

ЭКСТРАПОЛЯЦИОННАЯ АППРОКСИМАЦИЯ МУЛЬТИЭКСПОНЕНЦИАЛЬНОЙ КИНЕТИКИ ЗАТУХАНИЯ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ МЕТОДОМ ПАДЭ–ЛАПЛАСА

© 2018 г. **А.В. Клеваник**

*Институт фундаментальных проблем биологии РАН,
142290, Пушкино Московской области, ул. Институтская, 2*

E-mail: rgreen1@rambler.ru

Поступила в редакцию 30.03.17 г.

После доработки 03.09.18 г.

Описан метод мультиэкспоненциальной аппроксимации кинетики затухающей флуоресценции. В отличие от хорошо известного метода Прони, его можно использовать для анализа больших массивов данных эксперимента. От предыдущих реализаций метода аппроксимации Падэ–Лапласа он отличается наиболее точным способом расчета коэффициентов Падэ. Благодаря этому экспоненциальные параметры кинетики будут найдены, если будут выполнены следующие четыре условия: 1) кинетика будет содержать в себе не более восьми экспонент; 2) $\tau_a < 0,125T$; 3) $\tau_i > 4h$; 4) уровень шума будет ниже некоторого критического уровня. К сожалению, величина этого критического уровня зависит от числа экспонент N , присутствующих в кинетике: чем больше число экспонент, тем меньше должен быть шум. Величина T – интервал времени, на котором измерена кинетика; $h = T/n$; n – число точек, представляющих кинетику; $\tau_a = \max(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_N)$; $\tau_i = \min(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_N)$; τ_k – постоянная времени k -й экспоненты; $k = 1, 2, \dots, N$.

Ключевые слова: кинетика затухания флуоресценции, аппроксимация Падэ, преобразование Лапласа, отношение сигнала к шуму, несобственный интеграл, ускорение сходимости.

DOI: 10.1134/S000630291806011X

Разработано много методов мультиэкспоненциальной аппроксимации кинетических кривых затухающего типа [1]. Их можно разделить на две группы: итерационные и безытерационные. Итерационные методы, решая нелинейную задачу методом наименьших квадратов [1–3], показывают сильную зависимость аппроксимации от начальных значений искоемых параметров [1], т.е. не дают глобальный минимум аппроксимации. Тем не менее они нашли широчайшее применение в биофизике [2,3]. Безытерационные методы доставляют глобальный минимум аппроксимации. Но достаточно пальцев одной руки чтобы пересчитать публикации, в которых сообщалось об успешном применении этих методов к аппроксимации кинетики затухания флуоресценции. При этом число экспонент, как правило, не превышало двух [4–7]. Исключение составляет только опубликованная работа [8].

Пусть есть затухающая кинетика, которая представляет собой сумму четырех экспонент одинаковой амплитуды. Постоянные времена ($\tau_{1 \div 4}$) равны 1, 2, 4 и 8 нс. Отрезок времени T , на котором измерена кинетика, равен 72 нс. При этом 9 ($n = 9$) дискретных отсчетов с шагом $h = T/(n - 1) = 9$ нс представят эту кинетику. Воспользуемся программой аппроксимации кинетики, использующей метод Прони [9]. Восстановленные из такой кинетики значения $\tau_{1 \div 4}$ составили 1,69, 3,98, 8,0 и 0,08 нс. Таким образом, задачу о четырехэкспоненциальной аппроксимации решить не удалось. Представив эту же кинетику ббльшим числом точек ($n = 17$, $h = 4,5$ нс), получим: 1,0, 2,0, 4,0 и 8,0 нс. Этот результат замечателен тем, что кинетику представили дискретными точками, следующими с шагом 4,5 нс, а из такой кинетики восстановили постоянные времена, равные 1,0, 2,0 и 4,0 и 8,0 нс! Если $n = 256$, то установленные значения $\tau_{1 \div 4}$ составят 0,99, 1,95, 3,9 и 7,97 нс – все еще приемлемый результат. Но если $n = 512$, то установить значения $\tau_{1 \div 4}$ уже не удастся – имеем 3,64, 0,0,

Сокращения: $A \in \mathfrak{R}^{n \times m}$ – матрица A принадлежит множеству вещественных матриц размерности $n \times m$, SNR – величина отношения сигнала к шуму в децибелах.

0,0, и 0,0 нс. Итак, метод Прони будет работать надежно, если кинетика будет представлена *оптимальным* числом точек. Заметим, что метод, реализующий отбор оптимального числа точек, нетрудно разработать.

