measurements, Academic Press, New York (1983) 1—11
- [4] **L. Marcu**. Ann. Biomed. Eng., **40**, N 2 (2012) 304—331
- [5] **C. M. Vetromile, D. M. Jameson**. Method. Mol. Biol., **1076** (2014) 77—96
- [6] **M. M. Yatskou, M. Meyer, S. Huber, M. Pfenniger, G. Calzaferrri**. Chem. Phys. Chem., **4** (2003) 567—587
- [7] **P. J. Verwee, A. Squire, P. I. H. Bastiaens**. Methods in Cellular Imaging, Springer, New York (2001) 273—294
- [8] **A. V. Digris, E. G. Novikov, V. V. Skakun, V. V. Apanasovich**. Method. Mol. Biol., **1076** (2014) 257—277
- [9] **E. G. Novikov**. Rev. Sci. Instrum., **69**, N 7 (1998) 2603—2610
- [10] **E. G. Novikov**. Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A, **423** (1999) 435—438
- [11] **A. V. Digris, E. G. Novikov, V. V. Apanasovich**. Opt. Commun., **252** (2005) 20—38
- [12] **P. R. Bevington, D. K. Robinson**. Data Reduction and Error Analysis for the Physical Sciences, 3rd ed., McGraw-Hill, New York (2002) 39—41
- [13] **J. R. Lakowicz, G. Laczko, H. Cherek, E. Gratton, M. Limkeman**. Biophys. J., **46** (1984) 463—477