Обратимся теперь к методу аппроксимации Падэ–Лапласа [10,11]. Применяв метод, описанный в работе [11], при $n = 1024$ и $T = 80$ нс для $\tau_1 \div 4$ получим очень хороший результат: 1,0, 2,0, 4,0 и 8,0 нс. Но стоит сократить время измерения кинетики T до 48 нс, как задачу удастся решить только с очень большой относительной ошибкой: 0,33 (67%), 1,27 (36,5%), 3,39 (15,25%) и 7,84 нс. Но поскольку этот метод способен работать с большими массивами данных эксперимента, то он подходит для безытерационной аппроксимации кинетики затухающей флуоресценции. Наша цель – усовершенствовав его, сделать надежнее в эксплуатации.

МЕТОД МУЛЬТИЭКСПОНЕНЦИАЛЬНОЙ АППРОКСИМАЦИИ КИНЕТИКИ

Пусть $I(t)$ – измеренная в эксперименте кинетическая кривая затухающей флуоресценции, и мы хотим ее аппроксимировать суммой экспонент $\varphi(t, \tau, \mathbf{d}) = \sum_{k=1}^N d_k \exp(-t/\tau_k)$, где N – известное число экспонент, $\mathbf{d} \in \mathfrak{R}^N$ ($\tau \in \mathfrak{R}^N$) – вектор неизвестных амплитуд (постоянных времени). Введем квадратичный функционал $F(\tau, \mathbf{d}) = 0,5 \int_0^\infty (I(t) - \varphi(t, \tau, \mathbf{d}))^2 dt$. Он получит минимальное (нулевое) значение, если для любого момента времени t будет справедливо следующее равенство:

$$I(t) = \varphi(t, \mathbf{d}, \tau). \tag{1}$$

Поскольку кинетика $I(t)$ измерена в эксперименте, то, воспользовавшись равенством (1), найдем координаты векторов τ и \mathbf{d} . С этой целью возьмем в (1) преобразование Лапласа:

$$L(s) = \int_0^\infty e^{-st} I(t) dt = \sum_{k=1}^N d_k (s + 1/\tau_k)^{-1}. \tag{2}$$

Просуммировав в (2) правую часть, получим:

$$L(s) = P(s)Q^{-1}(s), \tag{3}$$

где $Q(s) = \prod_{k=1}^N (s + 1/\tau_k)$, $P(s) = \sum_{k=1}^N d_k \times \prod_{j \neq k}^N (s + 1/\tau_j)$. Из выражения (3) следует, что те значения аргумента (s_k , полюса), которые обращают знаменатель Лаплас-образа $L(s)$ в

нуль (нули полинома $Q(s)$), дают значения постоянных времени $\tau_k = -1/s_k$ [10–13]. Представим полиномы $P(s)$ и $Q(s)$ в следующем виде: $P(s) = \sum_{k=1}^N a_k s^{k-1}$, $Q(s) = 1 + \sum_{k=1}^N b_k s^k$. Найти нули полинома $Q(s)$ можно несколькими способами. В работах [14,15] предпочитают проводить расчет собственных чисел присоединенной матрицы \mathbf{V} [14–17]. Отметим, что любому заранее заданному характеристическому полиному можно сопоставить четыре сопровождающие матрицы, все они дадут один и тот же набор собственных чисел. Здесь \mathbf{V} – матрица следующей структуры [14,15]:

$$\mathbf{V} = \begin{bmatrix} -\frac{b_{N-1}}{b_N} & -\frac{b_{N-2}}{b_N} & \dots & -\frac{b_1}{b_N} & -\frac{1}{b_N} \\ 1 & 0 & \dots & 0 & 0 \\ 0 & 1 & \dots & 0 & 0 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ 0 & 0 & \dots & 1 & 0 \end{bmatrix}. \tag{4}$$

Поскольку \mathbf{V} – квадратная и несимметричная матрица, то ее собственные числа (или значения) комплексны. Если λ_k – k -е комплексное собственное число матрицы \mathbf{V} , то постоянное число времени (τ_k) k -й экспоненты будет: $\tau_k = -(\text{Re}(\lambda_k) + p_0)^{-1}$, где p_0 – параметр теории [10,11]. При этом амплитуда k -й экспоненты будет равна k -му вычету Лаплас-образа $L(s)$ [11,12]:

$$d_k = \frac{\sum_{j=1}^N a_j (\text{Re} \lambda_k)^{j-1}}{b_N \prod_{i=1, i \neq k}^N (\text{Re} \lambda_i - \text{Re} \lambda_k)}. \tag{5}$$

Заметим, что кинетика $I(t)$ может быть смещенной. Чтобы найти величину смещения Δ , необходимо ввести дополнительную экспоненту: $\mathbf{d} \in \mathfrak{R}^{N+1}$, $\tau \in \mathfrak{R}^{N+1}$. Рассчитав τ (4) и \mathbf{d} (5), находим, используя выражение (1), величину смещения Δ :

$$\Delta = n^{-1} \sum_{j=1}^n (I(t_j) - \sum_{k=1}^{N-1} d_k \exp(-t_j/\tau_k)),$$

где $N := N + 1$. Далее полагаем $y(t) = I(t) - \Delta$. Если $|d_N| > 10^{-15}$ ($I(0) = 1$), то, заменив $I(t)$ на $y(t)$, расчет τ (4) и \mathbf{d} (5) повторяем. Если шумы отсутствуют, а кинетика $I(t)$ смещена, то необходима только одна такая итерация. Если шумы присутствуют, то может понадобиться до 50 таких итераций. При этом от итерации к ите-

рации d_N монотонно сходится к нулю ($\sim 2 \cdot 10^{-39}$). Если на какой-то итерации произошло увеличение d_N и нет двух одинаковых постоянных времени, нет отрицательных постоянных времени, нет отрицательных амплитуд, то итерации можно остановить. Если случилось так, что $\tau_1 < h$, то кинетику $I(t)$ необходимо измерить заново, уменьшив величину шага h . Если $\tau_{N-1} < 0$, то кинетику $I(t)$ необходимо заново измерить, увеличив T . При этом $N - 1$ факторных чисел полезного сигнала должны отделяться хотя бы «щелью» от факторных чисел шума и число точек n не должно быть меньше 1000. Лучше будет, если $n = \max(1000, 1 + 4 \cdot 8 \cdot \tau_{N-1} / \tau_1)$. Чтобы не переизмерять кинетику $I(t)$, T и h можно оценить заранее. Постоянную времени τ_1 можно оценить из начального участка кинетики $I(t)$, воспользовавшись одноэкспоненциальным приближением [14,15]. Тогда величину шага, с которым следует измерить кинетику, можно найти из равенства $h \approx 0,25\tau_1$. Из конечного участка кинетики $I(t)$ в одноэкспоненциальном приближении можно оценить τ_{N-1} . Отрезок времени T , на котором следует провести измерение кинетики, будет составлять $T \approx 8\tau_{N-1}$.

Итак, чтобы решить задачу (1), необходимо найти коэффициенты a_k и b_k полиномов $P(s)$ и $Q(s)$. С этой целью аппроксимируем Лаплас-образ $L(s)$ полиномом $R(s) = \sum_{k=1}^{2N} c_k s^{k-1}$. Тогда равенство (3) примет следующий вид: $P(s) = R(s)Q(s)$. Пусть коэффициенты c_k полинома $R(s)$ известны. Тогда, собрав в последнем равенстве коэффициенты при одинаковых степенях s , получим:

$$\begin{bmatrix} c_N & c_{N-1} & \cdots & c_1 \\ c_{N+1} & c_N & \cdots & c_2 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_{2N} & c_{2N-1} & \cdots & c_N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \\ \vdots \\ b_N \end{bmatrix} = - \begin{bmatrix} c_{N+1} \\ c_{N+2} \\ \vdots \\ c_{2N} \end{bmatrix}, \quad (6)$$

$$\begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \\ \vdots \\ a_N \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & \cdots & c_1 \\ 0 & \cdots & c_1 & c_2 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ c_1 & c_2 & \cdots & c_N \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_{N-1} \\ \vdots \\ b_1 \\ 1 \end{bmatrix}. \quad (7)$$

Это системы уравнений Падэ [14,15]. Отметим, что структура системы уравнений (6) аналогична структуре уравнений Прони [18]. В уравнениях Прони вместо коэффициентов c_k фигурируют $2N$ дискретных элементов самой кинетики $I(t)$. Система (6) плохо обусловлена. По этой причине при ее численном решении необходимо применить либо специализированные программы, либо программы `ludcmp.f`,

`lubksb.f` и `mprove.f` [14,15,47]. Найдя коэффициенты b_k полинома $Q(s)$, умножив матрицу на вектор, рассчитываем коэффициенты a_k (7) полинома $P(s)$.

Чтобы сформировать систему уравнений (6), необходимо рассчитать $2N$ коэффициентов c_k полинома $R(s)$. Формула для расчета коэффициентов c_k имеет следующий вид:

$$c_k = \frac{1}{(k-1)!} \left. \frac{d^{(k-1)}L(s)}{ds^{k-1}} \right|_{s=p_0} \quad [11],$$

или

$$c_k = \frac{(-1)^{k-1}}{(k-1)!} \lim_{T \rightarrow \infty} \int_0^T t^{k-1} e^{-p_0 t} I(t) dt. \quad (8)$$

Чтобы рассчитать c_k , необходимо задать параметр p_0 . Проведенные численные эксперименты показали, что достаточно надежные результаты получаются тогда, когда p_0^{-1} равно тому моменту времени, при котором амплитуда кинетики уменьшится в e (e – основание натуральных логарифмов) раз. Несобственные интегралы (8) в работах [10,11] заменили определенными интегралами, которые рассчитывали, используя правило трапеции. Такой подход будет справедлив, если T будет неприемлемо большим: на таких интервалах времени кинетические кривые, как правило, не измеряют.

Если интегрируемая функция $f(t)$ задана таблично, т.е. представляет собой данные эксперимента, то расчет несобственных интегралов (8) – сложная задача. Следуя работе [13], разделим исходный отрезок интегрирования $[0, T]$ на L отрезков $[T_{k-1}, T_k]$, $k = 1, \dots, L$. На каждом из них рассчитаем определенные интегралы:

$$J_k = \int_{T_{k-1}}^{T_k} f(t) dt. \quad (9)$$

Тогда $c_k = \lim_{L \rightarrow \infty} \sum_{j=1}^L J_j$. Поскольку кинетика уже измерена, и T нельзя увеличить, то рост числа определенных интегралов J_k не приведет к желаемому результату. Чтобы конечная сумма ряда определенных интегралов (величина L фиксирована) сошлась к своему бесконечному пределу, необходимо применить процедуру ускорения сходимости числовой последовательности [13,19]. Для этого вначале перейдем от последовательности интегралов (9) к последовательности их частичных сумм:

$$W_k = \sum_{j=1}^k J_j, \quad k = 1, \dots, m. \quad (10)$$

Затем потребуем, чтобы линейная комбинация $\sum_{i=1}^M \gamma_i W_{j+1}$ определенного числа (M) частных сумм (10) для любого j ($j = 1, \dots, L - M + 1$) равнялась соответствующему несобственному интегралу c_k . Выполнение этого требования и условия $\sum_{i=1}^M \gamma_i = 1$ (γ_i – коэффициенты экстраполяции $\sum_{i=1}^M |\gamma_i| > 1$) приводят к следующей системе линейных алгебраических уравнений:

$$\begin{bmatrix} W_1 & \dots & W_M & -1 \\ \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ W_{L-M+1} & \dots & W_L & -1 \\ 1 & \dots & 1 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \gamma_1 \\ \vdots \\ \gamma_M \\ c_k \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 \\ \vdots \\ 0 \\ 1 \end{bmatrix}. \quad (11)$$

Здесь $M = L/2$, если L – четное и $M = (L + 1)/2$, если L – нечетное число. Систему уравнений (11) для каждого c_k решаем, используя сингулярное разложение матрицы коэффициентов [17,20]. Если матрица коэффициентов близка к особенной матрице, то применяем теорему Мура–Пенроза [17,21] и строим обобщенно-обращенную матрицу коэффициентов [22]. Рассчитывая определенные интегралы J_k (9), применяем разностную схему Ньютона–Котеса десятого порядка (формула 25.4.17 в работе [23]), где все коэффициенты все еще положительны. Отметим, что когда в формулах Ньютона–Котеса появляются отрицательные коэффициенты, то точность расчета определенных интегралов (9) существенно ухудшается [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Вернемся к задаче из раздела «Введение». Пусть $n = 1024$, а время T будем изменять. При этом будем сравнивать изложенный выше метод с его редуцированным вариантом, в котором экстраполяцию (11) не проводили. Когда смещение Δ отсутствует, он близок к методу, описанному в работе [11]. Пусть $T = 80$ нс. Описанный и редуцированный методы дали следующие значения $\tau_{1 \div 4}$: 1,0, 2,0, 4,0, 8,0 и 1,04, 2,1, 4,1, 8,0 нс. Основной метод для иных значений T (см. ниже) дал прежние значения $\tau_{1 \div 4}$: 1,0, 2,0, 4,0, 8,0. А вот редуцированный метод показал существенно худшие результаты: $T = 64$, $\tau_{1 \div 4} = 1,0, 1,98, 3,97, 8,0$; $T = 56$, $\tau_{1 \div 4} = 0,7, 1,5, 3,6, 7,9$; $T = 48$, $\tau_{1 \div 4} = 0,3, 1,3, 3,4, 7,8$; $T = 40$, $\tau_{1 \div 4} = 0,7, 1,7, 5,0, 10,8$. Итак, по мере уменьшения T при постоянном шаге h ошибка в расчете $\tau_{1 \div 4}$ растет. Но результат не зависит от величины T ($T > 40$ нс) если при расчете коэффициентов c_k проводить экстраполяцию (11). Поэтому *несобственные интегралы (8) целесообразно рассчитывать*.

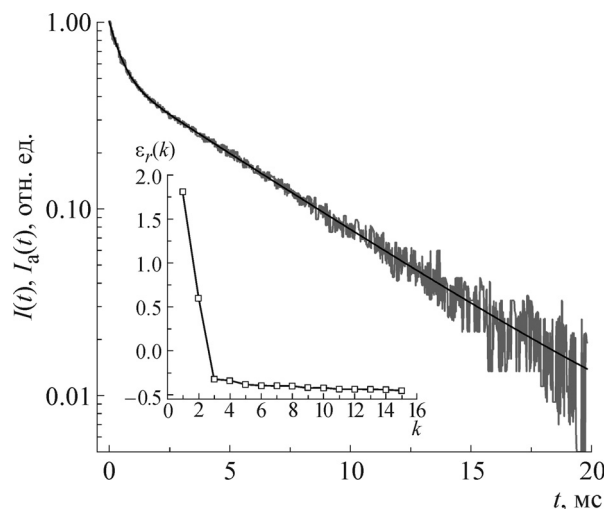


Рис. 1. Зашумленная ($SNR \approx 41,2$ дБ) биэкспоненциальная кинетика $I(t)$, взятая из публикации [11], и ее биэкспоненциально затухающий аппроксимант $I_d(t)$. Получены следующие значения искомым параметров: $d_1 = 0,5$ (0,5), $d_2 = 0,51$ (0,5), $\tau_1 = 0,49$ (0,5), $\tau_2 = 5,24$ (0,5). В скобках указаны точные значения искомым параметров. Врезка: факторный спектр кинетической кривой $I(t)$, который указывает, что именно две экспоненты следует использовать для аппроксимации кинетики $I(t)$.

Пусть теперь $T = 80$ нс, $\Delta \neq 0$, экстраполяцию (11) проводили, но дополнительная экспонента отсутствовала. Для $\tau_{1 \div 4}$ получили: $\Delta = 10^{-4}$ (1,0, 2,3, 4,9 и 8,5); $\Delta = 10^{-3}$ (1,1, 2,6, 6,9 и **22,1**); $\Delta = 10^{-2}$ (1,1, 2,7, 7,1 и **193,8**). Введя дополнительную экспоненту, при $\Delta = 10^{-2}$ для $\tau_{1 \div 4}$ получили 1,0, 2,0, 4,0, 8,0. Итак, *дополнительная экспонента крайне необходима*.

Иные проведенные численные эксперименты позволили заключить, что в идеальном эксперименте (без шума) предложенный здесь метод будет работать надежно, если $\tau_1/h \geq 2$, $T/\tau_N \geq 5$ и $N \leq 8$. Если кинетика будет состоять из девяти экспонент, то этот метод уже не сможет найти значений их показателей. Причиной тому служит система уравнений (6). В этом случае ее не удастся решить с требуемой точностью даже для аналитически точных значений коэффициентов c_k .

Из уравнения (1) следует, что методы аппроксимации, основанные на этом уравнении, не допускают наличия шумов. Но в уравнении (6) (аналог системы уравнений Прони [18]) входят не дискретные значения $I(t)$, а, с точностью до знака, моменты функции $I(t)$. Поэтому можно ожидать, что если шумы будут малой амплитуды, то метод все же будет работать. На рис. 1 показана биэкспоненциально затухающая кинетика с шумом [11] и результат

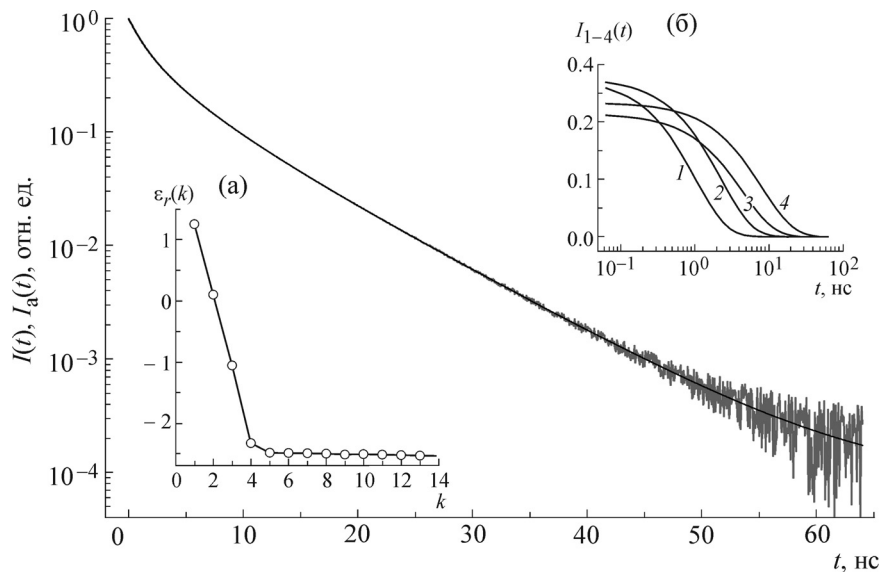


Рис. 2. Зашумленная ($SNR \approx 80$ дБ) четырехэкспоненциально затухающая кинетическая кривая $I(t)$ и аппроксимирующая ее четырехэкспоненциальная кинетика $I_a(t)$. Поскольку логарифм отрицательных чисел не определен, то кинетические кривые сместили на величину $\Delta = 2\minval(I(t))$. Врезка (а): факторный спектр исходной кинетики $I(t)$, показывающий, что для аппроксимации кинетики необходимо использовать четыре экспоненты (или пять при проведении расчета, чтобы учесть возможный сдвиг кинетики). Врезка (б): четыре экспоненциальные компоненты кинетики $I(t)$, амплитуды которых составили 0,2755 (1), 0,2764 (2), 0,2145 (3) и 0,2336 (4).

ее аппроксимации. Заметим, что в работе [11] кинетика задана на отрезке времени $T = 33$ мс. Благодаря применению процедуры экстраполяции (11) оказалось достаточным выбрать фрагмент кинетики, длительность которого составила всего 20 мс.

Но вернемся к задачам из раздела «Введение», прибавив к кинетике белый шум (ran2.f из работы [14,15]). Пусть, по-прежнему, $N = 4$; $\tau_{1 \div 4} = 1,0, 2,0, 4,0, 8,0$ нс; $d_{1 \div 4} = 1$; $n = 1019 \div 2306$; $T = 80$ нс и величина отношения сигнала к шуму (SNR) равна 100 дБ ($SNR = 20\lg(I_0/\langle s \rangle_T)$, I_0 – амплитуда кинетики без вклада шума, $\langle s \rangle_T = n^{-1}\sum_{j=1}^n |S_j - \bar{S}|$ – средняя амплитуда абсолютной величины шума, $\bar{S} = n^{-1}\sum_{j=1}^n S_j$ – средняя амплитуда шума). Для такого уровня шума метод Прони [8] при оптимальном числе точек ($n = 34$) дал весьма приемлемый результат: 1,0, 2,1, 4,1 и 8,0 нс. Но он совершенно не справился с кинетикой при $SNR = 90$ дБ. Метод, изложенный в статье, при $SNR = 90$ дБ дал замечательный результат: 1,0, 2,0, 4,0 и 8,0 нс.

Пусть $SNR = 80$ дБ. Теперь для $\tau_{1 \div 4}$ получили только приемлемый результат: 1,01, 1,99, 3,83 и 7,93 нс. На рис. 2 показана кинетика $I(t)$ и аппроксимирующая ее четырехэкспоненциальная кривая $I_a(t)$. На рис. 2 (врезка (а)) показаны четыре компоненты кривой $I_a(t)$. Из-за вклада шумов амплитуды компонент отли-

чаются от 0,25. На вставке (б) этого рисунка показан факторный спектр кинетики $I(t)$. Поскольку четвертое и пятое факторные числа расположены очень близко, и между ними отсутствует «ступенька», у нас нет полного основания для заключения, что кинетика состоит из четырех экспонент. Но если это число использовать в качестве оценки, то присутствующие в кинетике шумы не мешают получению весьма приемлемого результата. При этом полагали полученный результат весьма приемлемым, если для каждого из параметров величина отношения стандартного отклонения к его величине не превышала 0,1. Стандартные отклонения рассчитывали, как описано в работе [25]. Поскольку для произвольного момента времени t_k из-за вклада шумов $I(t_k) \neq \varphi(t_k, \mathbf{p}^*, \boldsymbol{\tau}^*)$, то потребуем выполнения следующего равенства:

$$I(t_k) = \varphi(t_k, \mathbf{p}^*) + \sum_{j=1}^{2N} \left. \frac{\partial \varphi(t_k, \mathbf{p}^*)}{\partial p_j} \right|_{\mathbf{p}=\mathbf{p}^*} (p_j - p_j^*).$$

Записав такие уравнения для любого $t_k \in [0, T]$, получим уравнение переноса ошибок [25]:

$$|\delta| \otimes |\delta^T| = \mathbf{B}\Delta \otimes \Delta^T \mathbf{B}^T,$$

где $|\delta| \otimes |\delta^T|$ – матрица ковариаций, или отклонений данных эксперимента от данных теоретической модели, $\delta_k = I(t_k) - \varphi(t_k, \mathbf{p}^*)$, $k =$

$1, \dots, n, (\dots) \otimes (\dots)^T$ – прямое произведение векторов, \mathbf{B} – матрица Якоби, $B_{kj} = \frac{\partial \varphi(t_k, \mathbf{p}^*)}{\partial p_j}$, $j = 1, \dots, 2N$, $\Delta \otimes \Delta^T$ – матрица

ковариаций ($\Delta = \mathbf{p} - \mathbf{p}^*$) оценок параметров [26]. Если $\mathbf{B} = \mathbf{U}\boldsymbol{\mu}\mathbf{V}^T$ – сингулярное разложение [14, 15, 17, 20], то $\Delta = \mathbf{V}\boldsymbol{\mu}^{-1}\mathbf{U}^T|\delta|$, и дисперсия σ_j^2 j -го параметра модели будет составлять $\sigma_j^2 = \Delta_j^2$.

Итак, уменьшение уровня шума в кинетике до того уровня, когда можно оценить правильное число экспонент в кинетике, очень важно с практической точки зрения: можно не беспокоиться о влиянии шумов на результат аппроксимации. На рис. 3 показана диаграмма, связывающая число экспонент в кинетике с допустимым уровнем шума в ней. Например, если кинетика состоит из двух экспонент, то SNR должно быть больше 35 дБ; если из трех, то SNR > 60 дБ, если из четырех, то SNR > 80 дБ и так далее. Если кинетика $I(t)$, измеренная в эксперименте, будет удовлетворять этим условиям (см. рис. 1, SNR ≈ 41 дБ), то описанный метод найдет такие значения искоемых параметров, которые доставят глобальный минимум аппроксимации. Отметим, что программы, перечисленные в работе [11], которые находят параметры экспонент, решая нелинейную задачу наименьших квадратов, не могут, как правило, найти более глубокий минимум аппроксимации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложен метод безытерационной мультиэкспоненциальной аппроксимации кинетики затухающей флуоресценции. От предыдущих реализаций метода аппроксимации Падэ–Лапласа его отличает большая надежность и устойчивость к шумам. Выявлены ограничения, свойственные данному методу. Аппроксимируемая кинетика не должна содержать больше восьми экспонент. Минимальная величина постоянной времени аппроксимирующей экспоненты (τ_{\min}) должна превышать $4h$, где h – шаг представления данных эксперимента. Максимальная величина постоянной времени аппроксимирующей экспоненты (τ_{\max}) не должна превышать восьмой части того времени, на котором представлена кинетика. Чем больше точек представят кинетику (1000–3000), тем лучше: точнее рассчитаем несобственные интегралы. Допустимый уровень шумов в кинетике зависит от числа экспонент, из которых состоит кинетика. Чем больше экспонент составили кинетику, тем меньше шумов должно быть в ней.

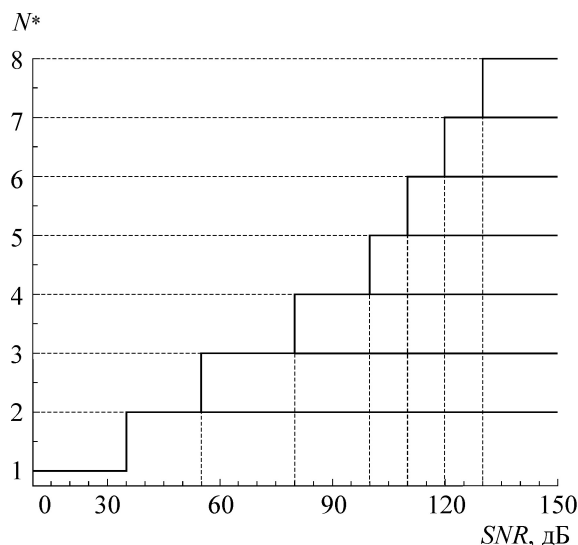


Рис. 3. Диаграмма связи числа экспонент (N_*), сформировавших кинетику, с критической величиной шума, под которой понимаем то наименьшее значение SNR, при котором еще возможно установление приемлемого значения экспоненциальных параметров с помощью метода, описанного в статье.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. V. Pereyra and G. Scherer, *Exponential data fitting* (San Diego State Univ., San Diego, 2009).
2. A. Holzwarth, *Methods Enzymol.* **246**, 334 (1995).
3. I. van Stokkum, *Global and target analysis of time-resolved spectra* (Vrije Universiteit, Amsterdam, 2005).
4. A. Gafni, R. Modlin, and L. Brand, *Biophys. J.* **15**, 263 (1975).
5. J. Eisenfeld, C. Ford, *Biophys. J.* **26**, 73 (1979).
6. J. Enderlein and R. Erdmann, *Optics Commun.* **134**, 371 (1997).
7. R. Niesner, B. Peker, P. Schlesche, and K.-H. Gericke, *ChemPhysChem.* **5**, 1141 (2004).
8. Z. Bajzer and F. Prendergast, *Biophys. J.* **65**, 2313 (1993).
9. M. Osborne and G. Smyth, *SIAM J. Sci. Stat. Comput.* **16**, 119 (1995). [Http://www.statsci.org/other/prony.html](http://www.statsci.org/other/prony.html), 30 June 2009.
10. Z. Bajzer, A. Myers, S. Sedarous, and F. Prendergast, *Biophys. J.* **56**, 79 (1989).
11. E. Hellen, *Am. J. Phys.* **73**, 871, (2005).
12. W. M. Siebert, *Circuits, signals, and systems* (The MIT Press, Cambridge, 1986).
13. A. M. Cohen, *Numerical methods for Laplace transform inversion* (Springer, New York, 2007).
14. W. Press, B. Flannery, S. Teukolsky, and W. Vetterling, *Numerical Recipes* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 1997).
15. W. Press, S. Teukolsky, W. Vetterling, and B. Flannery, *The art of Scientific Computing* (Cambridge Univ. Press, Cambridge, 2007).

16. M. Elad, P. Milanfar, and G. Golub, *IEEE Trans. Signal Process.* **52**, 1814 (2004).
17. G. Golub and C. van Loan, *Matrix computations* (The Johns Hopkins Press, London, 1996).
18. S. Marple, *Digital Spectral Analysis with Applications* (Prentice Hall, New Jersey, 1987).
19. C. Brezinski, *J. Comput. Appl. Mathematics* **122**, 1 (2000).
20. E. Anderson, Z. Bai, C. Bischof, et al., *LAPACK Users' Guide* (SIAM, Philadelphia, 1999).
21. R. Penrose, *Proc. Cambridge Philosoph. Soc.* **51**, 406 (1955).
22. Ф. Гантмахер, *Теория матриц* (Наука, М., 1966).
23. М. Abramovitz and I. A. Stegun, *Handbook of mathematical functions* (Dover Publications Inc., New York, 1964).
24. А. А. Самарский и А. Б. Гулин, *Численные методы* (Наука, М., 1989).
25. Д. Худсон, *Статистика для физиков* (Мир, М., 1970).
26. В. С. Губанов, *Обобщенный метод наименьших квадратов* (Наука, Санкт-Петербург, 1997).

Pade–Laplace Extrapolated Approximation for Multi-Exponential Decay Kinetics of Molecular Fluorescence

A.V. Klevanik

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,
ul. Institutskaya 2, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

A method for multiexponential approximation of fluorescence decay kinetics is described. Unlike the well-known Prony's method, this technique can be used for the analysis of large-scale experimental data array. This method differs from the previously applied Pade – Laplace approximation in more accurate calculation of the Pade coefficients. Thus, the exponential parameters will be found, if the following four conditions are satisfied: 1) the kinetic curve has no more than 8 exponentials; 2) $\tau_a < 0.125T$; 3) $\tau_i > 4h$; 4) the noise level is kept below the critical value. It is noteworthy that this critical value depends on the sum of exponentials N : the greater the sum of N , the lower the noise level is. T is the time domain for which the kinetic curve has been measured; $h = T/n$; n is the point number, representing the kinetic curve; $\tau_a = \max(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_N)$; $\tau_i = \min(\tau_1, \tau_2, \dots, \tau_N)$; τ_k ($k = 1, 2, \dots, N$) is the time constant for the k -th exponential.

Keywords: fluorescence decay kinetics, Pade approximation, Laplace transform, signal to noise ratio, improper integral, convergence acceleration